



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO EN EDAFOLOGÍA

RESPUESTAS FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE PLANTAS DE ARROZ CRECIDAS BAJO ESTRÉS OSMÓTICO

SOLEDAD GARCÍA MORALES

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2012

La presente tesis titulada **Respuestas fisiológica y molecular de plantas de arroz crecidas bajo estrés osmótico**, realizada por la alumna **Soledad García Morales**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA

DRA. LIBIA IRIS TREJO-TÉLLEZ

DIRECTOR

DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ MERINO

ASESORA

DRA. CAMILA CALDANA

ASESOR

DR. DAVID ESPINOSA VICTORIA

ASESOR

DR. EDGAR BRAULIO HERRERA CABRERA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero del 2012

RESPUESTAS FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE PLANTAS DE ARROZ CRECIDAS BAJO ESTRÉS OSMÓTICO

Soledad García Morales, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2012

Las plantas están expuestas a diversos tipos de estrés abiótico incluyendo sequía y salinidad, los cuales constituyen los principales factores que limitan la productividad de los cultivos en el mundo. Para responder al estrés, las plantas han desarrollado una serie de mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares. Entre estos últimos, los factores de transcripción juegan un papel preponderante en la regulación de la expresión de genes, y su identificación y caracterización es esencial para la regulación transcripcional y conferir tolerancia al estrés. El objetivo de este trabajo fue analizar las respuestas fisiológicas de cuatro cultivares mexicanos de arroz al estrés osmótico dado por deshidratación y salinidad, así como las respuestas moleculares de dos cultivares con respuestas contrastantes a los factores de estrés, en condiciones de hidroponía. Primero se evaluaron las respuestas fisiológicas de cuatro cultivares de arroz: Cotaxtla, Tres Ríos, Temporalero y Huimanguillo, bajo deshidratación dada por la adición de 10% PEG a la solución nutritiva y salinidad ocasionada adicionando 100 mM NaCl a la solución nutritiva. El cultivar Cotaxtla resultó más tolerante al presentar menor reducción en el crecimiento y mayor síntesis de aminoácidos totales y prolina. Tres Ríos fue el cultivar más sensible, al tener mayor reducción en el crecimiento y un nulo rendimiento del fotosistema II bajo condiciones de salinidad. Usando la técnica de RT-PCR en tiempo real se realizó un tamiz de 51 genes. Al analizar la curva de disociación se seleccionaron sólo 41 genes que mostraron un pico único en la curva. Para el análisis de la expresión relativa de los genes se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, con *actina* como gen de referencia y el testigo. La evaluación se hizo a las 6 y 24 h después de la aplicación de los tratamientos. Del análisis del perfil de expresión de los genes de interés se hallaron 11 genes inducidos por deshidratación en Cotaxtla, y 17 en Tres Ríos. Respecto a salinidad, cuatro genes fueron inducidos y seis genes reprimidos en Cotaxtla; mientras que en Tres Ríos, 30 genes fueron inducidos y dos reprimidos. Finalmente, se identificaron 10 genes candidatos (*Os03g02800*, *Os08g33910*, *Os01g66490*, *Os01g15640*, *Os07g04560*, *Os09g33490*, *Os10g21560*, *Os03g42630*, *Os02g36880* y *OsNAC6*) involucrados en las respuestas a salinidad y tres genes (*Os03g60080*, *Os07g04560* y *Os01g59640*) a deshidratación, ya que tuvieron un patrón de expresión contrastante en los dos cultivares evaluados. Estos resultados proveen evidencia de genes candidatos potencialmente involucrados en respuestas del arroz al estrés osmótico cuya caracterización subsecuente puede ayudar a descubrir nuevos mecanismos moleculares que controlan las respuestas de las plantas al estrés ocasionado por deshidratación y salinidad.

Palabras clave: *Oryza sativa*, sequía, deshidratación, salinidad, regulación transcripcional, RT-PCR en tiempo real

PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR RESPONSES OF RICE PLANTS GROWN UNDER OSMOTIC STRESS

Soledad García Morales, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2012

Plants are exposed to diverse kinds of abiotic stress including drought and salinity, and both drought and salinity are the major factors affecting crop productivity worldwide. To respond to abiotic stress factors, plants have developed a series of physiological, biochemical and molecular mechanisms. Among the later, transcription factors play a pivotal role in regulating gene expression, and therefore, their identification and characterization are essential for controlling gene transcription and conferring stress tolerance. Hence, this study aimed to analyze the physiological responses of four Mexican rice cultivars to osmotic stress (dehydration and salinity) as well as the molecular responses of two contrasting cultivars to the stress factors under hydroponic conditions. First we analyzed the physiological responses of the four Mexican rice cultivars: Cotaxtla, Tres Ríos, Temporalero and Huimanguillo under dehydration given by 10% PEG into the nutrient solution, and under salinity, adding 100 mM NaCl to the nutrient solution. Results showed that the cv. Cotaxtla was more tolerant to the osmotic stress, as plants showed less growth reduction and higher synthesis of amino acids, while Tres Ríos demonstrated to be the most sensitive cultivar, as its growth was drastically reduced in comparison to the others, and a null Photosystem II yield under salt conditions was registered. Using the real time RT-PCR technique, we performed a screening of 51 genes encoding NAC transcription factors. After analyzing the dissociation curve we selected only 41 genes showing only one peak in their respective melting curve. In order to analyze the relative expression of the genes we used the method $2^{-\Delta\Delta C_T}$, with *actine* as the housekeeping gene and a control gene. The evaluation was carried out 6 and 24 h after application of treatments. The expression profiling analysis of selected genes showed that 11 genes were induced by dehydration in the cv. Cotaxtla, while in Tres Ríos 17 genes were induced by the same stress factor. Concerning salinity tests, four genes were induced and six repressed in Cotaxtla, whereas in Tres Ríos 30 genes were induced and two repressed. Finally, we identified 10 genes (*Os03g02800*, *Os08g33910*, *Os01g66490*, *Os01g15640*, *Os07g04560*, *Os09g33490*, *Os10g21560*, *Os03g42630*, *Os02g36880* and *OsNAC6*) potentially involved in salt stress responses and three genes (*Os03g60080*, *Os07g04560* and *Os01g59640*) likely to be involved in dehydration responses, as those genes showed a contrasting expression pattern in both cultivars evaluated (one tolerant, the other sensitive). Our results provide evidence of candidate genes potentially involved in osmotic stress responses which subsequent characterization may help to discover novel molecular mechanisms controlling dehydration and salt stress responses.

Key words: *Oryza sativa*, drought, dehydration, salinity, transcriptional regulation, real time RT-PCR.

Dedico este trabajo a:

Al principal motivo de mi constante superación, mi hijo, Jorge Ulises Gil García, por ser mi inspiración, mi motor y mi más grande amor, por todo el tiempo que no te dedique por realizar este trabajo.

Al amor de mi vida, a mi compañero de todos estos años, Jorge Gil Galicia, por tu apoyo, tu amor, tu comprensión y sobre todo por tu confianza. Sabes que soy muy feliz a tu lado, que eres mi fortaleza, tu amor y el de nuestro hijo es lo que me impulsa a seguir adelante.

A mis mejores maestros en la carrera más importante...la vida, mis padres, Pánfilo García Luna y Antonia Morales Román, por enseñarme que el único camino hacia la superación y el éxito es el trabajo, la responsabilidad, la disciplina, la honradez, la humildad y el esfuerzo constante.

A mis hermanos, Alicia, José Antonio y Blanca Lilia, por su apoyo incondicional y por su cariño. Porque a su manera me han fortalecido y me han ayudado muchísimo.

A la familia Gil Galicia, por el apoyo y el afecto.

A mis tíos y a mis primos.

Este logro es tan mío como de ustedes.

Con todo mi amor y admiración, Soledad.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la vida, las oportunidades y sobre todo por la fortaleza.

Al CONACYT, por el financiamiento económico y la oportunidad para seguir superándome.

Al Colegio de Postgraduados, por las facilidades otorgadas en mis estudios de postgrado.

A la Línea Prioritaria de Investigación 5: Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal del Colegio de Postgraduados por todas las facilidades y apoyo prestados en la realización de esta investigación

A la Dra. Libia I. Trejo-Téllez y al Dr. Fernando C. Gómez-Merino, les estoy eternamente agradecida por todo su apoyo, por contagiarme de su entusiasmo, por permitirme crecer tanto académica como emocionalmente. Por su amistad y su confianza.

Al Dr. B. Edgar Herrera Cabrera, por su apoyo, su comprensión y sus atinados comentarios para mejorar este trabajo. Por su amistad y compromiso para la realización de esta tesis, muchas gracias.

Al Dr. David Espinosa Victoria, por sus valiosos comentarios que contribuyeron en mejorar el escrito.

A la Dra. Hilda V. Silva-Rojas, por abrirme las puertas de su laboratorio, por compartir sus conocimientos, por la oportunidad de trabajar con usted y por su amistad, mil gracias.

A la Dra. Camila Caldana y al Dr. Bernd Mueller-Roeber, por la oportunidad y la maravillosa experiencia en el Instituto Max Planck y la Universidad de Potsdam, Alemania.

A la Dra. Lilian Paola Matallana Ramírez, por su apoyo incondicional y por compartir conmigo su experiencia, durante mi estancia en Potsdam, Alemania. Muchas gracias por tu amistad y tu compañía cuando más la necesitaba.

Al INIFAP, especialmente al M.C. Leonardo Hernandez y a la Biol. Leticia Tavitás Fuentes, por todas las facilidades brindadas y por el apoyo con el material biológico. Por su gran amistad.

Al personal y profesores del Área de Nutrición Vegetal, especialmente a Laurita, Lupita, Don Rober, Sr. Juan Manuel, Sr. Wenses y el Sr. Juan Carlos, por su apoyo durante mi estancia en el Colegio y en el trabajo de invernadero y laboratorio.

Al Dr. Marcos Soto, el M. C. Ruben San Miguel y Sr. Domingo por las facilidades para determinar ácido abscísico.

Al Lic. Alfonso Nares por el apoyo en la edición de las imágenes presentadas en este trabajo. A Vero López Márquez por las facilidades y el apoyo durante mi estancia en el Colegio.

A los compañeros del laboratorio de Biotecnología de Semillas, especialmente a la señora Martha, a la señora Silva, la señora Alicia y a la Biol. Ana Laura, Gerardo, Cesar Ramiro, Emmanuel Nahum, Yoloxochitl, Adriana y a todos los que en este momento no recuerdo, pero que me ayudaron mucho.

A mis amig@s y companer@s que han estado conmigo durante todos estos años.

A mis papas, Pánfilo García Luna y Antonia Morales Román, no tengo palabras para agradecerles por todo su apoyo, su amor y su confianza. Por ser los mejores padres que pude tener, por guiarme siempre en el camino del trabajo, la rectitud, la honestidad y la humildad.

A mis hermanas Alicia y Blanca Lilia y mi hermano José Antonio, por todo su apoyo, su amistad y su cariño. Saben que siempre podrán contar conmigo.

A Jorge Gil Galicia y a mi amado hijo, Jorge Ulises Gil García, por su comprensión durante esta etapa, por su amor y su confianza. Todos mis esfuerzos han sido siempre pensando en nuestro bienestar.

A la familia Gil Galicia, por su apoyo incondicional

A todos mi gratitud infinita, Soledad.

CONTENIDO

	Pág.
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPÍTULO II. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN INVOLUCRADOS EN LOS MECANISMOS MOLECULARES DE RESPUESTA AL ESTRÉS OSMÓTICO.....	5
RESUMEN.....	5
2.1. INTRODUCCIÓN.....	6
2.2. ESTRÉS OSMÓTICO.....	7
2.3. PERCEPCIÓN DE LA SEÑAL.....	8
2.4. RUTA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.....	9
2.4.1. Papel del ABA en la señalización del estrés.....	12
2.5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR ESTRÉS OSMÓTICO Y POR FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....	13
2.5.1. Factores de transcripción.....	13
2.5.2. Regulón CBF/DREB.....	16
2.5.3. Regulón AREB/ABF.....	17
2.5.4. Regulón NAC y ZF-HD.....	18
2.5.5. Regulón MYC/MYB.....	19
2.6. EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE DIFERENTES FAMILIAS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....	19
2.6.1. Factores de transcripción de la familia Hsf.....	20
2.6.2. Familia de factores de transcripción NAC.....	23
2.7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	25
2.8. LITERATURA CITADA.....	26
CAPÍTULO III. RESPUESTA FISIOLÓGICA DE PLANTAS DE ARROZ CRECIDAS BAJO ESTRÉS OSMÓTICO EN CONDICIONES HIDROPÓNICAS	34
RESUMEN.....	34
3.1. INTRODUCCIÓN.....	35
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
3.3.1. Efecto del estrés osmótico en el crecimiento de la planta.....	39
3.3.2. Acumulación de peso fresco y peso seco.....	41
3.3.3. Contenido de clorofila.....	43
3.3.4. Contenido de aminoácidos en hojas.....	44
3.3.5. Concentración de cationes en vástago y raíz.....	46
3.5. CONCLUSIONES.....	50
3.6. LITERATURA CITADA.....	50

CAPÍTULO IV. CRECIMIENTO, ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA, CONCENTRACIÓN DE K⁺ Y Na⁺ EN PLANTAS DE ARROZ BAJO ESTRÉS SALINO.....	54
RESUMEN.....	54
4.1. INTRODUCCIÓN.....	55
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
4.3.1. Crecimiento de raíz y vástago.....	58
4.3.2. Producción de biomasa.....	60
4.3.3. Actividad fotosintética.....	64
4.3.4. Concentración de sodio y potasio.....	66
4.4. CONCLUSIONES.....	70
4.5. LITERATURA CITADA.....	71
CAPÍTULO V. PERFIL DE EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN, DE LA FAMILIA NAC, EN HOJAS DE ARROZ BAJO ESTRÉS OSMÓTICO.....	74
RESUMEN.....	74
5.1. INTRODUCCIÓN.....	75
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	77
5.2.1. Material vegetal y tratamientos.....	77
5.2.2. Colecta de muestras.....	78
5.2.3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA (transcripción reversa).....	79
5.2.4. Primers de interés y primers de referencia.....	79
5.2.5. PCR cuantitativa en tiempo real.....	82
5.2.6. Determinación del crecimiento, concentración de ácido abscísico y clorofila.....	83
5.2.7. Análisis estadístico.....	84
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	84
5.3.1. Confirmación de la especificidad de los primers.....	84
5.3.2. Genes de referencia	85
5.3.3. Expresión de genes <i>NAC</i> en hojas de arroz bajo condiciones de sequía y salinidad.....	86
5.3.4. Patrón de expresión de genes <i>NAC</i> regulados por salinidad.....	88
5.3.5. Patrón de expresión de genes <i>NAC</i> regulados por sequía.....	91
5.3.6. Genes <i>NAC</i> con expresión diferencial en Cotaxtla y Tres Ríos.....	92
5.3.7. Efecto del estrés osmótico en el crecimiento de plantas de arroz...	97
5.3.8. Contenido de ácido abscísico y clorofila.....	98
5.4. CONCLUSIONES.....	100
5.5. LITERATURA CITADA.....	101

CAPÍTULO VI. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y FENOTÍPICA DEL FACTOR DE CHOQUE TÉRMICO (Os02g13800) EN ARROZ BAJO ESTRÉS SALINO.....	105
RESUMEN.....	105
6.1. INTRODUCCIÓN.....	106
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	109
6.2.1. Material vegetal.....	109
6.2.2. Condiciones de crecimiento, aplicación de tratamientos y variables evaluadas.....	109
6.2.3. Extracción de RNA y digestión de DNA.....	110
6.2.4. Síntesis de cDNA.....	111
6.2.5. Condiciones para la RT-PCR en tiempo real.....	111
6.2.6. Análisis microscópico.....	112
6.2.7. Análisis estadístico.....	112
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	113
6.3.1. Análisis de la expresión del gen <i>Os02g13800</i> en el tipo silvestre Nipponbare y el mutante <i>hsf1-1</i>	114
6.3.2. Patrón de expresión del gen <i>Os02g13800</i> en el tipo silvestre Nipponbare.....	115
6.3.3. Confirmación de los genes blanco de <i>Os02g13800</i>	116
6.3.4. Análisis fenotípico.....	117
6.3.4.1. Fenotipo de las plántulas del mutante <i>hsf1-1</i> y el tipo silvestre Nipponbare.....	118
6.3.4.2. Crecimiento de plántulas del mutante y del tipo silvestre bajo estrés salino.....	119
6.3.4.3. Peso de la materia fresca y seca de dos genotipos.....	120
6.3.5. Morfología de la raíz.....	122
6.3.5.1. Secciones transversales de raíces bajo estrés salino.....	122
6.3.5.2. Cuantificación del diámetro de la sección transversal y del aerénquima.....	123
6.4. CONCLUSIÓN.....	126
6.5. LITERATURA CITADA.....	127

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO III

	Pág.
Cuadro 1 Efecto de los factores cultivar, estrés osmótico y su interacción en cada una de las variables evaluadas en este estudio.....	38
Cuadro 2 Efecto de la sequía (10% PEG) y salinidad (100 mM NaCl) en el peso fresco y seco de vástago y raíz de plantas de arroz, 15 días después de tratamientos.....	42
Cuadro 3 Contenido de clorofila (mg g^{-1} peso fresco) en hojas de cuatro cultivares de arroz crecidos bajo sequía (10% PEG) y salinidad (100mM NaCl) durante 15 días.....	44
Cuadro 4 Concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} (mg kg^{-1} peso seco) en vástago y raíz de cuatro cultivares de arroz crecidos bajo sequía (10% PEG) y salinidad (100mM NaCl) durante 15 días.....	49

CAPÍTULO IV

Cuadro 1 Efecto de cultivar, concentración de NaCl y su interacción, en la longitud de vástago y raíz de plantas de dos cultivares de arroz.....	58
Cuadro 2 Efecto de los factores cultivar, concentración de NaCl y su interacción sobre el peso de materia fresca de vástago y raíz en plantas de arroz.....	61
Cuadro 3 Efecto de los factores cultivar, concentración de NaCl y su interacción en el rendimiento cuántico del PS II en hojas de plantas de arroz.....	66
Cuadro 4 Concentración K^{+} (mg kg^{-1} peso materia seca) en raíz, tallo y hojas de los cultivares mexicanos de arroz Tres Ríos y Cotaxtla, seis días después de la aplicación de tratamientos.....	67
Cuadro 5 Concentración Na^{+} (mg kg^{-1} peso materia seca) en raíz, tallo y hojas de los cultivares mexicanos de arroz Tres Ríos y Cotaxtla, seis días después del inicio del estrés salino.....	68

CAPÍTULO V

	Pág.	
Cuadro 1	Primers específicos usados para el análisis de PCR en tiempo real, para genes <i>NAC</i> en arroz.....	79
Cuadro 2	Genes de referencia para la cuantificar el nivel de expresión relativa de los genes de interés.....	82
Cuadro 3	Genes <i>NAC</i> regulados por sequía y salinidad, 6 y 24h después del inicio del estrés, en hojas de arroz del cultivar Cotaxtla.....	94
Cuadro 4	Genes <i>NAC</i> regulados por sequía y salinidad, 6 y 24h bajo estrés, en hojas de arroz del cultivar Tres Ríos.....	96

CAPÍTULO VI

Cuadro 1	Comparación de los genes putativo blanco de Os02g13800 medidos por microarreglo basado en hibridación (Affymetrix Gene Chip) y RT-PCR en tiempo real. La expresión de los genes blanco seleccionados fueron analizados en raíces de plantas de Nipponbare estresadas con 50 mM NaCl por 3h.....	117
Cuadro 2	Análisis de varianza de las variables de crecimiento, peso de la materia, diámetro y formación de aerénquima de dos genotipos de arroz (<i>hsf1-1</i> y Nipponabre) crecidos bajo tres concentraciones de NaCl (0, 50 y 100 mM) durante cinco días.....	126

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II

	Pág.
Figura 1 Esquema de la vía de transducción de señales del estrés osmótico e iónico en plantas.....	11
Figura 2 Maquinaria molecular que controla la transcripción en organismos superiores.....	14
Figura 3 Red de regulación transcripcional de los elementos que actúan en <i>cis</i> y los factores de transcripción involucrados en la expresión de genes en respuesta al estrés osmótico.....	16
Figura 4 A) Módulos funcionales del HsfA2 de Arabidopsis. B) Interacciones con la maquinaria transcripcional.....	22
Figura 5 Estructuras de los dominios de unión al DNA de los factores de transcripción de la familia NAC y motivos previstos.....	24

CAPÍTULO III

Figura 1 Altura de vástago y raíz de plantas de cuatro cultivares mexicanos de arroz sometidos a sequía (10% PEG) y salinidad (100mM NaCl) durante 15 días.....	40
Figura 2 Efecto del estrés osmótico ocasionado por sequía y salinidad en el crecimiento de cuatro cultivares mexicanos de arroz, 15 días después de la aplicación de tratamientos.....	41
Figura 3 Relación raíz/vástago del peso fresco y peso seco de diferentes cultivares de arroz tratados con 10% PEG (sequía) y 100mM NaCl (salinidad) por 15 días.....	43
Figura 4 Contenido de amino ácidos totales y prolina en hojas de cuatro cultivares de arroz tratados con 10% PEG (sequía) y 100mM NaCl (salinidad) por 15 días.....	45
Figura 5 Concentración de Na ⁺ en vástago y raíz de cultivares de arroz: Cotaxtla, Temporalero, Huimanguillo y Tres Ríos, crecidos bajo sequía (10% PEG) y salinidad (100 mM NaCl) por 15 días.....	47
Figura 6 Efecto de sequía (10% PEG) y salinidad (100 mM NaCl) en la concentración de K ⁺ en vástago y raíz de cultivares mexicanos de arroz Cotaxtla, Temporalero, Huimanguillo y Tres Ríos, crecidos bajo condiciones de estrés durante 15 días.....	48

CAPÍTULO IV

	Pág.
Figura 1	Efecto de la salinidad en la longitud de vástago (A) y raíz (B) de plantas de los cultivares mexicanos de arroz Tres Ríos y Cotaxtla, seis días después del inicio de tratamientos..... 59
Figura 2	Plantas de arroz de los cultivares mexicanos Tres Ríos y Cotaxtla, 30 días después de la germinación y 6 días después de haber sido sometidas a 0 (testigo) y 100 mM de NaCl..... 60
Figura 3	Peso de materia fresca de los cultivares mexicanos de arroz Tres Ríos y Cotaxtla, seis días después de la aplicación de tratamientos..... 62
Figura 4	Peso de materia seca en vástago (A) y raíz (B) de plantas de arroz de los cultivares mexicanos Tres Ríos y Cotaxtla, crecidos bajo salinidad durante seis días..... 63
Figura 5	Rendimiento cuántico del fotosistema II de la segunda hoja totalmente expandida de plantas de los cultivares mexicanos de arroz Tres Ríos y Cotaxtla, crecidos en hidroponía con 0 (testigo) y 100 (salinidad) mM NaCl..... 65
Figura 6	Relación K^+/Na^+ en vástago de los cultivares mexicanos de arroz Tres Ríos y Cotaxtla, crecidos en solución hidropónica con 0 y 100mM de NaCl durante seis días..... 69
Figura 7	Relación K^+/Na^+ en raíz de los cultivares mexicanos de arroz Tres Ríos y Cotaxtla, crecidos en solución hidropónica con 0 y 100mM de NaCl durante seis días..... 70

CAPÍTULO V

Figura 1	(A) Gráfica de PCR en tiempo real de 41 genes de la familia <i>NAC</i> usados para definir su especificidad. (B) Curva de disociación de los primers seleccionados mostrando un pico único..... 85
Figura 2	Genes de referencia seleccionados, para ser usados en esta investigación, fueron analizados bajo condiciones de estrés, 3 y 24h después de la imposición de sequía o salinidad..... 86
Figura 3	Número de genes regulados (inducidos y/o reprimidos) por sequía y salinidad, con una tasa de cambio de ± 2 , en hojas de los cultivares de arroz: Cotaxtla y Tres Ríos, 6h (A) y 24h (B) después de la aplicación de tratamientos..... 87
Figura 4	Diagrama de Venn que muestra un resumen de los genes <i>NAC</i> inducidos y/o reprimidos por sequía y salinidad en hojas de dos cultivares de arroz..... 88

Figura 5	Perfil de expresión de genes <i>NAC</i> en hojas de dos cultivares de arroz, bajo condiciones de salinidad durante 6 y 24h.....	90
Figura 6	Nivel de expresión de genes <i>NAC</i> en hojas de dos cultivares de arroz (Cotaxtla y Tres Ríos), bajo sequía durante 6 y 24h.....	92
Figura 7	Diagrama de Venn indicando el número de genes regulados (inducidos y/o reprimidos) específicamente por sequía o salinidad, así como por ambos estreses durante 6 y 24h; en hojas de arroz de los cultivares Cotaxtla y Tres Ríos.....	93
Figura 8	Altura de vástago y longitud de raíz de plántulas de arroz cultivares Cotaxtla y Tres Ríos crecidas bajo condiciones de sequía y salinidad durante 6 d.....	98
Figura 9	Contenido de ABA y clorofila en hojas de arroz cultivares Cotaxtla y Tres Ríos, bajo condiciones de estrés por sequía y salinidad durante 48h.....	99

CAPÍTULO VI

Figura 1	Estructura del gen <i>factor de choque térmico Os02g13800</i> (heat shock factor).....	109
Figura 2	Nivel de expresión del gen <i>Os02g13800</i> en el tipo silvestre Nipponbare y mutante <i>hsf1-1</i>	114
Figura 3	Cambios en la expresión del gen <i>Os02g13800</i> en el tipo silvestre Nipponbare, bajo por 50 mM de NaCl.....	115
Figura 4	Efecto del estrés salino (0, 50 y 100 mM NaCl) en el crecimiento de plántulas del mutante <i>hsf1-1</i> y el tipo silvestre Nipponbare.....	118
Figura 5	Efecto de NaCl en la longitud de vástago y raíz de plantas del mutante <i>hsf1-1</i> y Nipponbare tipo silvestre, cinco días de aplicación de tratamientos.....	119
Figura 6	Efectos de diferentes concentraciones de NaCl en el peso fresco y seco de vástago y raíz en plantas del mutante <i>hsf1-1</i> y tipo silvestre Nipponbare, cinco días de aplicación de tratamientos.....	121
Figura 7	Secciones transversales de raíces del mutante <i>hsf1-1</i> y el tipo silvestre Nipponbare, cinco días de aplicación de NaCl.....	123
Figura 8	Efecto del estrés salino en el diámetro de la sección transversal de raíz y formación de aerénquima en el córtex del mutante <i>hsf1-1</i> y el silvestre Nipponbare.....	124

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Un gran desafío para los biotecnólogos involucrados en el área agrícola es satisfacer la demanda, cada vez mayor, y producción de alimentos frente a un constante aumento en la población mundial, que en 2050 llegará a más de 9 mil millones de personas (Godfray *et al.*, 2010; Tester y Landridge, 2010). Esta creciente demanda de alimentos es paralela a las pérdidas dramáticas de tierras cultivables debido al incremento severo en la destrucción del suelo por condiciones ambientales abióticas. Por lo que, la salinidad y la sequía son dos de los principales factores ambientales que inciden negativamente en el crecimiento y desarrollo de las plantas, lo que tiene un impacto crucial en la productividad agrícola y en los rendimientos (Gollmack *et al.*, 2011). La sequía es crítica para la producción de cultivos en las grandes áreas agronómicas en todo el mundo, lo cual es generalmente enfrentado con el empleo de irrigación extensiva. Sin embargo, la mayoría de los recursos hídricos son altamente salinizados mientras que el agua dulce de alta calidad, que es apta para riego, es muy limitada. Por consiguiente, no sólo la sequía, sino también la salinidad del suelo es, cada vez más, un problema agrícola debido a la amplia difusión de prácticas agrícolas como la irrigación (Flowers, 2004), lo que requiere, de manera urgente, el desarrollo de cultivos con mayor eficiencia en el uso del agua y tolerancia a salinidad.

La exposición de las plantas al exceso de sales causa desbalance y toxicidad iónica que provoca desequilibrios en el metabolismo. Otro componente de la salinidad es el estrés osmótico que resulta en déficit hídrico, comparable al estrés inducido por sequía (Bartels y Sunkar, 2005). Las plantas contrarrestan los efectos negativos de la salinidad y la sequía mediante la activación de respuestas bioquímicas que incluyen: 1) síntesis y acumulación de osmolitos, 2) mantenimiento de la homeostasis iónica intracelular y 3) remoción de especies reactivas de oxígeno generadas como un efecto secundario de la sequía (Ashraf y Akram, 2009). Otras respuestas morfológicas y fisiológicas incluyen: 1) precocidad, 2) reducción del área foliar, 3) enrollamiento de las hojas, 4) eficiente

sistema radical y reducción del macollaje y 5) reducción en la transpiración y cierre estomático (Islam *et al.*, 2009).

Con la finalidad de incrementar la eficiencia de los procesos adaptativos de las plantas, las estrategias de ingeniería genética vegetal para la reprogramación celular y molecular, pueden enfocarse en 1) conferir tolerancia al estrés por reprogramación directa en los procesos de transporte de iones y en el metabolismo primario y 2) modular la señalización y las rutas regulatorias de los mecanismos de adaptación. Este último enfoque parece ser la perspectiva, para conferir tolerancia al estrés, debido a que tanto la señalización como la orquestación de factores regulatorios son los componentes claves de la regulación transcripcional y transduccional que controlan los mecanismos de adaptación (Popova *et al.*, 2008). Por lo tanto, la reprogramación celular para incrementar la tolerancia de las plantas al estrés, requiere de la ingeniería genética de uno o algunos reguladores maestros de adaptación, en lugar de la modulación de numerosos mecanismos de adaptación celular y metabólica (Golldack *et al.*, 2011).

Los factores de transcripción son proteínas capaces de unirse específicamente a secuencias cortas de DNA, situadas en el promotor de los genes, e interactuar con el complejo de preiniciación de la transcripción, y de esta manera activar o inhibir la acción de la RNA polimerasa II. Entonces, los factores de transcripción modulan la tasa transcripcional de sus genes blanco. Un factor de transcripción puede modular la transcripción de varios genes, lo que incluye genes que codifican factores de transcripción, y reorientan la actividad celular, a nivel de organismo, para la adaptación a una condición externa en particular, como el estrés osmótico (Century *et al.*, 2008; Khong *et al.*, 2008).

En este sentido, el ácido abscísico (ABA) juega un papel central como molécula de señalización en las redes regulatorias del estrés en plantas (Bartels y Sunkar, 2005). Algunos factores de transcripción siguen una ruta de transducción de señales dependiente de ABA, mientras que otros parecen actuar de manera independiente. Los mecanismos moleculares para la regulación en la expresión de genes dependiente o independiente de ABA, aún no están completamente claros;

el análisis de promotores de genes en respuesta al estrés y el aislamiento de factores de transcripción que activan estos genes sugiere que hay distintos mecanismos de regulación para diferentes rutas (Agarwal y Jha, 2010).

Los factores de transcripción actúan, naturalmente, como reguladores maestros de los procesos celulares. Se espera que estos reguladores sean excelentes candidatos para modificar rasgos complejos en plantas cultivadas. Por lo que, tecnologías basadas en factores de transcripción son, probablemente, la parte más prominente de la siguiente generación de cultivos biotecnológicos con éxito (Century *et al.*, 2008).

El arroz (*Oryza sativa* L.) es un cereal de alto valor económico y social. Este cultivo es el alimento básico para más de la mitad de la población mundial, especialmente los que viven en países en desarrollo. El arroz junto con el trigo y el maíz proveen el 50% del total de las calorías consumidas por la población mundial. Aunque la producción mundial de arroz muestra un incremento anual, la población mundial crece más rápidamente. Los principales factores abióticos que afectan el rendimiento de arroz son la sequía y la salinidad (Hadiarto y Tran, 2011).

El objetivo general de este trabajo fue evaluar las respuestas fisiológicas, como el crecimiento y la acumulación de biomasa; y moleculares como cambios en el patrón de expresión de 41 genes de la familia NAC, en cultivares mexicanos de arroz crecidos bajo condiciones de estrés osmótico inducido por sequía y salinidad.

LITERATURA CITADA

- Agarwal, P. K. and B. Jha.** 2010. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biologia Plantarum*, 54: 201–212.
- Ashraf, M. and N. A. Akram.** 2009. Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: An analytical comparison. *Biotechnology Advances*, 27: 744–752.

- Bartels, D. and R. Sunkar.** 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24: 23–58.
- Century, K., T. L. Reuber and O. J. Ratcliffe.** 2008. Regulating the Regulators: The Future Prospects for Transcription-Factor-Based Agricultural Biotechnology Products. *Plant Physiology*, 147: 20–29.
- Flowers, T. J.** 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 55 :307–319.
- Godfray, H. C., J. R. Beddington, I. R. Crute, L. Haddad, D. Lawrence, J. F. Muir, J. Pretty, S. Robinson, S. M. Thomas and C. Toulmin.** 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327: 812–818.
- Golldack, D., I. Lüking and O. Yang.** 2011. Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Reports*, DOI 10.1007/s00299-011-1068-0.
- Hadiarto, T. and L. S. P. Tran.** 2011. Progress studies of drought-responsive genes in rice. *Plant Cell Reports*, 30: 297–310.
- Islam, M. A., H. Du, J. Ning, H. Ye and L. Xiong.** 2009. Characterization of Glossy1-homologous genes in rice involved in leaf wax accumulation and drought resistance. *Plant Molecular Biology*, 70: 443–456.
- Khong, G. N., F. Richaud, Y. Coudert, P. K. Pati, C. Santi, C. Périn, J.–C. Breitler, D. Meynard, D. N. Vinh, E. Guiderdoni and P. Gantet.** 2008. Modulating Rice Stress Tolerance by Transcription Factors. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 25: 381-404.
- Popova, O. V., O. Yang, K. J. Dietz and D. Golldack.** 2008. Differential transcript regulation in *Arabidopsis thaliana* and the halotolerant *Lobularia maritima* indicates genes with potential function in plant salt adaptation. *Gene*, 423: 142–148
- Tester, M. and P. Langridge.** 2010. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, 327: 818–822.

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II.

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN INVOLUCRADOS EN LOS MECANISMOS MOLECULARES DE RESPUESTA AL ESTRÉS OSMÓTICO

Soledad García-Morales, Libia I. Trejo-Téllez, Fernando C. Gómez-Merino, Camila Caldana, E. Braulio Herrera-Cabrera y David Espinosa-Victoria

RESUMEN

El estrés osmótico, resultado de la salinidad y la sequía, es la principal causa de pérdidas en los cultivos en todo el mundo. La adaptación de las plantas al estrés abiótico depende de la activación de cascadas de redes moleculares involucradas en la percepción, transducción de señales y la expresión de genes específicos. Los componentes clave que controlan y modulan las rutas adaptativas del estrés son los factores de transcripción. Un factor de transcripción está codificado por un gen único, pero regula la expresión de muchos otros genes que conducen a la activación de complejos mecanismos de adaptación, por lo que éste es una de las principales moléculas blanco para el mejoramiento genético en la tolerancia de los cultivos. Una molécula central del estrés abiótico que coordina una ruta reguladora de la expresión de los genes es el ácido abscísico (ABA). Se han identificado rutas de señalización dependientes o independientes de ABA; sin embargo, ambas median la adaptación al estrés osmótico. El objetivo de esta revisión es analizar el papel de los factores de transcripción en los mecanismos moleculares de respuesta al estrés osmótico, con énfasis en las familias NAC (**NAM** no apical meristem, **ATAF1-2** y **CUC** cup-shaped cotyledon) y HSF (heat shock factor).

Palabras clave: sequía, salinidad, percepción de señales, red de transducción de señales, NAC, Hsf

2.1. INTRODUCCIÓN

El estrés osmótico ocasionado por sequía y salinidad frecuentemente limita el crecimiento y la productividad de las plantas (Bartels y Sunkar, 2005; Agarwal *et al.*, 2006). Éstas responden y se adaptan a condiciones adversas con una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos, regulados por múltiples rutas de señalización en respuesta al estrés. Existe una superposición entre los patrones de expresión de los genes inducidos por sequía, salinidad y frío en *Arabidopsis* y arroz, en las que se han identificado más de 300 genes inducidos por estrés. Donde más de la mitad de los genes inducidos por sequía también son inducidos por alta salinidad, lo que indica la existencia de una intersección aparente entre las respuestas a sequía y salinidad. Por el contrario, solamente 10% de los genes inducidos por sequía también son inducidos por frío (Seki *et al.*, 2002; Nakashima y Yamaguchi-Shinozaki, 2010).

El estrés osmótico es un estímulo complejo que induce muchos atributos diferentes que a la vez están relacionados entre sí (desequilibrio iónico y estrés osmótico), lo que puede ser provisto a la célula con una información única. Con base en esta multiplicidad de señalización, puede haber múltiples sensores primarios que perciben la señal inicial del estrés y alteran la expresión de un gran número de genes. Las respuestas moleculares y celulares al estrés osmótico incluyen: percepción, transducción de señales al citoplasma y al núcleo, expresión de los genes y, finalmente, cambios metabólicos que conducen a la tolerancia del estrés (Shinozaki *et al.*, 2003; Agarwal *et al.*, 2006). La regulación transcripcional de la expresión génica está determinada por la tasa transcripcional mediante la activación o represión de un promotor bajo condiciones de estrés, la cual depende de varios factores de transcripción y sus interacciones con las secuencias regulatorias que actúan en *cis* (Bartels y Sunkar, 2005).

Los factores de transcripción son proteínas capaces de unirse específicamente a secuencias cortas de DNA (*cis*-elements) localizadas en el promotor de genes e interactuar con el complejo de preiniciación de la transcripción, y de esta manera activar o inhibir la RNA polimerasa II. Entonces, los factores de transcripción modulan la tasa de transcripción de sus genes

blanco, este tipo de sistema de regulación de la transcripción se denomina regulón (Nakashima *et al.*, 2009). Un factor de transcripción puede modular la transcripción de varios genes, que incluyen genes que codifican factores de transcripción de ellos mismos y reorientan la actividad celular para la adaptación a una condición externa en particular, como el estrés osmótico ocasionado por sequía o salinidad.

El ácido abscísico (ABA) es producido bajo condiciones de déficit hídrico y juega un papel importante como molécula de señalización en las redes regulatorias del estrés, en la respuesta de las plantas a la sequía y salinidad (Rai *et al.*, 2009). Aplicación exógena de ABA, induce una serie de genes que responden al estrés por deshidratación y frío (Shinozaki *et al.*, 2003). Otros estudios describen genes que se inducen por deshidratación y frío, pero no responden a tratamientos exógenos de ABA (Shinozaki *et al.*, 2003; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005). Esto sugiere la existencia de cascadas de transducción de señales en dos sentidos, dependiente e independiente de ABA, entre la señal inicial del estrés y la expresión de genes específicos. Hay dos elementos principales que actúan en cis: ABRE (ABA-Responsive Element) y DRE (Dehydration Response Element), los cuales funcionan en la expresión de genes dependiente e independiente de ABA, respectivamente, en respuesta del estrés abiótico. Además de estas rutas principales muchos otros sistemas reguladores de la transcripción están involucrados en la expresión de genes (Nakashima y Yamaguchi-Shinozaki, 2010).

En este trabajo, revisamos el papel de los factores de transcripción en los mecanismos moleculares de respuesta al estrés osmótico, con mayor énfasis en las familias NAC y HSF, las cuales fueron abordadas en la investigación doctoral.

2.2. ESTRÉS OSMÓTICO

La exposición a sequía o salinidad dispara muchas reacciones comunes en plantas. Ambas condiciones conducen a la deshidratación celular, la cual causa estrés osmótico y remueve el agua del citoplasma a los espacios extracelulares que resulta en una reducción del volumen vacuolar y citosólico. Además, el estrés

osmótico limita la absorción de agua del suelo o del medio de crecimiento de las plantas (Munns, 2002).

Otra consecuencia, de la sequía y la salinidad en plantas, es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, reactive oxygen species), las cuales afectan negativamente la estructura celular y el metabolismo. Respuestas tempranas al estrés hídrico y salino son idénticas excepto por el componente iónico. Estas similitudes incluyen procesos metabólicos tales como disminución de fotosíntesis o cambios en procesos hormonales. Altas concentraciones intracelulares de Na y Cl son problemas adicionales de la salinidad (Bartels y Sunkar, 2005; Verslues *et al.*, 2006).

Cuando el estrés osmótico es de intensidad moderada, conduce a una rápida inhibición del crecimiento de hojas y tallos, mientras que la raíz puede continuar creciendo. El grado de inhibición del crecimiento debido a estrés osmótico depende de la condición de la especie o tejido antes del estrés, de la escala de tiempo de respuesta, del tejido particular y de la especie en cuestión, y de cómo el estrés es aplicado (rápido o gradual). La inhibición del crecimiento del vástago durante el déficit hídrico puede contribuir a la acumulación de solutos y con esto al ajuste osmótico (Hasegawa *et al.*, 2000).

La adaptación al estrés osmótico es un proceso complejo, que involucra numerosos cambios que incluyen atenuación del crecimiento, cambios en la expresión de genes, incremento en los niveles de ABA, acumulación de solutos compatibles y proteínas protectoras, ajuste en el transporte iónico, e incrementos en los niveles de antioxidantes (Hasegawa *et al.*, 2000; Xiong y Zhu, 2002a).

2.3. PERCEPCIÓN DE SEÑALES

La percepción de señales es el primer paso en la respuesta de las plantas al estrés osmótico. Un sensor del estrés puede detectar cambios ambientales y transmitir específicamente la señal inicial del estrés a blancos celulares (Gao *et al.*, 2008). Cada estímulo ambiental proporciona a las células vegetales información específica. Dado un gran número de estímulos, es posible que las

plantas puedan monitorear las señales de una condición de estrés única a través de diferentes tipos de sensores (Xiong *et al.*, 2002b).

Los sensores son moléculas que perciben la señal inicial del estrés. Estos iniciarán o reprimirán una cascada que transmite una señal intracelular y en muchos casos, activan factores de transcripción nucleares para inducir o reprimir la expresión de un grupo específico de genes. Un solo sensor puede regular ramificaciones de la cascada de señalización, que es iniciada por la exposición al estrés (Xiong *et al.*, 2002b; Rodríguez *et al.*, 2005).

Se ha encontrado que el estrés por sequía, salinidad y/o frío induce la acumulación transitoria de Ca^{2+} en el citoplasma, el cual ingresa del espacio apoplástico o de la liberación de depósitos internos como los organelos celulares. Los canales responsables de la entrada de Ca^{2+} representan un tipo de sensor para la señalización del estrés. La liberación interna de Ca^{2+} es controlada por ligandos de canales sensibles a Ca^{2+} . Estos ligandos son segundos mensajeros (Rodríguez *et al.*, 2005).

Los receptores tipo quinasas fueron encontrados tanto en plantas como en animales. Estructuralmente, estos receptores consisten de un dominio extracelular que puede funcionar en la unión de ligandos o interacciones proteína-proteína, un dominio transmembranal y un dominio quinasa intracelular. Los dos componentes del sistema regulador respuesta-sensor involucran histidinas quinasas que inicialmente fueron encontradas en procariotas para la percepción de diferentes señales ambientales, también se han encontrado en células eucariotas como las plantas (Chinnusamy *et al.*, 2004). Cuando el dominio extracelular del sensor percibe una señal, el residuo de histidina citoplásmica es auto fosforilada y el radical fosforil se mueve a un receptor de aspartato en una respuesta reguladora, el cual puede constituir parte de la proteína sensor o una proteína separada (Rodríguez *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2008).

2.4. RUTA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Las plantas reaccionan a estímulos externos mediante el inicio de una cascada de señalización que activa la expresión de las respuestas adecuadas. En

contraste a la percepción en la transducción de señales, se han identificado varios componentes; aunque, se desconoce cómo interactúan las moléculas entre sí y dónde están posicionadas en la compleja red de señalización (Bartels y Sunkar, 2005).

Una vez que un estímulo celular es percibido, inmediatamente se generan moléculas de señalización como segundos mensajeros, por ejemplo: Ca^{2+} , inositol fosfato y especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species, ROS). Subsecuentemente, los segundos mensajeros activan, corriente abajo, una cascada de señales que fosforilan los factores de transcripción, que regulan la expresión de un grupo de genes o proteínas involucradas en la adaptación al estrés (Xiong *et al.*, 2002b). La fosforilación por proteínas quinasas es el mecanismo de regulación más común e importante en la transducción de señales (Ludwig *et al.*, 2004).

La red de transducción de señales para frío, sequía y estrés salino se puede dividir en tres tipos principales de señalización como se muestra en la Figura 1. a) Señalización del estrés osmótico/oxidativo que usa los módulos de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (mitogen-activated protein kinase, MAPK), la cual involucra la generación de enzimas removedoras de especies reactivas de oxígeno y componentes antioxidantes, así como osmolitos; b) señalización dependiente de Ca^{2+} que conduce a la activación de genes para proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (late embryogenesis abundant, LEA), involucrados en la producción de proteínas en respuesta al estrés, de las cuales la mayoría no tiene funciones definidas y c) señalización de la sal excesivamente sensible (salt overlay sensitive, SOS) dependiente de Ca^{2+} que regula la homeostasis iónica, este tipo involucra la ruta SOS y es específica del estrés iónico (Xiong *et al.*, 2002b; Rodríguez *et al.*, 2005).

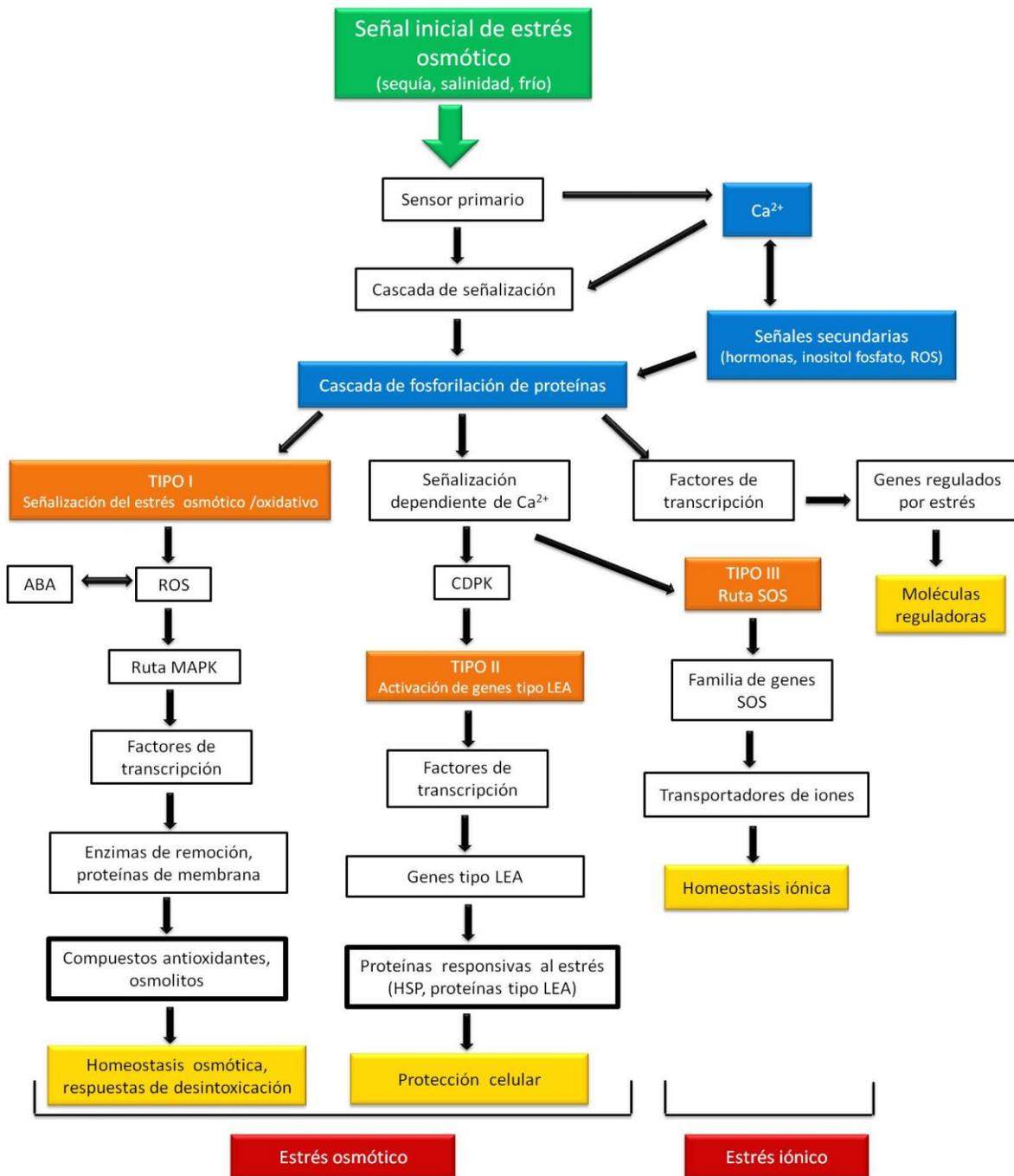


Figura 1. Esquema de la vía de transducción de señales del estrés osmótico e iónico en plantas. Una ruta de transducción de señales inicia con la percepción de la señal, seguido por la generación de segundos mensajeros (inositol fosfato y especies reactivas de oxígeno, ROS). Éstos pueden modular los niveles intracelulares de Ca^{2+} , frecuentemente al iniciar una cascada de fosforilación de proteínas. Finalmente las proteínas blancas están directamente involucradas en la protección celular o factores de transcripción que controlan un grupo específico de genes regulados por estrés (Rodríguez *et al.*, 2005).

La ruta de transducción de señales puede ser compartida por componentes de diversos factores de estrés como la sequía, salinidad o frío. Aunque hay múltiples rutas de sistemas de transducción de señales que operan a nivel celular para la regulación génica, el ácido abscísico es un componente conocido que actúa en una de las rutas de transducción de señales, mientras que hay otras rutas que actúan de manera independiente al ABA. Se sabe que los genes de respuesta temprana codifican factores de transcripción que activan genes de respuesta tardía (Zhu, 2002). No obstante, la existencia de componentes y ramas específicas, las rutas de señalización para estreses como la salinidad, sequía y frío, todas, interactúan con el ABA y convergen en múltiples pasos. Además, esta serie de componentes de señalización están asociados con las respuesta de las plantas a cambios de temperatura, estrés osmótico y anaeróbico (Grover *et al.*, 2001).

Una de las bondades de la manipulación de los factores de señalización es que se puede controlar una amplia gama de eventos, corriente abajo, que incrementan la tolerancia a múltiples factores de estrés (Umezawa *et al.*, 2006). La alteración de estos componentes de la transducción de señales es un método para reducir la sensibilidad de las células a condiciones de estrés. La inducción o la supresión de ciertos factores de señalización pueden mejorar, de manera efectiva, la tolerancia al estrés abiótico (Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2008).

2.4.1. Papel del ABA en la señalización del estrés

El ABA es una hormona vegetal que está involucrada en mucho aspectos del crecimiento y en las rutas del desarrollo, como la maduración del embrión, prevención de la germinación precoz, desarrollo, latencia y germinación de la semilla, regulación de la apertura estomática y activación de genes en respuesta al estrés (Gao *et al.*, 2008). El ABA controla muchas de las respuestas de adaptación al estrés, la activación de genes implicados en el ajuste osmótico, la compartimentalización de iones, la regulación del crecimiento de vástago y raíz y modificaciones de la conductividad hidráulica de la raíz (Verslues y Zhu, 2005).

Un gran número de genes, en respuesta al estrés, son sobre regulados por ABA en condiciones de desecación y desbalance osmótico. Hay un traslape en el

patrón de expresión de los genes de estrés bajo frío, sequía, salinidad y /o aplicación de ABA (Agarwal y Jha, 2010). Estos estreses desencadenan la acumulación de ABA y ésta a su vez activa varios genes asociados con el estrés cuya función puede ser la acumulación de osmoprotectantes y proteínas LEA, señalización, regulación transcripcional, etc. (Bartels y Sunkar, 2005). Estudios han confirmado el papel del ABA como una molécula intermediaria entre la percepción del estrés y la respuesta celular al estrés (Bartels y Sunkar, 2005; Gao *et al.*, 2008; Agarwal y Jha, 2010).

2.5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR ESTRÉS OSMÓTICO Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Las respuestas al estrés abiótico requieren la producción de proteínas metabólicas importantes como aquellas que involucran la síntesis de osmoprotectantes y de la operación de proteínas regulatorias en la ruta de transducción de señales, como quinasas o factores de transcripción. Dado que la mayoría de estas respuestas implican el control de la expresión de genes, los factores de transcripción juegan un papel importante en la respuesta de las plantas al estrés abiótico y a su desarrollo (Chaves y Oliveira, 2004).

En varios casos, la cantidad y disponibilidad de proteínas reguladoras puede depender de sus propios patrones de expresión. Los controles autocatalíticos se dan a nivel transcripcional, pos-transcripcional y/o en la traducción. La fosforilación de proteínas reguladoras es un acontecimiento importante en el control de la expresión génica en eucariotas. Por lo que, múltiples interacciones proteína-proteína y/o DNA-proteína, con frecuencia, determinan la tasa de transcripción por activación/represión de un promotor bajo determinadas condiciones ambientales (Bartels y Sunkar, 2005).

2.5.1. Factores de transcripción

Los factores de transcripción son proteínas con un dominio que se une a elementos específicos que actúan en *cis* presentes en el promotor de un gen blanco. Ellos inducen (activadores) o reprimen (represores) la actividad de la RNA

polimerasa (Figura 2), y entonces regulan la expresión de los genes (Saibo *et al.*, 2009). La estructura proteica de un factor de transcripción típico tiene dos dominios: el **dominio de unión al DNA** responsable de unir a elementos específicos que actúan en *cis* en las regiones del promotor de los genes blanco y el **dominio regulatorio** responsable de la regulación transcripcional de los genes blanco (Shen *et al.*, 2009).

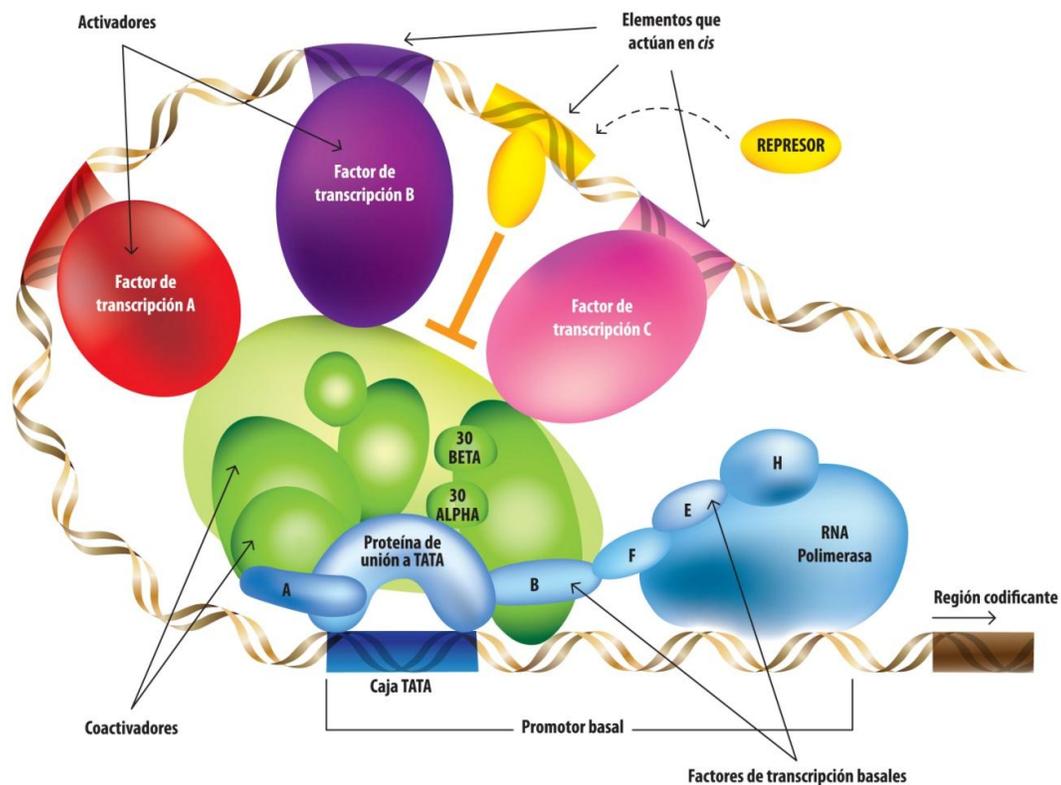


Figura 2. Maquinaria molecular que controla la transcripción en organismos superiores, la cual consisten en cuatro tipos de componentes: factores basales (en azul), éstos son esenciales para la transcripción pero no pueden por ellos mismos incrementar o disminuir la tasa transcripcional; los factores de transcripción pueden ser activadores o/y represores, estas moléculas reguladoras pueden variar de gen a gen y se comunican con los factores basales a través de coactivadores (verde), éstas son proteínas que se ligan a la proteína de unión TATA, que es el primer factor basal que reconoce la región reguladora de los genes conocido como promotor basal (Modificado de Gómez-Merino *et al.*, 2009).

Varios factores de transcripción interactúan con los elementos que actúan en *cis*, en las regiones del promotor, y forman un complejo de iniciación transcripcional sobre la caja TATA (promotor central), corriente arriba del sitio de iniciación de la transcripción. El complejo de iniciación transcripcional activa a la RNA polimerasa para inicial la transcripción de los genes de respuesta al estrés. En este proceso, se llevan a cabo varias interacciones entre los elementos que actúan en *cis* y los factores de transcripción, que funcionan como interruptores moleculares durante la transcripción, para determinar los eventos de iniciación de este proceso (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005).

Las plantas necesitan una gran cantidad de factores de transcripción para gobernar en forma adecuada y estricta la regulación transcripcional en respuesta a estrés osmótico. Para activar o reprimir la transcripción, los factores de transcripción deben estar ubicados en el núcleo, unidos al DNA, e interactuar con el aparato de transcripción basal. Por lo tanto, las señales de estrés que regulan la actividad de los factores de transcripción pueden afectar uno o la combinación de estos procesos. La regulación de los factores de transcripción se logra mediante la fosforilación reversible o por síntesis *de novo* de otros factores de transcripción (Bartels y Sunkar, 2005).

Un solo factor de transcripción puede controlar la expresión de muchos genes blanco. Así, un grupo de genes controlados por un cierto tipo de factores de transcripción es conocido como un regulón. En la respuesta de las plantas a estrés osmótico, al menos se pueden identificar cuatro regulones diferentes (Figura 3): 1) el regulón CBF/DREB; 2) regulón NAC y ZF-HD; 3) regulón AREB/ABF y 4) regulón MYC/MYB (Saibo *et al.*, 2009). Estos regulones son rutas involucradas en las respuestas al estrés osmótico y pueden ser dependientes o independientes de ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006). Además, la regulación de los genes en respuesta al estrés osmótico se lleva a cabo a través de la interacción entre los factores de transcripción y los elementos que actúan en *cis* en las regiones promotoras de los genes blanco, tales como los elementos de respuesta a la deshidratación de repetición C (CRT/DRE), el elemento sensible a ABA (ABRE), secuencia de reconocimiento NAC (NACR), secuencia de reconocimiento

HDZF (HDZFR) y elementos MYCR/MYBR (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

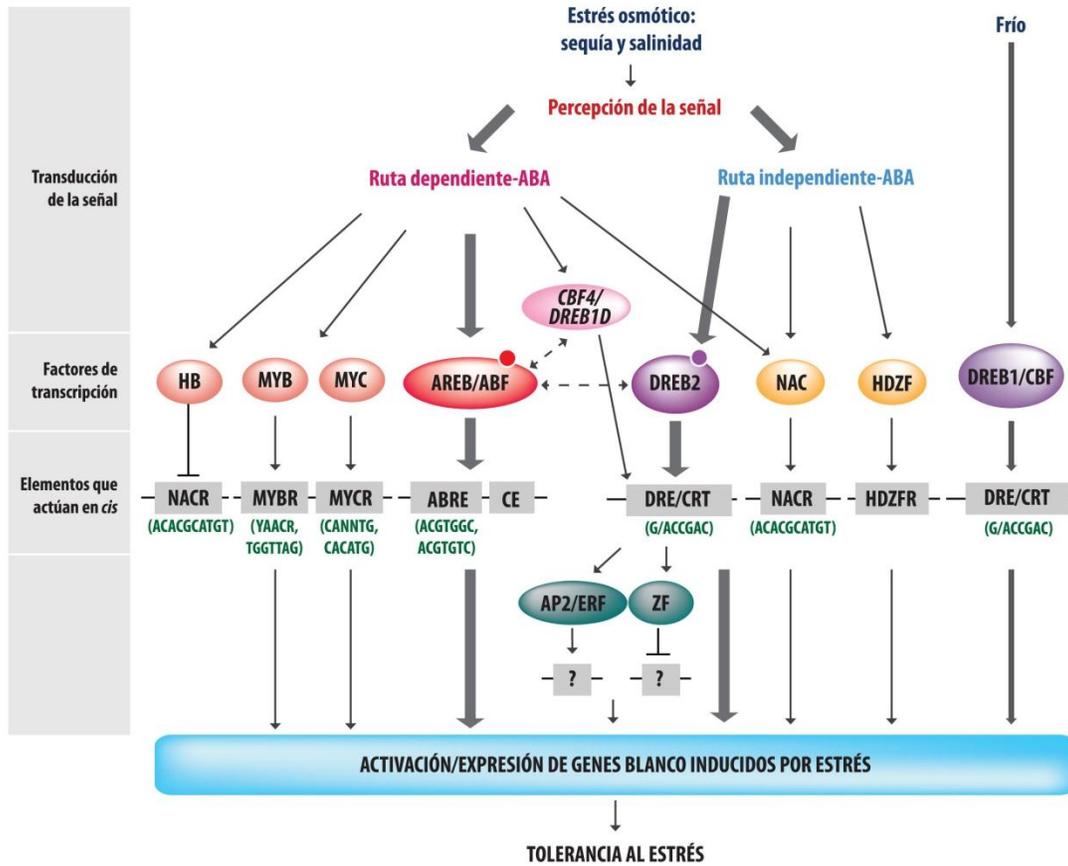


Figura 3. Red de regulación transcripcional de los elementos que actúan en *cis* y los factores de transcripción involucrados en la expresión de genes en respuesta al estrés osmótico. Los factores de transcripción se presentan en elipses de colores. Los elementos que actúan en *cis* se muestran en rectángulos grises. Los pequeños círculos identifican modificaciones de los factores de transcripción para su activación, como la fosforilación, en respuesta a señales de estrés. El grosor de las flechas grises indican las rutas principales de señalización. Las flechas discontinuas señalan interacción proteína-proteína (modificado de Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006).

2.5.2. Regulón CBF/DREB

Este regulón está involucrado principalmente en las respuestas al frío, y es conservado en el reino vegetal, inclusive en plantas que no se desarrollan en clima frío como tomate y arroz (Dubouzet *et al.*, 2003). Yamaguchi-Shinozaki y

Shinozaki (1994) identificaron un elemento que actúa en *cis* que, además del elemento de respuesta a ABA (ABA-responsive element, ABRE), también está presente en el promotor del gen *RESPONSIVE TO DEHYDRATATIO 29A* (*RD29A*), un gen inducido por sequía, salinidad y frío. Este elemento fue llamado elemento de respuesta a deshidratación (C-repeat/dehydration-responsive element, CRT/DREB) y fue caracterizado como dependiente de ABA. El motivo central de este elemento que actúa en *cis* es CCGAC y los factores de transcripción que se unen a este elemento fueron llamados factores de unión a CRT o proteínas 1 de unión a DRE (CBF/DREB1) (Liu *et al.*, 1998).

La expresión del gen *CBF/DREB1* es rápida y transita inducida por frío, y a su vez los factores de transcripción CBF/DREB1 activan la expresión de muchos otros genes que codifican proteínas involucradas en la producción de osmoprotectores y antioxidantes (Saibo *et al.*, 2009). En lo que se refiere a los genes *DRE2*, estos se expresan constitutivamente (bajo condiciones normales y bajo condiciones de estrés), aunque sus genes blanco (*RD29A*, *RD29B*, *RD17*, y *LEA14*) son inducidos solamente por deshidratación. Esto indica que los factores de transcripción *DREB2* son activados a través de modificaciones post-traduccionales con la finalidad de regular la expresión de los genes corriente abajo (Sakuma *et al.*, 2006).

2.5.3. Regulón AREB/ABF

Muchos genes inducidos por sequía y salinidad responden a ABA (Rabbani *et al.*, 2003). Un elemento conservado que actúa en *cis*, nombrado como elemento en respuesta a ABA (ABA-responsive element, ABRE; PyACGTGG/TC), fue identificado de los promotores de los genes inducidos por ABA. Por lo tanto, ABRE es uno de los principales elementos que actúan en *cis* en genes de respuesta a ABA. Para la transcripción, una sola copia de ABRE no es suficiente (Nakashima *et al.*, 2009). Por lo que, ABRE y elementos de acoplamiento, incluye elemento de acoplamiento 1 (coupling element 1, CE1) y el elemento de acoplamiento 3 (CE3), constituye un complejo en respuesta a ABA en la regulación de los genes *HVA1* y *HVA22* en trigo (Shen *et al.*, 1996).

Los ABFs o AREBs son factores de transcripción del tipo bZIP (basic leucine zipper) que se unen al motivo ABRE y activa la expresión de los genes dependientes de ABA (Choi *et al.*, 2000). Algunos de estos factores de transcripción, como AREB1 y AREB2, requieren una modificación pos-traducciona para su máxima activación. Estas modificaciones son, probablemente, una fosforilación dependiente de ABA (Saibo *et al.*, 2009). La mayoría de los elementos de acoplamiento conocidos son similares a ABRE. Por ejemplo, el arroz contiene un motivo A/GCGT. En *Arabidopsis*, la secuencia de CRT/DRE puede servir como un elemento de acoplamiento de ABRE en respuesta a ABA (Narusaka *et al.*, 2003), lo que sugiere la existencia de una interacción entre los regulones DREB y ABRE (Nakashima *et al.*, 2009).

El grupo de genes *AREB/ABF*, en su mayoría son redundantes y de expresión específica en tejidos vegetales o semillas (Choi *et al.*, 2000). Los genes *AREB1/ABF2*, *AREB2/ABF4* y *ABF3* son expresados principalmente en tejido vegetales, mientras que *ABI5* y *EEL* son expresados durante la maduración de la semilla o la germinación (Fujita *et al.*, 2005; Nakashima y Yamaguchi-Shinozaki, 2006). La expresión del gen *OsABI5* fue estimulado por ABA y salinidad, pero fue reprimido por sequía y frío en plántulas, su sobreexpresión incrementa la tolerancia a la salinidad en arroz (Zou *et al.*, 2008; Nakashima *et al.*, 2009).

2.5.4. Regulón NAC y ZF-HD

Una ruta independiente de ABA se dio a conocer, cuando se observó la acumulación de transcritos del gen *EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION STRESS 1 (ERD1)* antes de detectar algún incremento de ABA en respuesta a salinidad y sequía, lo que sugirió la presencia de una ruta independiente de ABA (Nakashima *et al.*, 1997). Análisis realizados en el promotor *ERD1* revelaron que pertenece a los factores de transcripción de la familia NAC; además, el homeodominio dedos de zinc (zinc finger homeodomain, ZF-HD) es esencial para la activación del gen *ERD1*. Sin embargo, la sobreexpresión de genes NAC, en *Arabidopsis*, mejoran la tolerancia a sequía sin la activación del gen *ERD1*, lo que

sugiere que pueda ser necesario la interacción de otros factores para controlar la expresión de este gen bajo condiciones de estrés (Tran *et al.*, 2007b).

Recientemente, el gen *STRESS-RESPONSIVE NAC1 (SNAC1)* fue aislado de un cultivar de arroz de secano. Las plantas que sobreexpresan el gen *SNAC1* no mostraron el fenotipo común, indeseado y enano de aquellos que sobreexpresan el gen *DREB1/CBF* (Ito *et al.*, 2006), lo anterior revela un mecanismo diferente de respuesta al estrés. El incremento en la tolerancia a la sequía puede ser debido, en parte, a la reducción en la tasa de transpiración (incremento en el cierre estomático) y a un aumento en la sensibilidad a ABA (Saibo *et al.*, 2009).

2.5.5. Regulón MYC/MYB

La expresión del gen *RESPOSIVE TO DEHYDRATION 22 (RD22)* inducible por sequía, de *Arabidopsis*, fue encontrado como inducido por ABA (Abe *et al.*, 2003). La región del promotor del gen *RD22* contiene los sitios de reconocimiento de los elementos *cis* de MYC (CANNTG) y MYB (C/TAACNA/G). Los factores de transcripción sólo se acumulan después de la acumulación de ABA. En *Arabidopsis*, se encontró que para la activación del gen *RD22*, tanto AtMYC como AtMYB tienen que trabajar cooperativamente. La sobreexpresión de estos factores de transcripción resulta en incremento en la sensibilidad a ABA y la tolerancia a sequía. Estudios que utilizan microarreglos en plantas transgénicas que sobreexpresan estos factores de transcripción revelan que no solamente fueron regulados diferencialmente por genes relacionados al ABA, sino también por genes relacionados con el ácido jasmónico, esto indica una superposición entre las respuestas del estrés abiótico y biótico (Abe *et al.*, 2003; Saibo *et al.*, 2009).

2.6. EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE DIFERENTES FAMILIAS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

En las rutas de transducción de señales, involucradas en la conversión de la percepción de la señal a la expresión de genes en respuesta al estrés, varios factores de transcripción y elementos que actúan en *cis* contenidos en promotores

funcionan no solamente como interruptores moleculares para la expresión génica, sino también como puntos terminales de la transducción de señales en los procesos de señalización (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006; Tran *et al.*, 2007a).

Los factores de transcripción activan cascadas de genes que actúan juntos para incrementar la tolerancia a múltiples tipos de estrés. Decenas de factores de transcripción están implicados en la respuesta de las plantas al estrés osmótico como salinidad y sequía (Vinocur y Altman, 2005). Así, los factores de transcripción pueden ser agrupados en familias de acuerdo a su dominio de unión al DNA (Riechmann *et al.*, 2000). Por lo que, la mayoría de los factores de transcripción se dividen en varias familias, tales como AP2/ERF, Bzip, NAC, MYB, MYC, Hsf, Cys2His2 zinc finger y WRKY. A menudo, miembros de la misma familia responden de diferente manera a estímulos de diferentes tipos de estrés. Por otro lado, algunos genes de respuesta al estrés pueden compartir los mismos factores de transcripción, como lo indica la superposición del perfil de expresión que se induce en respuesta a diferentes estreses (Bhatnagar-Mathur, 2008).

En los siguientes apartados se presenta una breve revisión de los factores de transcripción de la familia Hsf y NAC. La primera familia, recientemente, estudiada con mayor énfasis en respuesta al estrés osmótico (sequía y salinidad); mientras que la segunda es específica de plantas y ha sido extensamente relacionada con incrementar la tolerancia al estrés abiótico.

2.6.1. Factores de transcripción de la familia Hsf

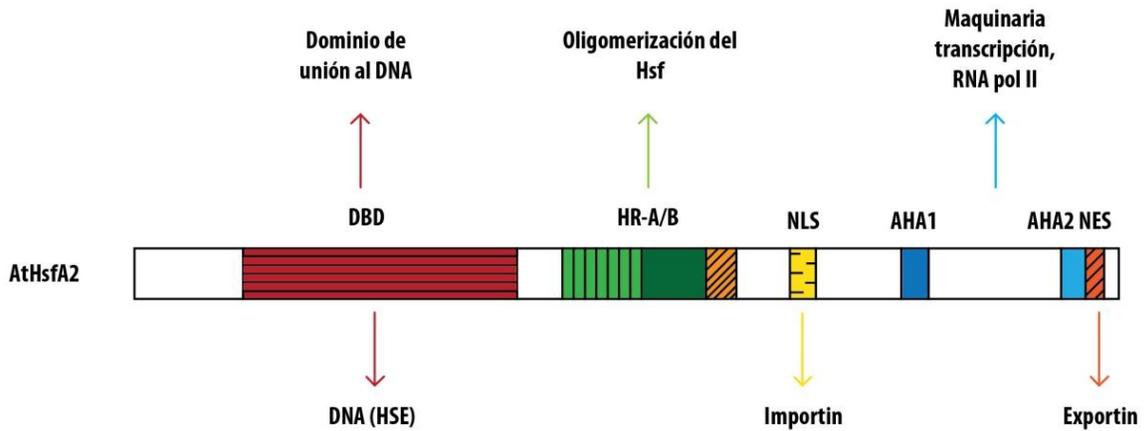
Todos los organismos poseen un evolutivo, conservado y rápido mecanismo de defensa celular comúnmente designado como respuesta de choque térmico (heat shock, HS), que activa una serie de reacciones en respuesta al estrés por calor y una serie de factores de estrés químico. Hsf se caracteriza por una rápida reprogramación de la expresión génica, lo que lleva a la producción de un conjunto definido de proteínas conocidos como proteínas de choque térmico (heat shock proteins, Hsps), la mayoría de las cuales actúan como chaperonas moleculares (Hartl y Hayer-Hartl, 2002).

La expresión de las Hsps está regulada por múltiples mecanismos. Los reguladores centrales de la expresión de Hsps son los factores de transcripción de choque térmico (heat shock transcription factors, Hsfs). Los Hsfs son los componentes terminales de una ruta de transducción de señales mediante la activación de genes de respuesta a estímulos de estrés térmico o a otro tipo de estreses, como el osmótico ocasionado por sequía y salinidad (Nover *et al.*, 2001; Morimoto, 2002).

A pesar de una considerable variabilidad en el tamaño y secuencia, la estructura básica de los Hsfs y sus sitios de reconocimiento en el promotor se conservan en todo el reino eucariota (Kotak *et al.*, 2004). Por lo que, la mayoría de las propiedades funcionales de Hsfs están vinculadas a dominios estructurales muy conservados (Figura 4A): el dominio de unión al DNA N-terminal (DNA-binding domain, DBD), el cual se caracteriza por un motivo central del tipo hélice-giro-hélice y un dominio adyacente de oligomerización bipartito (HR-A/B), compuesto de repeticiones hidrofóbicas (von Koskull-Döring *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010). Los Hsfs reconocen motivos palindrómicos de unión, llamados elementos de estrés por calor (heat stress elements, HSE: 5'-AGAA_nTTCT-3') que se conservan en los promotores de los genes inducibles por choque térmico de todos los eucariotas (Figura 4B) (Baniwal *et al.*, 2004; von Koskull-Döring *et al.*, 2007).

Los Hsfs, en plantas, están asignados en tres clases (A, B y C) en base a características estructurales y estudios filogenéticos (Nover *et al.*, 2001). En contraste con la clase B y los Hsfs que no son de plantas, las clases A y C muestran una inserción de 21 (clase A) o 7 (clase B) aminoácidos, respectivamente, que separan las regiones hidrofóbicas HR-A y B. Una particularidad notable de los Hsfs de la clase B es la falta de motivos ácidos AHA en su dominio de activación C-terminal (CTAD), los cuales son crucial para la función activadora de los Hsfs de la clase A (Döring *et al.*, 2000). Los Hsfs de la clase A, de *Arabidopsis*, comprende 15 genes/proteínas, algunas de las cuales se sabe que funcionan como activadores transcripcionales de los genes blanco en respuesta al estrés (Li *et al.*, 2010).

A) Estructura modular del HsfA2 de Arabidopsis



B) Interacciones del factor de transcripción Hsf con la maquinaria transcripcional

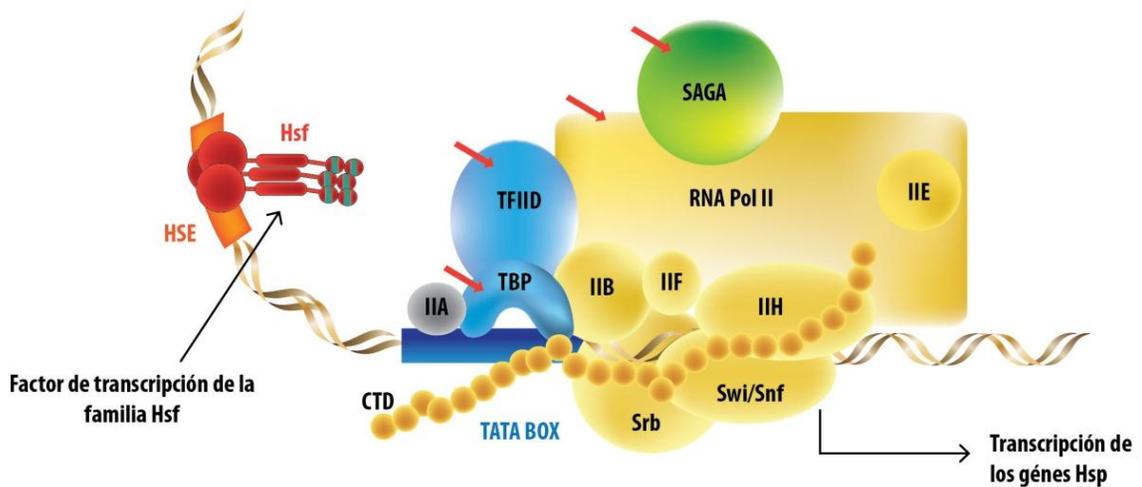


Figura 4. A) Módulos funcionales del HsfA2 de *Arabidopsis*. Los Hsfs tienen una estructura modular: el dominio de unión al DNA (DBD) N-terminal que se caracteriza por un motivo hélice-giro-hélice y se une a los elementos de estrés térmico (HSE) en la región promotora de los genes de respuesta al estrés de choque térmico. El dominio adyacente con un patrón repetido de residuos de aminoácidos hidrofóbicos (región HR-A/B) es requerido para la homo o hetero oligomerización de los Hsfs. **B)** Interacciones con la maquinaria transcripcional. Modelo de un Hsf clase A interactuando a través de sus motivos AHA con los componentes de la maquinaria transcripcional basal (flechas amarillas), compuesta por la RNA polimerasa II, los factores de transcripción TFIIA, IIB, IID, IIE, IIF Y IIH, así como TBP y los complejos coactivadores Srb y Swi/Snf (Baniwal *et al.*, 2004; von Koskull-Döring *et al.*, 2007).

Los estreses abióticos que induce fuertemente la expresión de los Hsfs, en *Arabidopsis*, fueron el frío, calor, sal y estrés osmótico (Swindell *et al.*, 2007). Por otro lado, Hu *et al.* (2009) demostraron que sequía y salinidad inducen la expresión de los Hsfs, con mayor fuerza que frío y calor, en arroz. Esto sugiere una posible diferencia en las respuestas entre las familias OsHsf y AtHsf. Las proteínas y los factores de transcripción de choque térmico muestran respuestas de expresión a una gran cantidad de estímulos de estrés. Estos diferentes tipos de estrés interactúan fuertemente con los Hsfs y las Hsp a nivel transcripcional; por lo que los Hsfs pueden ser un modelo natural para la comprensión integral entre las redes regulatorias asociadas con diferentes tipos de estrés, como la sequía, salinidad, frío y calor (Swindell *et al.*, 2007).

2.6.2. Familia de factores de transcripción NAC

Los factores de transcripción NAC son una de las familias de genes más grandes en plantas. Esta familia de proteínas contiene un dominio de unión al DNA altamente conservado N-terminal y un dominio C-terminal diversificado. NAC se deriva de los nombres de las primeras tres proteínas descritas que contienen el dominio de unión, llamados NAM (no apical meristem), ATAF1-2 y CUC (cup-shaped cotyledon) (Aida *et al.*, 1997). Las proteínas NAC parecen ser generalizadas en plantas, pero hasta ahora no se han identificado homólogos en otros eucariotas. Los factores de transcripción NAC están implicados en diversos procesos como el desarrollo vegetativo, de flores y raíces, respuesta a estrés biótico y abiótico (Olsen *et al.*, 2005), el control de la removilización de nutrientes de las hojas a los granos en desarrollo, regulación de la senescencia (Uauy *et al.*, 2006), división celular y determinación del número de macollos (Mao *et al.*, 2007). Además, controlan la composición de la pared celular durante la xilogénesis, desarrollo de fibras y formación de madera en plantas vasculares (Zhong y Ye, 2007).

Los factores de transcripción de la familia NAC contienen un dominio de unión al DNA altamente conservado N-terminal (dominio NAC) y una variable C-terminal (TRR). Investigaciones en *Arabidopsis* han indicado que hay, al menos, cinco sitios diferentes de unión para los factores de transcripción (Figura 5) (Shen

et al., 2009). Éstos incluyen la secuencia de reconocimiento de los NAC en respuesta a la sequía (NAC recognition sequence, NACRS) que contiene el motivo central CACG; el motivo IDE2 en respuesta a deficiencia de hierro que contiene la secuencia CA(A/C)G(T/C)(T/C/A)(T/C/A); el sitio de unión CBNACBS de la proteína CBNAC unida a la calmodulina que tiene el motivo central GCTT; el elemento de unión NAC de la pared secundaria (SNBE) con una secuencia consenso de 19 pares de bases (pb) (T/A)NN(C/T)(T/C/G)TNNNNNNA(A/C)GN(A/C/T) (A/T); y el segmentos de 21 pb del promotor 35S (283-263) que contiene dos secuencias centrales CGTA y CGTC (Kim *et al.*, 2007; Ogo *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2010, Le *et al.*, 2011). Además del dominio de unión al DNA también tiene la capacidad de mediar las interacciones proteína-proteína. La alta variabilidad de la región C-terminal hace que los NAC puedan actuar como activadores o represores de la transcripción (Le *et al.*, 2011).

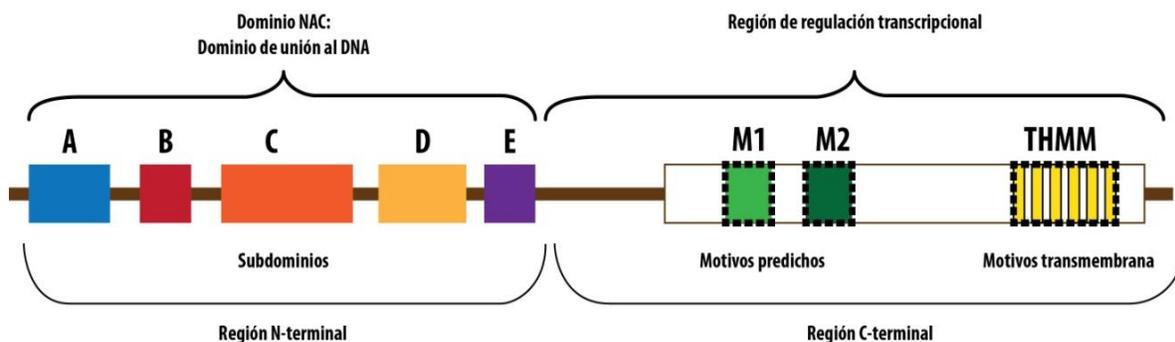


Figura 5. Estructuras de los dominios de unión al DNA de los factores de transcripción de la familia NAC y motivos previstos. Los rectángulos de color indican los subdominios de la proteína de la A – E. Estos comprenden el dominio N-terminal. También, se muestran los motivos predichos en la región C-terminal (Shen *et al.*, 2009).

Los dominios C-terminal de numerosos factores de transcripción de la familia NAC también muestran actividad de unión a proteínas. Por otro lado, la regione C-terminal de algunos NAC contienen motivos transmembranales (transmembrane motif, TMs) responsables del anclaje a la membrana plasmática (Figura 5) (Shen *et al.*, 2009). Otros reportes indican que el dominio NAC no sólo

interactúa con proteínas, sino también con el dominio NAC de otros miembros de la familia NAC para formar dímeros (Olsen *et al.*, 2005).

Se ha predicho la existencia de 117 genes que codifican factores de transcripción NAC en *Arabidopsis*, 151 genes en Arroz (Nuruzzaman *et al.*, 2010); 180 miembros de la familia NAC en soja (*Glycine max* L.) (Le *et al.*, 2011) y 48 miembros encontrados en cebada (Christiansen *et al.*, 2011). Sin embargo, sólo un número limitado de proteínas NAC han sido caracterizadas, hasta el momento. En *Arabidopsis*, tres genes NAC (*ANAC019*, *ANAC055*, y *ANAC072*) fueron inducidos por sequía, salinidad y bajas temperaturas; plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan estos genes mostraron incremento en la tolerancia comparado con el tipo silvestre (Tran *et al.*, 2007a). En arroz, un gen NAC (*SNAC1*) fue identificado en respuesta a estrés; la sobreexpresión de este gen condujo a una mayor tolerancia a sequía por la modulación del cierre estomático (Hu *et al.*, 2006). Otro gen NAC, *OsNAC6/SNAC2*, es inducido por estrés abiótico y ácido jasmónico y la sobreexpresión de este gen resulta en un incremento en la tolerancia del arroz a frío, sequía y salinidad (Hu *et al.*, 2008).

Hasta ahora, se ha demostrado que un gran número de factores de transcripción de la familia NAC están involucrados en respuestas al estrés biótico y abiótico. En particular, la tolerancia a estrés osmótico (sequía y salinidad) ha sido el centro de muchos estudios. La acumulación de ABA parece ser importante al desencadenar respuestas genéticas de las plantas al estrés osmótico, lo cual se ve reflejado en el hecho de que todos los factores de transcripción NAC que confieren resistencia a sequía, principalmente, son inducidos por tratamientos con ABA (Christiansen *et al.*, 2011).

2.7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los efectos celulares de estreses ambientales como la salinidad y la sequía no sólo inducen desequilibrios en la homeostasis iónica y osmótica, sino también afectan la fotosíntesis, reducen la energía celular y provocan desbalance redox. Además, muchos genes están regulados en respuesta a estos estreses osmóticos de sequía y salinidad. La comprensión de los mecanismos moleculares de

respuesta de las plantas al estrés abiótico es muy importante, ya que esto facilitaría su uso en el incremento de la tolerancia al estrés y la productividad. En esta revisión se describe el papel de los factores de transcripción involucrados en la respuesta al estrés osmótico, los cuales fueron abordados como regulones: CBF/DREB; AREB/ABF, MYC/MYB y NAC/ZF-HD. Estos grupos de factores de transcripción regulan la expresión de varios genes en respuesta al estrés osmótico y juegan un papel importante en proporcionar tolerancia a múltiples estreses, tanto de manera dependiente como independiente a ABA a través de los respectivos elementos que actúan en *cis* y los dominios de unión al DNA. El análisis funcional de los factores de transcripción proveería de mayor información sobre las redes regulatorias involucradas en respuestas al estrés abiótico y la diafonía entre diferentes rutas de señalización durante la adaptación al estrés. Además, el considerar a los genes que codifican factores de transcripción como candidatos en los programas de mejoramiento de cultivos, dará un entendimiento claro de los eventos de transducción de señales relacionados con el estrés osmótico, y finalmente conducirá al desarrollo, por ingeniería genética, de cultivares vegetales con mayor tolerancia al estrés.

2.8. LITERATURA CITADA

- Abe, H., T. Urao, T. Ito, M. Seki, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki.** 2003. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 15: 63–78.
- Aida, M., T. Ishida, H. Fukaki, H. Fujisawa and M. Tasaka.** 1997. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *The Plant Cell*, 9: 841–857.
- Agarwal, P. K. and B. Jha.** 2010. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biologia Plantarum*, 54: 201-212.
- Agarwal, P. K., P. Agarwal, M. K. Reddy, and S. K. Sopory.** 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, 25: 1263–1274.

- Baniwal, S. K., K. Bharti, K. Y. Chan, M. Fauth, A. Ganguli, S. Kotak, S. K. Mishra, L. Nover, M. Port, K. D. Scharf, J. Tripp, C. Weber, D. Zielinski and P. von Koskull-Döring.** 2004. Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *Journal of Biosciences*, 29: 471–487.
- Bartels, D. and R. Sunkar.** 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24:23–58.
- Bhatnagar-Mathur, P., V. Vadez and K. K. Sharma.** 2008. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Reports*, 27:411–424.
- Chaves, M. M. and M. M. Oliveira.** 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*, 55: 2365–2384.
- Chinnusamy, W., K. Schumaker and J-K. Zhu.** 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 55:225-236.
- Choi, H., J. Hong, J. Ha, J. Kang and S. Y. Kim.** 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 1723–1730.
- Christiansen, M. W., P. B. Holm and P. L. Gregersen.** 2011. Characterization of barley (*Hordeum vulgare* L.) NAC transcription factors suggests conserved functions compared to both monocots and dicots. *BMC Research Notes*, 4: 302.
- Döring, P., E. Treuter, C. Kistner, R. Lyck, A. Chen and L. Nover.** 2000. The role of AHA motifs in the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2. *Plant Cell*, 12: 265–278.
- Dubouzet, J. G., Y. Sakuma, Y. Ito, M. Kasuga, E. G. Dubouzet, S. Miura, M. Seki, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki.** 2003. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal*, 33: 751–763.
- Fujita, Y., M. Fujita, R. Satoh, K. Maruyama, M. M. Parvez, M. Seki, K. Hiratsu, o. T. Masaru, S. Kazuo and Y. S. Kazuko.** 2005. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17: 3470-3488.

- Gao, J. P., D. Y. Chao, and H. X. Lin.** 2008. Toward Understanding Molecular Mechanisms of Abiotic Stress Responses in Rice. *Rice*, 1: 36–51.
- Gómez-Merino F., L. I. Trejo-Téllez y A. Tiessen.** 2009. Factores de Transcripción: *In: Fundamentos y Metodologías Innovadoras para el Mejoramiento Genético de Maíz.* A Tiessen (ed). Fundación Ciencia Activa, Bogotá, Colombia. pp:127-163. ISBN: 978-970-95522-3-2.
- Grover, A., A. Kapoor, O. Satya Lakshmi, S. Agrawal, C. Sahi, S. Katiyar-Agarwal, M. Agarwal and H. Dubey.** 2001. Understanding molecular alphabets of the plant abiotic stress responses. *Current Science*, 80: 206–216.
- Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl M.** 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295: 1852-1858.
- Hasegawa, P. M., R. Bressan, J. K. Zhu, and H. J. Bohnert.** 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 463–499.
- Hu, H. H., M. Q. Dai, J. L. Yao, B. Z. Xiao, X. H. Li, Q. F. Zhang and L. Z. Xiong.** 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 35: 12987–12992.
- Hu, H. H., J. You, Y. J. Fang, X. Zhu, Z. Y. Qi and L. Z. Xiong.** 2008. Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Molecular Biology*, 67: 169–181.
- Hu, W., G. Hu and B. Han.** 2009. Genome-wide survey and expression profiling of heat shock proteins and heat shock factors revealed overlapped and stress specific response under abiotic stresses in rice. *Plant Science*, 176: 583–590.
- Ito, Y., K. Katsura, K. Maruyama, T. Taji, M. Kobayashi, M. Seki, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki.** 2006. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant and Cell Physiology*, 47: 141–153.
- Jensen, M. K., T. Kjaersgaard, M. M. Nielsen, P. Galberg, K. Petersen, C. O’Shea and K. Skriver.** 2010. The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signaling, *Biochemical Journal*, 426: 183–96.
- Kim, H. S., B. O. Park, J. H. Yoo, M. S. Jung, S. M. Lee, H. J. Han, K. E. Kim, S. H. Kim, C. O. Lim, D. J. Yun, S. Y. Lee and W. S. Chung.** 2007.

- Identification of a Calmodulin-binding NAC protein as a transcriptional repressor in *Arabidopsis*. *The Journal Biological Chemistry*, 282: 36292–302.
- Kotak, S., M. Port, A. Ganguli, F. Bicker and P. von Koskull-Döring.** 2004. Characterization of C-terminal domains of *Arabidopsis* heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization. *The Plant Journal*, 39: 98-112.
- Le, D. T., R. Nishiyama, Y. Watanabe, K. Mochida, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki and L. S. P- Tran.** 2011. Genome-Wide Survey and Expression Analysis of the Plant-Specific NAC Transcription Factor Family in Soybean During Development and Dehydration Stress. *DNA Research*, 18: 263–276.
- Li, M., J. Doll, K. Weckermann, C. Oecking, K. W. Berendzen and F. Schöffl.** 2010. Detection of in vivo interactions between *Arabidopsis* class A-HSFs, using a novel BiFC fragment, and identification of novel class B-HSF interacting proteins. *European Journal of Cell Biology*, 89: 126–132.
- Liu, Q., M. Kasuga, Y. Sakuma, H. Abe, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki.** 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10: 1391–1406.
- Ludwig, A. A., T. Romeis and J. D. Jones.** 2004. CDPK-mediated signaling pathways: specificity and cross-talk. *Journal of Experimental Botany*, 55: 181–188.
- Mao, C. Z., W. N. Ding, Y. R. Wu, J. Yu, X. W. He, H. X. Shou and P. Wu.** 2007. Overexpression of a NAC-domain protein promotes shoot branching in rice. *New Phytologist*, 176: 288–298.
- Morimoto, R. I.** 2002. Dynamic remodeling of transcription complexes by molecular chaperones. *Cell*, 110: 281-284.
- Munns, R.** 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25: 239-250.
- Nakashima, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki.** 2006. Regulons involved in osmotic stressresponsive and cold stress responsive gene expression in plants. *Physiologia Plantarum*, 126: 62–71.

- Nakashima, K., T. Kiyosue, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki.** 1997. A nuclear gene, *erd1*, encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 12: 851–861.
- Nakashima, k., Y. Ito, and K. Yamaguchi-Shinozaki.** 2009. Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in *Arabidopsis* and Grasses. *Plant Physiology*, 149: 88–95.
- Nakashima, K., and K. Yamaguchi-Shinozaki.** 2010. Promoters and Transcription Factors in Abiotic Stress-Responsive Gene Expression. *In: A. Pareek, S. K. Sopory, H. J. Bohnert and Govindjee (eds.), Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation*, pp.199–216.
- Narusaka, Y., K. Nakashima, Z. K. Shinwari, Y. Sakuma, T. Furihata, H. Abe, M. Narusaka, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki.** 2003. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *The Plant Journal*, 34: 137–148.
- Nover, L., K. Bharti, P. Döring, S. K. Mishra, A. Ganguli and K. D. Scharf.** 2001. *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones*, 6: 177-189.
- Nuruzzaman, M., R. Manimekalai, A. M. Sharoni, K. Satoh, H. Kondoh, H. Ooka and S. Kikuchi.** 2010. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene*, 465: 30–44.
- Ogo, Y., T. Kobayashi, R. Nakanishi Itai, H. Nakanishi, Y. Kakei, M. Takahashi, S. Toki, S. Mori and N. Nishizawa.** 2008. A novel NAC transcription factor, IDEF2, that recognizes the iron deficiency-responsive element 2 regulates the genes involved in iron homeostasis in plants. *The Journal Biological Chemistry*, 283: 13407–1317.
- Olsen, A. N., H. A. Ernst, L. L. Leggio and K. Skriver.** 2005. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science*, 10: 79–87.
- Rabbani, M. A., K. Maruyama, H. Abe, M. A. Khan, K. Katsura, Y. Ito, K. Yoshiwara, M. Seki, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki.** 2003. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-

- salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiology*, 133: 1755–1767.
- Rai, M., C. He, and R. Wu.** 2009. Comparative functional analysis of three abiotic stress-inducible promoters in transgenic rice. *Transgenic Research*, 18: 787–799.
- Riechmann, J. L., J. Heard, G. Martin, L. Reuber, C. Jiang, J. Keddie, L. Adam, O. Pineda, O. J. Ratcliffe, R. R. Samaha, R. Creelman, M. Pilgrim, P. Broun, J. Z. Zhang, D. Ghandehari, B. K. Sherman and G. Yu.** 2000. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290: 2105–2110.
- Rodríguez, M., E. Canales, and O. Borrás-Hidalgo.** 2005. Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biotecnología Aplicada*, 22: 1-10.
- Saibo, N. J. M., T. Lourenco and M. M. Oliveira.** 2009. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany*, 103: 609–623.
- Sakuma, Y., K. Maruyama, Y. Osakabe, F. Qin, M. Seki, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki.** 2006. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, *DREB2A*, involved in drought-responsive gene expression. *The Plant Cell*, 18: 1292–1309.
- Seki, M., M. Narusaka, J. Ishida, T. Nanjo, M. Fujita, Y. Oono, A. Kamiya, M. Nakajima, A. Enju, T. Sakurai, M. Satou, K. Akiyama, T. Taji, K. Yamaguchi-Shinozaki, P. Carninci, J. Kawai, Y. Hayashizaki, and K. Shinozaki.** 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal*, 31: 279–292.
- Shen, Q., P. Zhang and T. H. Ho.** 1996. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell*, 8: 1107–1119.
- Shen, H., F. Chen and R. A. Dixon.** 2009. A Bioinformatic Analysis of NAC Genes for Plant Cell Wall Development in Relation to Lignocellulosic Bioenergy Production. *Bioenergy Research*, 2: 217–232.
- Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki.** 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58: 221–227.

- Shinozaki, K., K. Yamaguchi-Shinozaki, and M. Seki.** 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in plant Biology*, 6: 410–417.
- Swindell, W. R. M. Huebner and A. P. Weber.** 2007. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*, 8: 125.
- Tran, L. S., K. Nakashima, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki.** 2007a. Plant gene networks in osmotic stress response: from genes to regulatory networks. *Methods in Enzymology*, 428: 109–128.
- Tran, L. S., K. Nakashima, Y. Sakuma, Y. Osakabe, F. Qin, S. D. Simpson, K. Maruyama, Y. Fujita, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki.** 2007b. Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the *ERD1* gene in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 49: 46–63.
- Uauy, C., A. Distelfeld, T. Fahima, A. Blechl and J. Dubcovsky.** 2006. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science*, 314: 1298–1301.
- Umezawa, T., M. Fujita, Y. Fujita, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki.** 2006. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Current Opinion in Biotechnology*, 17: 113–122.
- Verslues, P.E. and J. K. Zhu.** 2005. Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. *Biochemical Society Transactions*, 33: 375–379.
- Verslues, P. E., M. Agarwal, S. Katiyar-Agarwal, J. Zhu, and J. K. Zhu.** 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*. 45: 523–539.
- Vinocur, B. and A. Altman.** 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 123–132.
- Von Koskull-Döring, P., K. D. Scharf and L. Nover.** 2004. The diversity of plant heat stress transcription factors. *TRENDS in Plant Science*, 12: 452–457.
- Xiong, L. and J. K. Zhu.** 2002a. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment*, 25: 131–139.

- Xiong, L., K. S. Schumaker, and J. K. Zhu.** 2002b. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell*, 14(Suppl): S165–183.
- Yamaguchi-Shinozaki K. and K. Shinozaki.** 1994. A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*, 6: 251–264.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and K. Shinozaki.** 2005. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold stress- responsive promoters. *Trends in Plant Science*, 10: 88–94.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and K. Shinozaki.** 2006. Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 781–803.
- Zhong, R. and Z. H. Ye.** 2007. Regulation of cell wall biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 564–572.
- Zhu, J. K.** 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 247–273.
- Zou, M., Y. Guan, H. Ren, F. Zhang and F. Chen.** 2008. A bZIP transcription factor, OsABI5, is involved in rice fertility and stress tolerance. *Plant Molecular Biology*, 66: 675–683.

CAPÍTULO III

CAPÍTULO III.

RESPUESTA FISIOLÓGICA DE PLANTAS DE ARROZ CRECIDAS BAJO ESTRÉS OSMÓTICO EN CONDICIONES HIDROPÓNICAS

S. García-Morales, F.C. Gómez-Merino, L.I. Trejo-Téllez, C. Calda, D. Espinosa-Victoria y E.B. Herrera-Cabrera

RESUMEN

El estrés osmótico es una consecuencia común de la exposición a sequía y salinidad. Estos estreses abióticos conducen a una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan adversamente el crecimiento y la productividad de los cultivos. En este estudio se evaluó el efecto de dos agentes causantes de estrés osmótico (100 mM de NaCl y 10% de PEG, polietilenglicol) y el testigo (sin estrés osmótico) en el crecimiento de cuatro cultivares mexicanos de arroz (Cotaxtla, Temporalero, Huimanguillo y Tres Ríos, la última catalogada como susceptible a la sequía), durante la etapa vegetativa (macollaje). Doce días después de la germinación, las plantas fueron mantenidas en hidroponía por 45 días, con solución nutritiva de Steiner al 50%, bajo condiciones de invernadero en un experimento factorial 4 x 3 y una distribución completamente al azar. Las plantas fueron sometidas a estrés osmótico durante 15 días. Los resultados indican que la altura de planta, el peso de materia fresca y seca de vástago y raíz fueron reducidos significativamente en los cuatro cultivares estudiados. No obstante, la relación raíz/vástago aumentó en los cultivares Cotaxtla y Temporalero. El NaCl redujo significativamente ($p \leq 0.05$) la concentración de clorofila, mientras que el PEG no mostró efecto negativo en esta variable. Tanto el NaCl como el PEG incrementaron la concentración de aminoácidos totales en hojas, excepto en el cultivar Tres Ríos que únicamente fue afectado por salinidad. Sin embargo, sólo el NaCl incrementó substancialmente la concentración de prolina, de 5 a 25 veces más que el testigo. La concentración de K^+ fue reducida significativamente en raíz de Tres Ríos, mientras que en vástago todos los cultivares tuvieron reducciones. La concentración de Na^+ incrementó en todos los

cultivares al crecer bajo salinidad. Las concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} mostraron cambios en vástago, y en raíz sólo el Mg^{2+} . Lo que indica que un cultivar tolerante a sequía no necesariamente lo es a la salinidad, ya que el NaCl reduce el crecimiento y el contenido de clorofila debido a la acumulación de sodio en la parte aérea; siendo en este ensayo el cultivar Cotaxtla el más tolerante a salinidad y sequía, comparado con los otros cultivares estudiados.

Palabras clave: *Oryza sativa*, NaCl, polietilenglicol, clorofila, aminoácidos, concentración Na^+ , K^+

3.1. INTRODUCCIÓN

La sequía y salinidad son dos de los principales factores ambientales que determinan la productividad y distribución de las plantas. La exposición a estos tipos de estrés, desencadena muchas reacciones comunes en las plantas. Ambos estreses inducen deshidratación celular, lo que causa estrés osmótico y remoción de agua del citoplasma a los espacios extracelulares resultando en reducción del crecimiento (Zhu, 2002; Chinnusamy *et al.*, 2004). Las respuestas al estrés hídrico y salino son idénticas excepto por los componentes iónicos. Estas similitudes incluyen procesos metabólicos como disminución de la fotosíntesis o cambios hormonales. Altas concentraciones de Na y Cl con problemas adicionales del estrés salino (Bartels y Sunkar, 2005).

La adaptación a la sequía y salinidad es un proceso complejo que involucra numerosos cambios incluyendo atenuación del crecimiento, activación o represión en la expresión de genes, acumulación de solutos compatibles y proteínas protectoras. Entre éstos, una respuesta típica al estrés osmótico es la acumulación de prolina. Cuando las plantas son expuestas a sequía o salinidad, las plantas acumulan grandes cantidades de prolina como un osmoprotectante para mantener la estabilidad y prevenir daños (Mansour, 2000). Plantas de arroz crecidas en salinidad incrementan significativamente el contenido de prolina, esta respuesta parece ser una reacción al estrés y está asociado con la tolerancia a la salinidad (Hoai *et al.*, 2003). En general, las plantas tienden a acumular prolina como un

mecanismo de defensa contra el estrés osmótico actuando como un soluto compatible (Ghoulam *et al.*, 2002).

El NaCl es la sal soluble, presente en mayor cantidad en suelos con problemas de salinidad; bajo estas condiciones, cantidades excesivas de Na⁺ se transportan de la raíz a las hojas afectando el crecimiento de las plantas (Gao *et al.*, 2007). La toxicidad por Na⁺ resulta, primeramente, de la competencia del N⁺ con el K⁺ en los sitios enzimáticos de unión, esto interfiere con la activación de las enzimas, como consecuencia afectan el metabolismo y el crecimiento (Neves-Piestun y Bernstein, 2005).

El arroz es el principal alimento para más de dos billones de personas en Asia, África y América Latina (Salekdeh *et al.*, 2002); la sequía y salinidad se han convertido en un problema serio en muchos sistemas de producción de arroz, como en áreas costeras, áridas y bajo irrigación (Demiral y Türkan, 2005).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del estrés osmótico causado por sequía (10% PEG) y salinidad (100 mM NaCl) en el crecimiento, contenido de clorofila, acumulación de aminoácidos y concentración de Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺ en plantas de arroz, de cuatro cultivares mexicanos (Cotaxtla, Temporalero, Huimanguillo y Tres Ríos).

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron cuatro cultivares de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. indica), Cotaxtla, Temporalero, Huimanguillo y Tres Ríos (esta última catalogada como susceptible a sequía), provenientes del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Zacatepec, Morelos. El experimento se realizó en un invernadero tipo cenital, ubicado en el Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados.

Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 70% por 5 min e hipoclorito de sodio al 3%, durante 30 min. Después, fueron enjuagadas con agua estéril cinco veces y secadas en papel filtro. Los embriones secos fueron germinados en frascos con medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 3% (p/v) de sacarosa y solidificado con 0.8% de agar. Doce días después de la germinación,

las plántulas fueron trasplantadas a recipientes con 4 L de solución nutritiva de Steiner al 50%, el contenido iónico de la solución nutritiva, así como la mezcla de micronutrientes empleada, fue preparada como lo reportan Marín *et al.* (2010). El pH de la solución se mantuvo entre 5.5 y 6.0. La solución nutritiva fue renovada cada 5 d.

Se evaluaron dos agentes causantes de estrés osmótico (10% PEG, para inducir sequía y 100mM NaCl para salinidad), el testigo sin estrés y cuatro cultivares de arroz (Cotaxtla, Temporalero, Huimanguillo y Tres Ríos). La aplicación de tratamientos se inició 45 días después de que las plantas fueron transferidas a solución hidropónica, durante la etapa vegetativa (macollamiento). Quince días después de la aplicación de tratamientos, las plantas fueron cosechadas y separadas en vástago y raíz para determinar su longitud, peso fresco (p.f) y peso seco (p.s). El peso seco se determinó 48 h después de secar las muestras a 70 °C en una estufa de circulación de aire forzado. En la segunda y tercera hoja fresca totalmente expandida se determinó el contenido de clorofila usando 80% de acetona según Arnon (1949), prolina de acuerdo a Bates *et al.* (1973) y aminoácidos totales de acuerdo al método de la ninhidrina.

Para determinar la concentración de Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺, las plantas fueron divididas en vástago y raíz. Las muestras secas fueron molidas, pesadas y sometidas a digestión húmeda con una mezcla de ácidos perclórico y nítrico (Alcántar y Sandoval, 1999), los extractos obtenidos fueron leídos en un equipo de espectrometría de emisión atómica de inducción por plasma (ICP-AES) marca VARIANTM modelo Liberty II.

Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS ver. 9.0 (SAS Institute, 1990) bajo un diseño completamente al azar en un arreglo factorial 4 x 3 (cultivar x estrés osmótico), resultando 12 tratamientos con seis repeticiones cada uno. Una planta fue considerada como unidad experimental. Se hizo un análisis de varianza y comparación de medias mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95%.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 1 se muestran los resultados del análisis de varianza de los factores cultivar, estrés osmótico (sequía y salinidad) y su interacción (cultivar x estrés) para la altura de vástago, longitud de raíz, peso fresco y seco de vástago y raíz, así como su relación raíz/vástago, el contenido de clorofila, aminoácidos totales, prolina y concentración de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . En la mayoría de los casos se obtuvieron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) por efecto de cultivar y efectos significativos ($p \leq 0.05$) por estrés osmótico, a excepción de la concentración de Ca^{2+} en raíz, que no presentó diferencias significativas por factores de estudio.

Mientras que por efecto de su interacción (cultivar x estrés), las diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$) para la altura de vástago, longitud de raíz, contenido de clorofila a, la relación a/b, aminoácidos totales, concentración de K^+ y Mg^{2+} en vástago y concentración de Ca^{2+} en raíz; para el resto de las variables, los efectos fueron significativos.

Cuadro 1. Efecto de los factores cultivar, estrés osmótico y su interacción en cada una de las variables evaluadas en este estudio.

Variables	Fuente de variación		
	Cultivar	Estrés osmótico	Cultivares x Estrés
Grados de libertad	3	2	6
Altura de vástago	**	**	ns
Longitud de raíz	**	**	ns
Peso fresco de vástago	**	**	**
Peso fresco de raíz	**	**	*
Peso seco de vástago	**	**	**
Peso seco de raíz	**	**	**
Relación raíz/vástago de peso fresco	**	**	**
Relación raíz/vástago de peso seco	**	**	*
Contenido de clorofila a	**	**	*
Contenido de clorofila b	**	**	ns

Variables	Fuente de variación		
	Estrés		
	Cultivar	osmótico	Cultivares x Estrés
Contenido de clorofila a+b	**	**	*
Contenido de clorofila a/b	**	*	ns
Aminoácidos totales	**	**	ns
Contenido de prolina	**	**	**
Concentración de Na ⁺ en vástago	*	**	**
Concentración de K ⁺ en vástago	*	**	ns
Concentración de Ca ²⁺ en vástago	**	**	*
Concentración de Mg ²⁺ en vástago	**	**	ns
Concentración de Na ⁺ en raíz	**	**	**
Concentración de K ⁺ en raíz	**	**	**
Concentración de Ca ²⁺ en raíz	ns	ns	ns
Concentración de Mg ²⁺ en raíz	**	*	**

ns = no significativo; * = significativo al 5%; ** = significativo al 1%

3.3.1. Efecto del estrés osmótico en el crecimiento de la planta

La sequía y salinidad reducen significativamente la altura de vástago (Figura 1) en plantas de los cuatro cultivares evaluados (Cotaxtla, Temporalero, Huimanguillo, Tres Ríos).

Por el contrario, no se encontraron diferencias en la longitud de raíz, excepto en el cultivar Huimanguillo, el cual mostró menor longitud de raíz en las plantas crecidas bajo estrés osmótico comparado con el control.

De los cuatro cultivares evaluados, el cultivar Temporalero resultó ser de porte bajo ya que presentó la menor altura de vástago, mientras que los otros tres cultivares presentaron una altura semejante. La menor longitud de vástago fue encontrada en el cultivar Huimanguillo.

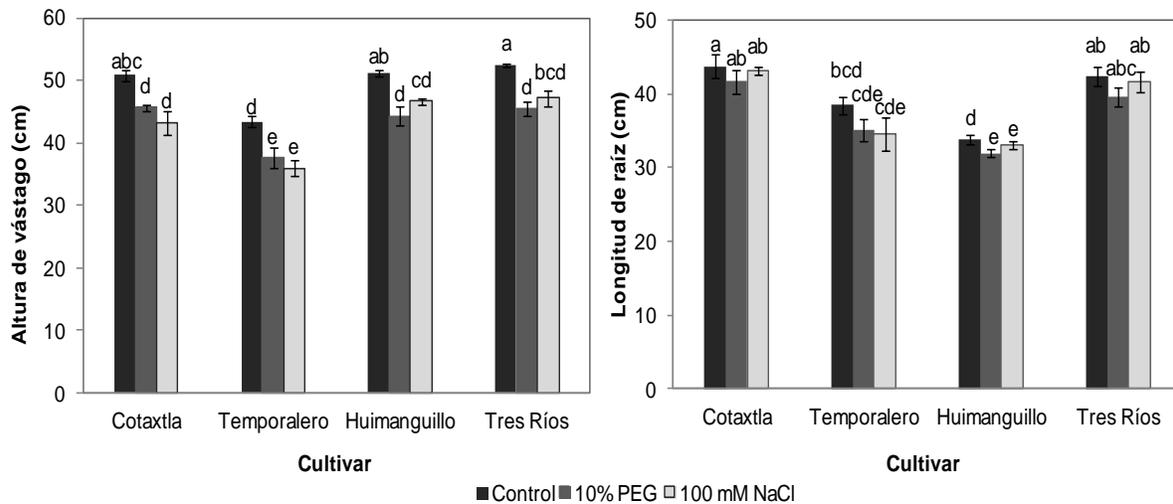


Figura 1. Altura de vástago y raíz de plantas de cuatro cultivares mexicanos de arroz sometidas a sequía (10% PEG) y salinidad (100mM NaCl) durante 15 días.

Medias con letras distintas en cada subfigura, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Barras sobre las columnas indican desviación estándar.

La reducción en el crecimiento, principalmente de las hojas, es de los primeros efectos visibles bajo condiciones de estrés osmótico, esto debido a que la salinidad puede modificar la tasa de diferenciación de hojas, así como la duración del periodo de expansión, lo que define la tasa de crecimiento y la tasa de senescencia (Taleisnik *et al.*, 2009).

En este trabajo encontramos que las plantas crecidas en condiciones de estrés osmótico tuvieron hojas más pequeñas, con menor número de macollos y un envejecimiento prematuro (senescencia) comparado con el testigo (Figura 2). Además, observamos reducción del área foliar, enrollamiento de las hojas, y acumulación de osmoprotectantes como prolina, el cual será abordado más adelante. Estos cambios morfológicos y fisiológicos, también, han sido reportados por Hadiarto y Tran (2011), en plantas de arroz en respuesta a sequía.

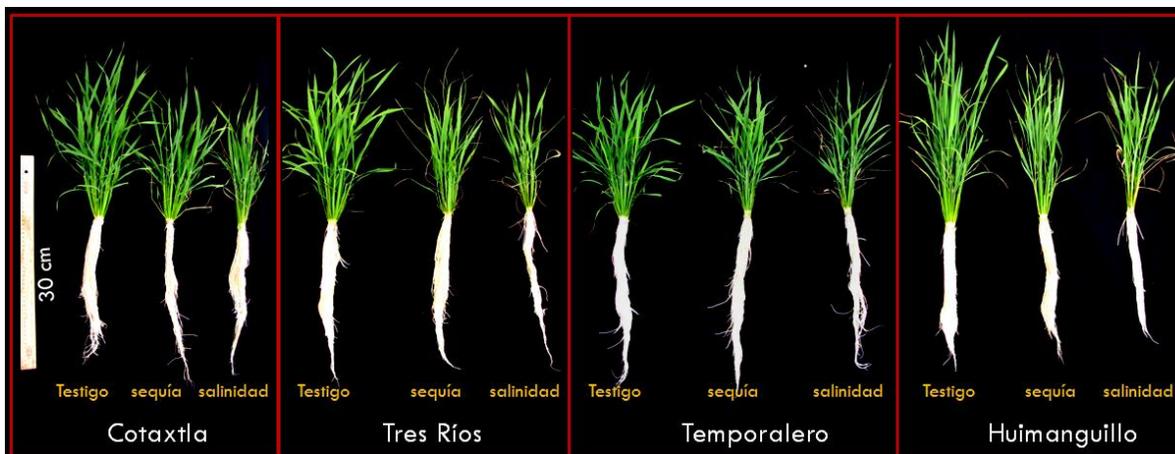


Figura 2. Efecto del estrés osmótico ocasionado por sequía y salinidad en el crecimiento de cuatro cultivares mexicanos de arroz, 15 días después de la aplicación de tratamientos.

3.3.2. Acumulación de peso fresco y peso seco

El peso fresco y seco de plantas de arroz, de los cultivares mexicanos: Cotaxtla, Temporalero, Huimanguillo, Tres Ríos, se presenta en la Cuadro 2. La aplicación de estrés osmótico (10% PEG y 100 mM NaCl) en el medio de crecimiento redujo significativamente ($p \leq 0.05$) el peso fresco de vástago y raíz, el mismo comportamiento se obtuvo en el peso seco. En los cuatro cultivares evaluados, el estrés osmótico provocó la reducción en el peso fresco de vástago superior al 30%. Mientras que, el peso fresco de raíz fue reducido de manera variable; en Cotaxtla y Huimanguillo las reducciones fueron alrededor del 20%, en Tres Río mayor a 25% y Temporalero del 16% con salinidad y del 32% con sequía, en todos los casos comparado con el testigo.

El peso seco de vástago (Cuadro 2) fue disminuido en más del 20% en Cotaxtla, Huimanguillo y Tres Ríos; mientras que en Temporalero fue superior al 30%. En el peso seco de raíz, Cotaxtla fue menos afectada por el estrés osmótico ya que tuvo reducciones del 7% y 12% (sequía y salinidad, respectivamente), los otros cultivares presentaron reducciones que fluctuaron del 16 al 29%. Todas las reducciones fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). Resultados semejantes se han obtenido en otros cultivares de arroz como Nipponbare, Taipei 309, IR57311 y LC-93-4, los cuales fueron sometidos a sequía durante 19 días

(Degenkolbe *et al.*, 2009). Por otro lado, otros cultivares (IR632, IR651 e IR29) que fueron sometidos a estrés salino por 14 días tuvieron reducciones del 16, 17 y 73%, respectivamente, en el peso seco de vástago (Moradi e Ismail, 2007) en comparación con el testigo.

Cuadro 2. Efecto de la sequía (10% PEG) y salinidad (100 mM NaCl) en el peso fresco y seco de vástago y raíz de plantas de cuatro cultivares de arroz, a los 15 días de ser sometidos a estrés.

Cultivar	Estrés	Peso fresco (g planta ⁻¹)			Peso seco (g planta ⁻¹)		
		Vástago	Raíz	Total	Vástago	Raíz	Total
Cotaxtla	Control	30.19 a	21.32 a	51.52 a	6.23 a	2.30 a	8.53 a
	10% PEG	20.04 de	16.71 bc	36.75 cd	4.81 cd	2.13 bcd	6.94 bc
	100 mM NaCl	20.50 d	17.28 b	37.78 c	4.49 cde	2.03 bc	6.52 cd
Temporalero	Control	26.56 bc	17.79 b	44.35 b	5.12 bc	1.72 cde	6.84 c
	10% PEG	13.78 f	12.03 e	25.81 g	3.36 f	1.36 f	4.72 f
	100 mM NaCl	14.56 f	14.79 cd	29.35 fg	3.42 f	1.30 f	4.72 f
Huimanguillo	Control	28.99 ab	17.74 b	46.73 b	5.53 ab	2.09 b	7.62 b
	10% PEG	19.39 de	13.67 de	33.06 de	4.52 de	1.76 de	6.28 cd
	100 mM NaCl	18.65 de	12.91 de	31.56 ef	3.99 ef	1.49 f	5.48 ef
Tres Ríos	Control	26.16 c	18.09 b	44.25 b	5.68 ab	2.02 b	7.70 b
	10% PEG	18.03 de	13.52 de	31.55 ef	4.28 de	1.60 de	5.88 de
	100 mM NaCl	17.38 e	13.34 cd	30.72 ef	4.74 cd	1.68 de	6.42 cd

Medias con letras distintas, en cada columna, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Como una consecuencia del estrés osmótico hubo reducción en el peso fresco y seco de las plantas de los cuatro cultivares de arroz (Cuadro 2), lo que provocó que las relaciones raíz/vástago de los cultivares Cotaxtla y Temporalero incrementaran significativamente, mientras que en Huimanguillo y Tres Ríos no tuvieron efectos significativos en estas variables (Figura 3). Lo que podría indicar que los cultivares que incrementaron las relaciones raíz/vástago (Cotaxtla y Temporalero) muestran mejores respuestas adaptativas al estrés, sobre todo a la

salinidad, ya que mientras el crecimiento del vástago se inhibe el crecimiento de la raíz se mantiene (Albacete *et al.*, 2008).

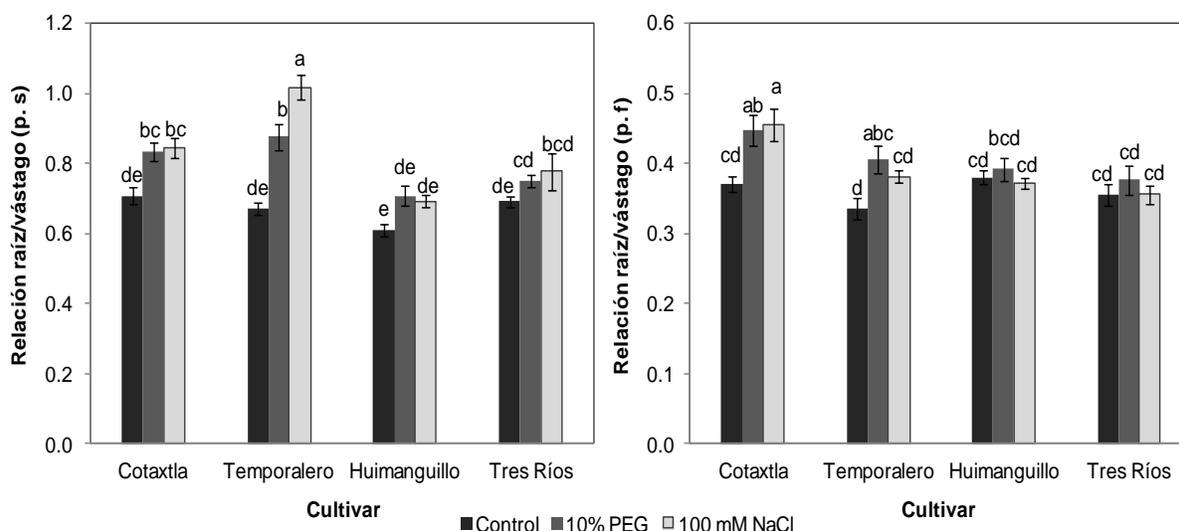


Figura 3. Relación raíz/vástago del peso fresco y peso seco de plantas de cuatro cultivares de arroz tratados con 10% PEG (sequía) y 100 mM NaCl (salinidad) por 15 días.

Medias con letras distintas en cada subfigura, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Barras sobre las columnas indican desviación estándar.

3.3.3. Contenido de clorofila

La salinidad redujo significativamente ($p \leq 0.05$) el contenido total de clorofila (a+b) y clorofila a en todos los cultivares estudiados (Cuadro 3), mientras que la sequía no tuvo efectos significativos ($p > 0.05$). El contenido de clorofila b sólo fue afectado por la salinidad en los cultivares Cotaxtla y Temporalero; lo que sugiere que, la reducción en el contenido total de clorofila está atribuido principalmente a la destrucción de la clorofila a, la cual resultó más sensible a la salinidad que la clorofila b. Mientras que la sequía no tuvo efectos negativos en el contenido de clorofila b. Resultados semejantes han sido reportados en trigo (Peng *et al.*, 2009), donde los cultivares JN177 y SR3 presentaron reducciones significativas en el contenido de clorofila a y b bajo condiciones de salinidad (200 mM NaCl); mientras que estrés por sequía (18% PEG, w/v) no se obtuvieron efectos negativos.

Cuadro 3. Contenido de clorofila (mg g^{-1} peso fresco) en hojas de cuatro cultivares de arroz crecidos bajo sequía (10% PEG) y salinidad (100 mM NaCl) a los 15 días de ser sometidos a estrés.

Cultivar	Estrés Osmótico	Contenido de clorofila (mg g^{-1} peso fresco)			
		A	b	a + b	a/b
Cotaxtla	Control	3.44 abc	1.37 a	4.81 ab	2.52 b
	10% PEG	3.24 bc	1.23 ab	4.48 bc	2.63 b
	100 mM NaCl	2.81 d	1.08 b	3.89 e	2.59 b
Temporalero	Control	3.50 abc	1.35 a	4.85 ab	2.60 b
	10% PEG	3.44 abc	1.22 ab	4.67 bc	2.82 ab
	100 mM NaCl	2.89 d	1.06 b	3.96 de	2.73 ab
Huimanguillo	Control	3.73 a	1.43 a	5.16 a	2.62 b
	10% PEG	3.58 ab	1.26 ab	4.84 ab	2.85 ab
	100 mM NaCl	3.36 bc	1.28 ab	4.64 bc	2.64 b
Tres Ríos	Control	3.60 ab	1.26 ab	4.87 ab	2.87 ab
	10% PEG	3.37 bc	1.07 b	4.43 bc	3.19 a
	100 mM NaCl	3.24 c	1.11 b	4.36 cd	2.93 ab

Medias con letras distintas, en cada columna, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

3.3.4. Contenido de aminoácidos en hojas

El contenido de aminoácidos solubles incrementó con la aplicación del estrés por sequía (10% PEG) y salinidad (100 mM NaCl) en casi todos los cultivares evaluados, excepto en Tres Ríos que sólo presentó acumulación significativa bajo estrés salino (Figura 4). Dichos incrementos fueron superiores al 12% cuando las plantas crecieron bajo sequía, mientras que bajo estrés salino el contenido de aminoácidos fluctuó entre el 18% (Tres Ríos) y 29% (Temporalero), respectivamente, siendo en todos los casos, estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) con respecto al testigo. Estos resultados, son congruentes con lo reportado por Ashraf y Harris (2004) quienes indican que la acumulación de aminoácidos totales en hojas se incrementa en plantas expuestas a salinidad.

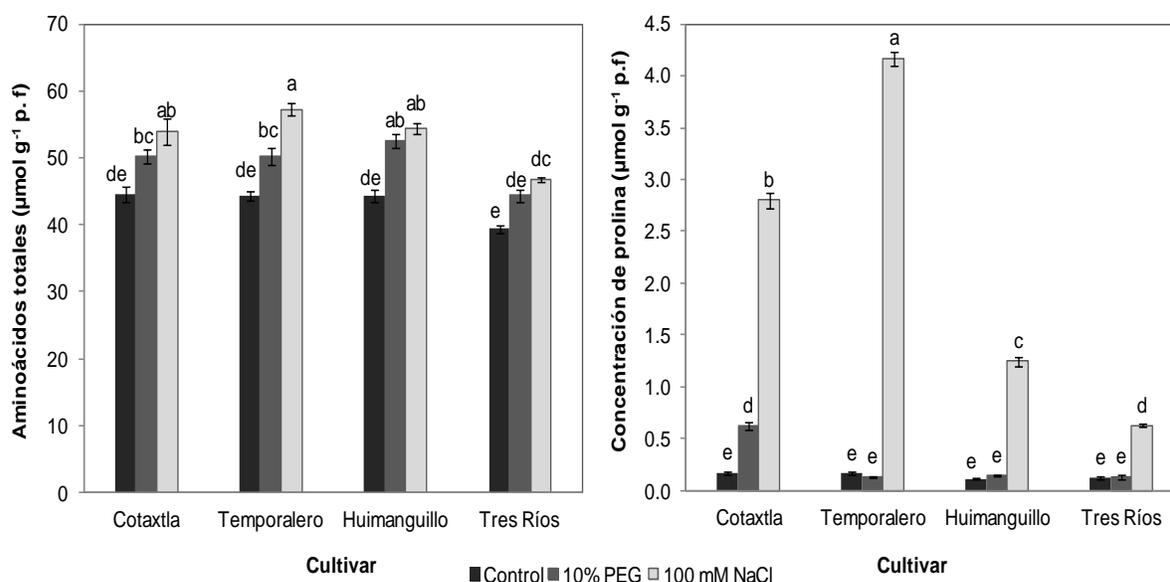


Figura 4. Contenido de aminoácidos totales y prolina en hojas de cuatro cultivares de arroz tratados con 10% PEG (sequía) y 100 mM NaCl (salinidad) por 15 días. Medias con letras distintas en cada subfigura, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Barras sobre las columnas indican desviación estándar.

La prolina es uno de los aminoácidos involucrados en la regulación del potencial osmótico en células vegetales. Según Ashraf y Harris (2004), la acumulación de prolina es una de las características comunes en muchas monocotiledóneas bajo estrés salino. En el presente estudio, sólo el cultivar de arroz Cotaxtla mostró un incremento de 362% en el contenido de prolina cuando las plantas fueron expuestas a sequía (Figura 4).

Por otro lado, la salinidad provocó incrementos en el contenido de prolina de todos los cultivares estudiados en comparación con el testigo. Estos aumentos fueron de cinco veces en el cultivar Tres Ríos, 10 veces en Huimanguillo, 16 veces en Cotaxtla y 25 veces en Temporalero. Resultados semejantes se obtuvieron en los cultivares de arroz IR29 e IR651, donde el contenido de prolina incrementó el 369 y 35%, respectivamente, bajo condiciones de salinidad (Moradi e Ismail, 2007).

De manera general, se ha relacionado que la acumulación de prolina es superior en los cultivares tolerantes que en los susceptibles (Zhu *et al.*, 2008).

3.3.5. Concentración de cationes en vástago y raíz

De manera general, la concentración de Na^+ en vástago y raíz en los cuatro cultivares evaluados incrementó significativamente ($p \leq 0.05$) al aplicar 100 mM de NaCl en la solución de crecimiento (Figura 5), esto comparado con el testigo, en los cuatro cultivares evaluados. Mientras que la aplicación de 10% de PEG ocasionó sólo en el vástago del cultivar Temporalero incrementos significativos en la concentración de Na^+ .

En vástago, la concentración de Na^+ sólo fue estadísticamente menor en el cultivar Temporalero, el mismo comportamiento fue obtenido en raíz; no obstante, la concentración más alta fue obtenida en Cotaxtla. Resultados semejantes se han obtenido en otros cultivares de arroz crecidos bajo condiciones de salinidad, tales como FL478 e IR29 (Walia *et al.*, 2005), IR632, IR651 e IR29 (Moradi e Ismail, 2007) y en cultivares de trigo K-65 y HD 2329 (Sharma *et al.*, 2005), estos investigadores reportan que cultivares de trigo tolerantes y susceptibles de salinidad siguen diferentes estrategias de adaptación, por lo que indican que HD 2329 (sensible) presentó menor concentración de Na^+ en raíz lo que involucra un mecanismo de exclusión de Na^+ , mientras que K-65 (tolerante) se comporta como acumuladora de este ión. En este sentido, Cotaxtla sería un cultivar tolerante al acumularse Na^+ en raíz.

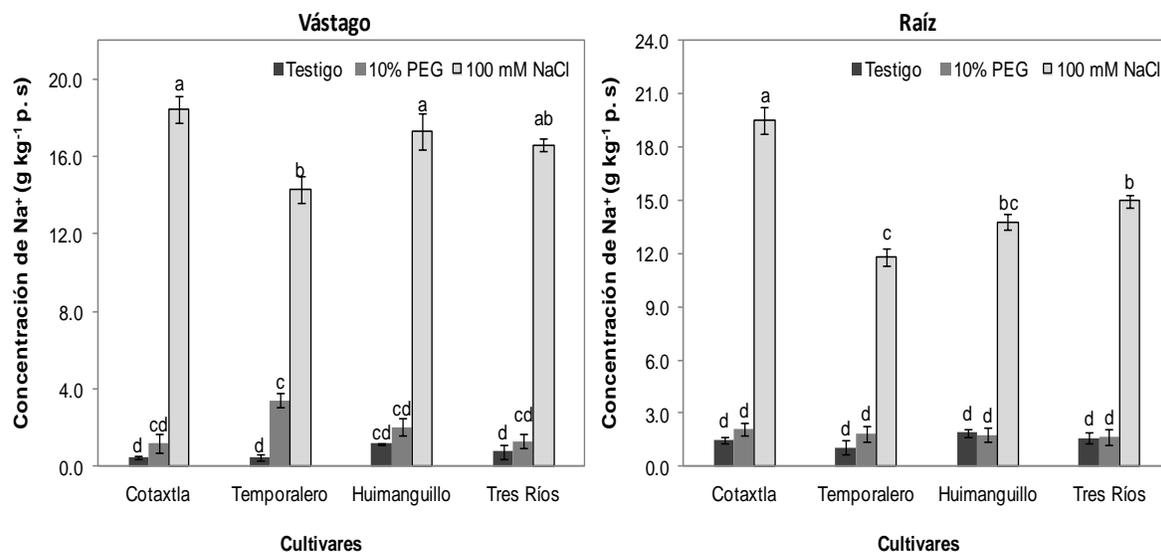


Figura 5. Concentración de Na⁺ en vástago y raíz en cuatro cultivares mexicanos de arroz: Cotaxtla, Temporalero, Huimanguillo y Tres Ríos, crecidos en condiciones de sequía (10% PEG) y salinidad (100 mM NaCl) por 15 días. Medias con letras distintas en cada subfigura, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Barras sobre las columnas indican desviación estándar.

En el caso de la concentración de K⁺ en vástago, todos los cultivares evaluados tuvieron reducciones significativas bajo condiciones de sequía y salinidad. Por el contrario, en raíz, los cultivares Cotaxtla y Temporalero no redujeron su concentración de K⁺ bajo ambos estreses; a diferencia de Huimanguillo que tuvo reducciones significativas en condiciones de salinidad; y en Tres Ríos, la concentración de K⁺ disminuyó drásticamente tanto en sequía como salinidad, en todos los casos comparado con respecto al testigo. La reducción en la concentración de K⁺ es el resultado de la habilidad que tiene el Na⁺ para competir con el K⁺ en los sitios de unión esenciales para las funciones celulares, lo que conduce a una toxicidad metabólica (Tester y Davenport, 2003). En otros cultivares de arroz como FL478 e IR29 (Walia *et al.*, 2005) se obtuvieron resultados similares, en ambos cultivares, la concentración de K⁺ se redujo en condiciones de salinidad. A diferencia del cultivar tolerante de trigo (K-65) que

mantuvo altas concentraciones de K^+ en vástago y raíz comparado con el cultivar sensible (HD 2329) (Sharma *et al.*, 2005).

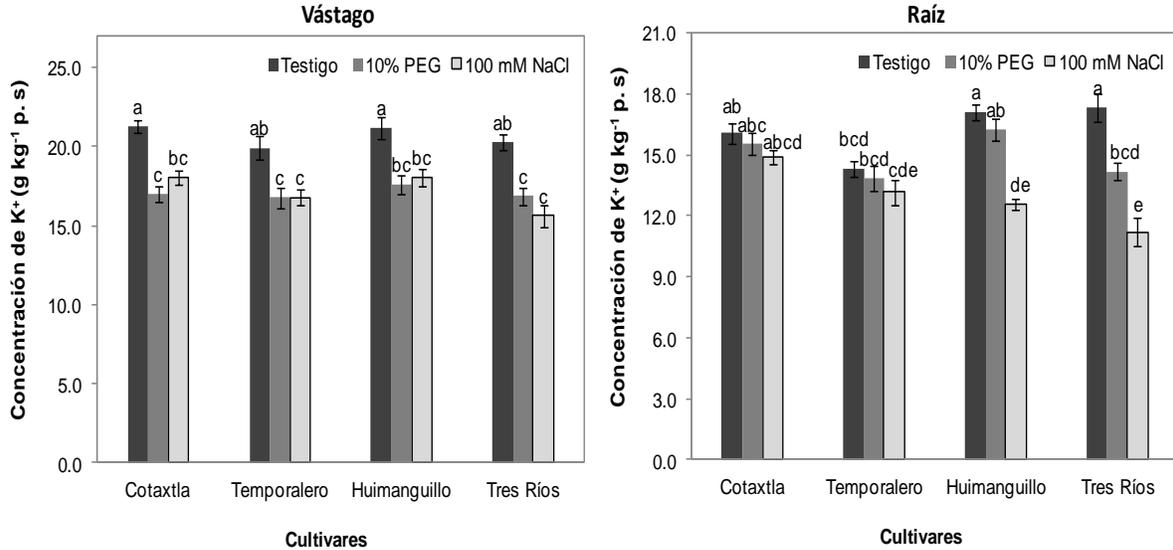


Figura 6. Efecto de sequía (10% PEG) y salinidad (100 mM NaCl) en la concentración de K^+ en vástago y raíz en cuatro cultivares mexicanos de arroz Cotaxtla, Temporalero, Huimanguillo y Tres Ríos, crecidos bajo condiciones de estrés durante 15 días.

Medias con letras distintas en cada subfigura, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Barras sobre las columnas indican desviación estándar.

Otro efecto relacionado con la salinidad, y específicamente como resultado de altas concentraciones de Na^+ , es el desbalance iónico debido a una acumulación excesiva de Na^+ lo que reduce la absorción de otro nutrientes minerales como K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} (Sudhir y Murthy, 2004). Sin embargo, los resultados obtenidos en la concentración Ca^{2+} , en raíz, no presentan cambios significativos (Cuadro 4). No así en vástago, ya que bajo condiciones de salinidad se tuvieron reducciones en la concentración de Ca^{2+} , lo que podría resultar en un desplazamiento del Ca^{2+} por Na^+ en la membrana plasmática. Estos resultados son semejantes a los obtenidos en sorgo (Netondo *et al.*, 2004), donde encontraron que el transporte de Ca^{2+} es afectado por el NaCl debido a una

interacción iónica, el Na^+ induce una baja concentración de Ca^{2+} en el fluido del xilema y como consecuencia, menor disponibilidad de éste hacia los tejidos foliares.

Los resultados obtenidos de la concentración de Mg^{2+} en vástago (Cuadro 4) no tuvieron reducciones significativas por efectos de sequía o salinidad. Esta respuesta también es observada en raíz, con excepción del cultivar Tres Ríos, el cual tuvo reducciones significativas comparadas con el testigo. Lo que podría indicar que el Na^+ no excluye al Mg^{2+} del sistema de absorción y tampoco afecta su movimiento vía xilema. En sorgo (Netondo *et al.*, 2004), se reporta que las concentraciones de Mg^{2+} en raíz no tuvieron un comportamiento claro al incrementar la salinidad.

Cuadro 4. Concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} (mg kg^{-1} peso seco) en vástago y raíz de cuatro cultivares de arroz crecidos bajo sequía (10% PEG) y salinidad (100mM NaCl) durante 15 d.

Cultivar	Estrés	Concentración (g kg^{-1} peso seco)			
		Ca^{2+}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Mg^{2+}
		Vástago		Raíz	
Cotaxtla	Control	5.82 abc	4.62 cdef	2.38 a	1.57 ab
	10% PEG	4.64 de	3.89 e	2.08 a	1.35 bcd
	100mM NaCl	5 bcd	4.57 def	2.17 a	1.49 abc
Temporalero	Control	6.27 ab	6.34 ab	1.98 a	1.15 d
	10% PEG	5.99 ab	5.55 bcd	2.10 a	1.22 dc
	100mM NaCl	5.45 bcd	5.63 abc	2.20 a	1.32 bcd
Huimanguillo	Control	6.6 a	6.59 a	2.24 a	1.59 ab
	10% PEG	4.98 cde	5.15 cde	2.17 a	1.69 a
	100mM NaCl	4.82 de	5.46 bcde	1.95 a	1.5 abc
Tres Ríos	Control	5.85 abc	5.35 bcde	2.28 a	1.61 ab
	10% PEG	4.49 de	4.44 ef	1.98 a	1.14 d
	100mM NaCl	4.42 e	4.61 cdef	1.95 a	1.35 bcd

Medias con letras distintas, en cada columna, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

3.5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio indican que los cuatro cultivares de arroz evaluados mostraron mayor sensibilidad a la salinidad que a la sequía, debido a la toxicidad iónica del Na. Sin embargo, Cotaxtla mostró mecanismos de tolerancia a la sequía y salinidad ya que mantuvo el crecimiento de la raíz, a pesar de que el crecimiento del vástago fue inhibido, lo que permitió que incrementara la relación raíz/vástago como adaptación al estrés osmótico. Además, la concentración de prolina incrementó significativamente tanto en sequía como en salinidad, y debido a que este aminoácido es considerado un osmorregulador, su acumulación contribuye a la estabilidad de la membrana y a mitigar el efecto del NaCl, por lo que su acumulación funciona como otro mecanismo de tolerancia al estrés osmótico. Adicionalmente, el cultivar Cotaxtla no presentó disminuciones significativas en la concentración de K⁺ en raíz, lo que podría evitar que el Na⁺ remplace al K⁺ y reducir la inactivación de enzimas que afecten los procesos metabólicos y así mantener el crecimiento de la planta.

3.6. LITERATURA CITADA

- Albacete, A., M. E. Ghanem, C. Martínez-Andújar, M. Acosta, J. Sánchez-Bravo, V. Martínez, S. Lutts, I. C. Dodd, and F. Pérez-Alfocea.** 2008. Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Journal of Experimental Botany*, 59:4119-4131.
- Alcántar G., G. y M. Sandoval V.** 1999. Manual de Análisis Químico de Tejido Vegetal. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo A.C. Publicación especial No. 10. Chapingo México. 156 p.
- Ashraf, M. and P. J. C. Harris.** 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, 166:3-16.
- Arnon, D. I.** 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts - polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24:1-15.

- Bartels, D. and R. Sunkar. 2005.** Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24:23-58.
- Bates, L. S., R. P. Waldren and I. D. Teare. 1973.** Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39:205-207.
- Chinnusamy, V., K. Schumaker and J. K. Zhu. 2004.** Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 55:225-236.
- Degenkolbe, T., D. P. Thi, E. Zuther, D. Repsilber, D. Walther, D. K. Hinch, K. I. and Köhl, K.I. 2009.** Expression profiling of rice cultivars differing in their tolerance to long-term drought stress. *Plant Molecular Biology*, 69:133-153.
- Demiral, T. and I. Türkan. 2005.** Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 53:247-257.
- Gao, J. P., D. Y. Chao and H. X. Lin. 2007.** Understanding Abiotic Stress Tolerance Mechanisms: Recent Studies on Stress Response in Rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49:742-750.
- Ghoulam, C., A. Foursy and K. Fares. 2002.** Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 47:39-50.
- Hadiarto, T. and L. S. P. Tran. 2011.** Progress studies of drought-responsive genes in rice. *Plant Cell Reports*, 30:297–310.
- Hoai, N. T. T., I. S. Shim, K. Kobayashi and U. Kenji. 2003.** Accumulation of some nitrogen compounds in response to salt stress and their relationships with salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Growth Regulation*, 41:159-164.
- Mansour, M. M. F. 2000.** Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biologia Plantarum*, 43:491-500.
- Marín, G., T., F. C. Gómez M., L. I. Trejo T., A. Muñoz O., L. Tavitas F., L. Hernández A. y A. Santacruz V. 2010.** Respuestas fisiológicas y

- nutrimentales de variedades de arroz a la concentración de aluminio. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33:37-44.
- Moradi, F. and A. M. Ismail.** 2007. Responses of Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence and ROS-Scavenging Systems to Salt Stress During Seedling and Reproductive Stages in Rice. *Annals of Botany*, 99:1161-1173.
- Murashige, T. and F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Neves-Piestun, B. G. and N. Bernstein.** 2005. Salinity-induced changes in the nutritional status of expanding cells may impact leaf growth inhibition in maize. *Functional Plant Biology*, 32:141–152.
- Netondo, G. W., J. C. Onyango and E. Beck.** 2004. Sorghum and Salinity: I. Response of Growth, Water Relations, and Ion Accumulation to NaCl Salinity. *Crop Science*, 44:797-805.
- Peng, Z., M. Wang, F. Li, H. Lv, C. Li and G. Xia.** 2009. A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat. *Molecular and Cell Proteomics*, 8:2676-2686.
- Salekdeh, G.H., J. Siopongco, L. J. Wade, B. Ghareyazie and J. Bennett.** 2002. A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. *Field Crops Research*, 76:199-219.
- Sharma, N., N. K. Gupta, S. Gupta and H. Hasegawa.** 2005. Effect of NaCl salinity on photosynthetic rate, transpiration rate, and oxidative stress tolerance in contrasting wheat genotypes. *Photosynthetica*, 43: 609-613.
- SAS.** 1990. SAS/STAT User's guide. Ver. 6.0 SAS Institute, Inc. Cary, NC 1686 p.
- Sudhir, P. and S. D. S. Murthy.** 2004. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica*, 42: 481-486.
- Taleisnik, E., A. A. Rodríguez, D. Bustos, L. Erdei, L. Ortega and M. E. Senn.** 2009. Leaf expansion in grasses under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 166: 1123-1140.
- Tester, M. and R. Davenport.** 2003. Na⁺ transport and Na⁺ tolerance in higher plants. *Annals of Botany*, 91: 503-527.
- Walia, H., C. Wilson, P. Condamine, X. Liu, A. M. Ismail, L. Zeng, S. I.**

- Wanamaker, J. Mandal, J. Xu, X. Cui and T. J. Close.** 2005. Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. *Plant Physiology*, 139:822-835.
- Zhu, J. K.** 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53:247-273.
- Zhu, J., Z. Bie and Y. Li.** 2008. Physiological and growth responses of two different salt-sensitive cucumber cultivars to NaCl stress. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54:400-407.

CAPÍTULO IV

CAPÍTULO IV.

CRECIMIENTO, ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA, CONCENTRACIÓN DE K⁺ Y Na⁺ EN PLANTAS DE ARROZ BAJO ESTRÉS SALINO

Soledad García-Morales, Libia I. Trejo-Téllez, Fernando C. Gómez-Merino, Camila Caldana, E. Braulio Herrera-Cabrera y David Espinosa-Victoria

RESUMEN

El estrés salino afecta el crecimiento y la productividad de los cultivos. En este estudio se determinó el crecimiento, el rendimiento del fotosistema II (PSII) y la concentración de K⁺ y Na⁺ en raíz, tallo, hojas viejas, y hojas jóvenes de los cultivares mexicanos de arroz: Tres Ríos y Cotaxtla. También, se determinó la relación K⁺/Na⁺ en vástago y raíz de ambos cultivares. El experimento se realizó en cámara de crecimiento, bajo condiciones controladas, con una distribución completamente al azar y un arreglo factorial 2 x 2 (Cultivar x Salinidad). Las plantas fueron crecidas en solución hidropónica durante 15 días y posteriormente una parte de ellas fueron tratadas con 100 mM de NaCl; plantas testigo (sin tratamiento con NaCl) fueron crecidas en paralelo. El estrés salino provocó reducciones del 20 y 15% en la longitud de vástago y raíz, respectivamente en el cultivar Tres Ríos; mientras que en el cultivar Cotaxtla, no se obtuvieron diferencias significativas en estas variables con respecto al testigo. El peso de materia seca fue disminuido en 24% en el cultivar Tres Ríos. El rendimiento cuántico del PSII se redujo en 30% al tercer día de la aplicación de tratamientos, en ambos cultivares. La concentración de Na⁺ fue significativamente mayor ($p \leq 0.05$) en las plantas tratadas con NaCl. En el cultivar Tres Ríos, el rendimiento del PSII disminuyó completamente después de seis días de la aplicación de tratamientos en tanto que, la concentración de K⁺ en tallo y hojas viejas también fue reducida y registró la menor relación K⁺/Na⁺ en vástago, lo que podría indicar que se trata de un cultivar más susceptible a la salinidad con respecto al cultivar Cotaxtla.

Palabras clave: *Oryza sativa*, rendimiento del fotosistema II, relación K^+/Na^+ , salinidad

4.1. INTRODUCCIÓN

La salinidad es uno de los principales problemas en la agricultura de riego y de temporal. El sistema de producción bajo riego provee cerca de un tercio de alimentos para mundo (Munns, 2002) y se estima que cerca del 20% de la superficie irrigada (45 millones de ha) es afectada por la salinidad (FAO, 2008). El estrés salino también es un problema en la agricultura de temporal, sobre todo en las áreas costeras debido que el agua salada ingresa a éstas durante la marea alta (Walia *et al.*, 2005). Se estima que el 2% de la superficie de agricultura de temporal (32 millones de ha) es afectada por salinidad (FAO, 2008). El problema de salinidad ha sido abordado a través de mejoras en las prácticas de producción y la introducción de cultivares tolerantes. Sin embargo, la implementación de un adecuado manejo del riego agrícola, en las superficies afectadas por la salinidad, ha sido económicamente no viable y difícil de implementar a larga escala (Walia *et al.*, 2005).

El estrés osmótico y la toxicidad iónica son efectos provocados por la salinidad. El estrés osmótico es el resultado de la sal presente en la solución de crecimiento que reduce la capacidad de la planta para absorber agua; mientras que, la toxicidad iónica es causada por una cantidad excesiva de sales que entran al flujo de transpiración dañando las células de las hojas. La reducción en el crecimiento y la fotosíntesis son los principales efectos del estrés salino (Munns *et al.*, 2006). La habilidad de las plantas para desarrollarse bajo salinidad es una característica que determina la distribución de los cultivos y su productividad en muchas áreas, lo que es importante para entender los mecanismos que confieren tolerancia en ambientes salinos (Pattanagul y Thitisaksakul, 2008).

En general, el arroz muestra variabilidad en cuanto a su sensibilidad a la salinidad excesiva, en sus diferentes estados de crecimiento. El arroz es considerado una especie relativamente tolerante a la salinidad en el estado de

germinación, mientras que durante el estado vegetativo y la etapa temprana es más sensibles a la salinidad, afectando directamente su rendimiento (Zeng, 2004).

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del estrés salino en el crecimiento y actividad fotosintética de plantas de dos cultivares de arroz mexicanos (Tres Ríos y Cotaxtla) durante la etapa vegetativa (macollaje). También se determinó la concentración de K^+ y Na^+ en raíz, tallo, hojas viejas y hojas jóvenes de plantas crecidas bajo condiciones controladas, así como la relación K^+/Na^+ en vástago y raíz, con la finalidad de identificar el nivel de tolerancia a la salinidad.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron dos cultivares de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*), Cotaxtla y Tres Ríos provenientes del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Zacatepec, Morelos. El experimento se realizó en el Instituto Max Planck de Fisiología Molecular de Plantas, en Golm, Alemania.

Las semillas de los dos cultivares fueron esterilizadas superficialmente con etanol al 70% por 5 min y posteriormente desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 3% y una gota de Tween20 durante 30 min para después ser lavadas con agua estéril cinco veces y secadas en papel filtro. Los embriones secos fueron colocados en un frasco con medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 3% (p/v) de sacarosa y solidificado con 0.8% de agar.

Para la germinación, los frascos fueron sometidos a oscuridad cinco días a 28 °C. Después, las semillas germinadas fueron transferidas a un cuarto de cultivo de tejidos bajo condiciones controladas (16 h luz a $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 22 °C, 8 h de oscuridad y humedad relativa del 70%) durante siete días. Doce días después de sembrar las semillas, las plantas fueron trasplantadas a recipientes conteniendo 10 L de solución nutritiva conteniendo 1.43 mM NH_4NO_3 , 1.00 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.64 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.13 mM K_2SO_4 , 0.32 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.00 mM Fe-EDTA, 7.99 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.15 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.15 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.075

μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $1.39 \mu\text{M}$ H_3BO_3 (Yang *et al.*, 1994). El pH de la solución nutritiva se mantuvo entre 5.5 y 6.0. La solución nutritiva fue renovada cada 5 d.

La aplicación de tratamientos se inició 15 d después de haber transferido las plantas a la solución nutritiva. Se evaluaron dos concentraciones de NaCl, 0 (testigo) y 100 mM en los dos cultivares de arroz.

Se determinó la actividad fotosintética con el fluorómetro portátil PAM-2000 (Walz, Alemania), sin adaptación a la oscuridad. Las mediciones se realizaron en la segunda hoja totalmente expandida, antes de la aplicación de los tratamientos, 1, 3, 5 y 6 d después del inicio del estrés salino. Seis días después de la aplicación de tratamientos, las plantas fueron cosechadas y separadas en vástago y raíz para determinar su longitud, peso fresco y peso seco. Las raíces fueron enjuagadas dos veces para eliminar los residuos de sales, provenientes de la solución nutritiva. El peso seco se determinó 48 h después de haber secado las muestras a 70°C en una estufa de circulación de aire forzado. Para determinar la concentración de potasio (K^+) y sodio (Na^+), las plantas fueron divididas en raíz, tallo, hojas viejas y hojas jóvenes. Las muestras secas fueron sometidas a digestión húmeda con una mezcla de ácidos perclórico y nítrico (Alcántar y Sandoval, 1999), los extractos obtenidos fueron leídos en un equipo de espectrometría de emisión atómica de inducción por plasma (ICP-AES) marca VARIANTM modelo Liberty II. Mientras que, la relación K^+/Na^+ fue obtenida del contenido de estos iones en vástago y raíz, en función de la concentración y del peso de materia seca.

Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS ver. 9.0 (SAS Institute, 1990) bajo un diseño completamente al azar en un arreglo factorial 2 X 2 (Cultivar X Concentración), resultando de la combinación de niveles cuatro tratamientos con 12 repeticiones cada uno. Una planta fue considerada como la unidad experimental. Para determinar las diferencias estadísticas se hizo un análisis de varianza y comparación de medias mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95%.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Crecimiento de raíz y vástago

Por efecto de cultivar no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en la longitud de vástago, sin embargo, por concentración de NaCl y su interacción con el cultivar se obtuvieron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$). Para el caso de la longitud de raíz, las tres fuentes de variación presentaron diferencias significativas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto de cultivar, concentración de NaCl y su interacción, en la longitud de vástago y raíz de plantas de dos cultivares de arroz.

Fuente de variación	Grados de libertad	Longitud	
		Vástago	Raíz
Cultivar	1	ns	**
Concentración de NaCl	1	**	**
Cultivar x Concentración de NaCl	1	**	*

ns = no significativo; * = significativo al 5%; ** = significativo al 1%

La salinidad, empleada (100 mM NaCl), redujo significativamente ($p \leq 0.05$) la longitud del vástago y de la raíz del cultivar Tres Ríos (20 y 15% respectivamente, en comparación con el testigo) como se observa en la Figura 1. Comparativamente, en el cultivar Cotaxtla no se encontraron reducciones significativas ($p > 0.05$) en la longitud de vástago y raíz en presencia de NaCl. Resultados similares se han obtenidos en los cultivares de arroz BR11, BR23, BR29 y BR1 (Alam *et al.*, 2004), IR36 (Gong *et al.*, 2006); donde, los síntomas de daño causado por la salinidad aparecieron principalmente en las hojas viejas, observándose que la parte superior de las hojas fue enrollada, las puntas se marchitaron y mostraron necrosis, como se observa en la Figura 2. Lo antes expuesto se debe a la acumulación de concentraciones tóxicas de Na^+ en las hojas maduras (Munns y Tester, 2008).

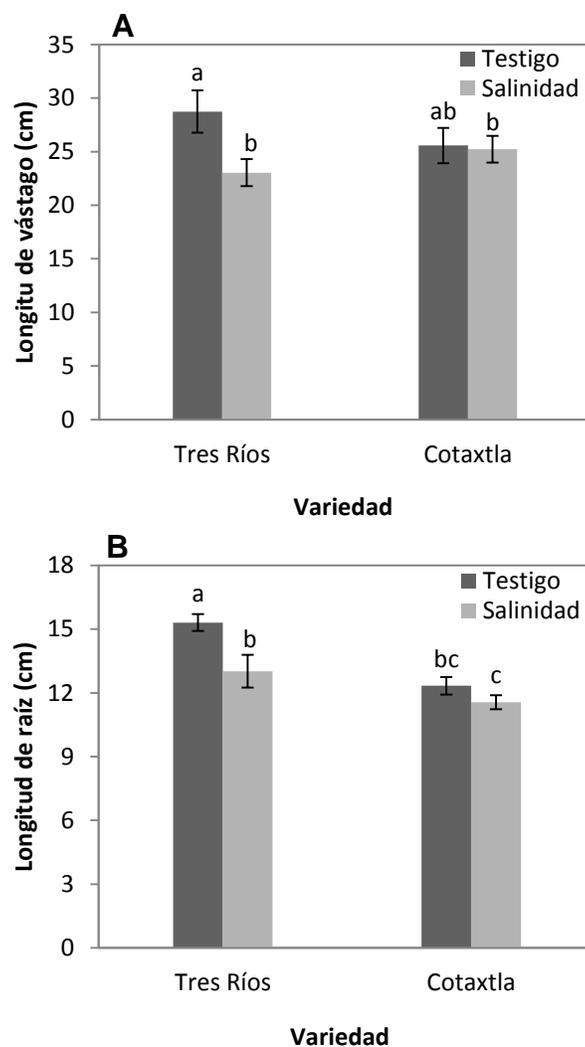


Figura 1. Efecto de la salinidad en la longitud de vástago (A) y raíz (B) de plantas de los cultivares mexicanos de arroz Tres Ríos y Cotaxtla, a los seis días de tratamiento.

Medias con letras distintas en cada subfigura, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Barras sobre las columnas indican desviación estándar.

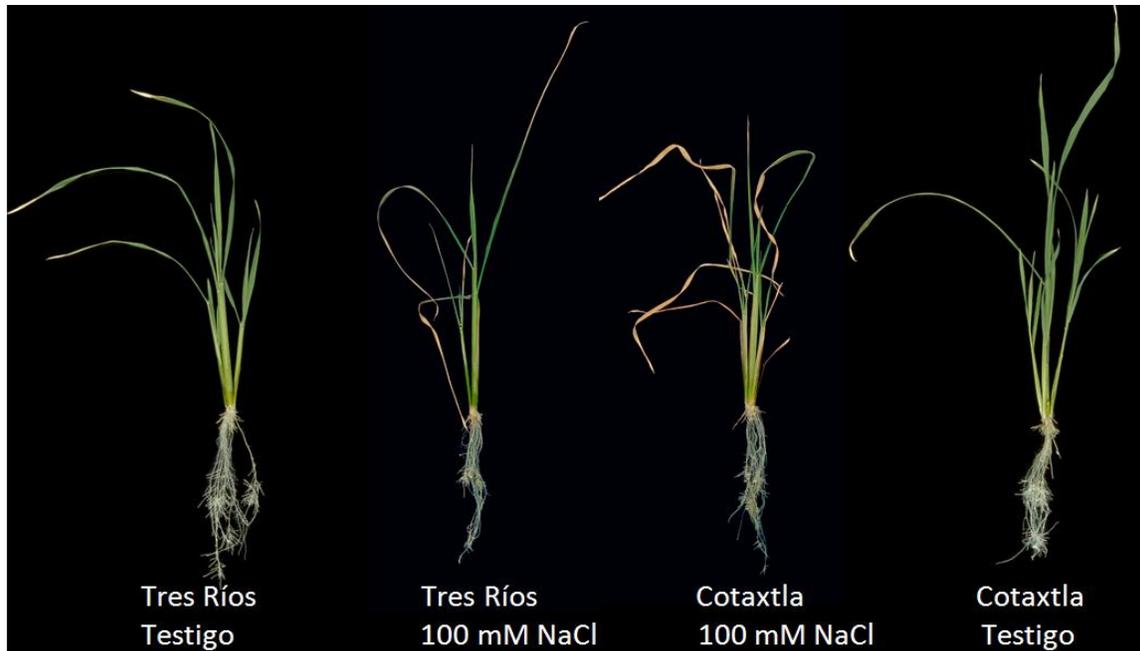


Figura 2. Plantas de arroz de los cultivares mexicanos Tres Ríos y Cotaxtla, 30 días después de la germinación y 6 días después de haber sido sometidas a 0 (testigo) y 100 mM de NaCl.

Jamil *et al.* (2006) encontraron una relación directa entre la reducción en la longitud de vástago y raíz con el incremento en la concentración de sales en el medio de crecimiento, esta tendencia fue observada en el cultivar Tres Ríos. Estos autores, indican que las variables antes mencionadas son indicadores importantes del estrés salino, debido a que la raíz está en contacto directo con el medio de crecimiento y absorbe el agua de éste, suministrándola al resto de la planta. Por lo tanto, la longitud de vástago y raíz proporciona un indicio de la respuesta de las plantas a la salinidad.

4.3.2. Producción de biomasa

En el peso de materia fresca de vástago y raíz se encontraron efectos altamente significativos ($p \leq 0.01$) con la fuente de variación cultivar y concentración de NaCl. Resultados semejantes se obtuvieron en el peso de materia fresca de raíz con el efecto de la interacción cultivar x concentración de

NaCl, contrario a lo registrado en vástago donde no se encontró diferencia significativa (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de los factores cultivar, concentración de NaCl y su interacción sobre el peso de materia fresca de vástago y raíz en plantas de arroz.

Fuente de variación	Grados de libertad	Peso de materia fresca	
		Vástago	Raíz
Cultivar	1	**	**
Concentración de NaCl	1	**	**
Cultivar x Concentración de NaCl	1	ns	**

ns = no significativo; * = significativo al 5%; ** = significativo al 1%

El estrés salino (100 mM NaCl) redujo significativamente el peso de materia fresca de vástago en ambos cultivares (Figura 3A); el cultivar Tres Ríos tuvo 31% menos peso de materia fresca en vástago y el cultivar Cotaxtla tuvo 22% menos, en los dos casos con respecto al testigo. Mientras que en la variable peso fresco de la raíz (Figura 3B) sólo fue afectado el cultivar Tres Ríos al mostrar una disminución significativa ($p \leq 0.05$) del 27% en comparación con el testigo.

El cultivar Cotaxtla no presentó diferencias con respecto al peso de materia seca de vástago y raíz, después de seis días de la aplicación de 0 y 100 mM NaCl. Esta respuesta se ha reportado en otros cultivares de arroz (IR632, IR651 e IR29), donde las plantas sometidas a estrés salino por una semana no presentan efectos negativos. Sin embargo, después de dos semanas de tratamiento con sales, el crecimiento se redujo significativamente en los tres cultivares (Moradi e Ismail, 2007).

Kumar *et al.* (2009) evaluaron 11 cultivares de arroz bajo condiciones de salinidad, y encontraron que los cultivares tolerantes presentan mayor altura de planta y peso de materia seca. En este contexto, el cultivar Cotaxtla no presentó los valores más altos de longitud de vástago y raíz, pero tampoco tuvo reducciones significativas ($p > 0.05$) en longitud de planta, peso fresco de raíz y

peso seco de vástago y raíz, lo que podría indicar que se trata de un cultivar tolerante a la salinidad.

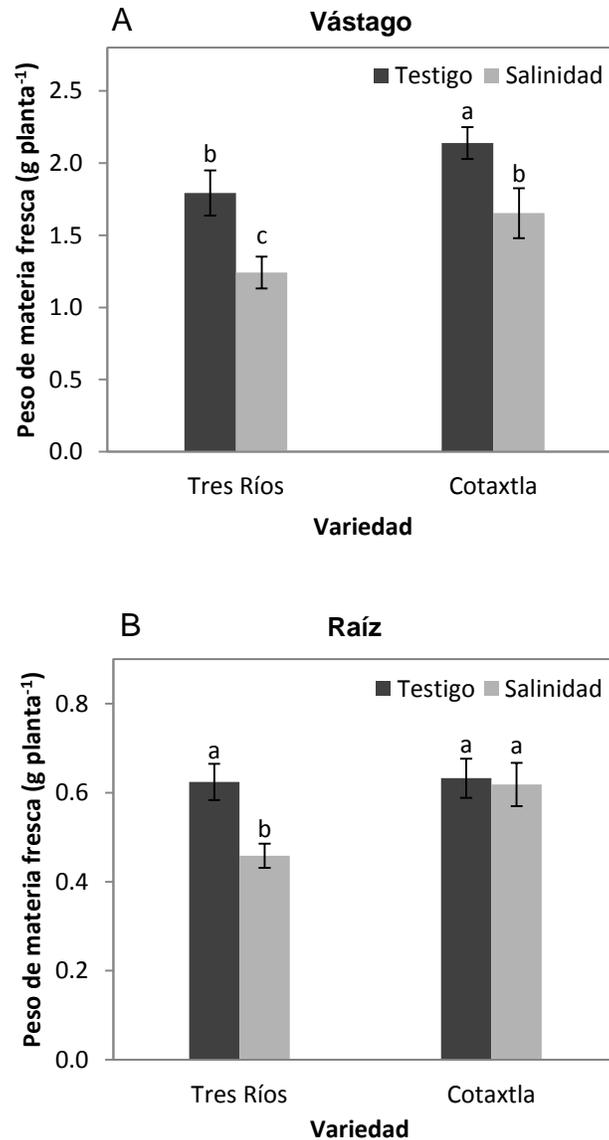


Figura 3. Peso de materia fresca de vástago (A) y raíz (B) de los cultivares mexicanos de arroz Tres Ríos y Cotaxtla, seis días después de la aplicación de 100 mM de NaCl.

Medias con letras distintas en cada subfigura, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Barras sobre las columnas indican desviación estándar.

El cultivar Tres Ríos tuvo una reducción significativa en el peso de materia seca tanto de vástago como de raíz (Figura 4); tal disminución fue del 24% en ambas variables con respecto al testigo. Lo anterior, debido a la interacción cultivar x concentración, ya que no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$) por el factor cultivar y tampoco por concentración de NaCl.

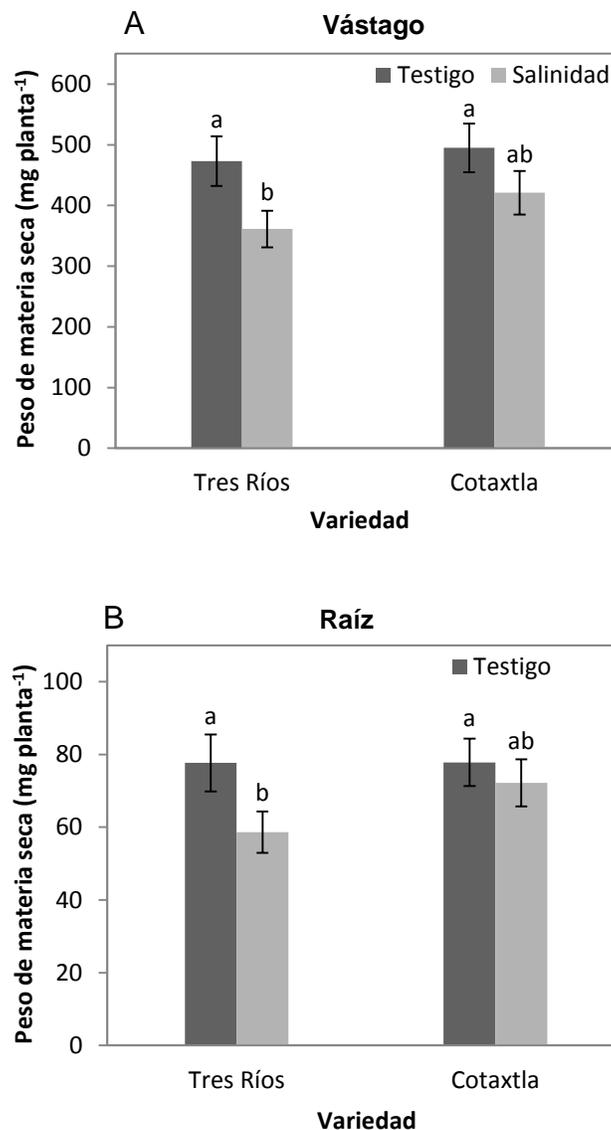


Figura 4. Peso de materia seca en vástago (A) y raíz (B) de plantas de arroz, de los cultivares mexicanos Tres Ríos y Cotaxtla, crecidas bajo salinidad durante seis días.

Medias con letras distintas en cada subfigura, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Barras sobre las columnas indican desviación estándar.

Resultados semejantes, a los aquí encontrados, se han obtenido en otros cultivares de arroz BR11, BR23, BR29 y BR31 (Alam *et al.*, 2004), trigo (Saqib *et al.*, 2005) y sorgo dulce (Almodares *et al.*, 2007). En el caso de sorgo dulce, las diferencias en la tolerancia a la salinidad en el estado vegetativo se deben a la diversidad genética y diferencias hereditarias entre cultivares; adicionalmente se observó que al incrementar la concentración de sodio, el peso de materia fresca y seca de las plantas disminuyó. Algunas especies son sensibles a salinidad, especialmente en la fase vegetativa, debido a que los mecanismos de tolerancia al estrés no han sido completamente desarrollados. Sin embargo, otras especies pueden mostrar tolerancia a la salinidad durante la fase vegetativa del crecimiento (Roy *et al.*, 2005).

4.3.3. Actividad fotosintética

Las plantas sometidas a estrés salino disminuyen su eficiencia fotosintética, lo cual parece estar asociado con el complejo del fotosistema II (PSII) (Munns *et al.*, 2006). La salinidad reduce la actividad del PSII y promueve la destrucción de los pigmentos de la clorofila por la acumulación de iones que pueden inhibir el rendimiento cuántico de transporte de electrones en el PSII (Sudhir y Murthy, 2004).

Lo expuesto anteriormente se observa en la Figura 5, donde se presenta el rendimiento cuántico del PSII de la segunda hoja totalmente expandida. Cuando las plantas crecieron en ausencia de salinidad, ambos cultivares, mantuvieron un alto rendimiento del PSII. Si embargo, cuando las plantas fueron sometidas al estrés salino (100 mM NaCl), una reducción del rendimiento fotosintético fue observado tres días después de la aplicación de tratamientos en ambos cultivares. Seis días después de la aplicación de tratamientos, el cultivar Tres Ríos mostró una reducción total en el rendimiento del PSII, mientras que el cultivar Cotaxtla tuvo una reducción del 90%.

Los resultados aquí obtenidos difieren de los reportados en otros cultivares de arroz (IR651 e IR632) tolerantes a la salinidad (Moradi e Ismail, 2007), y a los obtenidos en sorgo (Netondo *et al.*, 2004). En ambos casos, no hubo cambios

significativos en el rendimiento cuántico del PSII bajo condiciones de salinidad, lo cual puede indicar que la salinidad no afecta severamente el transporte de electrones en sorgo (Netondo *et al.*, 2004). En los cultivares de arroz IR651 e IR632, el rendimiento cuántico del PSII puede servir como una manera directa de determinar el efecto de la salinidad en el aparato fotosintético (Moradi e Ismail, 2007).

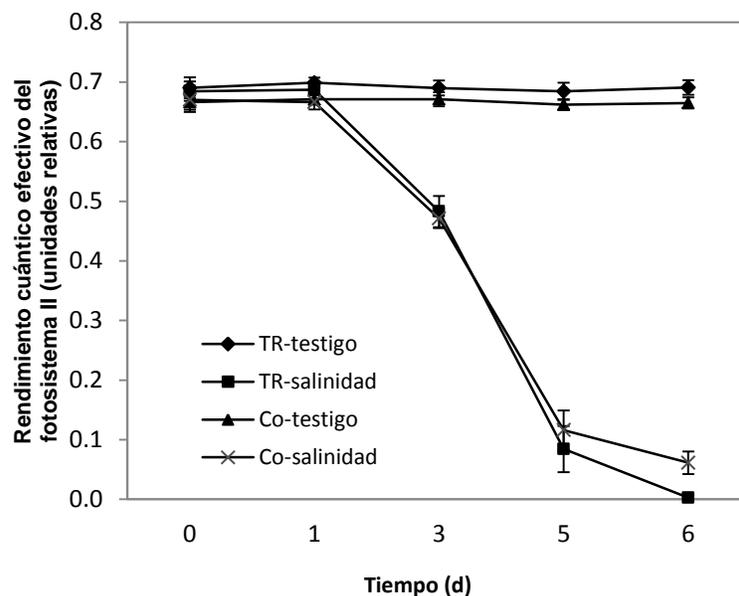


Figura 5. Rendimiento cuántico del fotosistema II de la segunda hoja totalmente expandida de plantas de los cultivares de arroz Tres Ríos y Cotaxtla, crecidos en hidroponía con 0 (testigo) y 100 (salinidad) mM NaCl. Barras sobre los puntos indican desviación estándar.

En el Cuadro 3, se presentan los efectos simples y la interacción de los factores evaluados sobre el rendimiento cuántico del PSII. Por efecto de cultivar se obtuvieron diferencias significativas en los días 0, 1, 5 y 6 después de la aplicación de tratamientos; mientras que por concentración de NaCl los efectos fueron significativos al 1% en los días 3, 5 y 6. Finalmente, la interacción cultivar x concentración de NaCl fue altamente significativa durante el quinto y sexto día de estrés salino.

Cuadro 3. Efecto de los factores cultivar, concentración de NaCl y su interacción en el rendimiento cuántico del PS II en hojas de plantas de arroz.

Fuente de variación	Grados de libertad	Tiempo (d)				
		0	1	3	5	6
Cultivar	1	**	**	*	ns	**
Concentración de NaCl	1	ns	ns	**	**	**
Cultivar x Concentración NaCl	1	ns	ns	ns	**	**

ns = no significativo; * = significativo al 5%; ** = significativo al 1%

4.3.4. Concentración de sodio y potasio

La concentración de K^+ , en los diferentes órganos de plantas de arroz, fue significativamente diferente debido a la interacción cultivar x concentración de NaCl (Cuadro 4). En raíz se tuvieron diferencias debido al factor cultivar, siendo Tres Ríos la que tuvo mayor concentración de K^+ comparado con Cotaxtla, sin y con la aplicación de NaCl en el medio de crecimiento. En tallo, las diferencias estadísticas observadas se deben al factor concentración de NaCl; es decir, la presencia de sales redujo significativamente la concentración de K^+ en tallo. También se obtuvieron diferencias por efecto de la interacción cultivar x NaCl, ya que mientras en el cultivar Tres Ríos la concentración de K^+ en tallo disminuyó significativamente, en Cotaxtla ésta se incrementó. El mismo comportamiento se obtuvo en la concentración en hojas viejas de ambos cultivares.

La reducción en la concentración de K^+ , obtenida en el cultivar Tres Ríos es similar a la obtenida en otros cultivares de arroz (Walia *et al.*, 2005) y trigo (Sharma *et al.*, 2005; Saqib *et al.*, 2005), esto debido a que la presencia de NaCl en el medio de crecimiento puede interferir con la absorción de cationes como el K^+ , Ca^{2+} o Mg^{2+} , o bien como resultado de la sustitución del K^+ por Na^+ (Tester y Davenport, 2003). En ambos cultivares, la concentración de K^+ en las hojas jóvenes se incrementó significativamente al aplicar NaCl, como un efecto de los tratamientos y de su interacción con el factor cultivar.

Cuadro 4. Concentración K^+ ($mg\ kg^{-1}$ peso materia seca) en raíz, tallo y hojas de los cultivares mexicanos de arroz Tres Ríos y Cotaxtla, seis días después de la aplicación de tratamientos.

Cultivar	NaCl (mM)	Concentración de K^+ ($mg\ kg^{-1}$ peso materia seca)			
		Raíz	Tallo	Hojas viejas	Hojas jóvenes
Tres Ríos	0	66.57 a	50.86 a	56.59 a	30.65 b
Tres Ríos	100	67.41 a	11.81 d	27.22 b	55.62 a
Cotaxtla	0	28.09 b	18.92 c	18.63 b	28.65 b
Cotaxtla	100	22.22 b	41.87 b	50.72 a	54.12 a
Cultivar					
Tres Ríos		66.99 a	31.34 a	41.91a	43.14 a
Cotaxtla		25.16 b	30.39 a	34.67 a	41.39 a
NaCl (mM)					
	0	47.33 a	34.89 a	37.61 a	29.65 b
	100	44.82 a	26.84 b	38.97 a	54.87 a

Medias con letras distintas en cada columna por factor o interacción, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Como resultado de la interacción cultivar x concentración de NaCl (Cuadro 5), al aplicar 100 mM de NaCl en la solución hidropónica la concentración de Na^+ fue significativamente superior en raíz, tallo y hojas de ambos cultivares. Estos resultados son congruentes con los obtenidos en otros cultivares de arroz, FL478 e IR29 (Walia *et al.*, 2005), trigo (Sharma *et al.*, 2005; Saqib *et al.*, 2005), soya y pepino (Dabuxilatu y Ikeda, 2005), donde se observó una relación positiva entre la concentración de sal y la concentración de Na^+ en raíz y vástago.

Tester y Davenport (2003) indican que muchas plantas son capaces de tolerar el estrés salino al excluir Na^+ del vástago, o al menos de las hojas, y mantener altos niveles de K^+ . Esto pudiera estar sucediendo en el cultivar Cotaxtla, ya que en condiciones de salinidad, tuvo mayor concentración de Na^+ en tallo que Tres Ríos, tal vez como un mecanismo de exclusión de Na^+ de las hojas. Además, bajo las mismas condiciones, este cultivar tuvo un incremento

significativo en la concentración de K^+ (Cuadro 1) en tallo y hojas viejas, mientras que Tres Ríos mostró reducciones.

La concentración de Na^+ fue superior en las hojas jóvenes tratadas con salinidad, en ambos cultivares. Sin embargo, el cultivar Cotaxtla registró mayor concentración de Na^+ en sus hojas jóvenes en comparación con el cultivar Tres Ríos. En algunas condiciones, una alta concentración de Na^+ en vástago puede ser benéfica para ayudar a la planta a mantener su turgencia, ya que los iones son secuestrados en la vacuola y de esta manera se puede reducir la toxicidad del Na^+ (Munns y Tester, 2008).

Cuadro 5. Concentración Na^+ ($mg\ kg^{-1}$ peso materia seca) en raíz, tallo y hojas de los cultivares mexicanos de arroz Tres Ríos y Cotaxtla, seis días después del inicio del estrés salino.

Cultivar	NaCl (mM)	Concentración de Na^+ ($mg\ kg^{-1}$ peso materia seca)			
		Raíz	Tallo	Hojas viejas	Hojas jóvenes
Tres Ríos	0	3.56 b	3.50 c	3.45 b	2.77 c
	100	26.37 a	13.88 b	17.15 a	9.87 b
Cotaxtla	0	2.88 b	1.41 c	1.84 b	2.17 c
	100	21.25 a	37.14 a	27.25 a	16.65 a
Cultivar					
	Tres Ríos	14.97 a	8.69 b	10.30 a	6.32 b
	Cotaxtla	12.07 a	19.28 a	14.55 a	9.41 a
NaCl (mM)					
	0	3.22 b	2.46 b	2.65 b	2.47 b
	100	23.81 a	25.51 a	22.20 a	13.26 a

Medias con letras distintas en cada columna por factor o interacción, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

La habilidad de las plantas para discriminar entre el Na^+ y el K^+ puede determinarse mediante un índice, la relación K^+/Na^+ (Flowers, 2004). En las Figuras 6 y 7 se presenta la relación de contenido K^+/Na^+ en vástago y raíz de los

dos cultivares de arroz estudiados. En general, se obtuvo que al aplicar 100 mM de NaCl en la solución hidropónica, la relación K^+/Na^+ se redujo significativamente ($p \leq 0.05$) en ambos cultivares. Resultados semejantes se han obtenido en otros cultivares de arroz, FL478 e IR29 (Walia *et al.*, 2005) y IR36 (Gong *et al.*, 2006), en trigo (Saqib *et al.*, 2005), *Sesbania rostrata* y frijol (Jungklang *et al.*, 2003). En vástago (Figura 6), el cultivar Tres Ríos tuvo la menor relación K^+/Na^+ cuando las plantas fueron sometidas al estrés. La información aquí mostrada es similar a la reportada en otros cultivares de arroz que difieren en su tolerancia a la salinidad (Moradi e Ismail, 2007), donde se encontró que el cultivar IR29, susceptible a salinidad, tuvo una relación K^+/Na^+ en hojas significativamente menor que los cultivares IR632 e IR651 (tolerantes).

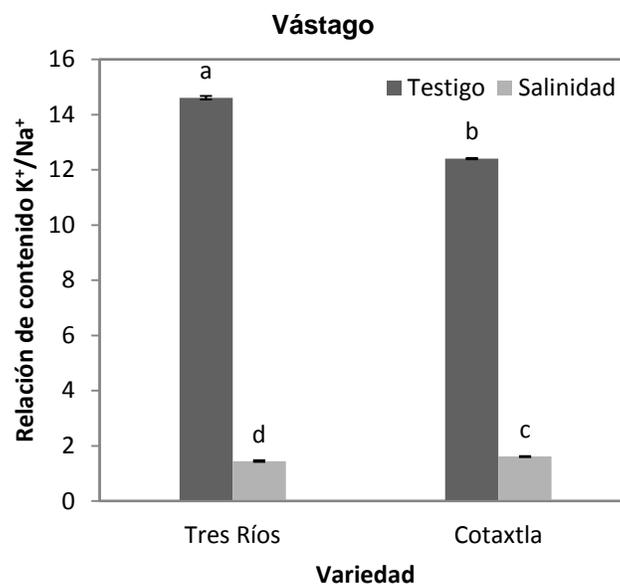


Figura 6. Relación K^+/Na^+ en vástago de los cultivares mexicanos de arroz Tres Ríos y Cotaxtla, crecidos en solución hidropónica con 0 y 100 mM de NaCl durante seis días.

Medias con letras distintas, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Barras sobre las columnas indican desviación estándar.

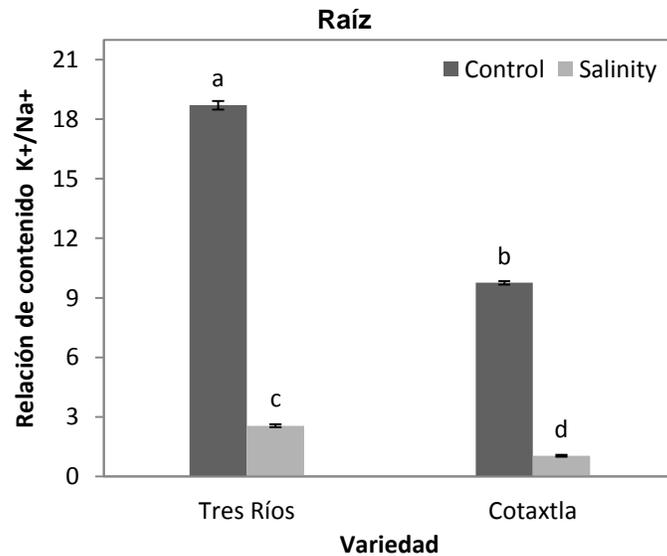


Figura 7. Relación K^+/Na^+ en raíz de los cultivares mexicanos de arroz Tres Ríos y Cotaxtla, crecidos en solución hidropónica con 0 y 100 mM de NaCl durante seis días.

Medias con letras distintas, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Barras sobre las columnas indican desviación estándar.

4.4. CONCLUSIONES

La aplicación de 100 mM de NaCl en el medio de crecimiento durante seis días ocasionó que el cultivar Tres Ríos tuviera reducciones significativas en la longitud de vástago y de raíz, peso de materia fresca y seca, disminución significativa en el rendimiento cuántico del fotosistema II (PSII), menor concentración de K^+ en tallo y hojas y como consecuencia una relación K^+/Na^+ en vástago menor, lo que sugiere que este cultivar es susceptible a salinidad comparado con el cultivar Cotaxtla, el cual mostró mayor tolerancia a este estrés.

4.5. LITERATURA CITADA

- Alam, M. Z., T. Stuchbury, R. E. L. Naylor and M. A. Rashid.** 2004. Effect of salinity on growth of some modern rice cultivars. *Journal of Agronomy*, 3:1-10.
- Alcántar G., G. y M, Sandoval V.** 1999. Manual de Análisis Químico de Tejido Vegetal. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo A.C. Publicación especial No. 10. Chapingo México. 156 p.
- Almodares, A., M. R. Hadi and B. Dosti.** 2007. Effects of salt stress on germination percentage and seedling growth in sweet sorghum cultivars. *Journal of Biological Science*, 7:1492-1495.
- Dabuxilatu, M. and M. Ikeda.** 2005. Interactive effect of salinity and supplemental calcium application on growth and ionic concentration of soybean and cucumber plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, 51: 549-555.
- FAO (Food and Agriculture Organization).** 2008. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-effect soils. FAO Land and Plant Nutrition Management Service, Rome. Available at: <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/>
- Flowers, T. J.** 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 55: 307-319.
- Gong, H. J., D. P. Randall and T. J. Flowers.** 2006. Silicon deposition in the root reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by reducing bypass flow. *Plant, Cell and Environment*, 29: 1970–1979.
- Jamil, M., L. Deog Bael, J. Kwang Yong, M. Ashraf, L. Sheong Chun and R. Eui Shik.** 2006. Effect of salt (NaCl) stress on germination and early seedling growth of four vegetables species. *Journal of Central European Agriculture*, 7:273-282.
- Jungklang, J., K. Usui and H. Matsumoto.** 2003. Differences in physiological responses to NaCl between salt-tolerant *Sesbania rostrata* Brem. & Oberm. and non-tolerant *Phaseolus vulgaris* L. *Weed Biology and Management*, 3: 21–27.

- Kumar, B. S., S. Titov, M. Moffazzal Islam, A. Siddika, S. Sultana and M. Shahidul Haque.** 2009. Phenotypic and genotypic screening of rice genotypes at seedling stage for salt tolerance. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 4: 126-131.
- Moradi, F. and A. M. Ismail.** 2007. Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. *Annals of Botany*, 99: 1161-1173.
- Munns, R.** 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environment*, 25: 239–250.
- Munns, R., R. A. James and A. Läuchli.** 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*, 57:1025-1043.
- Munns, R. and M. Tester.** 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 651–81
- Murashige, T. and F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Netondo, G. W., J. C. Onyango and E. Beck.** 2004. Sorghum and salinity II. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. *Crop Science*, 44:806-811
- Pattanagul, W. and M. Thitisaksakul.** 2008. Effect of salinity stress on growth and carbohydrate metabolism in three rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance. *Indian Journal of Experimental Biology*, 46:736-742.
- Roy, P. K., K. Niyogi, D. N. SenGupta and B. Ghoosh.** 2005. Spermidine treatment to rice seedlings recovers salinity stress-induced damage of plasma membrane and PM-bound H⁺-ATPase in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *Plant Science*, 168:583-591.
- SAS.** 1990. SAS/STAT User's guide. Ver. 6.0 SAS Institute, Inc. Cary, NC 1686 p.
- Saqib, M., J. Akhtar and R. H. Qureshi.** 2005. Na⁺ exclusion and salt resistance of wheat (*Triticum aestivum*) in saline-waterlogged conditions are improved by the development of adventitious nodal roots and cortical root aerenchyma. *Plant Science*, 169: 125–130.

- Sharma, N., N. K. Gupta, S. Gupta and H. Hasegawa.** 2005. Effect of NaCl salinity on photosynthetic rate, transpiration rate, and oxidative stress tolerance in contrasting wheat genotypes. *Photosynthetica*, 43: 609-613.
- Sudhir, P. and S. D. S. Murthy.** 2004. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica*, 42: 481-486.
- Tester, M. and R. Davenport.** 2003. Na⁺ transport and Na⁺ tolerance in higher plants. *Annals of Botany*, 91: 503-527.
- Walia, H., C. Wilson, P. Condamine, X. Liu, A. M. Ismail, L. Zeng, S. I. Wanamaker, J. Mandal, J. Xu, X. Cui and T. J. Close.** 2005. Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. *Plant Physiology*, 139:822-835.
- Yang, X., V. Rômheld and H. Marschner.** 1994. Effect of bicarbonate on root-growth and accumulation of organic-acids in Zn-Inefficient and Zn-efficient rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil*, 164: 1-7.
- Zeng, L.** 2004. Response and correlated response to salt tolerance selection in rice by yield parameters. *Cereal Research Communications*, 32:477–484.

CAPÍTULO V

CAPÍTULO V.

PERFIL DE EXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NAC EN HOJAS DE ARROZ BAJO ESTRÉS OSMÓTICO

Soledad García-Morales, Libia I. Trejo-Téllez, Fernando C. Gómez-Merino, Camila Caldana, B. Edgar Herrera-Cabrera y David Espinosa-Victoria

RESUMEN

Las plantas responden a estímulos ambientales adversos con el inicio de una serie de procesos de señalización que incluyen la activación de factores de transcripción que pueden regular la expresión de un conjunto de genes para responder y adaptarse al estrés. La familia NAC (NAM, ATAF y CUC) son factores de transcripción específicos de plantas con diversas funciones tanto en el desarrollo como en la regulación del estrés. En este trabajo se analizó el perfil de expresión de 41 genes que codifican factores de transcripción de la familia NAC, usando la técnica de RT-PCR en tiempo real. Se usaron plántulas de arroz, de los cultivares Cotaxtla y Tres Ríos, crecidas 20 días en condiciones hidropónicas. Se aplicó 18.5% de PEG para inducir sequía, 100 mM de NaCl para salinidad y el testigo, sin estrés. El nivel de expresión relativa de los genes fue determinado a las 6 y 24 h después de la aplicación de tratamientos. De los genes estudiados, en el cultivar Cotaxtla, 11 genes fueron inducidos y ninguno reprimido; en Tres Ríos, 17 genes fueron inducidos por sequía y tres reprimidos. En el caso de salinidad, cuatro genes fueron inducidos y seis reprimidos en la cultivar Cotaxtla, en tanto que en Tres Ríos se encontraron 30 genes inducidos y dos reprimidos. De todos los genes evaluados, destacan aquellos que se encontraron inducidos en un cultivar y reprimidos en el otro: para sequía se identificaron tres genes y en salinidad 10; de los cuales sobresalen el gen *Os07g04560*, que tuvo un patrón de expresión contrastante en los cultivares evaluados, bajo sequía y salinidad. Además, genes como *Os08g33910*, *Os11g08210* (*OsNAC5*), *2_Os05g34830* (*OsNAC5*) y *OsNAC6* fueron inducidos por sequía y salinidad a las 6 y 24 h del muestreo. En conclusión, en esta investigación se identificaron genes NAC que

responden a estrés osmótico, y que su posterior caracterización sería el sustento para la posible generación de cultivares con mejor resistencia a la sequía y a la salinidad.

Palabras clave: *Oryza sativa*, factores de transcripción, familia NAC, sequía, salinidad, RT-PCR en tiempo real

5.1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de su ciclo de vida, las plantas están expuestas a diversos factores de estrés abiótico, incluyendo sequía y salinidad, los cuales son causantes de estrés osmótico. Como respuesta al estrés y la tolerancia, las plantas han desarrollado una serie de mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares. La base fisiológica de estas respuestas moleculares es la integración de muchos eventos de transducción dentro de una amplia red de vías de señalización, que incluyen percepción de señales del estrés osmótico, generación de segundos mensajeros y transducción de señales del estrés (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006; Nakashima *et al.*, 2009). Se han identificado muchos genes en respuesta al estrés, cuya expresión juega un papel importante en el desarrollo de mecanismos de tolerancia ante estos eventos (Li *et al.*, 2008).

La regulación de la expresión génica es esencial para todos los organismos, y proporciona un mecanismo complejo de control mediante el cual las plantas responden a estímulos y estrés ambiental, y además regula los procesos de desarrollo (Shinozaki *et al.*, 2003). Esta regulación está coordinada por una serie de mecanismos que involucran la metilación del DNA, organización de la cromatina, dimerización y unión específica a secuencias de DNA, este último mecanismo pueden ser realizado por factores de transcripción (Jeong *et al.*, 2010). Además de reconocer los motivos específicos de DNA en las regiones reguladoras de los genes, una característica esencial para clasificar a una proteína como los factores de transcripción es que puedan activar o reprimir la transcripción, esto debido a la interacción con otras proteínas. En función de las interacciones proteína-proteína, un factor de transcripción puede funcionar como activador de un

grupo de genes o como represor de otros (Feller *et al.*, 2011). Estas proteínas activan o reprimen la transcripción de los genes mediante unión directa a los promotores de los genes blanco de manera específica (Qu y Zhu, 2006)

Los genomas de arroz (*Oryza sativa*) y *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) codifican más de 2000 reguladores transcripcionales, cada uno, que representan entre el 4 y 6% del número total estimado de proteínas en cada especie (Zhang *et al.*, 2011). Aproximadamente, 45% de estos factores de transcripción forman parte de familias de genes que son específicos para plantas (Riechmann *et al.*, 2000; Kikuchi *et al.*, 2003). Un ejemplo de estos grupos de factores de transcripción, es la familia NAC.

Las proteínas pertenecientes a la familia NAC comprenden uno de los grupos más grandes de factores de transcripción que están extensamente distribuidos en varias especies vegetales. El nombre deriva de los tres primeros genes descritos y que contienen el dominio del meristemo no apical (*no apical meristem*, *NAM*) de *Petunia* (Souer *et al.*, 1996); los genes *ATAF1*, *ATAF2* (*Arabidopsis thaliana* activation factor) nombrados así por su habilidad de activar el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor en levaduras (Christianson *et al.*, 2010), y *CUC* (cup-shaped cotyledon) de *Arabidopsis* (Aida *et al.*, 1997). Esta familia de proteínas es caracterizada por un dominio de unión al DNA en la terminal amino altamente conservado, el cual es denominado como “dominio NAC”, y diversas regiones en la terminal carboxilo (Shen *et al.*, 2009).

Inicialmente, Ooka *et al.* (2003) encontraron 75 proteínas NAC de un conjunto de datos de cDNA de arroz (28,469 clones). Posteriormente, con la disponibilidad de las secuencias del genoma, fue posible identificar 149 genes que pertenecen a la familia NAC de factores de transcripción en arroz (Xiong *et al.*, 2005). De ahí, Fang y colaboradores (2008) realizaron un análisis sistemático de la secuencia de arroz, el cual reveló 140 genes de la familia NAC. Las proteínas NAC están relacionadas con el desarrollo de las plantas y con la respuesta al estrés abiótico. Por ejemplo, en arroz, el gen *SNAC1* (stress-responsive NAC) fue identificado y sobre-expresado condujo al incremento en la tolerancia a la sequía (Hu *et al.*, 2006). Otro gen NAC (*OsNAC6/SNAC2*) inducido por estrés abiótico y

por ácido jasmónico, y al ser sobreexpresado incrementó la tolerancia del arroz al frío, sequía y salinidad (Nakashima *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008). Más tarde, el gen *OsNAC5* fue relacionado con la removilización de Fe y Zn de los tejidos verdes a las semillas, además se reportó como asociado a la senescencia y dependiente del ácido abscísico (Sperotto *et al.*, 2009). Posteriormente, fue reportado que *OsNAC5* está involucrado en la respuesta de adaptación al estrés por sequía y salinidad (Takasaki *et al.*, 2010).

Por otro lado, el arroz es uno de los cultivos más importantes del mundo, ya que aporta el 20% de la demanda de cereales para la alimentación en el mundo (FAO, 2011), además está considerado como una especie modelo en la familia de las gramíneas. Por esta razón, una mejor comprensión de las complejas interacciones entre los genes de esta especie es de gran importancia para incrementar su valor nutricional, rendimiento de grano, rango de cultivo, resistencia a enfermedades y tolerancia al estrés ambiental tanto en el arroz como en otros cereales (Ficklin *et al.*, 2010).

El objetivo de este estudio fue analizar el perfil de expresión de 57 genes que codifican factores de transcripción de la familia NAC con la finalidad de identificar aquellos con potencial para incrementar la tolerancia al estrés osmótico, causado por sequía y/o salinidad, en dos cultivares Mexicanos de arroz.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Material vegetal y tratamientos

Se utilizaron dos cultivares de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. indica), Cotaxtla, y Tres Ríos (esta última catalogada como susceptible a sequía), provenientes del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo experimental Zacatepec, Morelos. El experimento se llevó a cabo en un invernadero tipo cenital, ubicado en el Colegio de Postgraduados (Montecillo, Estado de México).

Las semillas de ambos cultivares fueron desinfectadas con etanol al 70% por 5 min, después con hipoclorito de sodio al 3% durante 30 min. Posteriormente,

fueron enjuagadas con agua destilada estéril cinco veces y secadas en papel filtro. Los embriones secos fueron germinados en frascos con medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 3% (p/v) de sacarosa y solidificado con 1.2% de agar. Los frascos con el medio MS y las semillas fueron colocados en oscuridad a 28°C por tres días (d). Catorce días después de la siembra, las plántulas fueron trasplantadas a recipientes con 9 L de solución nutritiva, la cual contenía 1.43 mM NH_4NO_3 , 1.00 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.64 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.13 mM K_2SO_4 , 0.32 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.00 mM Fe-EDTA, 7.99 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.15 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.15 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.075 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 1.39 μM H_3BO_3 (Yang *et al.*, 1994), con un potencial osmótico de -0.035 MPa. El pH de la solución se mantuvo entre 5.5 y 6.0. La solución nutritiva fue renovada cada 5 d.

Se evaluaron dos agentes causantes de estrés osmótico: 18.5% PEG, para inducir sequía y 100 mM NaCl para salinidad; ambos tratamientos con un potencial osmótico de -0.44 MPa), además del testigo sin estrés; y los dos cultivares de arroz: Cotaxtla y Tres Ríos. La aplicación de tratamientos se inició 20 días después de transferir las plantas a la solución hidropónica, donde se agregó 18.5% de PEG o 100 mM de NaCl a los recipientes con solución nutritiva; las plantas testigo crecieron al mismo tiempo.

5.2.2. Colecta de muestras

Para el análisis de la expresión génica, se tomaron muestras de cada cultivar por separado, antes de la aplicación de tratamientos, 3 h, 6 h y 24 h después de la aplicación de tratamientos (18.5% PEG y 100 mM NaCl). Se muestrearon la segunda y tercer hoja totalmente expandida. Una repetición biológica consistió en mezclar hojas de tres plantas crecidas bajo las mismas condiciones. Hojas de las plantas testigo (sin estrés) fueron tomadas en cada tiempo de muestreo. Tres réplicas biológicas fueron cosechadas y procesadas en paralelo. Todas las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido inmediatamente después de cortar el tejido. Enseguida, fueron almacenadas a -80°C hasta la extracción de RNA.

5.2.3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA (transcripción reversa)

La extracción de RNA fue realizada con aproximadamente 50 mg de material vegetal. Las muestras de tejido vegetal fueron molidas hasta polvo fino con mortero y pistilo, usando nitrógeno líquido. El RNA total fue aislado usando el kit SV total RNA Isolation Systema (Promega), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, el cual incluye un tratamiento con DNAsa I. La concentración de RNA total fue determinada con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific NanoDrop, Wilmington, DE, EEUU) y la integridad fue confirmada en geles de agarosa al 1% (p/v). En todas las muestras, los valores de las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} fueron iguales a 2.1 o superiores.

Para la transcripción reversa se usó de 3.5 a 5 μ g de RNA total con el primer oligo-dT, para la síntesis de la primera cadena de cDNA, y la enzima SuperScript IIITM RT (Invitrogen), en un volumen total de 20 μ L de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

5.2.4. Primers de interés y primers de referencia

Los primers (Cuadro 1) fueron seleccionados de una plataforma de 2500 factores de transcripción en arroz (Caldana *et al.*, 2007). Además, se incluyeron dos pares de primers relacionados para ser inducidos por sequía y salinidad, *OsNAC6* (Nakashima *et al.*, 2007) y *OsNAC5* (Sperotto *et al.*, 2009).

Cuadro 1. Primers específicos usados para el análisis de PCR en tiempo real, para genes *NAC* en arroz.

Identificación TIGR v5.0	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Amplicón (bp)
Os03g56580	AGACCGACTGGATGATGCACGA	TGCAGATGGTCCAGACCTCAGCTT	99
Os06g46270	TGAAGTTGCCTCTCAAGGAGGACT	CAGCTTGGCAATGGTTGTCTACT	74
Os02g56600	TACCAGATGTGGCGAAGCTG	TACTTGC GGTCGCGGAA	64
Os02g06950	CTGGCAGCTAGACTACATGCAGG	GCCATTGATGTAACGAGGAGGA	121
Os02g42970	GAAAACGGCACCACACCTGA	GCCACCCGCTTCTTGAACA	62
Os03g03540	GCGACATCGATCTCTACCGC	TACCCGATCCCAATGTTCTT	61
Os03g02800	CTTCCATCCAAGGTGGATGTTG	GCCAATCTTCGTGTCAAGGCT	117
Os07g37920	TTGCCATCGGAGTCAGCAG	TGGAGAGTTGGAACGGATGC	64

Identificación TIGR v5.0	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Amplicón (bp)
Os03g21060	AACGGTTCATGCGTTGGTG	CATCCCCATGTTAGAGTGGAGC	102
Os08g33910	GGATCTCCCAAAGCTTGCG	GAACCCAGCTGTTGTACACC	112
Os03g01870	GACCTACCAGAGGTGGCGAA	TTGCTCGCTCTGTTCTCTGC	101
Sin anotación_1	GGAAGAGAAATCCTTCCTGCCT	TGCTCTGGTTGCACGGTTT	106
Os06g01480	TGGATTTTCGTTTCCACCCG	TCTTGCGGCCACCTTCTTC	70
Os03g60080	CATCCCAGGAACAACAGCA	GTACATGCCCTGGATATCGTCCG	64
Os10g42130	GCGTGATCAAGAGGCACGA	TGCTGATCATTCTTTTCGCC	72
Os05g34310	CCCATAATCGCAGATGTGCGAA	CCCCAAATAGAGCCATGGATG	70
Os01g66490	GCCGGCAGCCACAACACTATAG	TTGGTTGATGCGACGACG	64
Os01g15640	TGCAAAGTGCATGTTCCAA	ATGGCTCGATCCTTTCCAGTG	138
Os07g04560	GCAACGTGAACGGTGGCTAC	GCTGCTACTGTTCCATTGCTCC	61
Os09g32040	CGGAAAATCAGATGTTGCGG	GCGCACGTATTCTCTGCCAT	69
Os12g43530	GATTTTCATCCGACGGATCAAGA	TCACCTTTGGAAGATCCCAGG	132
Os06g51070	CATTCCCGACACCATGCAAT	CCTCCGGTAGACCTTGCAGA	68
Os09g33490	TCGTCGTCGAGCTGTGTCA	CCTCTCTTTGAGAGGCAGATGG	103
Os11g31330	AAATACCTCTACCCCGTGCTTT	CAACATCGGTGATGATCGCA	61
Os02g34970	TGACATCATCCCGACGCTG	GCTTGCAAGTGCTTTGCCATT	69
Os04g35660	ATTGAATGGTAAAGCACTCCAATCC	GTCTGCGTCGCATGACTGAA	63
Os01g59640	CTGAATCCTCCGAATCTGCGT	CGGCATTGTGCTGCTAATCTG	65
Os11g04960	GCAGGCAAATCCCAGATGG	GCGGCCTTTTTATTGCGTTT	122
Sin anotación_2	GGTCGAGATCGGCCTCAAATA	ACACAGAACAAGCTCGTCGGAG	61
Os10g27390	AGAACGAGGTTCCGGATCTTG	TCCCTGCCTTCTCTCTCA	61
Os03g59730	GTATCGCATCCCGCAGTTTC	TGTAAGCAGGCGGTTTGAATC	61
Os06g15690	TCGGACATCCTGGATAATTGACA	CACCGATCCAGATGCATTTTTT	67
Os07g13920	CGATCAGAACCAACAGGATTGG	AGTCATCGCCATCACACAGA	68
Os11g31360	TGTCAACTACCTGTACCGCCGT	TCCACATCGGTGATGAAGTCG	66
Os01g48130	TTGCTGACCTGCTGTTGCAT	TGGAAGAAGTGCCGGATCA	65
Os10g26270	GGCGACCAAAACCCTGTCA	TTCACCGGCTCTGTGTCCTC	102
Os10g21560	GGAATGACCATAACGCAGCTG	CAAACCCTTGTTTCAGGTGGACT	108
Os12g07790	CGAGATAGTTGGCGCATACGA	CGAAGCCAATGGACAGCATC	62
Os11g31380	GAAACAACCATCGCCAAGAGA	ACGGCGAGCACATTACGAA	62
Os04g40130	TTACACGGACGAAACGGACCT	AGTGTGATCCCCATCCACCC	88
Os12g22940	TCCCAGCTATTTGTTCTGCC	ACAGCGGTGGATTGCCATT	110
Os10g27360	CATCGAGGTTGCGGATCTTG	TGTCCACTCTGGTTCGTGCTC	114
Os08g10080	CCTCTCCACCTCAAGGTGAAGACA	CGCAATCCGAACGAAGAACAACAA	96
Os12g29330	TCCGACTAAGCTAGGCAAGGCAAG	TTGGGGCGATTTTCGTTAAGCA	98

Identificación TIGR v5.0	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Amplicón (bp)
Sin anotación_3	TTGGACCTGGATGCGTTGCTGT	CGTGTCGAATTCCTCCCAAACCT	63
Os03g42630	TGATGCACGAGTACAGGCTCCA	AGCTTCTTGAAGACGCGGCAGA	85
Os02g36880	CCGCCAATTCCAAGCAGGATCA	TCGAGGCTCTTCTTGAACACCCT	61
Os02g36880	TCATGCACGAGTACCGCATCCA	ACAGCACCCACTCCTGATCCTT	69
Os04g38720	TGCTGCAAAAGCAATAAGCAAGGA	TGCTGCTCCATTGCTGCCTAAG	78
Os10g09820	CGAGAAATACAAGGGTTACGGAGA	CCATCCACCACCACCTTCTATT	108
Os11g08210	ACAACGCCCTCAGGTTGGATGA	TCGTACCTCTCGATCACTCCCTTC	73
Os05g34830	TGGGTCCTGTGCCGAATCTACAAC	GGTCTCCCCGTGGCTCATCATATT	99
Os05g34830	AGGAGCTGGTGATGCACTACCT	CGTACAGCGCCATTCTTGTAGAGG	100
Os06g33940	GCAAGAAGACCGACTGGATCATGC	CCACCCAACCATCTTCTGGACAT	78
Os02g15340	TGTTTGTGTGCCTTTCCAAGAGTG	TAGAGCAATTCCTCGTCCGTCG	107
OsNAC5 ^a	CAGCAGCTGATGGTATTGTC	AGAGACCTGTTTGGCACGAA	100-150
OsNAC6 ^b	CCAGCCCAAGATCAGCGAGT	TCATGTACTGGGGCAAGCCA	124

El Locus Identificador fue adoptado de la base de datos TIGR. * Casi todos los genes fueron obtenidos de Caldana *et al.* (2007), a excepción de OsNAC5^a, el cual fue obtenido de Sperotto *et al.* (2009) y OsNAC6^b de Nakashima *et al.* (2007).

La especificidad de los primers y de los genes de referencia o housekeeping (Cuadro 2), se determinaron mediante el análisis de la curva de disociación. Para el primero, se realizó un tamizado (screening) de todos los primers; se usó cDNA equivalente a 120 ng de material inicial de RNA total. Para los siguientes análisis, sólo se consideraron aquellos genes que presentaron un pico único. Para los segundos, se realizaron tres replicas técnicas, bajo diferentes condiciones de estrés: aplicación de PEG, NaCl y testigo; así como en los diferentes tiempos de muestreo: 0, 3 y 24 h después de la aplicación de tratamientos.

Cuadro 2. Genes de referencia para cuantificar el nivel de expresión relativa de los genes de interés.

Gen	Primer Forware (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Amplicón (bp)
<i>Actina</i>	CTCCCCCATGCTATCCTTCG	TGAATGAGTAACCACGCTCCG	91
<i>Actina I</i>	ATCCTTGTATGCTAGCGGTCA	ATCCAACCGGAGGATAGCATG	118
<i>β-Tubulina</i>	GGAGTCACATGCTGCCTAAGGTT	TCACTGCCAGCTTACGGAGG	64
<i>Factor de elongación 1α</i>	GTCATTGGCCACGTGCGACTC	TGTTTCATCTCAGCGGCTTCC	118

5.2.5. PCR cuantitativa en tiempo real

La PCR en tiempo real se llevó a cabo en placas de 96 pozos usando el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems by Life Technologies, CA, EEUU) con la mezcla de reacción Power SYBR® Green PCR, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La concentración final de cada primer fue de 250 nM en un volumen final de 20 $\mu\text{L}\cdot\text{pozo}^{-1}$. El perfil térmico de la PCR fue de 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos a 95°C por 15 s y 60°C por 1 min. La curva de disociación fue obtenida después del último ciclo de la PCR a 95°C por 15 s seguido por un constante incremento (2%) entre 60°C y 95°C.

Para cada reacción de PCR se incluyó una etapa de disociación. El ciclo umbral (C_T) para cada corrida se determinó usando los ajustes automáticos para la línea base y el nivel umbral del software SDS del equipo ABI Prism 7900HT. Se utilizaron los genes *Actina*, *β-tubulina* y *factor de elongación-1α* como genes de referencia para normalizar la expresión de los genes *NAC* en los diferentes tratamientos.

El nivel relativo de expresión de los factores de transcripción fue determinado usando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, descrito por Schmittgen y Livak (2008), restando el valor de C_T de los genes *NAC* menos el C_T de los genes de referencia ($\Delta C_T = C_T$ del gen de interés $- C_T$ gen de referencia), donde, $\Delta\Delta C_T$ representa $\Delta C_{T-\text{condición de estrés}} - \Delta C_{T-\text{testigo}}$. Esta expresión relativa también puede ser expresada como tasa de cambio. Si el primer ΔC_T es superior al segundo ΔC_T (testigo), entonces el valor de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ sería menor de 1; lo que implica que hay una reducción en la

expresión debido a los tratamientos. Para calcular la tasa de cambio de la reducción en la expresión se utilizó la siguiente fórmula: $\frac{-1}{2^{-\Delta\Delta C_T}}$ (Schmittgen y Livak, 2008). Los genes fueron definidos como genes expresados diferencialmente con una tasa de cambio de al menos 2 (valor absoluto), después de la aplicación de tratamientos. Para lo anteriores, el nivel de expresión fue designado como “inducido” cuando la tasa de cambio fue ≥ 2 y “reprimido” con un valor ≤ -2 , de acuerdo a Le *et al.* (2011a) y Le *et al.* (2011b).

5.2.6. Determinación del crecimiento, concentración de ácido abscísico y clorofila

Seis días después de la aplicación de tratamientos, las plantas fueron cosechadas y separadas en vástago y raíz para determinar su longitud y peso seco (p.s). El peso seco se determinó 48 h después de secar las muestras a 70 °C en una estufa de circulación de aire forzado.

El contenido de ácido abscísico (ABA) se determinó, en las dos primeras hojas recién desarrolladas, 48 h después de la aplicación de los tratamientos. El material vegetal fue liofilizado durante 72h y luego molido. Se tomaron 50 mg y se les agregó 2 mL de acetona a 90%. Las muestras fueron agitadas por 12 min en baño de ultrasonido con hielo. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm por 5 min, se tomó el sobrenadante y se aforó a 2 mL. Se tomaron 300 μ L del sobrenadante y se colocaron, gota a gota, en placas de HPTLC (Silica gel 60 F254 Multiformat pre-scored to 5x5, Merk). La placa fue colocada en una cámara para cromatografía que contenía acetato de etilo como fase líquida y se dejó correr la muestra hasta 0.5 cm antes del borde. Se dejó evaporar los restos de acetato de la placa y se observó en luz UV para detectar la presencia de ABA, se marcó y se raspó el ABA para posteriormente ser eluido de la placa. La extracción se hizo con 1 mL de acetato de etilo en agitación por 30 min a 428 rpm. Se filtró a vacío y se evaporó con nitrógeno. Se agregó 1 mL de etanol HPLC, se filtró en acrodisco de 0.45 μ m de diámetro de poro y se colocó en viales para ser leídos en HPLC.

Para el HPLC, el detector fue establecido a 266 nm. En la separación se usó la fase reversa en la columna SB-C8 (250 x 4.6 mm, 5 μ m, Zorbax, Alemania).

La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo (40%) y ácido trifluoroacético 0.01% pH 2.95 (40:60), bajo un método isocrático, y una tasa de flujo de 1 mL min⁻¹.

El contenido de clorofila se determinó de acuerdo a Arnon (1949), usando acetona al 90%, en 50 mg de hojas liofilizadas.

5.2.7. Análisis estadístico

Para el análisis de las variables fisiológicas evaluadas, se consideró el resultado de seis tratamientos con seis repeticiones cada uno. Para ABA y clorofila se consideraron cuatro repeticiones. Una plántula fue considerada como unidad experimental. Se hizo un análisis de varianza y comparación de medias mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95%, con apoyo del programa estadístico SAS ver. 9.0 (SAS, 1990).

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Confirmación de la especificidad de los primers

La especificidad de los primers es un factor determinante en los ensayos de RT-PCR en tiempo real. Para esto, se hizo un tamizado inicial de los 57 primers seleccionados, usando cDNA de las muestras testigo y dos replicas técnicas. Se determinó la especificidad analizando sus respectivas curvas de disociación. Del total de primers, 16 mostraron la amplificación de productos inespecíficos con muy baja expresión y por lo tanto una amplificación muy retardada o simplemente no amplificaron. Los otros 41 primers produjeron un pico único en sus curvas de disociación y una curva de amplificación típica, tal como se puede ver en la Figura 1. Estos últimos 41 primers fueron utilizados para los análisis posteriores. El análisis de las curvas de disociación para identificar la especificidad de los primers, también se ha empleado en el análisis de expresión de genes de la familia NAC en cebada (Christiansen *et al.*, 2011) y soja (Le *et al.*, 2011a; Le *et al.*, 2011b).

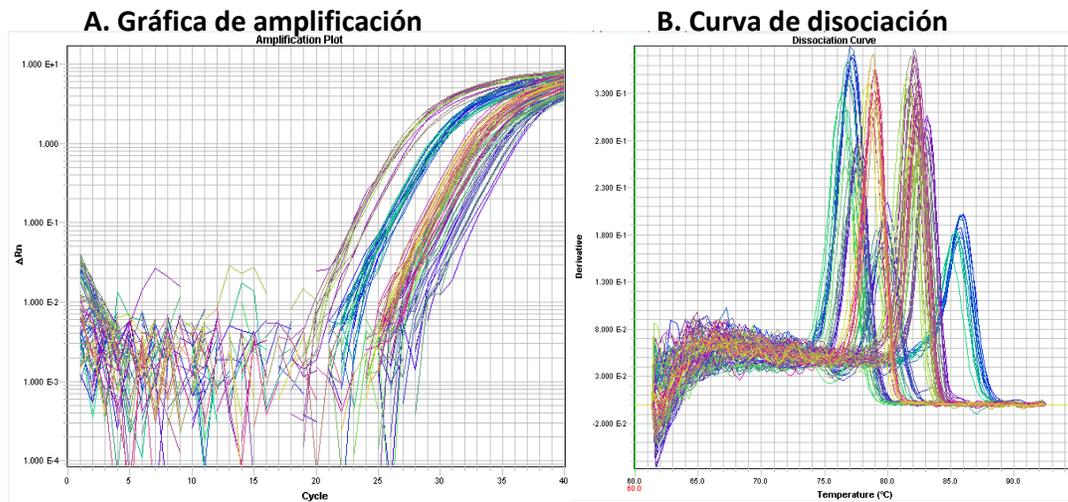


Figura 1. (A) Gráfica de PCR en tiempo real de 41 genes de la familia NAC usados para definir su especificidad. (B) Curva de disociación de los primers seleccionados mostrando un pico único.

5.3.2. Genes de referencia

Para este estudio se consideraron cuatro genes de referencia: *actina*, *actina I*, *factor de elongación-1α* y *β-tubulina* (Cuadro 2). La expresión de los cuatro genes bajos diferentes condiciones de estrés (sequía y salinidad), en diferentes puntos de tiempo (0, 3 y 24 horas después de la aplicación de tratamientos), se presentan en la Figura 2. Al analizar las curvas de disociación de los genes de referencia, se observó en *actina I* la formación de productos inespecíficos, por lo que este gen fue excluído para los siguientes análisis. Como se observa en la Figura 2, el *factor de elongación-1α* tuvo la mayor expresión (menor valor de C_T) de los genes analizados, lo que concuerda con lo reportado por Caldana *et al.* (2007). También, se puede observar que hay un efecto por los tratamientos y el tiempo de exposición al estrés. Sin embargo, considerando los resultados obtenidos durante todo el análisis, *actina* y el *factor de elongación-1α* fueron los genes de referencia más estables, ya que presentaron menos fluctuaciones en su nivel de expresión bajo las diferentes condiciones del experimento. Esto último difiere de lo reportado por Guénin *et al.* (2008), quienes reportan que el *factor de elongación-1α* resultó ser uno de los genes menos estables al analizar su expresión en seis diferentes tipos de muestras tomados de *Arabidopsis*.

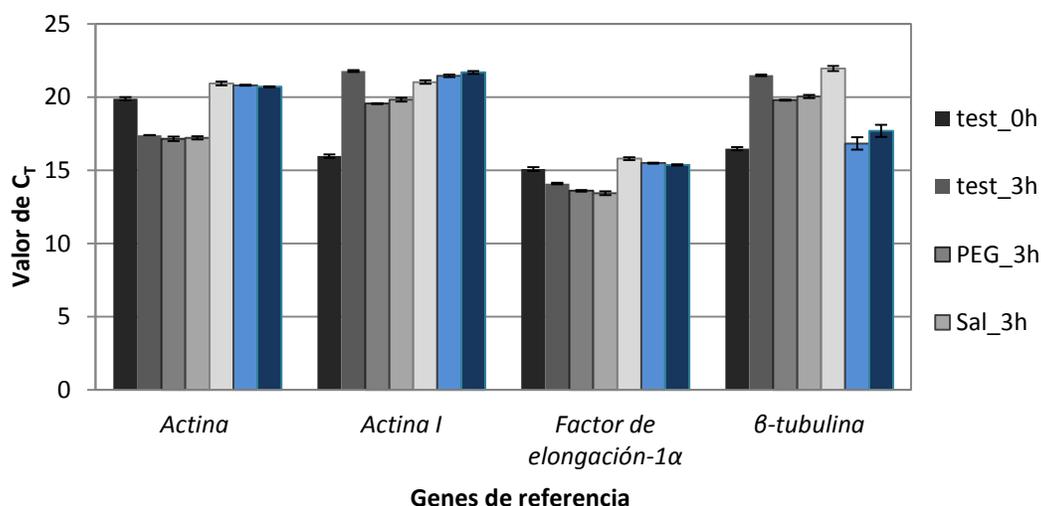


Figura 2. Genes de referencia seleccionados para ser usados en esta investigación, fueron analizados bajo condiciones de estrés, 3 y 24 h después de la imposición de sequía o salinidad. \pm desviación estándar de tres réplicas técnicas.

5.3.3. Expresión de genes *NAC* en hojas de arroz bajo condiciones de sequía y salinidad

Para determinar el nivel de expresión de los genes previamente seleccionados, se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de acuerdo a Schmittgen y Livak (2008). Para esto se usó *actina* como gen de referencia con lo que se obtuvo el primer ΔC_T , y para el segundo ΔC_T se comparó con el testigo. Los resultados fueron obtenidos 6 y 24 h después de la aplicación de 18.5% de PEG, para inducir sequía, o 100 mM de NaCl para salinidad.

De un total de 41 genes que pasaron la prueba tamiz mostrando un pico único en la curva de disociación, en el cultivar Cotaxtla y después de 6 h bajo estrés 9 genes fueron regulados (ya sea reprimido o inducidos) por sequía y 7 genes por salinidad (Figura 3A). En el caso del cultivar Tres Ríos, 13 genes mostraron una expresión diferencial en condiciones de sequía y 22 genes por salinidad. Después de 24 h de la aplicación de los tratamientos, el número de genes regulados incrementó, a excepción del cultivar Cotaxtla crecido en condiciones de salinidad, donde disminuyó el número de genes diferencialmente expresado (Figura 3B). En general, se puede decir que la activación en la

expresión de los genes, en respuesta al estrés osmótico por sequía y salinidad, incrementa constantemente a medida que el tiempo de exposición al estrés continúa.

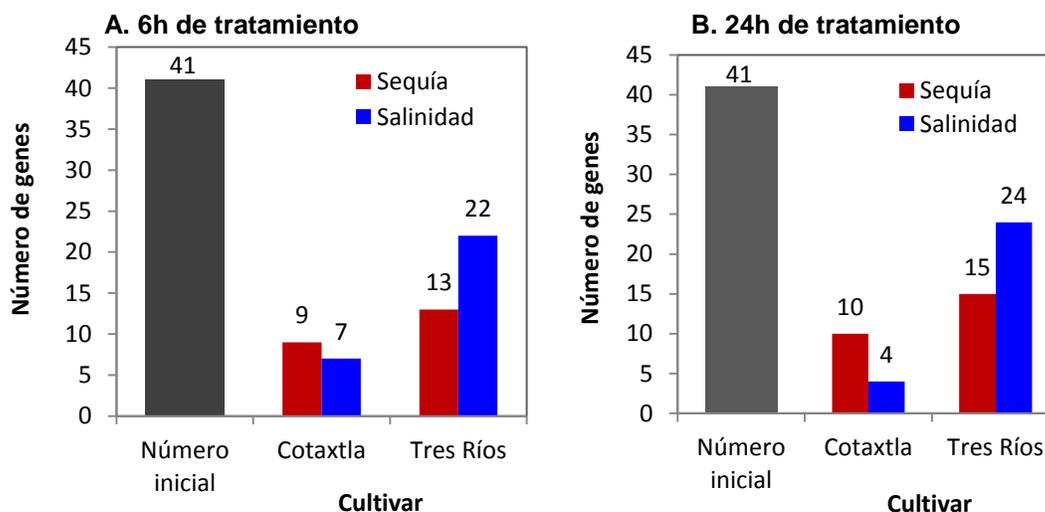


Figura 3. Número de genes regulados (inducidos y/o reprimidos) por sequía y salinidad, con una tasa de cambio de ± 2 , en hojas de los cultivares de arroz: Cotaxtla y Tres Ríos, 6h (A) y 24h (B) después de la aplicación de tratamientos.

Una vez que los datos fueron normalizados, la expresión de los genes fue definida como **inducidos** cuando se obtuvo un valor de $2^{-\Delta\Delta C_T} \geq 2$ y **reprimidos** con valores ≤ -2 . Para sequía, obtuvimos 11 genes inducidos en el cultivar Cotaxtla, y ninguno fue reprimido. En la cultivar Tres Ríos, 17 genes fueron inducidos por sequía y sólo tres fueron reprimidos. Otros seis genes más fueron inducidos tanto en Cotaxtla como en Tres Ríos (Figura 4).

En cuanto al estudio sobre salinidad se obtuvieron cuatro genes inducidos en Cotaxtla y 30 genes en Tres Ríos. Por otro lado, seis genes fueron reprimidos por salinidad en Cotaxtla y dos en el cultivar Tres Ríos. Hasta aquí, la expresión de la mayoría de los genes evaluados fue regulada por salinidad, al encontrar el mayor número de genes inducidos con la aplicación de 100 mM de NaCl. De los dos cultivares evaluados, Tres Ríos tuvo más genes con expresión diferencial que Cotaxtla. También, puede notarse que hubo un mayor número de genes inducidos

que aquellos que fueron reprimidos, lo que indica un incremento en la expresión de los genes debido a los tratamientos.

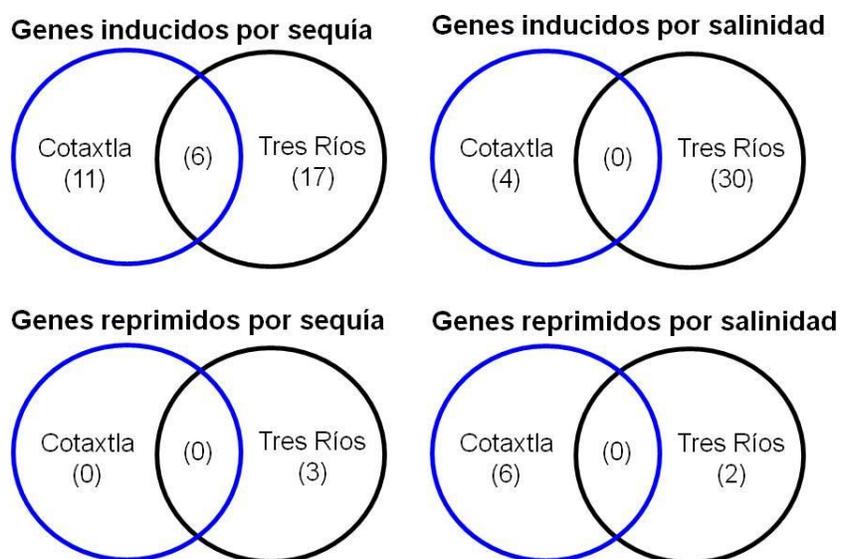


Figura 4. Diagrama de Venn que muestra un resumen de los genes *NAC* inducidos y/o reprimidos por sequía y salinidad en hojas de dos cultivares de arroz. La expresión de los genes fue definida como inducidos (parte superior) o reprimidos (parte inferior) con una tasa de cambio igual o mayor a un valor absoluto de 2, después de 6 y 24 h de la aplicación de tratamientos.

5.3.4. Patrón de expresión de genes *NAC* regulados por salinidad

Con la finalidad de identificar genes candidatos en respuesta al estrés por salinidad se realizó un perfil de expresión de 41 genes que codifican factores de transcripción de la familia *NAC*. Para esto se usó la técnica de RT-PCR en tiempo real y el método de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ para el análisis de datos. Se usaron plantas con 20 días de crecimiento en condiciones hidropónicas y sometidas a estrés salino (100 mM de NaCl) durante 6 y 24 h.

El nivel de expresión relativa de cada uno de los genes se determinó normalizando los datos con *actina* como gen de referencia y con el testigo, ambos casos para cada punto de tiempo (6 o 24 h). De los 41 genes evaluados, 32 de ellos tuvieron una expresión diferencial, ya sea reprimidos o inducidos, en algún

punto de tiempo del muestreo o en alguno de los dos cultivares evaluados. El perfil de expresión de cada uno de estos genes diferencialmente expresados se presenta en la Figura 5.

En el caso del cultivar Cotaxtla, cuatro genes (*Os02g56600*, *Os07g04560*, *Os02g34970* y *Os01g59640*) fueron inducidos por salinidad con una tasa de cambio mayor o igual 2 por al efecto del tratamiento, comparado con el testigo. Bajo las mismas condiciones, en el cultivar Tres Ríos se encontraron 30 genes inducidos (Figura 5). Por otro lado, sólo dos genes (*Os03g60080* y *Os01g59640*) en Tres Ríos y seis genes (*Os03g02800*, *Os08g33910*, *Os07g04560*, *Os01g59640*, *Os03g42630* y *OsNAC6*) en Cotaxtla mostraron una reducción en su expresión debido al estrés salino.

De acuerdo a su perfil de expresión (Figura 5), la mayoría de los genes inducidos presentaron dos tendencias: la primera corresponde a una tasa de cambio menor de 2 en 6 h, para después incrementar el nivel de expresión a un valor mayor de 2 para las 24 h. La segunda, inicia con una expresión relativa mayor de 2 a las 6 h, para después ser reducida a las 24 h. Otros genes de interés son aquellos que fueron reprimidos en el cultivar Cotaxtla e inducidos en Tres Ríos, que de acuerdo a los resultados del Capítulo IV resultó sensible a salinidad comparado con Cotaxtla. Estos genes son: *Os03g02800*, *Os08g33910*, *Os01g66490*, *Os01g15640*, *Os07g04560*, *Os09g33490*, *Os10g21560*, *Os03g42630*, *Os02g36880* y *OsNAC6*. Dichos genes resultan de gran importancia, ya que en varios estudios para identificar genes con potencial para incrementar la tolerancia al estrés abiótico, principalmente en plantas transgénicas, los genes de interés tienden a estar reprimidos en un genotipo y sobreexpresados en otro, por ejemplo los genes *OsNAC5* (Song *et al.*, 2011), *OsNAC10* (Jeong *et al.*, 2010) y *ONAC045* (Zheng *et al.*, 2009), entre otros.

Por otro lado, también se encontraron genes que fueron inducidos solamente en el cultivar Cotaxtla: *Os03g56580*, *Os03g03540*, *Os03g21060*, *Os09g32040*, *Os06g51070*, *Os04g35660*, *Os11g04960*, *Os10g21560*, *Os08g10080*, *Os11g08210* y *Os05g34830*, en tanto que sólo un gen fue inducido únicamente en Cotaxtla (*Os02g34970*).

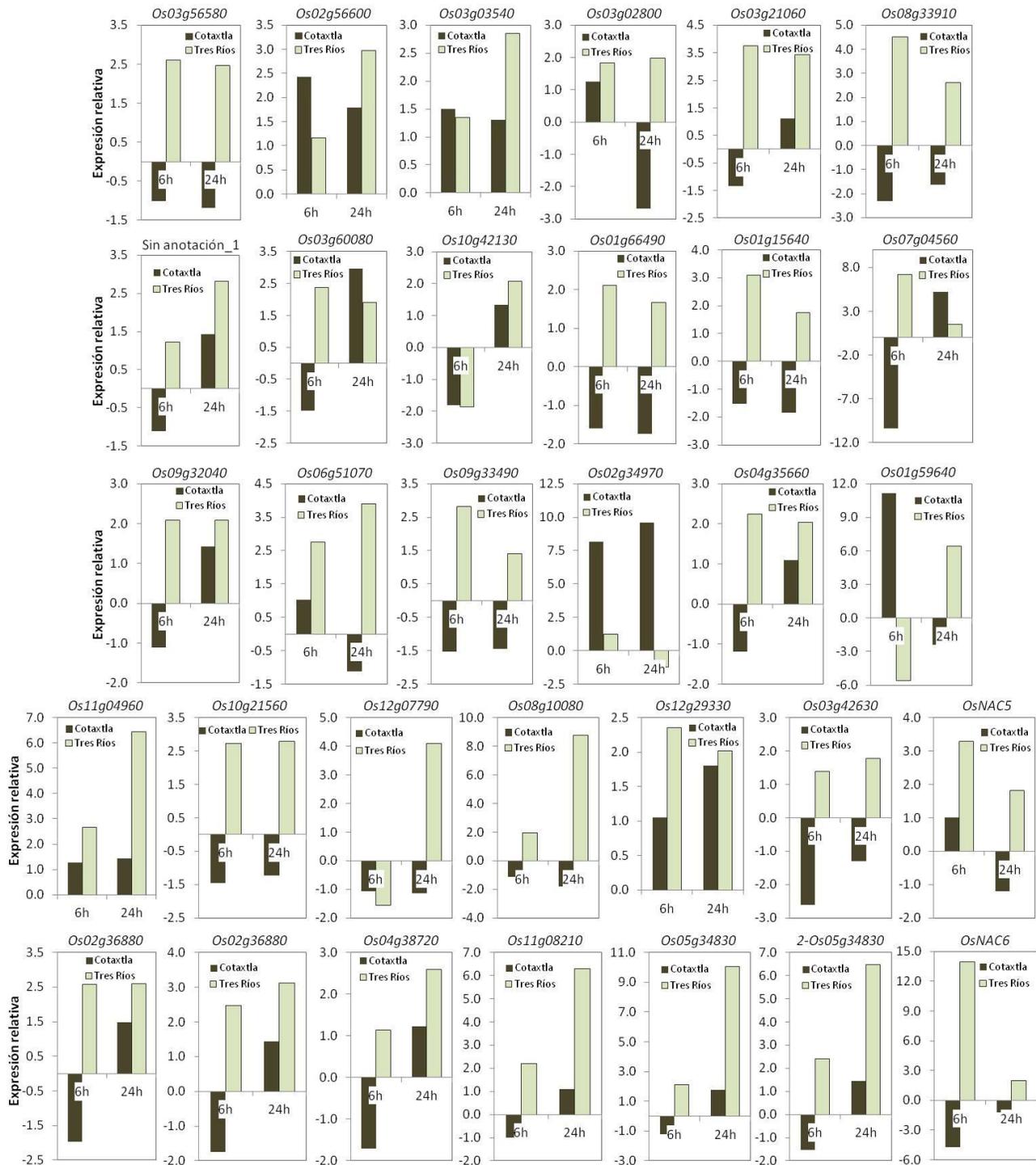


Figura 5. Perfil de expresión de genes NAC en hojas de dos cultivares de arroz (Cotaxtla y Tres Ríos), bajo condiciones de salinidad durante 6 y 24 h. La expresión relativa de los genes fue determinada como la tasa de cambio con el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, normalizada con *actina* como gene de referencia y con el testigo (sin estrés).

5.3.5. Patrón de expresión de genes *NAC* regulados por sequía

De acuerdo a los criterios definidos para el análisis de la expresión relativa de los genes de interés, de un total de 41 genes, 24 de ellos (58.5%) mostraron ser expresados diferencialmente, ya sea 6 o 24 h después de la aplicación de 18.5% de PEG, para inducir sequía; tanto en el cultivar Cotaxtla como Tres Ríos. El nivel de expresión relativa de cada uno de estos genes regulados por sequía se presenta en la Figura 6.

Independientemente del tiempo de muestreo (6 h o 24 h), once genes fueron inducidos por sequía, con una tasa de cambio \geq a 2, en el cultivar Cotaxtla y ningún gen fue reprimido (tasa de cambio \leq a -2). En la cultivar Tres Ríos, 17 genes fueron inducidos y 3 reprimidos (*Os10g42130*, *Os07g04560* y *Os01g59640*). Otros seis genes fueron inducidos en ambos cultivares: *Os08g33910*, *Sin anotación_1*, *Os02g34970*, *Os11g08210*, *1_Os05g34830* y *2_Os05g34830* (Figura 6).

De manera similar que bajo condiciones de salinidad, el patrón de expresión de los genes regulados por sequía consiste en un incremento paulatino en el nivel de expresión de 6 a 26 h. Otros genes presentan una tasa de cambio \geq de 2 a las 6 h y posteriormente una reducción en su nivel de expresión a las 24 h de haber aplicado los tratamientos (< 2). Por el contrario, tres genes (*Os10g42130*, *Os07g04560* y *Os01g59640*) fueron reprimidos a las 6 h, y sólo el último gen mostró ser inducido a las 24 h, es decir; que los dos primeros genes no fueron expresados diferencialmente.

Se identificaron tres genes (*Os03g60080*, *Os07g04560* y *Os01g59640*) con mayor potencial para estar involucrados en las respuestas al estrés por sequía, ya que fueron inducidos en el cultivar Cotaxtla (catalogada con mayor tolerancia que el otro cultivar evaluado) y, al mismo tiempo, reprimidos en Tres Ríos, que resultó más sensible a sequía en los estudios fisiológicos.

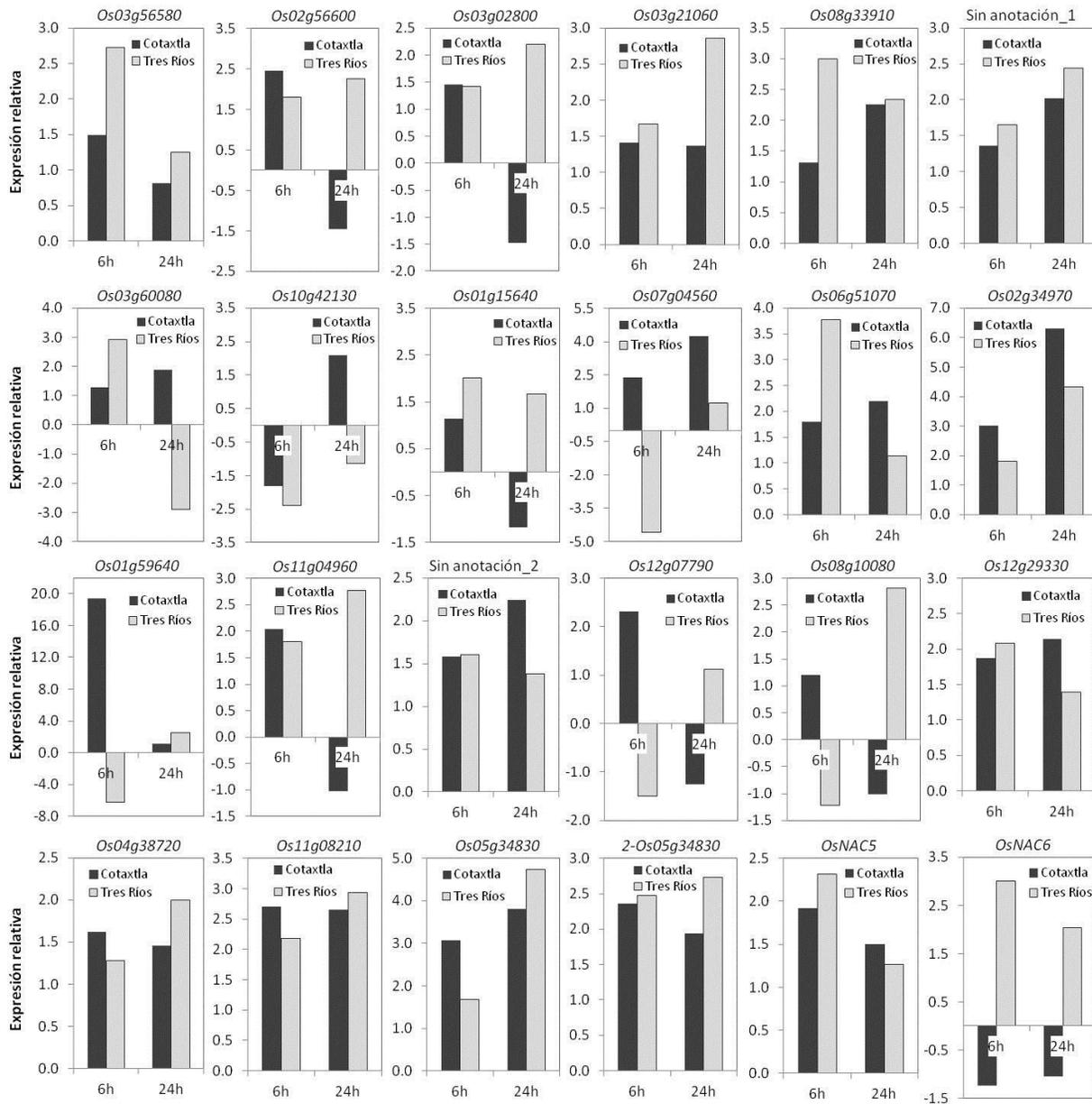


Figura 6. Nivel de expresión de genes *NAC* en hojas de dos cultivares de arroz (Cotaxtla y Tres Ríos), bajo condiciones de sequía durante 6 y 24h. La expresión relativa de los genes fue determinada como la tasa de cambio con el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, normalizada con *actina* como gene de referencia y con el testigo (sin estrés).

5.3.6. Genes *NAC* con expresión diferencial en Cotaxtla y Tres Ríos

Los factores de transcripción *NAC* regulan varios procesos fisiológicos, incluyendo aquellos que responden a condiciones de estrés hídrico y estrés

osmótico, como la sequía y salinidad (Olsen *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 2010). Con la finalidad de identificar el perfil de expresión de 41 genes *NAC* en hojas de arroz, plántulas de arroz de 20 días fueron sometidas a sequía y salinidad durante 6 y 24 h. Estos estudios de expresión se realizaron con la técnica de RT-PCR en tiempo real.

De los resultados de la expresión relativa encontramos que, en el cultivar Cotaxtla, un total de 18 genes fueron regulados por los tratamientos aplicados, de los cuales 10 genes fueron diferencialmente expresados por sequía (*Sin anotación_1*, *Sin anotación_2*, *Os10g42130*, *Os06g51070*, *Os11g04960*, *Os12g07790*, *Os12g29330*, *Os11g08210*, *1_Os05g34830* y *1_Os05g34830*), 3 genes (*Os03g02800*, *Os03g42630* y *OsNAC6*) por salinidad y 5 genes (*Os02g56600*, *Os08g33910*, *Os07g04560*, *Os02g34970* y *Os01g59640*) por ambos estreses. En la cultivar Tres Ríos, un gen (*Os02g34970*) fue regulado por sequía, nueve genes (*Os03g03540*, *Os01g66490*, *Os09g32040*, *Os09g33490*, *Os04g35660*, *Os10g21560*, *Os12g07790*, *Os02g36880* y *Os02g36880*) y 21 más tanto por sequía como por salinidad (Figura 7). Estos resultados indican que la cultivar Tres Ríos tuvo un mayor número de genes que se superponen, es decir, que están regulados por sequía y salinidad. De los genes que fueron inducidos por los dos tipos de estrés, cuatro de ellos (*Os02g56600*, *Os08g33910*, *Os07g04560* y *Os01g59640*) están regulados en ambos cultivares evaluados.

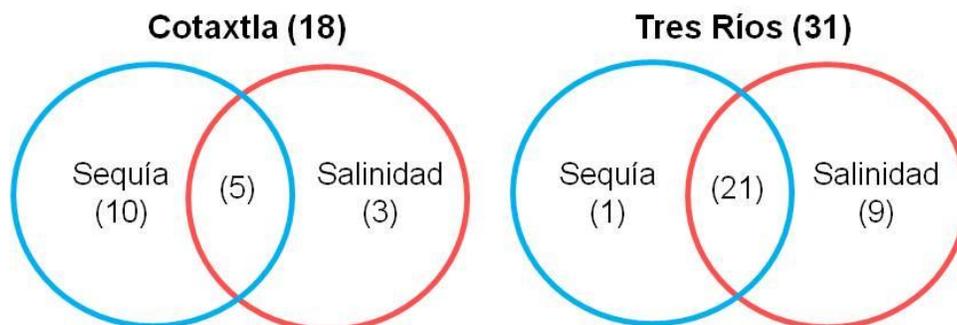


Figura 7. Diagrama de Venn indicando el número de genes regulados (inducidos y/o reprimidos) específicamente por sequía o salinidad, así como por ambos estreses durante 6 y 24 h en hojas de arroz de los cultivares Cotaxtla y Tres Ríos.

Los genes regulados por sequía y salinidad, en Cotaxtla, corresponden a proteínas putativas o similares a las proteínas NAM (**No apical meristem**), proteínas hipotéticas, y genes de las proteínas conocidas como OsNAC4, NAC2, OsNAC1, OsNAC5 y OsNAC6 (Cuadro 3). Estos genes fueron diferencialmente expresados ya sea por sequía y/o salinidad, a las 6 o 24 h de la aplicación de tratamientos.

Cuadro 3. Genes NAC regulados por sequía y salinidad, 6 y 24h después del inicio del estrés, en hojas de arroz del cultivar Cotaxtla.

Identificador	Nomenclatura [§]	Descripción	6h		24h	
			Sequía	salinidad	sequía	Salinidad
Os02g56600	ONAC032	No apical meristem (NAM) protein, putative	Inducido	inducido		
Os03g02800	ONAC054	No apical meristem (NAM) protein, putative				Reprimido
Os08g33910	ONAC063	Similar to NAM (no apical meristem)-like protein		reprimido	inducido	
Sin anotación_1		No apical meristem (NAM) protein, putative			inducido	
Os10g42130	ONAC121	putative NAM (no apical meristem) protein			inducido	
Os07g04560	ONAC096	hypothetical protein	inducido	reprimido	inducido	Inducido
Os06g51070	ONAC095	NAM (no apical meristem)-like protein [imported] - Arabidopsis			inducido	
Os02g34970	ONAC028	hypothetical protein	inducido	inducido	inducido	Inducido
Os01g59640	ONAC035	No apical meristem (NAM) protein, putative	inducido	inducido		Reprimido
Os11g04960	ONAC125	Putative OsNAC4 protein	inducido			
Sin anotación_2		No apical meristem (NAM) protein, putative			inducido	
Os12g07790	ONAC135	hypothetical protein	inducido			
Os12g29330	ONAC139	Similar to NAC domain protein NAC2			inducido	
Os03g42630	ONAC006	putative OsNAC1 protein		reprimido		
Os11g08210	OsNAC5/ ONAC009	OsNAC5 protein [imported] - rice	inducido		inducido	
1_Os05g34830	1_ONAC088	OsNAC5 protein [imported] - rice	inducido		inducido	
2_Os05g34830	2_ONAC088	OsNAC5 protein [imported] - rice	inducido			
		OsNAC6		reprimido		

El Locus Identificador fue adoptado de la base de datos TIGR. * Casi todos los genes fueron obtenidos de Caldana *et al.* (2007), a excepción de OsNAC6 de Nakashima *et al.* (2007). [§] Tomado de Fang *et al.* (2008)

Para el caso del cultivar Tres Ríos, un gran número de genes que fueron regulados por sequía o salinidad pertenecen a proteínas putativas NAM, otras a proteínas hipotéticas, proteínas NAC similares a los dominios NAC1 y NAC2, algunas más son las llamadas OsNAC1, OsNAC4, OsNAC6, dos genes que codifican proteínas OsNAC2 y cuatro genes para OsNAC5. Por otro lado, genes como *Os08g33910*, *Os11g08210* (OsNAC5), *2_Os05g34830* (OsNAC5) y OsNAC6 fueron inducidos por sequía y salinidad a las 6 y 24h del muestreo. El gen *Os01g59640* fue reprimido por ambos estreses a las 6 h, para luego ser inducidos a las 24 h.

El gen *OsNAC5* ya ha sido caracterizado como inducido por salinidad en las hojas bandera y panículas de plantas de arroz cultivar IR75862, cuya regulación es dependiente de ABA (Sperotto *et al.*, 2009). También ha sido reportado que *OsNAC5* está involucrado en las respuestas y adaptación de plantas de arroz a la sequía, salinidad y frío (Takasaki *et al.*, 2010). Por su parte, Song *et al.* (2011) encontraron que la represión de este gen en arroz reduce la tolerancia a la sequía, salinidad y frío; mientras, que la sobreexpresión en *Arabidopsis* y arroz incrementa la tolerancia a estos estreses.

Otro gen NAC, *OsNAC6/SNAC2* fue inducido por estrés abiótico y tratamiento con ácido jasmónico, y la sobreexpresión de este gen resultó en un incremento en la tolerancia del arroz a la sequía, salinidad y frío (Ohnishi *et al.*, 2005), así como al estrés biótico (Nakashima *et al.*, 2007). Además, estimula una mejor germinación y tasa de crecimiento, bajo condiciones de alta salinidad; incrementó la tolerancia a tratamientos con PEG y mayor sensibilidad al ABA (Hu *et al.*, 2008).

Además, se ha encontrado que el gen *OsNAC2/ONAC004* puede controlar el número de macollos en arroz. La sobreexpresión de *OsNAC2* promueve el amacollamiento, lo que mejora la estructura de la planta para una mejor eficiencia en el uso de la luz y un mayor potencial para la producción de biomasa (Mao *et al.*, 2007).

Cuadro 4. Genes *NAC* regulados por sequía y salinidad, 6 y 24 h bajo estrés, en hojas de arroz del cultivar Tres Ríos.

Identificador	Nomenclatura [§]	Descripción*	6h		24h	
			Sequía	salinidad	sequía	Salinidad
Os03g56580	ONAC066	putative NAC domain protein	Inducido	inducido		Inducido
Os02g56600	ONAC032	No apical meristem (NAM) protein, putative			inducido	Inducido
Os03g03540	ONAC056	No apical meristem (NAM) protein, putative				Inducido
Os03g02800	ONAC054	No apical meristem (NAM) protein, putative			inducido	Inducido
Os03g21060	ONAC058	No apical meristem (NAM) protein, putative		inducido	inducido	Inducido
Os08g33910	ONAC063	Similar to NAM (no apical meristem)-like protein	Inducido	inducido	inducido	Inducido
Sin anotación_1		No apical meristem (NAM) protein, putative			inducido	Inducido
Os03g60080	SNAC1/ ONAC002	putative NAC-domain protein	inducido	inducido	reprimido	
Os10g42130	ONAC121	putative NAM (no apical meristem) protein	reprimido			Inducido
Os01g66490	ONAC075	No apical meristem (NAM) protein, putative		inducido		
Os01g15640	OsNAC8/ ONAC074	No apical meristem (NAM) protein, putative	inducido	inducido		
Os07g04560	ONAC096	hypothetical protein	reprimido	inducido		
Os09g32040	ONAC042	Similar to nam-like protein 7		inducido		Inducido
Os06g51070	ONAC095	NAM (no apical meristem)-like protein [imported] – Arabidopsis	inducido	inducido		Inducido
Os09g33490	ONAC001	Similar to NAC domain protein NAC2		inducido		
Os02g34970	ONAC028	hypothetical protein			inducido	
Os04g35660	ONAC079	No apical meristem (NAM) protein, putative		inducido		inducido
Os01g59640	ONAC035	No apical meristem (NAM) protein, putative	reprimido	reprimido	inducido	inducido
Os11g04960	ONAC125	Putative OsNAC4 protein		inducido	inducido	inducido
Os10g21560	ONAC061	putative transcription factor		inducido		inducido
Os12g07790	ONAC135	hypothetical protein				inducido
Os08g10080	ONAC104	Similar to NAC domain protein NAC1			inducido	inducido
Os12g29330	ONAC139	Similar to NAC domain protein NAC2	inducido	inducido		inducido
Os02g36880	OsNAC1/ ONAC027	OsNAC1 protein		inducido		inducido
Os04g38720	OsNAC2/ ONAC004	OsNAC2 protein			inducido	inducido
Os11g08210	OsNAC5/ ONAC009	OsNAC5 protein [imported] - rice	inducido	inducido	inducido	inducido
1_Os05g3483	1_ONAC088	OsNAC5 protein [imported] - rice		inducido	inducido	inducido

Identificador	Nomenclatura [§]	Descripción*	6h		24h	
			Sequía	salinidad	sequía	Salinidad
0						
2_Os05g3483	2_ONAC088	OsNAC5 protein [imported] - rice	inducido	inducido	inducido	inducido
0		OsNAC5 ^a	inducido	Inducido		
		OsNAC6 ^b	inducido	Inducido	inducido	inducido

El Locus Identificador fue adoptado de la base de datos TIGR. * Casi todos los genes fueron obtenidos de Caldana *et al.* (2007), a excepción de OsNAC5^a, el cual fue obtenido de Sperotto *et al.* (2009) y OsNAC6^b de Nakashima *et al.* (2007). § Tomado de Fang *et al.* (2008).

5.3.7. Efecto del estrés osmótico en el crecimiento de plantas de arroz

El crecimiento de plantas de arroz fue evaluado seis días después de la aplicación del estrés osmótico provocado por sequía (18.5% PEG) y salinidad (100 mM NaCl). Para esto, se determinó la altura de vástago y raíz (Figura 8) en plantas de arroz de los cultivares Cotaxtla y Tres Ríos de 20 días de crecimiento en condiciones hidropónicas. Para la altura de vástago, no se obtuvieron diferencias significativas en el testigo. Sin embargo, bajo condiciones de estrés se obtuvieron reducciones significativas en ambos cultivares.

En el testigo, la longitud de raíz en el cultivar Tres Ríos tuvo las raíces más grandes que Cotaxtla. Bajo condiciones de estrés y con respecto al testigo, Cotaxtla no presentó reducciones significativas, contrario a lo obtenido en Tres Ríos donde la longitud de raíz fue afectada negativamente tanto por sequía como por salinidad.

La reducción en el crecimiento, bajo condiciones de salinidad se debe principalmente a la toxicidad citosólica del Na⁺ que compite con el K⁺ por los principales sitios de unión en procesos metabólicos clave que incluyen reacciones enzimáticas, síntesis de proteínas y funciones de los ribosomas (Shabala y Cuin, 2008). En lo que se refiere a la sequía, los principales daños que afectan el crecimiento son el estrés osmótico, que conduce a la deshidratación celular, y déficit hídrico con una disminución del potencial hídrico en los tejidos vegetales (Hadiarto y Tran, 2011).

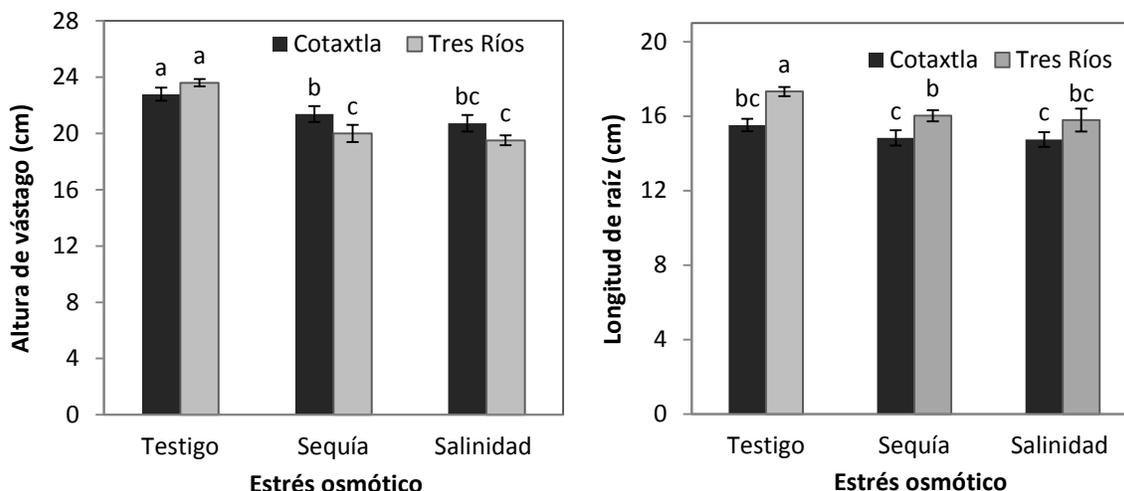


Figura 8. Altura de vástago y longitud de raíz de plántulas de arroz cultivares Cotaxtla y Tres Ríos crecidas bajo condiciones de sequía y salinidad durante 6 días. Medias con letras distintas en cada subfigura, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Barras sobre las columnas indican desviación estándar.

5.3.8. Contenido de ácido abscísico y clorofila

La síntesis de ABA es una de las respuestas más rápidas de las plantas al estrés abiótico, ya que está involucrada en procesos de desarrollo y regulación de respuestas adaptativas a sequía y alta salinidad (Hadiarto y Tran, 2011). Asimismo, se ha encontrado que bajo estrés por sequía, se incrementa el nivel endógeno de ABA (Du *et al.*, 2010). Esto concuerda los datos obtenidos en esta investigación, ya que, bajo condiciones de sequía, encontramos un incremento significativo en el contenido de ABA en ambos cultivares evaluados (Figura 9). Sin embargo, bajo condiciones de salinidad, sólo Tres Ríos tuvo un aumento en la síntesis de ABA, comparado con el testigo.

Además, la expresión de varios genes regulados por sequía y salinidad son controlados por ABA a nivel transcripcional, es decir que la expresión de estos genes es dependiente de ABA. En este sentido, el mayor contenido de ABA fue obtenido en el cultivar Tres Ríos bajo condiciones de salinidad (Figura 9), lo que resulta interesante ya que este cultivar tuvo el mayor número de genes (30) inducidos bajo las mismas condiciones (Figura 4). Estos hallazgos indican que algunos o varios genes pueden tener una expresión dependiente de ABA, lo cual

se podría averiguar analizando los promotores de esos genes e identificando los elementos que actúan en *cis*, lo que nos daría un mejor entendimiento del papel del ABA en la regulación de los genes.

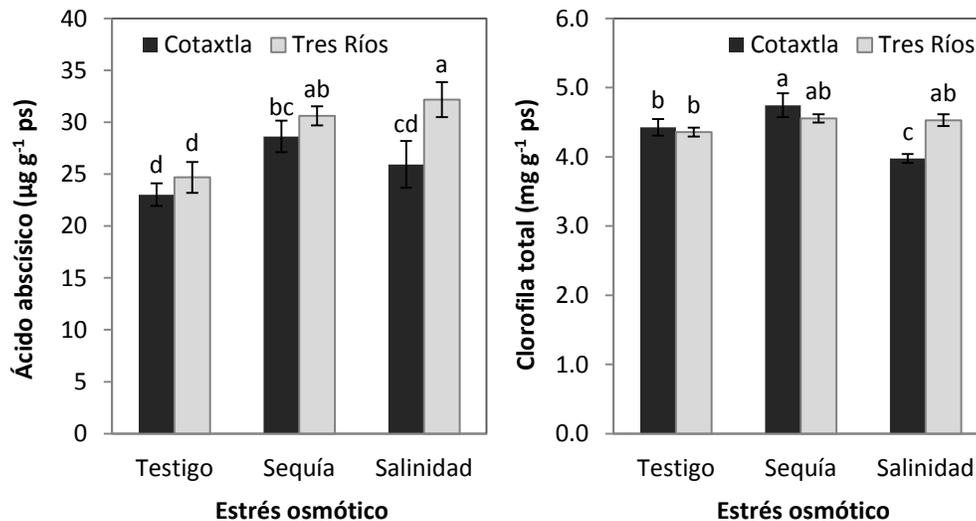


Figura 9. Contenido de ABA y clorofila en hojas de arroz cultivares Cotaxtla y Tres Ríos, bajo condiciones de estrés por sequía y salinidad durante 48 h. ps = peso seco. Medias con letras distintas en cada subfigura, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Barras sobre las columnas indican desviación estándar.

Por otro lado, se sabe que la senescencia es un proceso que ocurre de una manera dependiente de la edad; sin embargo, el inicio y el progreso de este proceso puede estar influenciado por una cultivar de hormonas y condiciones de estrés (Sperotto *et al.*, 2009), entre las cuales destacan la sequía y salinidad. Además, la senescencia se caracteriza por la degradación de clorofila y desintegración de cloroplastos (Balazadez *et al.*, 2008). En este sentido, se determinó el contenido de clorofila total (Figura 9), encontrando que el cultivar Cotaxtla tuvo un incremento significativo bajo la exposición de sequía por 48 h, mientras que en condiciones de salinidad se obtuvo una reducción estadísticamente significativa. Contrario a esto, Tres Ríos no presentó cambios en el contenido de clorofila, bajo condiciones de estrés. Paradójicamente, se ha

reportado al ABA como un inductor de la senescencia (Criado *et al.*, 2007); mientras que en los resultados de esta investigación no se encontró dicha relación, ya que Tres Ríos tuvo el mayor contenido de ABA y no presentó cambios en el contenido de Clorofila. Esto tampoco se observó en la cultivar Cotaxtla, donde no hubo cambios en el contenido de ABA, pero sí reducción en el contenido de clorofila, con respecto al testigo, lo cual indica que en Cotaxtla, el proceso de degradación de clorofila es una consecuencia común del estrés por salinidad, pero independiente de ABA. Además, podría indicar que algunos factores de transcripción de la familia NAC pueden ser genes asociados a la senescencia, pero cuya expresión sea independiente de ABA.

5.4. CONCLUSIONES

En esta investigación se presenta el análisis del perfil de expresión de 41 genes de factores de transcripción de la familia NAC, bajo condiciones de sequía y salinidad en hojas de arroz de dos cultivares mexicanos (Cotaxtla y Tres Ríos). Se identificaron 10 genes potenciales (*Os03g02800*, *Os08g33910*, *Os01g66490*, *Os01g15640*, *Os07g04560*, *Os09g33490*, *Os10g21560*, *Os03g42630*, *Os02g36880* y *OsNAC6*) para ser involucrados en las respuestas a salinidad y tres genes (*Os03g60080*, *Os07g04560* y *Os01g59640*) para sequía, ya que tuvieron un patrón de expresión contrastante en los dos cultivares evaluados.

Bajo condiciones de salinidad, Cotaxtla presenta degradación de clorofila y un menor contenido de ABA, lo cual significa que es un proceso independiente de ABA. Mientras que en Tres Ríos, se obtuvo un mayor contenido de ABA, pero sin cambios en la clorofila, confirmando lo obtenido en Cotaxtla, senescencia inducida por salinidad independiente de ABA.

Los hallazgos aquí reportados proveen información útil sobre genes *NAC* en arroz, asociados con la respuesta al estrés osmótico, que pueden ser utilizados para la generación de plantas con mayor tolerancia al estrés por sequía y salinidad, lo que representa una estrategia biotecnológica para enfrentar los efectos del cambio climático que están afectando severamente a la agricultura en México.

5.5. LITERATURA CITADA

- Aida, M., T. Ishida, H. Fukaki, H. Fujisawa and M. Tasaka.** 1997. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *The Plant Cell*, 9:841-857.
- Arnon, D. I.** 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts - polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24:1-15.
- Balazadeh, S., D. M. Riaño-Pachón, and B. Mueller-Roeber.** 2008. Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, Suppl 1:63-75.
- Caldana, C., W. R. Scheible, B. Mueller-Roeber and S. Ruzicic.** 2007. A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. *Plant Methods*, 3:7.
- Christiansen, M. W., P. B. Holm and P. L. Gregersen.** 2011. Characterization of barley (*Hordeum vulgare* L.) NAC transcription factors suggests conserved functions compared to both monocots and dicots. *BMC Research Notes*, 4:302.
- Christianson, J. A., E. S. Dennis, D. J. Llewellyn and I. W. Wilson.** 2010. ATAF NAC transcription factors: Regulators of plant stress signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 5:428-432.
- Criado, M. V., I. N. Roberts, M. Echeverria, A. J. Barneix.** 2007. Plant growth regulators and induction of leaf senescence in nitrogen-deprived wheat plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26:301-307.
- Du, H., N. Wang, F. Cui, X. Li, J. Xiao and L. Xiong.** 2010. Characterization of the b-carotene hydroxylase gene *DSM2* conferring drought and oxidative stress resistance by increasing Xanthophylls and abscisic acid synthesis in rice. *Plant Physiology*, 154:1304-1318.
- Fang, Y., J. You, K. Xie, W. Xie, L. Xiong.** 2008. Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. *Molecular Genetics & Genomics*, 280: 547-563.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).** 2011. **FAO Cereal Supply and Demand Brief.** FAO, Rome. Available in: <http://www.fao.org/worldfoodsituation/wfs-home/csdb/es/>
- Feller, A., K. Machemer, E. Braun and E. Grotewold.** 2011. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *The Plant Journal*, 66:94-116.
- Ficklin, S. P., F. Luo and F. A. Feltus.** 2010. The Association of Multiple Interacting Genes with Specific Phenotypes in Rice Using Gene Coexpression Networks. *Plant Physiology*, 154:13-24.

- Guénin, S., M. Mauriat, J. Pelloux, O. V. Wuytswinkel, C. Bellini and L. Gutierrez.** 2009. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of Experimental Botany*, 60:487-493.
- Hadiarto, T. and L. S. P. Tran.** 2011. Progress studies of drought-responsive genes in rice. *Plant Cell Reports*, 30: 297–310.
- Hu, H., M. Dai, J. Yao, B. Xiao, X. Li, Q. Zhang and L. Xiong.** 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 35:12987-12992.
- Hu, H., J. You, Y. Fang, X. Zhu, Z. Qi, L. Xiong.** 2008. Characterization of transcription factor gene *SNAC2* conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Molecular Biology*, 67:169-181.
- Jeong, J. S., Y. S. Kim, K. H. Baek, H. Jung, S. -H. Ha, Y. D. Choi, M. Kim, C. Reuzeau and J. -K. Kim.** 2010. Root-Specific Expression of *OsNAC10* Improves Drought Tolerance and Grain Yield in Rice under Field Drought Conditions. *Plant Physiology*, 153:185-197.
- Kikuchi, S., K. Satoh, T. Nagata, N. Kawagashira, K. Doi, N. Kishimoto, J. Yazaki, M. Ishikawa, H. Yamada, H. Ooka, et al.** 2003. Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from *japonica* rice. *Science*, 301:376-379.
- Le, D. T., R. Nishiyama, Y. Watanabe, K. Mochida, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki and L. S. P. Tran.** 2011a. Genome-Wide Expression Profiling of Soybean Two-Component System Genes in Soybean Root and Shoot Tissues under Dehydration Stress. *DNA Research*, 18:17-29.
- Le, D. T., R. Nishiyama, Y. Watanabe, K. Mochida, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki and L. S. P. Tran.** 2011b. Genome-Wide Survey and Expression Analysis of the Plant-Specific NAC Transcription Factor Family in Soybean During Development and Dehydration Stress. *DNA Research*, 18:263-276.
- Li, W. X., Y. Oono, J. Zhu, X. J. He, J. M. Wu, K. Iida, X. Y. Lu, X. Cui, H. Jin, J. K. Zhu.** 2008. The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and post-transcriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell*, 20: 2238-2251.
- Mao, C. Z., W. N. Ding, Y. R. Wu, J. Yu, X. W. He, H. X. Shou and P. Wu.** 2007. Overexpression of a NAC-domain protein promotes shoot branching in rice. *New Phytologist*, 176:288-298.
- Murashige T and F Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.

- Nakashima, K., L. S. Tran, D. Van Nguyen, M. Fujita, K. Maruyama, D. Todaka, Y. Ito, N. Hayashi, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki.** 2007. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal*, 51:617-630.
- Nakashima, k., Y. Ito, and K. Yamaguchi-Shinozaki.** 2009. Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in Arabidopsis and Grasses. *Plant Physiology*, 149:88-95.
- Ohnishi T., S. Sugahara, T. Yamada, K. Kikuchi, Y. Yoshiba, H. Y. Hirano, and N. Tsutsumi.** 2005. OsNAC6, a member of the NAC gene family, is induced by various stresses in rice. *Genes & Genetic Systems*, 80:135-139.
- Olsen, A.N., H. A. Ernst, L. L. Leggio and K. Skriver.** 2005. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Science*, 10:79-87.
- Ooka, H., K. Satoh, K. Doi, T. Nagata, Y. Otomo, K. Murakami, K. Matsubara, N. Osato, J. Kawai, P. Carninci, Y. Hayashizaki, K. Sozuki, K. Kojima, Y. Takahara, K. Yamamoto and S. Kikuchi.** 2003. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research*, 10:239-247.
- Qu, L.-J. and Y. -X. Zhu.** 2006. Transcription factor families in *Arabidopsis*: major progress and outstanding issues for future research. *Current Opinion in Plant Biology*, 9:544-549.
- Riechmann, J. L., J. Heard, G. Martin, L. Reuber, C. Jiang, J. Keddie, L. Adam, O. Pineda, O. J. Ratcliffe, R. R. Samaha, et al.** 2000. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290:2105-2110.
- SAS.** 1990. SAS/STAT User's guide. Ver. 6.0 SAS Institute, Inc. Cary, NC 1686 p.
- Schmittgen, T. D. and K. J. Livak.** 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3:1101-1108.
- Shabala, S. and T. A. Cuin.** 2008. Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, 133:651-669.
- Shen, H., F. Chen and R. A. Dixon.** 2009. A Bioinformatic Analysis of NAC Genes for Plant Cell Wall Development in Relation to Lignocellulosic Bioenergy Production. *Bioenergy Research*, 2:217-232.
- Shinozaki, K., K. Yamaguchi-Shinozaki and M. Seki.** 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 6:410-417.
- Song, S. Y., Y. Chen, J. Chen, X. Y. Dai, W. H. Zhang.** 2011. Physiological mechanisms underlying OsNAC5-dependent tolerance of rice plants to abiotic stress. *Planta* 234:331-345.

- Souer, E., A. van Houwelingen, D. Kloos, J. Mol, R. Koes.** 1996. The *no apical meristem gene* of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell*, 85:159-170.
- Sperotto, R. A., F. K. Ricachenevsky, G. L. Duarte, T. Boff, K. L. Lopes, E. R. Sperb, M. A. Grusak and J. P. Fett.** 2009. Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. *Planta*, 230:985-1002.
- Takasaki, H., K. Maruyama, S. Kidokoro, Y. Ito, Y. Fujita, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Nakashima.** 2010. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Molecular Genetics and Genomics*, 284:173-183.
- Tran, L.S., R. Nishiyama, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki.** 2010. Potential utilization of NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach. *GM Crops*, 1:32-39.
- Xiong, Y., T. Liu, C. Tian, S. Sun, J. Li and M. Chen.** 2005. Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between *monocots* and *eudicots*. *Plant Molecular Biology*, 59: 191-203.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and K. Shinozaki.** 2006. Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses. *Annual Review of Plant Biology*, 57:781-803.
- Yang, X, V. Römheld and H. Marschner.** 1994. Effect of bicarbonate on root-growth and accumulation of organic-acids in Zn-inefficient and Zn-efficient rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil*, 164:1-7.
- Zhang, H., J. Jin, L. Tang, Y. Zhao, X. Gu, G. Gao and J. Luo.** 2011. PlantTFDB 2.0: update and improvement of the comprehensive plant transcription factor database. *Nucleic Acids Research*, 39:D1114-D1117.
- Zheng X., B. Chen, G. Lu and B. Han.** 2009. Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379:985-989.

CAPÍTULO VI

CAPÍTULO VI.

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y FENOTÍPICA DEL FACTOR DE CHOQUE TÉRMICO (*Os02g13800*) EN ARROZ BAJO ESTRÉS SALINO

Soledad García-Morales, Camila Caldana, Libia I. Trejo-Téllez, Fernando C. Gómez-Merino, E. Braulio Herrera-Cabrera y David Espinosa-Victoria

RESUMEN

La salinidad induce respuestas fisiológicas y moleculares en plantas, que incluyen cambios fisiológicos, bioquímicos, metabólicos y de expresión genética; ésta última, regulada por factores de transcripción. Con el uso del arroz como modelo, en esta investigación se analizó la expresión del gen *Os02g13800*, con la técnica de RT-PCR en tiempo real, en la raíz del mutante *hsf1-1* (heat shock transcription factor 1) y cultivar Nipponbare tipo silvestre de arroz. También, se evaluó el efecto de NaCl en el crecimiento de plántulas y morfología de raíz de ambos genotipos. La mutación fue hecha en plantas del cultivar Nipponbare (*Oryza sativa* ssp. japonica) con una inserción de T-DNA aproximadamente 30 pb corriente arriba del codón de terminación de la traducción del gen *factor de choque térmico Os02g13800 (heat shock factor 1-1, hsf1-1)*. Las semillas fueron esterilizadas y sembradas en medio MS con cada uno de los tratamientos (0, 50 y 100 mM NaCl). Las plántulas crecieron en ambiente controlado (16 h luz, 140 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 24 °C y 70% HR). Cinco días después de la germinación se realizaron cortes transversales de la radícula y siete días después se determinó la longitud de vástago y raíz, peso fresco y seco. Se confirmó una reducción del 98% en la expresión de *Os02g13800* en raíces del mutante *hsf1-1* comparado con el tipo silvestre; además, mediante RT-PCR en tiempo real se confirmaron siete genes como putativos blanco de *Os02g13800*, de los 12 genes blanco identificados por microarreglos. Por otro lado, en los genotipos mutante *hsf1-1* y Nipponbare tipo silvestre, el crecimiento de vástago y raíz fue reducido al incrementar la concentración de NaCl; la misma respuesta se obtuvo en el peso fresco y seco. Las diferencias fueron encontradas en el desarrollo de aerénquima en la raíz. El

mutante *hsf1-1* presentó mayor porcentaje de aerénquima que el tipo silvestre Nipponbare. Esto puede indicar que *hsf1-1* es más tolerante a salinidad, ya que el aerénquima aumenta la exclusión de Na, evitando su transporte al vástago.

Palabras clave: *Oryza sativa*, factor de transcripción, inserción T-DNA, salinidad, aerénquima

6.1. INTRODUCCIÓN

La salinidad es uno de los principales factores que limitan la productividad de los cultivos. Aproximadamente 20% de la tierra cultivable en el mundo y cerca de la mitad de las áreas bajo irrigación están afectadas por salinidad (Zhu, 2001). Durante la respuesta y adaptación de las plantas a diversos estreses, muchos genes son inducidos, así como la acumulación de una gran cantidad de proteínas funcionales relacionadas con la resistencia al estrés (Seki *et al.*, 2002; Shinozaki *et al.*, 2003). Como un estimulador de la expresión génica, los factores de transcripción (FT) juegan un papel importante en la regulación de muchos aspectos de la biología de las plantas, lo que incluye crecimiento, desarrollo y respuesta al estrés biótico y abiótico (Gao *et al.*, 2006).

La expresión de los genes relacionados con el estrés abiótico es ampliamente regulada por factores de transcripción específicos. Los factores de transcripción son proteínas que intensifican o reprimen la expresión de los genes a través de su unión a secuencias específicas del ácido desoxirribonucleico en los promotores de sus genes blanco (Riechmann *et al.*, 2000). Los genes que codifican FT representan una fracción considerable del genoma de todos los organismos eucariontes, incluyendo plantas superiores. Análisis del genoma del arroz indican que aproximadamente 2.6% de los genes identificados codifican factores de transcripción (Yu *et al.*, 2002).

Factores de transcripción, miembros de las familias APETALA2 (AP2), bZIP, zinc finger, MYB, NAC y HSF han mostrado tener funciones en respuesta al estrés (Kikuchi *et al.*, 2003). La familia de factores de transcripción de choque térmico, HSF (Heat Shock Factors, factor de choque térmico), está compuesta de

módulos funcionales que indican el complejo de regulación de esta familia de factores de transcripción, a niveles intra- e intermoleculares. La expresión de los genes de choque térmico es crucial para la supervivencia de las células expuestas a estímulos extracelulares, pero también durante la fisiología celular normal (Pirkkala *et al.*, 2001).

En todos los organismos, la respuesta al choque térmico está regulada a nivel transcripcional por los HSF, los cuales son activados por estrés que conducen a una unión específica con los elementos de choque térmico (Heat Shock Element, HSE) en el promotor y posteriormente la transcripción de estos genes. Todos los HSF contienen un dominio de unión al DNA, un dominio oligomerizado, una secuencia de localización nuclear y en muchos casos una secuencia de exportación nuclear (Nover *et al.*, 2001). El dominio de unión al DNA, en HSF de plantas, está codificado en dos partes separadas por un intrón, el cual está insertado inmediatamente corriente arriba de la parte que codifica para el motivo de unión al DNA H2-T-H3 (hélice-giro-hélice), este motivo permite el reconocimiento específico y la unión con el HSE palindrómico, 5'AGAAnnTTCT-3' en el promotor de los genes blanco (Schulthsis *et al.*, 1996). La posición del intrón es idéntica en todos los HSF, pero el tamaño es altamente variable entre diferentes genes *Hsf* en plantas (Nover *et al.*, 2001).

La mayoría de los HSF, conocidos en plantas, pueden ser clasificados como grupo A o B y subgrupos, como se ha hecho en *Lycopersicon esculentum*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Pisum sativum*, *Nicotiana tabacum*, *Medicago sativa* y *Glycine max*. Los HSF de la clase C muestran variación en la secuencia del dominio de unión al DNA. (Nover *et al.*, 2001).

En arroz se han reportado 68 miembros de la familia HSF (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2010). Los HSF son activadores transcripcionales de las proteínas de choque térmico, y a su vez éstas están involucradas en respuestas a varios estreses abióticos como calor, sequía, salinidad y frío (Hu *et al.*, 2009).

Por otro lado, la transferencia de DNA (T-DNA) es el segmento de DNA del plásmido inductor de tumor que está presente en la bacteria patogénica *Agrobacterium tumefaciens* que es transferido a las células vegetales e insertado

dentro del DNA de la planta como parte de un proceso de infección. Esta propiedad ha sido explotada por inserción al azar del T-DNA dentro del genoma de la planta. Dependiendo donde se insertó el T-DNA en el gen y otros factores como la redundancia de los genes, la acción del gen es usualmente interrumpida, lo que se conoce como genes knock-out. Ya que se conoce la secuencia del DNA foráneo (T-DNA), con el uso de primers específicos, una adecuada PCR y la secuenciación de los productos amplificados se puede identificar la localización genómica de donde se insertó el T-DNA (Chopra, 2005; Shikazono *et al.*, 2005). Por lo que, la generación de mutantes con inserción T-DNA juega un papel importante en la genómica funcional (Li *et al.*, 2006), ya que de esta manera se puede identificar su función.

Por otro lado, el arroz es uno de los cultivos más importantes en el mundo y una especie modelo monocotiledónea para muchas investigaciones moleculares. En general, el arroz muestra variabilidad en el nivel de sensibilidad al estrés salino en los estados de desarrollo de su ciclo de vida. Es considerado relativamente tolerante durante la germinación; mientras que durante el crecimiento, las etapas de plántula joven y etapa temprana de reproducción son consideradas más sensibles a la salinidad (Singh *et al.*, 2008). Bajo condiciones de salinidad, el arroz ha desarrollado diferentes estrategias y mecanismos para resistirla, tales adaptaciones pueden ser anatómicas y fisiológicas.

Para investigar la función del *factor de choque térmico Os02g13800*, se utilizó un mutante (*hsf1-1*) que lleva una inserción T-DNA en el segundo exón de este gen, la respuesta de las plantas fue analizada bajo condiciones de salinidad. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue analizar la expresión del gen *Os02g13800*, con la técnica de RT-PCR en tiempo real, en la raíz del mutante *hsf1-1* (heat shock transcription factor 1) y cultivar Nipponbare tipo silvestre de arroz. Además de evaluar el efecto de NaCl en el crecimiento de plántulas y morfología de raíz de ambos genotipos.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Material vegetal

Se utilizaron dos genotipos de arroz, el tipo silvestre Nipponbare (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*) y el mutante *hsf1-1* (heat shock transcription factor 1). La mutación fue realizada en plantas del cultivar Nipponbare con una inserción de T-DNA en el segundo exón, aproximadamente 30 pb corriente arriba del codón de terminación de la traducción del gen *factor de choque térmico Os02g13800* (*heat shock factor*), tal como se puede observar en la Figura 1.

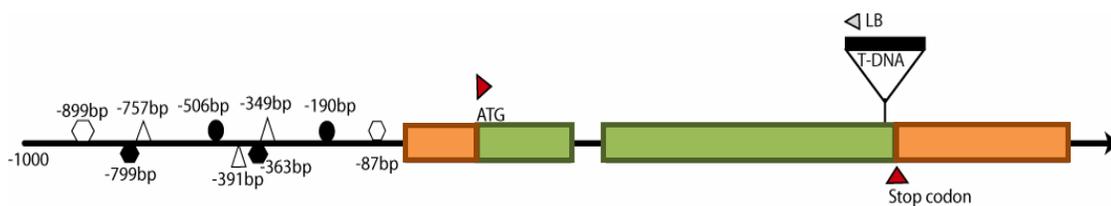


Figura 1. Estructura del gen *factor de choque térmico Os02g13800* (*heat shock factor*).

Estructura predicha del gen *factor de choque térmico Os02g13800*, obtenida de la plataforma del Instituto de Investigaciones Genómicas (The Institute of Genomic Research or TIGR: <http://rice.tigr.org>) v5. Los rectángulos verdes representan los exones, la línea delgada entre los dos rectángulos indica un intrón, los rectángulos anaranjados representan las regiones no traducidas (UTR). Los codones de inicio y final de la traducción están indicados con triángulos rojos. La flecha negra del lado derecho indica la orientación de la secuencia en el cromosoma. La posición de la inserción de T-DNA en el gen *Os02g13800* se muestra arriba, cerca del codón de final en el segundo exón. En la izquierda de la figura, corriente arriba del sitio predicho como inicio de la traducción (ATG), se indica los elementos que actúan en cis en el promotor del gen.

6.2.2. Condiciones de crecimiento, aplicación de tratamientos y variables evaluadas

Para el análisis de expresión del gen *Os02g13800* se usaron plantas crecidas en hidroponía. Antes de la germinación, las semillas de arroz fueron descascaradas, después fueron tratadas con agua estéril a 60 °C por 15 min, posteriormente las semillas fueron colocadas en doble capa de pape filtro húmedo para la germinación. Durante la germinación las semillas fueron conservadas a 28°C, en oscuridad, durante 4 d y después fueron transferidas a una cámara de crecimiento (12 h luz a 600 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 26 °C; 12 h oscuridad a 22°C y humedad

relativa del 70%). Cinco días después de la germinación, las plántulas fueron transferidas a hidroponía en recipientes de 10 L de solución nutritiva (Yang *et al.*, 1994). Dos semanas después del trasplante, se agregó el tratamiento salino aplicando 50 o 100 mM de NaCl. Las plantas testigo crecieron en forma paralela. Las raíces fueron colectadas después de 30 min, 3, 6 y 24 h de exposición al NaCl, las muestras fueron almacenadas a -80 °C.

Para el análisis fenotípico se usaron plántulas crecidas en placas con agar. Las semillas, sin cáscara, de los dos genotipos fueron esterilizadas con etanol al 70% por 5 min y desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 3% más una gota de Tween 20, durante 30 min, para después ser lavadas con agua estéril cinco veces y secadas en papel filtro. Los embriones secos fueron colocados en placas cuadradas con medio MS, suplementado con 3% (p/v) de sacarosa y solidificado con 0.8% de agar. Para la germinación, las placas fueron sometidas a oscuridad durante dos días a 28 °C. Dos días después de la siembra, las plántulas fueron trasplantadas a cajas cuadradas de petri con medio MS y 0, 50 y 100 mM de NaCl (concentración final). Después, fueron transferidas a un cuarto de cultivo de tejidos bajo condiciones controladas (16 h luz a $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 22 °C, 8 h de oscuridad y humedad relativa del 70%). Siete días después de la siembra y cinco días bajo estrés salino, se determinó la longitud de vástago y raíz, y peso de la materia fresca. Las muestras fueron secadas a 72 °C por 48 h, para posteriormente determinar el peso seco.

6.2.3. Extracción de RNA y digestión de DNA

Las raíces de tres réplicas biológicas fueron agrupadas para la extracción de RNA total, que se llevó a cabo usando el kit de extracción RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) de acuerdo las instrucciones del fabricante. La cantidad y calidad de RNA fue determinada por mediciones fotométricas a 230, 260 y 280 nm (NanoDrop ND-100 UV-Vis spectrophotometer, NanoDrop Technologies); la integridad del RNA fue supervisada en gel de agarosa al 1% (p/v).

La digestión del DNA se llevó a cabo en 15 μL de RNA total (2 μg) con 1 μL de DNase (Ambion) y 2 μL de buffer DNase 10X (Ambion); la reacción se realizó

durante 30 min a 37 °C, posteriormente se agregaron 1.8 µL de buffer de inactivación y se mantuvo a temperatura ambiente por 2 min, después se centrifugó a 14 000 rpm por 1.5 min. La contaminación con DNA fue probada, por PCR en tiempo real, usando la secuencia del intrón: gen *Os01g01840* (forward 5'-TAGAGAGTTTCGATCTTGCGCG-3' and reverse 5'-CGGCCATTCAATGAAGTCTT-3').

6.2.4. Síntesis de cDNA

El cDNA fue sintetizado de 2 µg de RNA total (después de la digestión de DNA) usando la transcriptasa reversa Superscript TMIII (Invitrogen). La calidad del cDNA fue evaluado por RT-PCR en tiempo real usando primers de genes de referencia (genes de mantenimiento o housekeeping), *β-tubulina* (forward 5'-GGAGTCACATGCTGCCTAAGGTT-3' y reverse 5'-TCACTGCCAGCTTACGGAGG-3') y *factor de elongación-1α* (forward 5'-GTCATTGGCCACGTCGACTC-3' y reverse 5'-TGTTTCATCTCAGCGGCTTCC-3').

6.2.5. Condiciones para la RT-PCR en tiempo real

La RT-PCR en tiempo real o cuantitativa se realizó con el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) en un volumen total de reacción de 5 µL (0.5 µL de cDNA, 2.0 µL de mezcla de primers 0.5 µM cada uno y 2.5 µL de mezcla de reacción SYBR Green de Applied Biosystem). La reacción de RT-PCR en tiempo real se realizó siguiendo el perfil térmico recomendado por el fabricante: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 min. Después de los 40 ciclos, la especificidad de las amplificaciones fue probada por calentamiento de 60 a 95 °C con una rampa de velocidad de 1.9 °C min⁻¹, lo que resultó en la curva de fusión.

El análisis de datos se realizó usando el programa SDS 2.2.1 (Applied Biosystems). La expresión de los factores de transcripción fue normalizada, restando el valor de C_T de los FT menos el C_T de los genes de referencia ($\Delta C_T = C_T$ del gen de interés - C_T gen de referencia). C_T (threshold cycle) es el número de ciclos en el

cual la fluorescencia del SYBR Green (ΔR_n), en la PCR, alcanza un valor arbitrario durante la fase exponencial de la amplificación del DNA (Czechwski *et al.*, 2004).

6.2.6. Análisis microscópico

Para los estudios microscópicos, se utilizó la radícula de plántulas de siete días de edad (días después de la germinación) de los dos genotipos de arroz. Las plántulas fueron germinadas en medio MS sin NaCl y dos días después fueron trasplantadas a placas con 50 y 100 mM de NaCl por 5 d. Las raíces fueron cortadas en segmentos de 10 mm y posteriormente fijadas en 4% de paraformaldehído y 2.5% de glutaraldehído en amortiguador fosfato salino (PBS) 10X, pH 7.2, por 2 h en vacío y después toda la noche a 4 °C. Después de la fijación, los segmentos de raíces fueron lavados tres veces con PBS 1X durante 15 min y después fueron gradualmente deshidratados con soluciones crecientes de etanol (del 30 al 100%). Posteriormente las raíces fueron embebidas en Technovit® 7100 y metacrilato de glicol y colocadas en moldes, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las secciones transversales (3 μm de grosor) fueron cortadas con el micrótopo rotatorio (Leica RM 2265) y teñidas con calcoflúor blanco al 0.01% (diluido 1:10 con PBS). Las secciones fueron observadas bajo luz UV en el microscopio Olympus BX 51. El diámetro de la sección transversal y el área del aerénquima se estimó usando el programa Cell^P (Olympus).

6.2.7. Análisis estadístico

Para el análisis de los caracteres evaluados, las cajas petri del estudio microscópico fueron colocadas bajo un diseño completamente al azar en un arreglo factorial 2 x 3 (genotipo x concentración de NaCl), resultando seis tratamientos con seis repeticiones cada uno. Una caja de petri con 10 plántulas fue considerada como una unidad experimental. Se hizo un análisis de varianza y comparación de medias mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95%, con apoyo del programa estadístico SAS ver. 9.0 (SAS, 1990).

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El factor de choque térmico *Os02g13800* fue seleccionado como gen candidato en base a los resultados obtenidos de un experimento de RT-PCR en tiempo real con 2500 factores de transcripción en dos cultivares de arroz (*subsp. indica*) bajo condiciones de estrés salino. Estos análisis revelaron que *Os02g13800* fue altamente inducido por salinidad (100 mM NaCl) tanto en el cultivar sensible, DR2 (30 min, 3, 6 y 24h después de la aplicación de tratamientos) como en el tolerante Cham (3 y 6h después del estrés) (Caldana, 2007).

Con la finalidad de confirmar y comparar la expresión del gen *Os02g13800* en el mutantes *hsf1-1* y en el tipo silvestre de arroz, las plantas fueron crecidas en hidroponía por 14 días. Las raíces fueron muestreadas a 0, 30 min, 1 y 3 h después de la aplicación de 50 mM de NaCl.

Para la caracterización funcional del gen *Os02g13800*, se utilizó una línea con una inserción T-DNA (a la que se le denominó mutante *hsh1-1*), dicha inserción se localiza aproximadamente 30 pb corriente arriba del codón de terminación de la traducción en el cultivar Nipponbare (*O. sativa subsp. japonica*). Análisis previos de esta línea indican un incremento en la tolerancia a la salinidad.

El factor de choque térmico *Os02g13800* codifica una región que comprende 897 pb y codifica una proteína de 298 aminoácidos. El dominio conservado de unión al DNA más la región adyacente HR-A/B característico de la familia HSF se localiza en la posición 13 a 177 en la porción N-terminal. Debido a que las proteínas HSF se clasifican de acuerdo a las características de su conector flexible y a la región de oligomerización (HR-A/B), la proteína *Os02g13800* pertenece al grupo C, el cual contiene siete residuos de aminoácidos entre las partes A y B (Kotak *et al.*, 2004).

6.3.1. Análisis de la expresión del gen *Os02g13800* en el tipo silvestre Nipponbare y el mutante *hsf1-1*

En un trabajo previo, la expresión de *Os02g13800* se redujo en el mutante *hsf1-1* (Caldana, 2007). Para confirmar este resultado se realizó un análisis de RT-PCR en tiempo real. El nivel de expresión de *Os02g13800* fue normalizado con el gen de referencia β -*tubulina*, con la expresión $\Delta C_T = C_T (\text{gen } Os02g13800) - C_T (\beta\text{-tubulina})$. El tipo silvestre Nipponbare con la expresión relativa superior (menor valor ΔC_T) fue usado como estándar. Entonces, el nivel relativo de mRNA fue calculado con la siguiente ecuación $100 * 2^{-[\Delta C_T(\text{mutante}) - \Delta C_T(\text{tipo silvestre})]}$. Se obtuvo una drástica reducción del 98% en la expresión de *Os02g13800* en raíces del mutante *hsf1-1* comparado con el tipo silvestre (Figura 2). Estos resultados confirman los obtenidos en el trabajo previo, donde la reducción en el nivel de transcritos fue el mismo (98%) en condiciones similares.

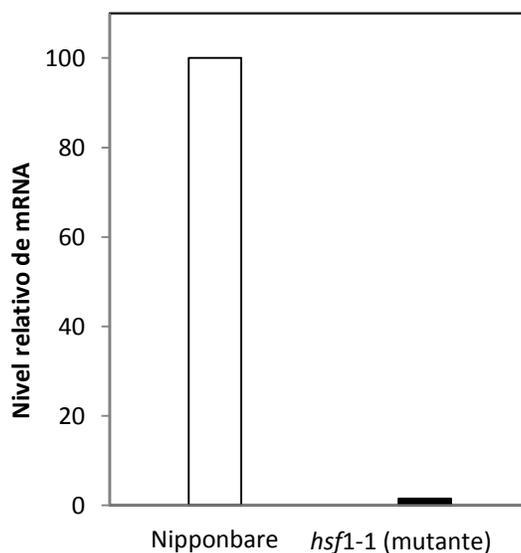


Figura 2. Nivel de expresión del gen *Os02g13800* en el tipo silvestre Nipponbare y mutante *hsf1-1*.

El nivel de transcritos del gen *Os02g13800* fue normalizado con el gen de referencia β -*tubulina*, usando la fórmula $\Delta C_T = C_T (Os02g13800) - C_T (\beta\text{-tubulina})$.

6.3.2. Patrón de expresión del gen *Os02g13800* en el tipo silvestre Nipponbare

La expresión de *Os02g13800* fue analizada usando la técnica de RT-PCR en tiempo real en raíces del tipo silvestre Nipponbare bajo condiciones de salinidad (50 mM NaCl), el control (sin la aplicación de sal se creció y muestreó al mismo tiempo); los muestreos se llevaron a cabo a 30 min, 1 y 3 h después de la aplicación de tratamientos. Como se puede ver en la Figura 3, inicialmente el gen *Os02g13800* fue inducido a los 30 min y después fue reprimido a las 3 y 6 h del estrés, esto en Nipponbare.

En el primer punto de muestreo (30 min), el nivel de expresión obtenido fue muy bajo y éste no puede ser considerado como inducido. Los resultados obtenidos después de 1 y 3 h muestran una tendencia similar en el patrón de expresión del gen *Os02g13800*, el nivel de expresión fue reprimido en raíces de Nipponbare.

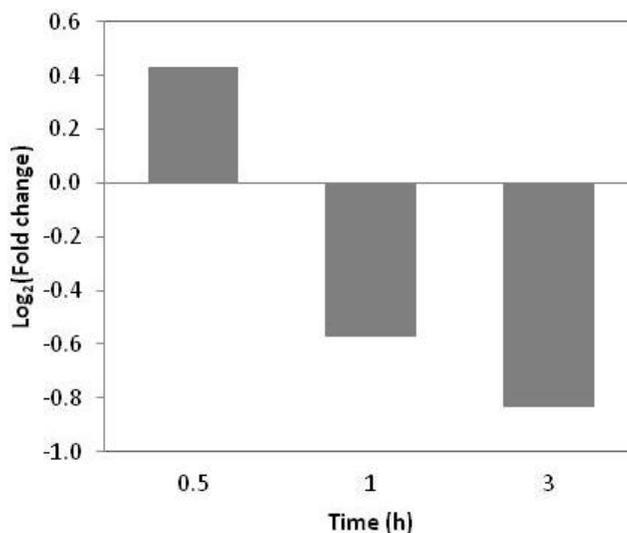


Figura 3. Cambios en la expresión del gen *Os02g13800* en el tipo silvestre Nipponbare, bajo por 50 mM de NaCl.

Se empleó la técnica de RT-PCR en tiempo real para el análisis de expresión del gen *Os02g13800* después de someter raíces de Nipponbare a 50 mM de NaCl. El nivel de expresión fue normalizado con el gen de referencia (*factor de elongación 1α*) y la tasa de cambio (Fold Change) fue calculada usando la expresión $2^{-\Delta\Delta C_T}$, donde $\Delta\Delta C_T$ representa $\Delta C_T \text{ estrés salino} - \Delta C_T \text{ testigo}$. Para obtener el resultado se transformó a escala \log_2 .

6.3.3. Confirmación de los genes blanco de *Os02g13800*

Con la finalidad de identificar los genes putativo blanco del gen *Os02g13800*, se realizó un perfil comparativo de expresión usando raíces del mutante *hsf1-1* y del tipo silvestre Nipponbare bajo condiciones de estrés salino (50 mM NaCl) y sin estrés (testigo). Datos obtenidos de un microarreglo (Affymetrix Gene Chip) revelaron 14 genes putativos blanco de *Os02g13800*, incluyendo proteínas de choque térmico (heat chock protein), proteínas LEA y proteínas inducidas por estrés hídrico, las cuales fueron inducidas por estrés salino en el tipo silvestre Nipponbare, pero no reguladas en el mutante *hsf1-1*.

En este trabajo, verificamos el nivel de expresión de 12 de los 14 candidatos putativo usando RT-PCR en tiempo real. Para lo cual, plantas de ambos genotipos fueron crecidas bajo 50 mM de NaCl y sin sal (testigo) durante 30 min, 1 y 3 h.

Los resultados obtenidos de la tasa de cambio en la expresión de los 12 genes putativos blanco, de *Os02g13800*, identificada en el tipo silvestre Nipponbare por RT-PCR en tiempo real después de 3 h de la aplicación de 50 mM NaCl, fueron comparados con el cambio transcripcional observado por el microarreglo Affymetrix (Cuadro 1).

Para identificar los genes putativos blanco de *Os02g13800*, en un trabajo previo, los genes regulados en Nipponbare por estrés salino fueron comparados con los genes inducidos en el mutante *hsf1-1*. Considerando la ausencia de un gen funcional (*Os02g13800*) en el mutante (también confirmado en este trabajo, Figura 2), sus genes blanco no pueden ser inducidos por estrés salino en *hsf1-1*, pero estos genes deberían ser regulados en Nipponbare. Un gen fue considerado putativo blanco de *Os02g13800* cuando su cambio transcripcional, bajo estrés salino, fue superior 2 veces en Nipponbare. Siguiendo este criterio de selección, en este estudio, se confirmaron siete genes como putativos blanco de *Os02g13800*, de los 12 genes blanco (datos en gris, Cuadro 1).

Cuadro 1. Comparación de los genes putativos blanco de *Os02g13800* medidos por microarreglo basado en hibridación (Affymetrix Gene Chip) y RT-PCR en tiempo real. La expresión de los genes blanco seleccionados fueron analizados en raíces de plantas de Nipponbare estresadas con 50 mM NaCl por 3 h.

Locus identifíer	Affimetrix	RT-PCR en tiempo real	Descripción
	log ₂ (FCh)	log ₂ (FCh)	
Os05g46480	2.7	5.3	late embryogenesis abundant protein, group 3
Os01g50910	2.0	3.8	late embryogenesis abundant protein, group 3
Os10g18820	3.9	5.9	dirigent-like protein
Os12g14580	2.1	0.4	tetraspanin family protein
Os04g01740	2.5	5.6	heat shock protein 82
Os11g37970	2.4	-2.9	win1 precursor, putative
Os12g43440	2.9	-0.2	thaumatin-like protein precursor, putative
Os02g36190	2.4	0.3	Cytochrome P450 71D7, putative
Os12g08260	3.2	1.0	pyruvate dehydrogenase E1 component, alpha subunit
Os03g12890	2.2	-1.1	branched-chain-amino-acid aminotransferase 5
Os03g60580	2.7	2.3	actin-depolimerizig factor 4
Os03g10090	3.1	3.9	polyol transporter protein 4

El experimento con Affymetrix fue realizado por Caldana (2007). Para análisis del nivel de expresión, usando RT-PCR en tiempo real, se usó *β-tubulina* para normalizar los datos obtenidos.

6.3.4. Análisis fenotípico

Para analizar la función *in vivo* del gen *Os02g13800* bajo condiciones de estrés, el mutante *hsf1-1*, generado de plantas del tipo silvestre Nipponbare, tiene una inserción T-DNA 30 pb corriente arriba del codón de terminación. Para lo cual, semillas de ambos genotipos fueron sembradas en agar sin NaCl (control), dos días después, cuando apareció la punta del coleóptilo, las semillas germinadas fueron transferidas a medio fresco con 50 mM y 100 mM de NaCl. Plántulas con cinco días bajo estrés salino fueron analizadas.

6.3.4.1. Fenotipo de las plántulas del mutante *hsf1-1* y el tipo silvestre Nipponbare

Como se muestra en la Figura 4, sin la aplicación de NaCl (testigo), se observa mayor crecimiento de vástago y raíz en el mutante *hsf1-1* comparado con el tipo silvestre Nipponbare. Sin embargo, se observó un pequeño incremento en el crecimiento de vástago y raíz de *hsf1-1* con 50 mM de NaCl. Las diferencias más significativas entre *hsf1-1* y Nipponbare fueron observadas cuando las plántulas fueron sometidas a estrés salino con 100 mM de NaCl. Es de destacarse, que bajo condiciones de salinidad, Nipponbare presenta más raíces laterales que el mutante, esto puede deberse a la mutación del tipo knockout (en este caso, la inserción de T-DNA) que condujo a cambios significativos en el fenotipo del mutante (Charng *et al.*, 2007). Así, las plantas del mutante *hsf1-1*, sin expresión del gen *Os02g13800*, muestran diferencias fenotípicas con respecto al tipo silvestre, provocado por estrés salino.

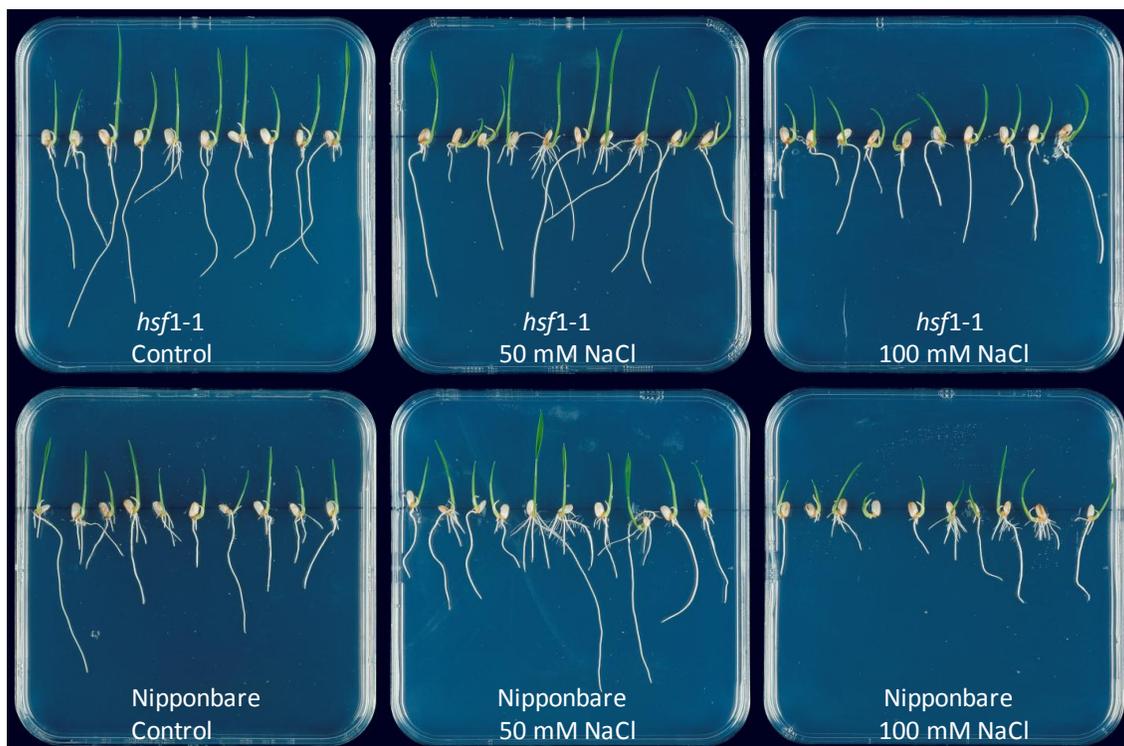


Figura 4. Efecto del estrés salino (0, 50 y 100 mM NaCl) en el crecimiento de plántulas del mutante *hsf1-1* y el tipo silvestre Nipponbare.

6.3.4.2. Crecimiento de plántulas del mutante y del tipo silvestre bajo estrés salino

Concentraciones crecientes de NaCl redujeron el crecimiento de plántulas tanto del tipo silvestre como del mutante *hsf1-1*. Al incrementar la concentración de la sal, la longitud de vástago y raíz disminuyen (Figura 5), en todos los casos las reducciones fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). Por ejemplo, con 100 mM de NaCl hubo una reducción de 33 y 37% en el vástago de *hsf1-1* y Nipponbare, respectivamente. Por su parte, en la raíz se tuvieron reducciones del 40% en el mutante *hsf1-1* y del 44% en el tipo silvestre Nipponbare, en todos los casos con respecto al control. De acuerdo a los resultados obtenidos, el crecimiento de la raíz fue más afectado que el crecimiento del vástago, esto debido a que la raíz está expuesta directamente al medio salino (Krishnamurthy *et al.*, 2009).

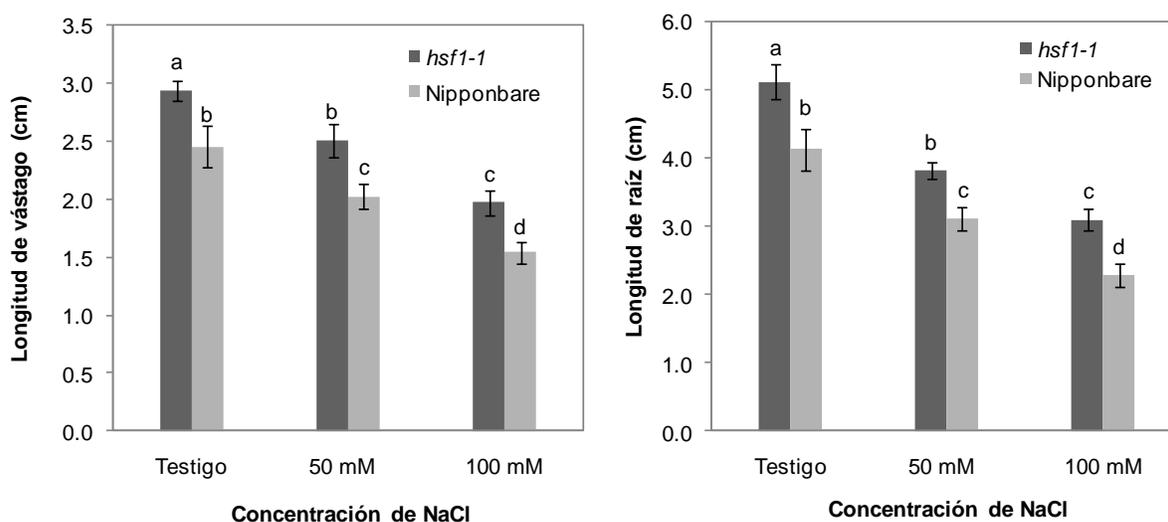


Figura 5. Efecto de NaCl en la longitud de vástago y raíz de plantas del mutante *hsf1-1* y Nipponbare tipo silvestre, cinco días de aplicación de tratamientos. Medias con letras distintas en cada subfigura, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Barras sobre las columnas indican desviación estándar.

6.3.4.3. Peso de la materia fresca y seca de dos genotipos

De manera general, el mutante *hsf1-1* tuvo mayor acumulación en el peso de la materia fresca y seca, tanto de vástago como de raíz, bajo todos los tratamientos evaluados (Figura 6). Para el caso del peso de la materia fresca, en vástago, el mutante *hsf1-1* presentó reducciones significativas ($p \leq 0.05$) con la aplicación de 50 mM de NaCl, tales reducciones fueron del 16%. Resultados similares se obtuvieron en el tipo silvestre, bajo las mismas condiciones. Con la aplicación de 100 mM de NaCl, las reducciones en el peso de la materia fresca de vástago fueron, alrededor, del 25% en ambos genotipos, comparado con el testigo. En el caso de la raíz, con la aplicación de 50 mM NaCl, el mutante incrementó ligeramente su peso de la materia fresca (6%), mientras que el tipo silvestre redujo su peso fresco de raíz, no obstante, en ninguno de los dos casos hubo diferencias significativas. Al agregar 100 mM NaCl en el medio de crecimiento, el mutante tuvo una reducción del 16% en el peso fresco de la raíz, por su lado el tipo silvestre presentó reducción del 21%, en todos los casos con respecto al testigo.

En el peso de la materia seca (Figura 6), el mutantes *hsf1-1* presentó reducciones significativas ($p \leq 0.05$) en el vástago, al aplicar 50 y 100 mM de NaCl, las reducciones fueron del 8 y 10%, respectivamente. Mientras que en el tipo silvestre, el peso seco del vástago tuvo una reducción del 8% con 50 mM; esta reducción se duplicó (16%) con la aplicación de 100 mM NaCl. En el caso del peso seco de la raíz, ambos genotipos mostraron disminuciones cuando se aplicó 100 mM NaCl en la solución hidropónica, con respecto al testigo; dicho decremento en el peso seco de la raíz fue superior al 25% tanto en el mutante como en el tipo silvestre. Estas reducciones en el peso de la materia seca son el resultado por un lado, de una reducción en la tasa de crecimiento de las hojas y la inhibición en el desarrollo de macollos debido a la presencia de sales en el medio de crecimiento; y por otro lado, por la acumulación de Na^+ en la planta, principalmente en la lámina foliar (Munns y Tester, 2008). El peso de la materia seca de la raíz fue el más afectado (mostró mayor reducción), debido a que la raíz está en contacto directo con las sales (Figura 4) afectado la división y la

elongación celular y como consecuencia reducción del crecimiento (Figura 5) y de la acumulación de biomasa (Figura 6).

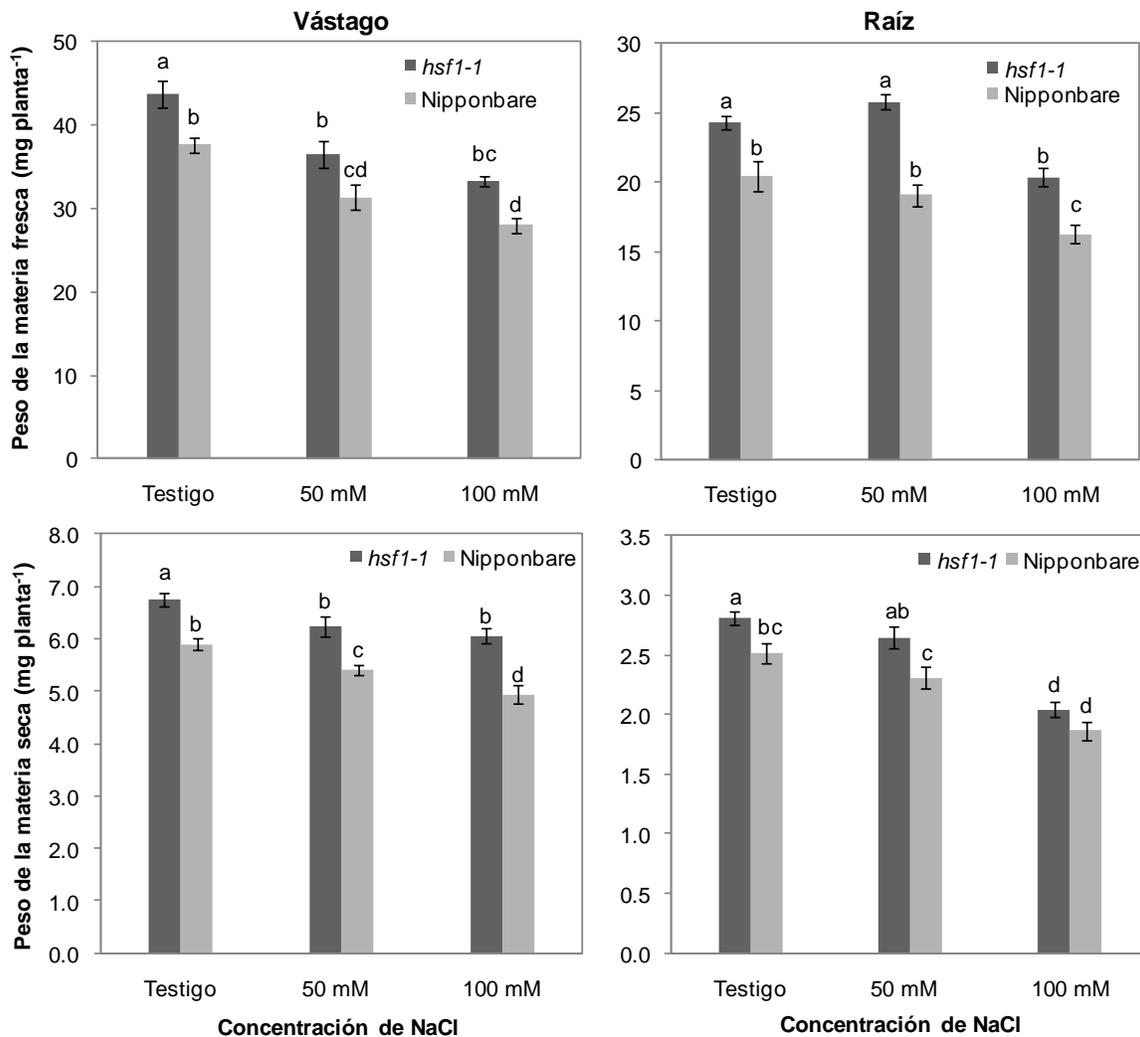


Figura 6. Efectos de diferentes concentraciones de NaCl en el peso de la materia fresca y seca de vástago y raíz en plantas del mutante *hsf1-1* y tipo silvestre Nipponbare, cinco días de aplicación de tratamientos.

Medias con letras distintas en cada subfigura, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Barras sobre las columnas indican desviación estándar.

6.3.5. Morfología de la raíz

Para identificar el efecto del estrés salino en la morfología de raíces del mutante *hsf1-1* y del tipo silvestre, las plántulas fueron expuestas a 0, 50 y 100 mM de NaCl durante cinco días. Se realizaron cortes transversales en la raíz principal, a 5 mm de la punta de la raíz. Las secciones transversales fueron teñidas con calcaflúor al 0.01% y posteriormente fueron observadas bajo luz UV.

6.3.5.1. Secciones transversales de raíces bajo estrés salino

Las secciones transversales de *hsf1-1* y de Nipponbare se presentan en la Figura 7. La estructura anatómica de las secciones transversales no presenta diferencias, sin la aplicación de sal (testigo). La mayor diferencia entre ambos genotipos fue encontrada en el córtex a 5 mm de la punta de la raíz. Las secciones de las raíces crecidas bajo 100 mM de NaCl (Figura 7 C y D) presentan más espacios aéreos tanto en *hsf1-1* como en Nipponbare, comprado con el testigo. Sin embargo, estas estructuras fueron más abundantes en el mutante. Estos espacios aéreos corresponden al aerénquima, usualmente formado en raíces maduras de muchos cereales (Ranathunge *et al.*, 2003).

Aparentemente, el estrés osmótico induce la formación prematura de aerénquima, esta estructura permite que el oxígeno pase de las hojas a la raíz. Estudios han mostrado que la tasa de difusión del oxígeno a las raíces está correlacionado con la habilidad de tolerar una gran cultivar de condiciones adversas durante el crecimiento (Ranathunge *et al.*, 2003; Mostajeran y Rahimi-Eichi, 2008).

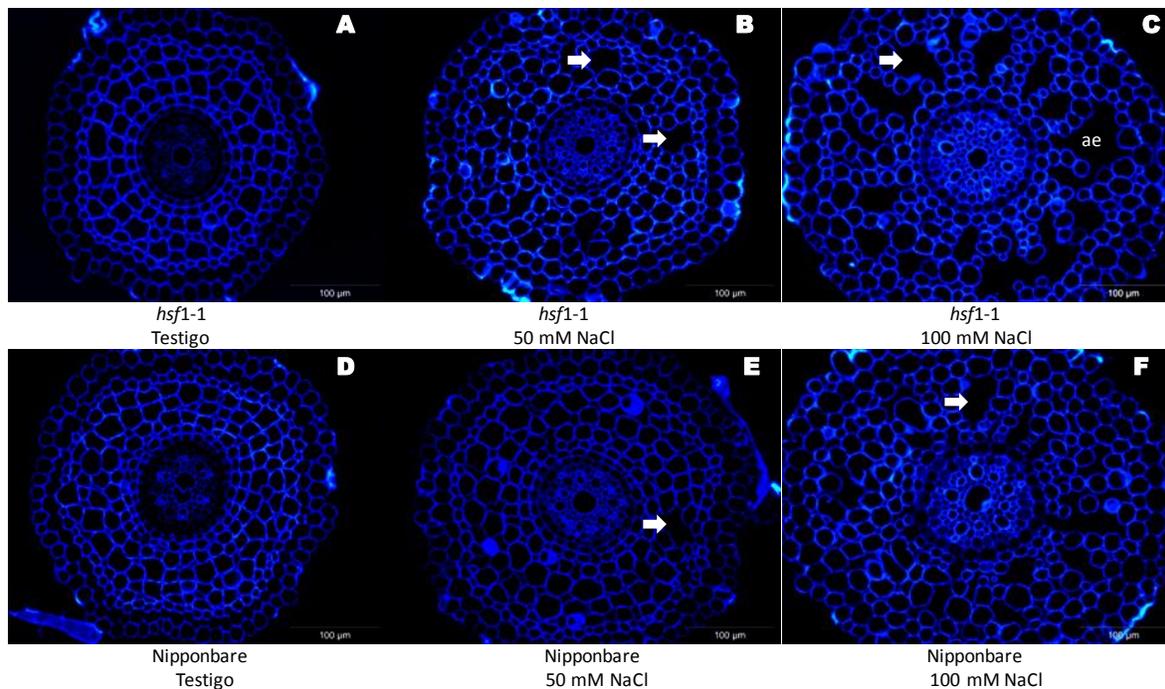


Figura 7. Secciones transversales de raíces del mutante *hsf1-1* y el tipo silvestre Nipponbare, cinco días de aplicación de NaCl.

Las secciones fueron tomadas 5 mm de la punta de la raíz. Las flechas muestran los espacios intercelulares que forman el aerénquima en el córtex.

6.3.5.2. Cuantificación del diámetro de la sección transversal y del aerénquima

Para identificar las diferencias en la sección transversal del mutante y del tipo silvestre, se midió el diámetro de dichas secciones. El diámetro de ambos genotipos incrementa con la aplicación de concentraciones crecientes de NaCl (Figura 7). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias estadísticas ($p \geq 0.05$) entre el mutante *hsf1-1* y el tipo silvestre Nipponbare bajo las mismas condiciones de estrés.

Por otro lado, con la finalidad de confirmar las diferencias en el desarrollo del aerénquima en el córtex de ambos genotipos, el área de esta estructura fue determinada en porcentaje del área total de la sección transversal (Figura 7). Sin la aplicación de NaCl (testigo), los dos genotipos presentan un porcentaje muy similar de aerénquima; sin embargo, con la aplicación de 50 mM la formación de

aerénquima incrementó, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los dos genotipos. Con 100 mM de NaCl, el desarrollo de esta estructura fue superior ($p \leq 0.01$) en el mutante *hsf1-1*.

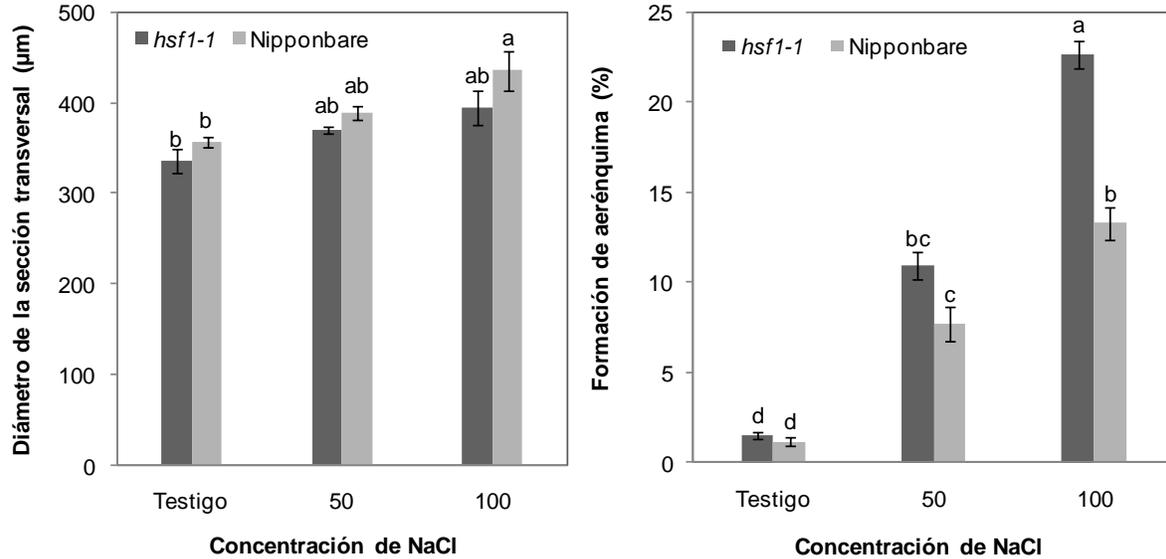


Figura 8. Efecto del estrés salino en el diámetro de la sección transversal de raíz y formación de aerénquima en el córtex del mutante *hsf1-1* y el silvestre Nipponbare.

Medias con letras distintas en cada subfigura, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Barras sobre las columnas indican desviación estándar.

La formación de aerénquima requiere la muerte de las células corticales en la raíz, y este proceso es mediado a través de la muerte celular programada (Drew *et al.*, 2000). Este mecanismo juega un papel importante en la respuesta adaptativa de la planta al medio ambiente. La muerte celular programada puede ser observada en respuesta a ataques de patógenos, y a varios estreses abióticos como salinidad, frío, anegación e hipoxia (Li *et al.*, 2007; Shabala, 2009). En este sentido, Liu *et al.* (2007) evaluaron dos ecotipos de arroz (IRAT109 e IR20) bajo estrés osmótico (salinidad y sequía) y encontraron que la muerte celular inducida por salinidad o sequía puede ser un mecanismo importante que contribuye a la

tolerancia del estrés abiótico. Además, Saqib *et al.* (2005) encontraron que los genotipos de trigo que desarrollaron más aerénquima bajo condiciones de salinidad y anegamiento (nivel reducido de oxígeno, similar al sistema de producción del arroz) fueron capaces de reducir la acumulación de Na en sus hojas, mantener mayores tasas fotosintéticas y crecimiento del vástago. Lo que sugiere que la formación de aerénquima en el mutante *hsf1-1* puede ser un mecanismo importante de tolerancia al estrés salino, comparado con Nipponbare.

Los resultados obtenidos del análisis de varianza muestran diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) entre los genotipos evaluados, en la mayoría de las variables observadas, excepto el diámetro de la sección transversal de las raíces (Cuadro 2), donde las diferencias fueron significativas ($p \leq 0.05$). Con respecto a los diferentes tratamientos con NaCl, todas las determinaciones resultaron altamente significativas. Sin embargo, de acuerdo a la interacción Genotipo x NaCl sólo el peso fresco de vástago y raíz, así como la formación de aerénquima presentaron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$). Lo que indica que se obtuvieron diferencias significativas al separar los efectos por genotipos y por los diferentes niveles de NaCl. No obstante, en la mayoría de las variables evaluadas no se obtuvieron diferencias significativas en la interacción genotipo x NaCl, debido al efecto producido por la aplicación conjunta de cada uno de los niveles de los dos factores analizados (genotipo y NaCl). Lo que significa que el genotipo no tiene efectos sobre los diferentes niveles de NaCl y viceversa, el efecto de estos dos factores es independiente.

Cuadro 2. Análisis de varianza de las variables de crecimiento, peso de la materia, diámetro y formación de aerénquima de dos genotipos de arroz (*hsf1-1* y Nipponabre) crecidos bajo tres concentraciones de NaCl (0, 50 y 100 mM) durante cinco días.

Variables	Fuente de variación		
	Genotipo	NaCl	Genotipo x NaCl
Grados de libertad	1	2	2
Altura de vástago	**	**	ns
Longitud de raíz	**	**	ns
Peso fresco de vástago	**	**	*
Peso fresco de raíz	**	**	**
Peso seco de vástago	**	**	ns
Peso seco de raíz	**	**	ns
Diámetro de la sección transversal	*	**	ns
Formación de aerénquima	**	**	*

ns = no significativo; * = significativo al 5%; ** = altamente significativo al 1%

6.4. CONCLUSIONES

En función de los objetivos planteados en este trabajo, el mutante *hsf1-1* presentó menor reducción en crecimiento y menos efectos negativos en la acumulación de biomasa por efecto de la salinidad, y tuvo mayor formación de aerénquima que el tipo silvestre Nipponbare de arroz. Por lo anterior, el *hsf1-1* es más tolerante a salinidad, ya que el aerénquima aumenta la exclusión de Na, evitando su transporte al vástago, lo que le confiere resistencia al mutante. Mediante RT-PCR en tiempo real, se confirmó que el mutante *hsf1-1* tuvo una reducción del 98% en el nivel relativo de RNA del gen *Os02g13800*. También, se confirmaron siete genes como putativos blanco de los 12 genes seleccionados mediante microarreglos (Affymetrix Gene Chip).

6.5. LITERATURA CITADA

- Caldana, C.** 2007. Genome wide identification and functional characterization of transcription factors involved in the initial phase of salt stress in rice. PhD Dissertation. Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology and University of Potsdam.
- Chang, Y. Y., H. C. Liu, N. Y. Liu, W. T. Chi, C. N. Wang, S. H. Chang and T. T. Wang.** 2007. A Heat-Inducible Transcription Factor, HsfA2, Is Required for Extension of Acquired Thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 143:251–262.
- Chopra, V. L.** 2005. Mutagenesis: Investigating the process and processing the outcome for crop improvement. *Current Science*, 89(2):353-359.
- Czechowski, T., R. P. Bari, M. Stitt, W. R. Scheible, and M. K. Udvardi.** 2004. Realtime RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root and shoot-specific genes. *Plant Journal*, 38:366-379.
- Drew, M. C., C. J. He and P. W. Morgan.** 2000. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends in Plant Science*, 5:123-127.
- Gao, G., Y. F. Zhong, A. Y. Guo, Q. H. Zhu, W. Tang, W. M. Zheng X. C. Gu, L. P. Wei and J. C. Luo.** 2006. DRTF: a database of rice transcription factors. *Bioinformatics*, 22:1286-1287.
- Hu, W., G. Hu and B. Han.** 2009. Genome-wide survey and expression profiling of heat shock proteins and heat shock factors revealed overlapped and stress specific response under abiotic stresses in rice. *Plant Science*, 176:583–590.
- Kikuchi, S., K. Satoh, T. Nagata, N. Kawagashira, K. Doi, N. Kishimoto, J. Yazaki, M. Ishikawa, H. Yamada, H. Ooka, et al.** 2003. Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice. *Science*, 301:376–379.
- Kotak, S., M. Port, A. Ganguli, F. Bicker and P. von Koskull-Doring.** 2004. Characterization of C-terminal domains of *Arabidopsis* heat stress

- transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization. *The Plant Journal*, 39:98-112.
- Krishnamurthy, P., K. Ranathunge, R. Franke, H.S. Prakash, L. Schreiber and M. K. Mathew.** 2009. The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 230:119-134.
- Li, Y., M. G. Rosso, P. Viehoveer and B. Weissarr.** 2006. GABI-Kat SimpleSearch: an *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database with detailed information for confirmed insertions. *Nucleic Acids Research*, 00:D1-D5.
- Li, J. Y., A. L. Jiang and W. Zhang.** 2007. Salt Stress-induced Programmed Cell Death in Rice Root Tip Cells. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49:481–486.
- Liu, S. H., B. Y. Fu, H.X. Xu, L. H. Zhu, H. Q. Zhai and Z. K. Li.** 2007. Cell death in response to osmotic and salt stresses in two rice (*Oryza sativa* L.) ecotypes. *Plant Science*, 172:897–902.
- Mostajeran, A. and V. Rahimi-Eichi.** 2008. Drought stress effects on root anatomical characteristics of rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Pakistan Journal of Biological Science*, 11:2173-2183.
- Munns, R. and M. Tester.** 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 651–81.
- Nover, L., K. Bharti, P. Doring, S. K. Mishra, A. Ganguli and K. D. Scharf.** 2001. *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress and Chaperones*, 6:177–189.
- Pérez-Rodríguez, P., D. M. Riano-Pachon., L. G. Guedes C., S. A. Rensing, B. Kersten and B. Mueller-Roeber.** 2010. PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Research*, 38:D822-D827.

- Pirkkala, L., P. Nykänen and L. Sistonen.** 2001. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB Journal*, 15:1118–1131.
- Ranathunge, K., E. Steudle and R. Lafitte.** 2003. Control of water uptake by rice (*Oryza sativa* L.): role of the outer part of the root. *Planta*, 217:193-205.
- Riechmann, J. L., J. Heard, G. Martin, L. Reuber, C. Z. Jiang, J. Keddie, L. Adam, O. Pineda, O. J. Ratcliffe, R. R. Samaha, R. Creelman, M. Pilgrim, P. Broun, J. Z. Zhang, D. Ghandehari, B. K. Sherman and G. Yu.** 2000. Arabidopsis transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290:2105-2110.
- Saqib, M., J. Akhtar and R.H. Qureshi.** 2005. Na⁺ exclusion and salt resistance of wheat (*Triticum aestivum*) in saline-waterlogged conditions are improved by the development of adventitious nodal roots and cortical root aerenchyma. *Plant Science*, 169:125–130.
- SAS.** 1990. SAS/STAT User's guide. Ver. 6.0 SAS Institute, Inc. Cary, NC 1686 p.
- Shikazono, N., C. Suzuki, S. Kitamura, H. Watanabe, S. Tano, A. Tanaka,** 2005. Analysis of mutations induced by carbon ions in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 56(412):587-596.
- Seki, M., M. Narusaka, J. Ishida, T. Nanjo, M. Fujita, Y. Oono, A. Kamiya, M. Nakajima, A. Enju, T. Sakurai, M. Satou, K. Akiyama, T. Taji, K. Yamaguchi-Shinozaki, P. Carninci, J. Kawai, Y. Hayashizaki and K. Shinozaki.** 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal*, 31:279–292.
- Shabala, S.** 2009. Salinity and programmed cell death: unravelling mechanisms for ion specific signaling. *Journal of Experimental Botany*, 60:709–712.
- Shinozaki, K., K. Yamaguchi-Shinozaki and M. Seki.** 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 6:410–417.

- Singh, A. K., M. W. Ansari, A. Pareek and S. L. Singla-Pareek.** 2008. Raising salinity tolerant rice: recent progress and future perspectives. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 14:137-154.
- Yang, X., V. Romheld and H. Marschner.** 1994. Effect of bicarbonate on root-growth and accumulation of organic-acids in Zn-inefficient and Zn-efficient rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil*, 164:1-7.
- Yu, J., S. N. Hu, J. Wang, G. K. S. Wong, S. G. Li, B. Liu, Y. J. Deng, L. Dai, Y. Zhou, X. Q. Zhang M. Cao, J. Liu, J. Sun, J. Tang, Y. Chen, X. Huang, W. Lin, C. Ye, W. Tong, L. Cong, J. Geng, Y. Han, L. Li, W. Li, G. Hu, X. Huang, W. Li, J. Li, Z. Liu, L. Li, J. Liu, Q. Qi, J. Liu, L. Li, T. Li, Wang X, Lu H, Wu T, Zhu M, Ni P, Han H, Dong W, Ren X, Feng X, Cui P, Li X, Wang H, Xu X, Zhai W, Xu Z, Zhang J, He S, Zhang J, Xu J, Zhang K, Zheng X, Dong J, Zeng W, Tao L, Ye J, Tan J, Ren X, Chen X, He J, Liu D, Tian W, Tian C, Xia H, Bao Q, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao W, Li P, Chen W, Wang X, Zhang Y, Hu J, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang G, Xiong Y, Li Z, Mao L, Zhou C, Zhu Z, Chen R, Hao B, Zheng W, Chen S, Guo W, Li G, Liu S, Tao M, Wang J, Zhu L, Yuan L, Yang H.** 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp.indica). *Science*, 296:79-92.
- Zhu, J. K.** 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6:66–71.