

Instituto Politécnico Nacional



Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada

"Estudio de las respuestas fenotípicas y fisiológicas del musgo *Ceratodon stenocarpus* ante estrés osmótico, salinidad y congelación bajo condiciones de cultivo *in vitro*

Para obtener el título de Maestra en Ciencias

PRESENTA

Elizabeth Morales Eliosa.

Directores

Dr. Miguel Angel Villalobos López Dra. Analilia Arroyo Becerra

Tepetitla de Lardizabal- Tlax.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de <u>Tepetitla-Tlaxcala</u> siendo las <u>11:00</u> horas del día <u>22</u> del mes de <u>Abril</u> del <u>2010</u> se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Fosgrado e Investigación de <u>CIBA-TLAXCALA</u> para examinar la tesis de titulada:

"Estudio de las respuestas fenotípicas y fisiológicas del musgo Ceratodon stenocarpus ante estres osmótico, salinidad y congelación bajo condiciones de cultivo in vitro".

Presentada por el alumno: Elizabeth Morales Elicsa Apelido paterno Apellido malerno Nombre(s) Con registro: A 8 9 0 8 0 3 aspirante de: Maestria en Biotecnología Aplicada Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron SU APROBACIÓN DE LA TESIS, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes. LA COMISIÓN REVISORA Director de Tesis Dr. Miguel Angel Villalobos López Dra. Analilia Arroyo Becerra Contro de Investigaci Dr. Jua Manuel Estévez P. Dra. Martha Dofores Bibbins Martinez an Biotecnologia Aplicade Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil PRESIDENTE DEL COLEGIO al 1. 2x C Dra. Alma Leticia Martinez Ayala

SIP-14



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de <u>Tepetitla-Tlaxcala</u> el día <u>28</u> del mes <u>Mayo</u> del año <u>2010</u>, el (la) que suscribe <u>Elizabeth Morales Eliosa</u> alumno (a) del Programa de <u>Maestría en Biotecnología Aplicada</u> con número de registro <u>A080389</u>, adscrito a <u>Centro de Investigación Aplicada</u>. CIBA-Tlaxcala, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de <u>Dr. Miguel Angel Villalobos</u> <u>López y Dra Analilia Arrollo Becerra y cede los derechos del trabajo intitulado "Estudio de las respuestas fenotípicas y fisiológicas del musgo *Ceratodon stenocarpus* ante estrés osmótico, salinidad y congelación bajo condiciones de cultivo *in vitro*", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.</u>

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección <u>ciba mangel_ipn@hotmail.com</u>. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Elizabeth Morales Eliosa Nombre y firma

CONTENIDO

Índice de figuras.

Resumen

Abstract

I.	INTRODUCCIÓN	14
II.	ANTECEDENTES	17
2	2.1 Panorama general de los efectos del estrés abiótico sobre las plantas	17
2	2.2 Estrategias de las plantas para contender con el estrés hídrico	19
	2.2.1 Escape:	19
	2.2.2. Evasion:	19 20
2	2.3	20
F	Respuestas de las plantas al estrés hídrico	20
	2.3.1 Inhibición del crecimiento:	20
	2.3.2 Cierre estomático	21
	2.3.3 Ajuste osmótico	21
2	2.4 Efectos de las bajas temperaturas en las plantas	22
2	2.5 La aclimatación de las plantas a frío y su papel en la tolerancia al	
C	congelamiento	23
2	2.6 Papel del ABA en la osmorregulación	25
2	2.7 Señalización del estrés abiótico	25
2	2.8	30
E	Evidencias generales de la regulación de la traducción en plantas	30
2	2.9	31
٦	Fransporte fotosintético de electrones y estrés	31
2	2.10. Fotosíntesis y los mecanismos afectados por el estrés abiótico.	32
2	2.11	36
٦	Folerancia a la desecación en plantas de resurrección	36
	2.11.1 Ajuste metabólico y sistemas antioxidantes	38
2	2.12. Briofitas	40
2	2.13	41
ł	Antecedentes directos del Proyecto	41

III. JUSTIFICACIÓN	42
IV. OBJETIVOS	43
4.1 Objetivo General	43
4.2 Objetivos Específicos	43
V. MATERIALES Y METODOS	44
5.1 Estrategia experimental para la obtención de esporas independiente stenocarpus	es de C44
5.2 Estrategia experimental para el análisis fenotípico y fisiológico de C stenocarpus sometido a estrés osmótico y salinidad.	;. 45
5.3 Estrategia experimental para el análisis fenotípico y fisiológico de C stenocarpus sometido a estrés por congelación.	;_ 46
5.4	47
Obtención de la línea EM4 de Ceratodon stenocarpus	47
5.5	47
Propagación de Ceratodon stenocapus	47
5.6 Tratamiento de estrés para	47
C. stenocarpus	47
5.7 Análisis del papel de ABA en la respuesta a estrés abiótico del proto C. stenocarpus	onema de 48
5.8	49
Efecto de ABA en el fotosistema II (PSII) de los protonemas estresados stenocarpus	de C49
VI. RESULTADOS	51
6.1 Material Biológico	51
6.2 Obtención de la línea EM4 de Ceratodon stenocarpus.	52
6.3. Análisis de la respuesta fenotípica del protonema de C. stenocarpu estrés osmótico y salino bajo condiciones de cultivo in vitro (mezcla de	s ante esporas)
6.3.1 <i>C. stenocarpus</i> en estrés osmótico generado por Manitol.	>> 55
6.3.2.	58
6.3.3. <i>C. stenocarpus</i> en estrés salino causado por Cloruro de Sodio (NaCl)	58 61
6.4 Participación de ABA en las respuestas de los protonemas de C.	
stenocarspus ante estrés osmótico y salino (mezcla de esporas)	64

6.4.1	65
ABA mejora la respuesta de C. stenocarpus cuando es sometido a estrés híper osmótico.	_ 65
6.4.2. C. stenocarpus sometido a estrés híper salino y la participación de ABA (mezcla de	Э
esporas)	68
6.5. Línea pura EM4 (monosporica) de Ceratodon stenocarpus sometida a est	rés
osmótico y salino en presencia de la fitohormona acido abscisico (ABA).	71
6.5.1. Línea pura EM4 de <i>C. stenocarpus</i> sometida a estrés híper osmótico y la participa	 ción
de ABA	72
6.5.1.1	74
Medición del fotosintema II (PSII) de la línea EM4 de C. stnocarpus sometida a estrés	
hiper-osmótico y la participación de ABA.	74
6.5.2. Línea pura EM4 de C. stenocarpus sometida a estrés híper salino y la participaciór	ו de
ABA	78
6.5.2.2. Medición del fotosistema II (PSII) de la línea EM4 de C. stenocarpus sometida	а
estrés híper-salino (NaCl)	80
6.5.3. Línea pura EM4 de <i>C. stenocarpus</i> sometida a estrés por congelación y la participa	ación
de ABA	84
6.5.3.1. Línea EM4 de <i>C. stenocarpus</i> ante estrés de -10°C por 24 hrs.	84
6.5.3.2. Línea EM4 de <i>C. stenocarpus</i> ante estrés de -10°C por siete días.	86
6.5.3.3. Línea EM4 de <i>C. stenocarpus</i> ante estrés de -20°C por 24 hrs.	88
6.5.3.4. Línea EM4 de <i>C. stenocarpus</i> ante estrés de -20°C por siete días.	90
6.5.3.5. La línea EM4 de <i>C. stenocarpus</i> ante estrés de -76°C por 24 hrs.	93
6.5.3.6. La línea EM4 de <i>C. stenocarpus</i> ante estrés de -76ºC por siete días	95
/II.Discusión	98

Bibliografía.

Índice de figuras

Fig. 1. Rutas de Señalización para la activación trasncripcional de genes inducidos por estrés abiótico.

Fig. 2. Esquema simplificado de los mecanismos fotosintéticos que pueden ser afectados por la sequía, frío y salinidad.

Figura 3. Ejemplos de plantas de resurrección de Sudáfrica investigadas para determinar los mecanismos de tolerancia a la desecación.

Figura 4. Obtención de esporas independientes de C. stenocarpus.

Figura 5. Diagrama de flujo para la evaluación fenotípica y fisiológica de *C. stenocarpus* sometido a estrés osmótico y salinidad.

Figura 6. Esquematización del tratamiento de congelación para la evaluación de las respuestas fenotípicas y fisiológicas del musgo *C. stenocarpus*

Figura. 7. Cultivo *in* vitro de *C. stenocarpus* a partir de mezcla de esporas.

Fig. 8. Germinación de esporas independientes de *C. stenocarpus* en medio MS0.5X.

Figura 9. Desarrollo de las clonas EM1, EM4 y EM6.

Figura 10. Retraso del desarrollo de las Clonas EM4 y EM6.

Figura 11. Selección de la Clona EM4 para los tratamientos de estrés osmótico, salino y congelación.

Figura 12. C. stenocarpus tolerante a estrés osmótico por Manitol.

Figura 13. *C. stenocarpus* recupera su metabolismo de un prolongado tiempo de exposición ante (25d) estrés osmótico (Manitol).

Figura 14. *C. stenocarpus* muestra fenotipo de tolerancia a estrés osmótico causado por Sorbitol.

Figura 15. *C. stenocarpus* tiene la capacidad de recuperar su metabolismo sometido a estrés causado por Sorbitol

Figura 16. El musgo *C. stenocarpus* tolerante a estrés salino (NaCl).

Figura 17. Análisis fenotípico de la recuperación metabólica de *C. stenocarpus* del estrés salino.

Figura 18. *C. stenocarpus* tiene la capacidad de recuperar su metabolismo a altas concentraciones de NaCl.

Figura. 19. La presencia de ABA en *C. stenocarpus* ayuda a contender con las respuestas fenotípicas ante estrés híper osmótico.

Figura 20. La participación de ABA en la recuperación de *C. stenocarpus* del estrés híper osmótico no es contundente.

Figura 21. Participación de ABA en *C. stenocarpus* ante estrés híper salino.

Figura 22. Análisis fenotípico de recuperación del musgo *C. stenocarpus* después de un estrés híper salino.

Figura 23. La línea EM4 de C. stenocarpus es tolerante a estrés híper osmótico.

Figura 24.Comportamiento del estatus del PSII de la Línea EM4 de *C. stenocarpus* ante estrés híper- osmótico (sorbitol).

Figura 25.El ABA tiene un papel importante en la línea EM4 en su recuperación de las vías metabólicas en tejidos dañados por estrés osmótico.

Figura 26. La línea EM4 de *C. stenoc*arpus tolerante a estrés hípersalino en presencia de ABA.

Figura 27. Comportamiento de la actividad fotosintética de la línea EM4 de *C. st*enocarpus sometida a estrés híper salino (NaCI).

Figura 28. La línea EM4 recupera su metabolismo normal después de un estrés híper salino de 10 días.

Figura 29. La línea EM4 es tolerante a estrés por congelación de -10°C por 24hrs.

Figura 29. Actividad fotosintética de la línea EM4 de *C. stenocarpus* sometida a estrés por congelación de -10°C por 24 hrs.

Figura 31. La línea EM4 de *C. stenocarpus* es tolerante a -10°C por 7 días en presencia de ABA.

Figura 32. Actividad fotosintética de la línea EM4 de *C. stenocarpus* sometida a estrés de -10°C por 7 días.

Figura 33. Análisis fenotípico de la recuperación de la clona EM4 después de un estrés de -20°C por 24hr.

Figura 34. Actividad fotosintética del PSII de la línea EM4 de *C. stenocarpus* sometida a estrés de -20°C por 24hrs.

Figura 35. La línea EM4 es tolerante a estrés de -20°C por siete días en presencia de ABA.

Figura 36. Actividad fotosintética del PSII de la línea EM4 de *C. stenocarpus* ante estrés de -20°C por siente días.

Figura 37. La línea EM4 de *C. stenocarpus* es tolerante a estrés de -76°C por 24hrs

Figura 38. Actividad fotosintética de la línea EM4 de *C.stenocarpus* ante estrés de -76°C por 24hrs.

Figura 39. Respuestas fenotípicas de la línea EM4 de *C. stenocarpus* ante estrés de -76°C por siete días.

Figura 40. Actividad fotosintética de la línea EM4 de *C. stenocarpus* ante estrés de -76°C por siete días.

Resumen

El crecimiento de las plantas y su productividad se ven afectados por los diversos factores de estrés abiótico. El déficit de agua es uno de los principales factores abióticos desfavorables afectado el crecimiento y rendimiento de los cultivos agrícolas. En general, la sequía se produce cuando el agua disponible en el suelo se reduce y las condiciones atmosféricas causan pérdida continua de agua por la transpiración o evaporación. En la naturaleza existen plantas que han desarrollado estrategias de tolerancia al déficit hídrico como son las briofitas son entre las primeras plantas que dominaron la vida terrestre desde más de 400 millones de años, y ahora son distribuidas en todo el mundo desde los trópicos hasta la Antártida (Proctor and Tuba 2002; Robinson et al. 2003). Su adaptación a la tierra se atribuye a la resistencia al estrés por desecación que causa una rápida deshidratación de las células (Oliver et al. 2000).

En este trabajo se realizaron estudios fenotípicos y fisiológicos en el musgo *Ceratodon stenocarpus* el cual no ha sido identificado, además ya se cuenta con el sistema de cultivo *in vitro*. Se realizaron ensayos en células de protonema obtenidas a través de la germinación de mezcla de esporas que expuestas durante 25 días a concentraciones de agentes osmóticos (Sorbitol y Manitol de 400 hasta 1000 mM y NaCl de 200 hasta 500 mM). El tejido protonemal del musgo resultaron ser tolerante a estrés osmótico en concentraciones de 400 a 800 mM, además dichos tejidos presentaron la capacidad de recuperar su metabolismo normal, después de 85 días en medio control.

Los ensayos realizados con células de protonema sometidas a estrés salino durante 25 días, estas presentaron tolerancia en concentraciones de 200 hasta 500 mM, de igual forma presentaron la capacidad de recuperar su pigmentación al ser transferidas a medio control en un tiempo de 19 días.

Por otra parte se evaluó la participación del acido abscisico (ABA) en las células de protonema expuestas a altas concentraciones del agente osmótico (Sorbitol de 800 hasta 2000 mM) durante diez días, resultando fenotipos de tolerancia en todas las concentraciones. Además el musgo tuvo la capacidad de

recuperar su metabolismo normal en un tiempo de 35 días, al transferir las células de protonema a medio control. Así también la participación de ABA en el musgo *C. stenocarpus* para contender con el estrés salino fue contundente para tolerar concentraciones de 400 a 800 mM al ser expuesto en dichas concentraciones durante diez días.

Además nuestro modelo de estudio resulto ser tolerante a estrés por congelación al ser sometido a temperaturas de -10°C, -20°C y 76°C durante siete días, con la participación de ABA.

Al realizar los estudios fisiológicos a través de la medición de la actividad fotosintética del PSII en las células de protonema sometidas en cada uno de los estreses abióticos, este mostro un comportamiento general de disminución durante el estrés abiótico, sin embargo este mostro recuperación de su actividad al transferir los tejidos a medio control.

De acuerdo a nuestros estudios realizados en células de protonema del musgo *C. stenocarpus* lo proponemos como un modelo de estudio en las respuestas de tolerancia ante los estreses bióticos específicamente osmótico, salinidad y congelación.

Abstract

The plant growth and productivity are affected by various abiotic stress factors. The water deficit is a major abiotic stresses affecting growth and yield of agricultural crops. In general, drought occurs when the available soil water is reduced and atmospheric conditions cause continuous loss of water through transpiration and evaporation. In nature there are plants that have developed strategies for tolerance to water deficit such as bryophytes are among the first plants that dominated terrestrial life from more than 400 million years and are now distributed worldwide from the tropics to Antarctica (Proctor and Tuba 2002; Robinson et al. 2003). Adaptation to the land is attributed to the resistance to desiccation stress causes rapid dehydration of the cells (Oliver et al. 2000).

In this work phenotypic and physiological studies conducted in the moss Ceratodon stenocarpus which has not been identified, in addition to the culture system in vitro. Were carried out in protonema cells obtained through germination of spores mixture exposed for 25 days at concentrations of osmotic agents (sorbitol and mannitol of 400-1000 mM NaCl and 200-500 mM). Protonemal moss tissue were to be tolerant to osmotic stress at concentrations of 400-800 mM, these tissues also showed the ability to recover their normal metabolism, after 85 days in control medium.

For tests protonema cells under salt stress for 25 days, they showed tolerance at concentrations of 200-500 mM, the same way had the ability to regain pigmentation to be transferred to control medium in a time of 19 days.

Moreover we evaluated the involvement of abscisic acid (ABA) in protonema cells exposed to high concentrations of osmotic agent (sorbitol 800-2000 mM) for ten days, resulting phenotypes of tolerance at all concentrations. Moss also had the ability to recover their normal metabolism in a time of 35 days, by transferring protonema cells to control medium.

Also the involvement of ABA in moss C. stenocarpus to contend with the stress was overwhelming to tolerate salt concentrations of 400-800 mM when exposed to these concentrations for ten days. Furthermore, our study model proved to be tolerant to freezing stress when subjected to temperatures of -10 $^{\circ}$ C, -20 $^{\circ}$ C and 76 $^{\circ}$ C for seven days, with the participation of ABA.

In carrying out physiological studies through the measurement of photosynthetic activity of PSII in the cells of protonema subject in each of abiotic stress, this behavior showed a general decline during abiotic stress, but this showed recovery of their activity transferring the medium control tissues.

According to our studies of the moss protonema cells of C. stenocarpus we propose as a model to study the responses of tolerance to biotic stresses specifically osmotic, salinity and freezing.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas experimentan varios estreses ambientales que incluyen la poca disposición de agua (sequía), un exceso de sal (salinidad), estrés por luz UV, falta de nutrientes, estrés por metales pesados y temperaturas extremas. Dichos estreses provocan una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares en las plantas afectando negativamente su crecimiento y su productividad. Se calcula que a nivel mundial los efectos del estrés abiótico provocan una disminución media del rendimiento de los terrenos agrícolas de un 50% (Boyer, 1982; Bray y col., 2000). La sequía y la salinidad se están extendiendo de forma especial en ciertas regiones y podrían dar lugar a una excesiva salinidad de más del 50% de la tierra arable para el año 2050 (Wang et al., 2003). El estudio de los efectos de estos factores se ha abordado a diferentes niveles que van desde aspectos fisiológicos hasta moleculares. La tolerancia o susceptibilidad a dichos estreses ambientales es un fenómeno muy complejo, en parte porque el estrés puede ocurrir en múltiples etapas de desarrollo de la planta y con frecuencia más de un estrés puede afectar a las plantas de manera simultánea.

El agua es un componente importante de todos los organismos vivos, facilitando muchas reacciones biológicas por ser un buen disolvente y transportador (Bohnert et al., 1995). En las plantas al igual que en los organismos fotosintetizadores el agua juega un papel importante en proporcionar la energía necesaria para la fotosíntesis. Las moléculas del agua se disuelven para ceder los electrones que se utilizan para el rendimiento de la energía, del centro de reacción del foto sistema II (Salisbury y Ross, 1992a). Una de las principales consecuencias del estrés hídrico es la pérdida del agua protoplasmática, que conduce a la concentración de iones como el Cl⁻ y NO₃⁻. En altas concentraciones estos iones inhiben las funciones metabólicas y la pérdida del agua de la célula, lo que tiende a la formación de lo que se denomina estado cristalino. En este estado cualquier líquido que se queda en la célula tiene una alta viscosidad incrementando así los cambios de las interacciones moleculares que pueden

causar desnaturalización de las proteínas y rompimiento de las membranas (Hartung *et al.*, 1998; Hoekstra *et al.*, 2001). Así que las plantas requieren de codificar genes cuyos productos ayuden a mantener su turgor y funciones metabólicas.

La tolerancia a la desecación es la capacidad que tienen algunos organismos de perder virtualmente toda el agua libre intracelular, manteniéndose en un estado de suspensión animada para que, una vez que el agua nuevamente esté disponible, recuperar las funciones normales.

Un pequeño grupo de angiospermas es conocido como "plantas de resurrección" ya que son capaces de tolerar un desecación extrema (Gaff, 1997). Un ejemplo de este tipo de plantas es *Xserophyta viscosa* (familia Velloziaceae) esta especie puede ser deshidratada hasta llegar a un 5% del contenido de agua relativa (RWC) y sorprendentemente después de rehidratarse por 80 horas puede continuar con sus actividades fisiológicas normales (Sherwin y Farrant, 1998; Farrant 2000).

La tolerancia a la desecación es un fenómeno complejo que implica la coordinación de la expresión de un gran número de genes (Walters *et al.*, 2002). Por lo tanto a fin de obtener plantas tolerantes a sequía más de un gen deberá ser co-expresado. Por ejemplo la expresión de *XVPer1* (el cual se piensa que protege al DNA de las especies reactivas de oxigeno) junto con *XVSAP1* (el cual previene del daño de la membrana). *XVGols* y *ALDRXV4*, ambos osmoprotectantes, podría dar lugar a una seria de proteínas que juntos confieren tolerancia a la sequía.

No obstante se han encontrado organismos capaces de tolerar la desecación en los tres dominios de la vida. Dentro del Reino Plantae encontramos a las briofitas, plantas muy antiguas que han mostrado una fuerte tolerancia al estrés, especialmente a la desecación; por ello se ha propuesto que las briofitas están preparadas evolutivamente para tolerarla, ya que fueron los primeros organismos vegetales evolucionados para emerger del agua y ocupar el ambiente terrestre (M.A. Jenks, A. J. Wood, 2007; M. J. Oliver *et al* 2005).

La fitohormona ácido abscisico (ABA) no solo regula los procesos que ocurren durante el desarrollo de las semillas (por ejemplo tolerancia a la

desecación), sino también controla los procesos asociados a las respuestas del estrés hídrico durante el desarrollo vegetativo de las semillas de las plantas. El ABA se ha encontrado en la mayoría de las plantas terrestres (Finkelstein y Rock, 2002) y ha mostrado tener respuestas fisiológicas y moleculares en plantas que no tienen semillas, como los musgos (Goode *et al.*, 1993; Minami *et al.*, 2003, 2005; Werner *et al.*, 1991; Knight *et al.*, 1995).

Por ejemplo el musgo el musgo Tortula ruralis tiene la capacidad de sobrevivir a una desecación rápida y completa la cual parece basarse en una vía independiente de ABA. De hecho, se ha sugerido que T. ruralis cuenta con un mecanismo constitutivo de genes de estrés apoyado por la inducción de un conjunto de genes asociados a la reparación de la rehidratación (Oliver, 1991; Oliver et al., 2004 y 2005). Sin embargo, para este musgo no existen investigaciones de la expresión génica, aislamiento de genes y activación de mecanismos moleculares. Es importante mencionar que tal mecanismo constitutivo no es universal en todas las briofitas. Por citar un ejemplo, el musgo Physcomitrella patens muestra una resistencia a la deshidratación pero es sensible a la desecación. En *P. patens* ABA está relacionado con la inducción de genes relacionados con el estrés, los cuales son homólogos a los genes inducidos por deshidratación en plantas superiores (Knight et al., 1995; Machuka et al., 1999; Frank et al., 2005; Kamisugi y Cuming, 2005; Oldenhof et al., 2006) y tolerancia a frio (Minami et al., 2003; Takezawa y Minami, 2004; Oldenhof et al., 2006). P. patens ha surgido como un importante modelo para el estudio del desarrollo y el estrés en briofitas, ya que se cuenta con la secuenciación completa de su genoma y se han desarrollado importantes técnicas de manipulación genética como la transformación sitio dirigida por recombinación homóloga.

II. ANTECEDENTES

2.1 Panorama general de los efectos del estrés abiótico sobre las plantas

La distribución de las plantas sobre la tierra depende de la presencia e intensidad de diversos factores bióticos y abióticos. En condiciones naturales, las plantas se encuentran continuamente sometidas a situaciones ambientales cambiantes que provocan una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan negativamente al crecimiento de la planta y su productividad (Wang *et al.*, 2001).

La agricultura es la principal consumidora de agua en el mundo y uno de los factores más limitantes para el futuro de la humanidad. Las reservas de agua en el planeta han ido disminuyendo con el creciente aumento de la población y de las prácticas agrícolas (IFPRI, 2005). Debido a que la agricultura consume 70% del agua utilizada por el hombre, es importante ahorrar este recurso, implementando técnicas agrícolas que tiendan a reducir su consumo. La disponibilidad de agua es uno de los factores cruciales que modula el crecimiento de las plantas; en el estrés hídrico se incluyen tanto la sequía como la salinidad, factores importantes para la agricultura, ya que impiden a los cultivos desarrollar su potencial genético (Zhu, 2002; Zhu, 2003).

En las últimas décadas, las investigaciones sobre los efectos de la salinidad de los suelos en los cultivos reflejan la importancia de este problema para la agricultura mundial. El estrés salino es uno de los factores ambientales adversos que influye sobre aspectos de la fisiología de las plantas, lo que a su vez limita la productividad de los cultivos de interés económico. La salinidad reduce la capacidad de las plantas para absorber agua, ocasionando una reducción en el crecimiento (Munns, 2002).

Altas concentraciones de sales en la solución externa de las células vegetales ocasiona varios efectos, que pueden resumirse fundamentalmente en

tres tipos: sequía osmótica, toxicidad debida a la excesiva absorción de cloro y sodio y un desbalance nutricional (Trinchant *et al.*, 2004; Karimi *et al.*, 2005). El estrés osmótico es provocado por el bajo potencial hídrico en el suelo, reduce los rendimientos de una amplia variedad de cultivos en el mundo y el nivel de ácido abscísico (ABA) se incrementa, desencadenando el cierre estomático y el ajuste osmótico, entre otras respuestas (Zhu, 2003; Taylor *et al.*, 2000; Zhu, 2002).

La toxicidad debida a la excesiva absorción de cloro y sodio produce clorosis marginal de la hoja y, con ello, una disminución del área fotosintética, lo que determina reducciones en la fotosíntesis neta, como resultado del aumento de la respiración en los órganos de la planta. La respiración de mantenimiento incrementa los requerimientos de carbohidratos para producir la energía necesaria para el transporte de iones, la compartimentalización de iones y la reparación de daños celulares. Otros efectos de la toxicidad provocada por estas sales son la disminución en la síntesis de proteínas, disminución en la conductancia estomática, síntesis de pared celular y expansión celular (Bartels y Ramanjulu, 2005; Munns, 2002). El desbalance nutricional afecta la absorción y el transporte de otros nutrientes, influyendo de esta manera sobre la disponibilidad de Zn, Fe, P, Ca, K, Mg, Mn y Cu, entre otros (Munns, 2002).

Su efectos provocan una disminución media del rendimiento de los terrenos agrícolas de un 50% (Boyer, 1982; Bray *et al.*, 2000) del planeta. La sequía y la salinidad se están extendiendo de forma especial en ciertas regiones y se calcula que podrían dar lugar a una excesiva salinidad de más del 50% de la tierra arable para el año 2050 (*Wang et al.*, 2003). Aunque estos estreses son claramente distintos en su naturaleza física y cada uno provoca respuestas específicas en la planta, es cierto también que activan algunas reacciones comunes y que los mecanismos de respuesta pueden estar interconectados (Wang *et al.*, 2003; Zhu 2001a). Así, sequía y salinidad se manifiestan como un estrés osmótico que provoca la disrupción de la homeóstasis y la distribución de iones en la célula (Serrano *et al.*, 1999; Zhu 2002). Consecuentemente existe una compleja red de señalización responsable de la adaptación de la planta a estas condiciones medioambientales adversas (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Knight y

Knight, 2001; Zhu, 2001b; 2002). Esta adaptación incluye la activación de rutas similares de señalización y respuestas celulares como la producción de proteínas de estrés, síntesis de antioxidantes y acumulación de solutos compatibles (Vierling y Kimpel, 1992; Zhu *et al.*, 1997; Cushman y Bohnert, 2000). La respuesta más importante de la planta frente al estrés abiótico es la activación trasncripcional de genes específicos. La regulación espacial y temporal de patrones de expresión de genes de estrés específicos es una parte importante de la adaptación de la planta al estrés abiótico (Riechmann *et al.*, 2000).

2.2 Estrategias de las plantas para contender con el estrés hídrico

Se ha clasificado el comportamiento de las plantas frente al estrés hídrico como escape, evasión y tolerancia, los cuales se describen a continuación:

2.2.1 Escape: en estos casos las plantas ajustan su fenología para cumplir su ciclo fuera de los períodos de déficit hídrico. El caso típico es el de las plantas terófitas (efímeras, anuales). En cultivos también puede observarse una estrategia de escape. Por ejemplo, en zonas con clima Mediterráneo donde se produce una situación de sequía terminal, existen variedades de cereales como trigo o cebada que ajustan su ciclo fenológico de manera que completan el llenado de los granos antes que se produzcan las condiciones de máximo estrés (Araus *et al.*, 2002; Slafer *et al.* 1994).

2.2.2. Evasión: en este caso las plantas poseen mecanismos para evitar (o postergar) la deshidratación. Una estrategia es aumentar la capacidad de absorción de agua gracias al incremento de la superficie radicular o disminución de la resistencia hidráulica (Nilsen y Orcutt 1996) siendo frecuente en plantas conocidas como 'derrochadoras de agua' ('*water-spenders'*). La estrategia inversa es la que adoptan las plantas 'ahorradoras', que minimizan las pérdidas de agua

por diversas vías, tales como el cierre estomático y la disminución de la transpiración cuticular. Dentro de esta misma estrategia conservadora podrían incluirse las plantas que producen menos biomasa aérea al sufrir déficit hídrico, aumentando por ende la proporción relativa de masa radicular.

2.2.3 Tolerancia: este término se refiere a la capacidad de resistir en forma reversible la deshidratación de los tejidos. Aunque el ejemplo extremo de esto son las llamadas '*plantas poikilohídricas*' (Oliver 1996), las plantas 'mediterráneas' como *Rosmarinus* o *Melissa* son capaces de soportar un alto grado de deshidratación de sus tejidos (Munné-Bosch y Alegre 2000a, b). Ejemplos clásicos de estas plantas (también llamadas plantas de "resurrección") son *Craterostigma plantagineum* y *Xerophyta viscosa*.

2.3 Respuestas de las plantas al estrés hídrico

Diversos y numerosos procesos de las plantas pueden ser alterados por el estrés hídrico. Las respuestas pueden ser transitorias o bien involucrar cambios en la expresión génica. Por ejemplo, ante un déficit hídrico *Arabidopsis thaliana* responde modificando la expresión de gran cantidad de genes (Bray 2002). El estrés hídrico puede considerarse un síndrome complejo, integrado por una numerosa serie de procesos, algunos de los cuales son deletéreos y otros son adaptativos (Chaves *et al.*, 2002). Por lo tanto, es virtualmente imposible pormenorizar la totalidad de los procesos que son afectados por el estrés hídrico. A continuación se enumeran y describen brevemente las respuestas que se consideran más relevantes en relación al estrés hídrico:

2.3.1 Inhibición del crecimiento: una de los primeros efectos del déficit hídrico sobre las plantas es la inhibición de la elongación celular y por ende, del crecimiento. Es bastante conocido que el crecimiento de la raíz es menos sensible que el crecimiento de la parte aérea, lo que conduce a un aumento de la relación parte aérea/raíz (Mullet y Whitssit 1996). La variación del área foliar es una de las

respuestas macroscópicas más tempranas en plantas bajo déficit hídrico (Passioura. 1996).

2.3.2 Cierre estomático. El cierre estomático (y la consecuente disminución de la conductancia) es uno de los efectos del estrés hídrico más ampliamente conocido. El fenómeno está vinculado al aumento de los niveles xilemáticos (o cambios en la compartimentalización) del ácido abscísico (ABA), aunque la intensidad de la respuesta puede ser modulada por otros factores tales como el gradiente de presión parcial de vapor de agua (VPD) de forma aún no del todo esclarecida (Tardieu 1997; Tardieu y Simonneau 1998). Es un hecho conocido que el cierre estomático puede inducirse aún antes de cualquier cambio detectable en el potencial hídrico (ψw) y el contenido de agua relativo (*RWC* es decir, el contenido porcentual de agua en relación al contenido de agua a hidratación máxima) de las hojas, y actualmente se acepta la existencia de una señal proveniente de las raíces (Flexas y Medrano 2002). La señal que hipotéticamente provendría de las raíces ha sido asociada con el ABA, aunque el mecanismo exacto del proceso parece ser complejo y no ha sido esclarecido aún (Davies y Gowing 1999). El resultado obvio del cierre estomático es la disminución de la tasa transpiratoria y por ende, del agua consumida por la planta, la caída de la conductancia estomática (disminución de los valores de concentración intercelular de CO₂ o Ci) produce una caída de la asimilación de CO₂ y diversos efectos asociados, tales como acumulación de poder reductor, susceptibilidad a la foto inhibición y/o foto oxidación, etc.

2.3.3 Ajuste osmótico. La acumulación de osmolitos en las células vegetales resulta en una disminución del potencial osmótico, permitiendo el mantenimiento de la absorción de agua y de la presión de turgor. En condiciones de estrés hídrico esto puede contribuir al mantenimiento de diversos procesos fisiológicos tales como la apertura estomática, la fotosíntesis y la expansión celular (Serraj y Sinclair 2002). Esta respuesta al déficit hídrico es conocida como *ajuste osmótico* (OA) u *osmoregulación.* Debe señalarse que el verdadero ajuste osmótico ocurre cuando

hay un aumento en el número total de moléculas osmóticamente activas, no considerándose como tal al aumento pasivo de solutos que se produce en la deshidratación de los tejidos (Nilsen y Orcutt 1996). Por lo tanto, para la correcta evaluación del OA debe medirse el potencial osmótico a turgencia máxima, evitando así el artefacto producido por la disminución del volumen celular. Existen diversos métodos para el análisis del *OA*, siendo de amplia utilización las técnicas psicrométricas (Briscoe. 1984) en tejidos previamente hidratados (Babu *et al.,* 1999).

2.4 Efectos de las bajas temperaturas en las plantas

Al igual que lo mencionado para el estrés hídrico, los efectos de las bajas temperaturas en las plantas incluyen cambios en la bioquímica y biofísica de las membranas, en la síntesis proteica, modificaciones conformacionales en enzimas, en la ultra estructura de mitocondrias y cloroplastos (Kratsch y Wise. 2000) y en los metabolismos fotosintético y respiratorio (Nilsen y Orcutt. 1996) además de disminución del crecimiento y alteraciones en el desarrollo (Allen y Ort. 2001). Uno de los efectos mejor caracterizados de las bajas temperaturas es la disminución de la fluidez de las membranas. El frío produce la llamada 'separación de fases', que si se prolonga en el tiempo, impide a la membrana mantener los gradientes iónicos y el metabolismo comienza a sufrir alteraciones. Finalmente, la muerte de la célula puede sobrevenir si el daño se acentúa. En este sentido, ha recibido considerable atención el papel de la insaturación de lípidos de membrana en la tolerancia a bajas temperaturas y de hecho éste ha sido considerado como uno de los factores críticos entre los mecanismos de tolerancia por frío (Nishida y Murata 1996). En esta tesis se prestará especial interés a los efectos sobre el aparato fotosintético (en particular, la fotoinhibición).

Es importante destacar que el estrés por bajas temperaturas es un síndrome complejo y difícilmente puede ser separado completamente de otros

tipos de estrés, ya que, por ejemplo, es frecuente observar déficit hídrico asociado a las bajas temperaturas. Este fenómeno puede tener diversas causas, entre otras, la disminución de la conductividad hidráulica de las raíces y alteraciones en el grado de control estomático (Allen y Orr. 2001) conduciendo a un desbalance entre captación de agua y transpiración. Las plantas sometidas a bajas temperaturas muestran una caída (al menos transitoria) en el potencial hídrico y el *RWC* (Vernieri *et al.*, 2001). De hecho, la respuesta de aclimatación al estrés hídrico asociado a bajas temperaturas está recibiendo considerable atención en la actualidad. El daño inducido por bajas temperaturas varía ampliamente (según las especies), tanto en magnitud como en la escala temporal en la que los primeros síntomas aparecen. En algunas especies estos daños pueden aparecer durante el episodio de estrés, en otras, en cambio, en el período posterior de recuperación, en el las plantas son sometidas a temperaturas "normales" para la especie (Nilsen y Orcutt. 1996).

La variabilidad en el grado de daño también puede observarse a nivel celular, donde unos componentes son más dañados que otros. Se ha señalado que los cloroplastos parecen ser los organelos más sensibles a las bajas temperaturas (Nilsen y Orcutt 1996). Tanto los procesos fotosintéticos que ocurren a nivel tilacoidal (transporte de electrones, fotofosforilación) como en el estroma cloroplástico pueden ser alterados por episodios de bajas temperaturas.

2.5 La aclimatación de las plantas a frío y su papel en la tolerancia al congelamiento.

La formación de hielo intracelular puede causar una tensión mecánica en la pared celular conduciendo a la ruptura de la membrana celular (McKersie, *et al.,* 1997; Olien, *et al.,* 1997). También se ha demostrado que la desnaturalización de las proteínas en las plantas a bajas temperaturas podría resultar en un daño celular (Guy, *et al.,* 1998).

En general los resultados de la aclimatación por frío ayuda en la protección y estabilización de la integridad de las membranas celulares, en el mejoramiento de los mecanismos antioxidantes, aumento en los niveles de azúcares intracelulares que protegen a las proteínas mediante la inducción de genes que codifican chaperonas moleculares (Guy, y Li, 1998). Todas estas modificaciones ayudan a la planta a resistir y superar la deshidratación severa asociada con estrés por congelamiento.

La función principal de la aclimatación al frío es estabilizar las membranas contra las lesiones de la congelación. La aclimatación resulta en un aumento en la proporción de ácidos grasos insaturados y por lo tanto una caída en la temperatura de transición (Raison, *et al.,* 1986; Williams, *et al.,* 1988). Su función es evitar la lisis inducida por la expansión y la formación de lípidos hexagonal de fase II, se ha observados en estudios realizados en el centeno y en otras plantas (Steponkus, *et al.,* 1993; Uemura, *et al.,* 1997).

La aclimatación a frío genera cambios físicos y bioquímicos en la restructuración de las membranas celulares a través de cambios en la composición de los lípidos y la inducción de otras proteínas no enzimáticas que alteran el punto de congelación del agua. La adición de solutos disminuye el punto de congelación del agua a un valor más negativo, lo que impide la formación del hielo.

Las bajas temperaturas inducen una serie de alteraciones en los componentes celulares, incluyendo el enlace de los ácidos grasos insaturados (Cossins, *et al.*, 1994), la composición de glicerolípidos (Lunch, *et al.*, 1982), los cambios en la composición proteica y de carbohidratos y la activación de canales iónicos (Knight, *et al.*, 1996). La acumulación de sacarosa y otros azúcares simple que ocurre con la aclimatación al frío también contribuye a la estabilización de la membrana ya que estas moléculas pueden proteger las membranas contra daños por congelación. Las bajas temperaturas activan un número de genes inducibles por frío (Jones, *et al.*, 1994), como los que codifican a las dehidrinas, proteínas de transferencia de lípidos así como las proteínas LEA (Nishida y Murata 1996).

2.6 Papel del ABA en la osmorregulación

El ácido abscísico (ABA) juega un papel crucial en diferentes aspectos de la osmorregulación en casos de estrés hídrico y salino durante el crecimiento vegetativo. El papel del ABA como señal de estrés a larga distancia producida en la raíz está bien establecido. Usualmente, este fitorregulador es sintetizado en el citosol de las células de la raíz, se transporta por el apoplasto de la raíz y es conducido vía xilema con la corriente transpiratoria a los brotes (Steudle, 2000: Coursol et al., 2003; Zyalalov, 2004). La reducción de la transpiración a través de los estomas es una respuesta crucial regulada por ABA en plantas expuestas a estrés. El cierre de los poros estomáticos en las hojas es un mecanismo por el cual las plantas superiores regulan el balance hídrico. Las células oclusivas o guarda, que integran el poro estomático, responden a cambios en los niveles hídricos. El cierre estomático inducido por el ABA es mediado por la reducción en la presión de turgencia de las células guarda, las cuales requieren un eflujo de K⁺ y Cl⁻ la remoción de sacarosa y la conversión de ácido málico en malato e H⁺. El ABA activa un canal de entrada de calcio, ocasionando un incremento en la concentración de Ca⁺² en el citosol de las células guarda, la inhibición de los canales de entrada de K⁺ y la activación de los canales de salida de K⁺; todo esto conlleva a un incremento del potencial hídrico, la salida de agua y la pérdida de turgor de las células guarda, lo que conduce al cierre estomático (Coursol et al., 2003; Pandey y Assmann, 2004; Assmann y Wang, 2001; Inman-Barber y Smith, 2005; Zyalalov, 2004; Steudle, 2000).

2.7 Señalización del estrés abiótico.

Los estreses de tipo abiótico en general y el déficit de agua en particular provocan la producción de ABA la cual, que a su vez induce la transcripción de una serie de genes participantes en la respuesta al estrés abiótico. El análisis de la expresión de los genes inducibles por ABA hace evidente que algunos de ellos requieren para su inducción una previa biosíntesis de proteína, lo que sugiere la existencia de 2 rutas independientes entre la producción de ABA endógeno y la expresión génica provocadas directamente por el estrés (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Por otra parte, el análisis de la expresión de genes inducibles por déficit hídrico en plantas deficientes en ABA o insensibles al ABA han demostrado que algunos de los genes inducidos por estrés no requieren la acumulación de ABA endógeno bajo condiciones de seguía o frío (Ingram y Bartels, 1996; Bray, 1997; Shinozaki y Yamaguchi- Shinozaki, 1996, 2003). Así, en la respuesta al estrés abiótico no solo hay rutas de señalización dependientes de ABA sino también rutas independientes. Se ha sugerido la existencia de al menos 4 rutas de señalización independientes en la activación de genes inducibles por estrés (Figura 1) (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996): dos son dependientes de ABA (rutas A y B) y dos independientes de ABA (rutas C y D). A partir de los resultados obtenidos por análisis genómicos y moleculares se ha sugerido que existe una regulación cruzada entre estos sistemas (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2003). El inicio del sistema de señalización es común para todas las rutas, y consiste en un sistema de dos componentes receptor de la señal de estrés hídrico por ausencia de agua o alta salinidad llamado ATHK1. Por otra parte, el estrés por frío es detectado por otra vía parcialmente desconocida donde el primer miembro caracterizado es ICE1.

En las rutas dependientes de ABA, la señal recibida a partir de ATHK1 es transducida hasta la ruta de síntesis de esta hormona, en la cual la enzima clave reguladora del flujo es el codificado por el gen NCED3 (Tan *et al.,* 2003). A partir de la señal de estrés recibida, el ABA es sintetizado *de novo* en la planta, actuando a modo de señalizador endógeno de estrés. Esta nueva "señal endógena" es transducida a partir de dos rutas, las cuales se diferencian en la rapidez de respuesta: la ruta A es dependiente de síntesis proteica, y por tanto es lenta; sin embargo, la ruta B es independiente de síntesis proteica, y por tanto más rápida que la anterior (Figura 1).

Los elementos implicados en la transducción de señal del ABA comprenden tanto productos de genes activadores de la respuesta al estrés (*ERA1, SnRK2 y SnRK3*) (Umezawa, 2004) como productos de genes represores de estas respuestas (*ABI1, ABI2, ATHB6 y FRY1*) (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2003, Zhu, 2002)



Fig. 1. Rutas de Señalización para la activación trasncripcional de genes inducidos por estrés abiótico. Las rutas A y B son dependientes de ABA mientras que las rutas C y D son independientes de la hormona.

En la ruta B la inducción de los genes se caracteriza por no requerir síntesis de proteínas. La región promotora de estos genes inducibles por estrés abiótico contienen elementos *cis* conservados que responden a ABA llamados ABRE (*Abscisic acid Responsive Elements*) cuya secuencia es ACGTGG/TC (Bonetta y McCourt, 1998; Grill y Himmelbach, 1998; Leung y Gidaudat, 1998). Los elementos ABRE fueron descritos por primera vez en los promotores de los genes *Em* de trigo y *rab* de arroz, donde ya se identificó a la proteína de unión al el

elemento ABRE. Dicha proteína de unión a ABRE, para el caso del promotor *Em* de trigo se llama EmBP-1, la cual funciona como un factor transcripcional del tipo bZIP (Menkes *et al.*, 1995). Los cDNAs para las proteínas de unión a los elementos ABRE que han sido aislados tienen una región básica adyacente a un motivo "cierre de Leucina" (bZIP), por lo que pertenecen a la gran familia de factores transcripcionales bZIP. Se ha comprobado que los nucleótidos alrededor de la secuencia ACGT del elemento ABRE participan en la especificidad de la unión de las proteínas bZIP (Menkes *et al.*, 1995). Aparte de los elementos ABRE durante el déficit de agua existen otros elementos *cis* que participan en la expresión de genes dependientes de ABA. Tal es el caso de los motivos "caja Sph" y GTGTC que en maíz regulan la expresión dependiente de ABA durante la sequía y la desecación de la semilla (McCarty, 1995).

En la ruta A la biosíntesis de factores proteicos es necesaria para la expresión de genes dependiente de ABA. Los genes de esta ruta poseen en sus secuencias promotoras motivos de unión de proteínas de unión al DNA como MYC o MYB (Iwasaki *et al.*, 1995). Estos factores de transcripción, como *rd22BP1* (también llamado *ATMYC2*), se inducen por sequía o estrés salino de forma que los productos resultantes inducen la transcripción dependiente de ABA de ciertos genes de respuesta a estrés abiótico. Adicionalmente varios factores de transcripción tipo bZIP de maíz, arroz y *Arabidopsis* responden al frío, deshidratación y tratamiento con ABA exógeno (Kusano *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1996; Nakagawa *et al.*, 1996).

Estos factores bZIP se unen a secuencias tipo "caja G" indicando que proteínas bZIP inducibles por ABA también participan en esta ruta de señalización sin la unión a elementos ABRE. En las rutas independientes de ABA, la señal captada a partir del sensor *ATHK1* de *Arabidopsis* es transducida por la fosfolipasa *AtPLC1*, la cual tiene como represor a *FRY1*. Así como una serie de quinasas de tipo MAPK (*AtMPK3, ATMEKK1*) (Xiong *et al.*, 2001). Experimentos realizados con plantas deficientes o insensibles a ABA han demostrado la existencia de genes de respuesta a estrés abiótico cuya inducción no requería ABA bajo condiciones de estrés pero que sí respondían al tratamiento con ABA

exógeno (Thomashow, 1994; Ingram y Bartels, 1996; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Bray, 1997). Estos genes implican la existencia de la ruta D, la responsable de la transducción de la señal del estrés por frío y que presenta una regulación cruzada con las rutas de transducción de la señal de estrés hídrico por medio del factor CBF4. El primer miembro caracterizado de la ruta D es ICE1, un factor bHLH tipo MYC que regula la expresión de DREB1A. DREB1A es un factor de transcripción que regula la expresión del resto de genes de la familia DREB1 (DREB1B y DREB1C) (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2000). Los genes de la familia DREB1 tienen como blanco de acción a una serie de genes de resistencia a estrés como rd29a, kin1, rd17, cor15a y erd10 (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Al analizar la secuencia de sus promotores se ha encontrado la presencia de una secuencia de 9 pb TACCGACAT llamada elemento DRE (Drought Responsive Element) que es esencial para la inducción de estos genes bajo condiciones de estrés pero que no funciona como elemento ABRE (Shinozaki y Yamaguchi- Shinozaki, 1997). La existencia de elementos ABRE en la secuencia de los promotores de estos genes explica su inducción por ABA. Estos motivos DRE así como motivos similares llamados "repetición C" (CRT) se han descrito en varios genes de respuesta a seguía y frío y constituyen una ruta de señalización independiente de ABA (Baker et al., 1994; Jiang et al., 1996; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2000; Thomashow 1999). Los factores de transcripción que interaccionan con los elementos DRE han sido caracterizados (Stockinger et al., 1997) y se ha comprobado que todas las proteínas de unión a DRE contienen un motivo de unión al DNA también descrito en las proteínas EREBP y AP2 (motivo EREBP/AP2) las cuales están involucradas en procesos como la respuesta a etileno y la morfogénesis floral respectivamente. Esta ruta de señalización está regulada por HOS1 que es un represor de ICE1 y de los genes de la familia DREB1B (Figura 1). Por último, existen diversos genes inducibles por estrés abiótico que no responden al tratamiento con ABA lo que sugiere que existe una 4^a ruta de señalización (ruta C) (Thomashow, 1994; Ingram y Bartels, 1996; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Bray, 1997). Esta ruta es también independiente del estrés por frío y tiene como factores de transcripción

reguladores los productos de los genes de la familia DREB2 (*DREB2A y DREB2B*). Entre los genes regulados por estos factores DREB se encuentran *rd1* y *rd21*que codifican tiol proteasas y *erd1* que codifica una subunidad reguladora de una proteasa cloroplástica (Nakashima *et al.*, 1997).

2.8. Evidencias generales de la regulación de la traducción en plantas.

En todos los organismos la regulación de la traducción del RNAm permite la modulación fina a nivel de síntesis de proteína a partir de su RNAm correspondiente. La eficiencia de traducción de un RNAm individual puede ser estimada mediante la evaluación de la cantidad de RNAm asociado con los ribosomas implicados en la traducción (Kawaguch y Barley-Serres 2002). Cuando varios RNAm que se encuentran activamente listos para ser traducidos por los ribosomas forman complejos ribonucleicos conocidos como polisomas. La traducción del RNAm se produce en respuesta a numerosos estímulos ambientales como el estrés por altas temperaturas (Horiguchi, et al., 200) estrés salino (Hua, et al., 2000), por déficit de agua (Wood, et al., 2000), por la ausencia de oxígeno, por la infección de patógenos e inhibición de sacarosa. En un estudio realizado con hojas de A. thaliana en condiciones de deshidratación, se calculó la proporción de los RNAm individuales acomplejados en polisomas en más de dos mil gene. Kawaguchi y colaboradores 2004, informaron que la mayoría de los RNAm mostraron una disminución significativa en polisomas asociados a las respuestas del estrés por deshidratación, así también observaron que las transcripciones relacionadas con la maquinaria de síntesis de proteínas y el control del ciclo celular fueron particularmente abundantes entre los transcritos regulados traduccionalmente. Estos resultados sugieren que el control traduccional puede ser importante para la regulación en respuesta a un estrés por inhibición de sacarosa.

En un estudio reciente de estrés por hipoxia seguido de la re oxigenación (el cual está relacionado con el contenido de ATP celular), se observo la

promoción de un ajuste a nivel de polisomas en plántulas de *A. thaliana.* Estos datos sugieren que la regulación a nivel de traducción contribuye a la adaptación de las plantas a los cambios del medio ambiente al limitar el consumo del ATP y redirigir la síntesis de proteínas específicas. Por lo tanto la traducción diferencial del RNAm parece ser un componente clave en la respuesta a la inhibición de oxígeno y re oxigenación (Branco-Price *et al.,* 2008)

2.9. Transporte fotosintético de electrones y estrés

Los procesos fotoquímicos a nivel del fotosistema II (*PSII*) son sensibles al estrés hídrico. Sin embargo, la magnitud y consecuencias de esta sensibilidad son variables según la especie y principalmente, por la severidad del estrés (Lu y Zhang 1998; Medrano et al., 2002). Bajo situaciones de estrés hídrico, la capacidad de transporte electrónico puede verse afectada por diversas causas: (a) disminución en el número total de centros del PSII en estado funcional y (b) cambios en la eficiencia de los centros funcionales (Flexas y Medrano 2002). La disminución del número de centros funcionales se relaciona a la integridad de la maquinaria fotosintética y podría ser asociada con la llamada "fotoinhibición crónica" (Osmond y Grace 1995). Aunque existen pocos estudios del daño directo, diversas evidencias sugieren que la maguinaria implicada en el transporte de electrones es escasamente afectada, al menos a estreses moderados, por lo que se considera que el aparato fotosintético es relativamente resistente a estos niveles de estrés mediano (Cornic y Massacci 1996). Sin embargo, estreses hídricos más severos, los cuales pueden observarse en condiciones naturales de cultivo (Araus et al., 1998), podrían causar eventuales daños a la maquinaria fotosintética.

Cuando se analiza el transporte lineal (o acíclico) de electrones (estimado por la eficiencia cuántica del *PSII*, φ *PSII*) en condiciones de estrés, se observa una caída en el transporte (Flexas *et al.*, 1998), y en general esta regulación a la

baja ('*downregulation*') está asociada a un aumento en la tasa de disipación de energía al nivel de la antena del *PSII* (Nogués y Baker 2000; Flexas *et al.*, 2002). En términos generales, la disminución de la tasa del transporte electrónico suele ser de menor magnitud que la caída de la tasa fotosintética (Flexas *et al.*, 1998), lo que sugiere que otros procesos (distintos a la asimilación de CO^2) se convierten en destinos alternativos de electrones. Es decir, la disminución del transporte de electrones con el estrés hídrico moderado no parece estar vinculada a daño, sino que sería un proceso que puede revertirse cuando la situación de estrés es superada (Lawlor 2002). Esta '*downregulation*', es un proceso complejo y aún no esclarecido completamente, aunque se conoce que el gradiente transtilacoidal de pH (ΔpH) tiene un papel crucial.

2.10. Fotosíntesis y los mecanismos afectados por el estrés abiótico.

La fotosíntesis tiene un papel central como fuente de energía para el metabolismo de la planta y su eficiencia puede reducirse drásticamente debido al estrés abiótico. Durante la evolución las plantas han desarrollado muchas estrategias para aclimatarse a los cambios ambientales adversos. El objetivo principal, se supone es mantener la eficiencia fotosintética a un nivel tan alto como sea posible, evitando el desequilibrio de energía resultante del estrés abiótico y los consecuentes daños fotooxidativos.

El estrés abiótico interfiere con la fotosíntesis en diferentes puntos, por ejemplo: difusión del CO², en la eficiencia del PSII, en el transporte de electrones, la formación de ROS (Reactive Oxygen Species), en el contenido de la ribulosa-1,5 bisfosfato (RuBP, dependiente de ATP y suministro de NADPH), en la actividad de ribulosa-1-bisfosfato carboxilasa, 5/oxigenasa (Rubisco) y en la foto respiración.

Es bien conocido que el estrés por sequía, salinidad o frío inducen el cierre estomático (Wilkinson *et al.*, 2001; Zhu, 2002; Chaves *et al.*, 2003), desaceleración de la asimilación de CO² y por consiguiente la reducción de la tasa de fotosíntesis

(fig. 2). Además se ha demostrado que la reducción de la conductancia del mesófilo igualmente es una importante causa igualmente de la baja difusión de CO^2 , debido al estrés hídrico (Flexas *et al.*, 2002; Warren *et al.*, 2004) y salino (Centritto *et al.*, 2003). Además se ha propuesto que las acuaporinas de la membrana plasmática están estrechamente relacionadas con la conductancia del mesófilo (Uehlein *et al.*, 2003; Hanba *et al.*, 2004). Por lo tanto la expresión y/o la regulación de acuaporinas podría mediar los efectos ambientales sobre la difusión de CO^2 . La conductancia del mesófilo y la relación con la difusión de CO^2 , en términos de respuesta de las plantas al estrés, es sin embargo aun no completamente entendido.

En cuanto al control de la apertura estomática, este proceso es mediado por ABA y posiblemente por otras señales generadas en respuesta a estrés abiótico. En la regulación de la expresión de genes relacionados con el movimiento de las células guarda, se sabe que están involucradas una vía dependiente de ABA y la vía independiente de ABA (Cominelli *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2005).

Las causas de la disminución de la tasa fotosintética bajo distintos estreses ambientales (y con distinta intensidad) aun no están establecidas, y existe gran controversia acerca de los principales puntos fisiológicos responsables de la alteración sobre la fotosíntesis. El cierre estomático se considera la principal respuesta al frío, la sequía y la salinidad (Flexas y Medrano, 2002). Sin embargo, las bajas temperaturas, la salinidad y la sequía alteran el metabolismo de muchas maneras que afectan la tasa de fotosíntesis. Por ejemplo las bajas temperaturas alteran ATP/ADP y probablemente alteran los índices reductores ATP (Savitch *et al.*, 1997) como una consecuencia del metabolismo alterado de la sacarosa. Sin embargo el estrés por frío (estrés moderado de 5°C) en *A. thaliana* no está asociado con una limitación en el ATP, pero con un incremento en el índice reductor ATP/NADPH debido a un metabolismo reductor alterado (Savitch *et al.*, 2001).

La sequía puede conducir a una limitación en el suministro de ATP en el cloroplasto, como consecuencia de la disminución de la capacidad de síntesis (Tezara *et al.,* 1999) causada por la pérdida de la ATPsintetasa (Lawlor y Tezara,

2009). Tanto la sequía y la temperatura por razones diferentes decrece la síntesis de RuBP la cual depende de las concentraciones de ATP y NADPH así como la actividad de la enzimas del ciclo de Calvin (Fig.2) y así reducir la tasa de fotosíntesis y la asimilación de CO².



Fig. 2. Esquema simplificado de los mecanismos fotosintéticos que pueden ser afectados por la sequía, frío y salinidad. En azul y fechas cafés corresponde a las vías de señalización de frío y sequía/ salinidad respectivamente. Las condiciones ambientales adversas que provoca el estrés osmótico inducen el cierre estomático, lo cual determina la tasa de asimilación del CO2. El ácido abscísico (ABA) está implicado en la mayoría de las respuestas generadas por la sequía y salinidad, así como también puede mediar algunos por el estrés de bajas temperaturas. Las flechas negras indican la continuación de la señalización por sequía, frío y salinidad. Las líneas punteadas representan las posibles interacciones. PSI fotosistema I, PSII fotosistema II, ROS especies reactivas de oxígeno, 3PGA 3 fosfoglicerato, RuBP ribulosa 1-5- bifosfato, PG fosfoglicolato, CF factor de acoplamiento, Ci interna de CO2, C_c, CO2 en el cloroplasto. Nelson J.M. Saibo. Annals of Botany 2008.

Cuando las plantas están expuestas a los estreses ambientales y la disponibilidad de CO² dentro de la hoja (Ci) es restringida y/o la síntesis de ATP se ve afectada, la actividad del ciclo de Calvin se reduce, sin embargo permanece activo el PSII. En estas condiciones las concentraciones del aceptor final de electrones (NADP+) es generalmente muy baja (Fig. 4). Esto conduce a un exceso

de energía de excitación en los fotosistemas. Los estados de alta energía pueden ser disipados por non-photochemical queenching (por ejemplo el ciclo de la xantofila) o bien por procesos alternativos, tales como el metabolismo fotorespiratorio (Niyogi, 2000). Si no se disipan los electrones se acumulan en la cadena de transporte de electrones y se transfieren al oxígeno (reacción de Mehler); estos procesos generan ROS, como el superóxido. Debido a su alto nivel reactivo las ROS reaccionan con muchos componentes celulares los cuales son dañados (por ejemplo las proteínas, el DNA, y los lípidos) constituyendo un estrés oxidativo; por lo que entonces se necesita desintoxicar el interior de la celula, a través de la superóxido dismutasa (SOD) y el ciclo del glutatión ascorbato (Noctor y Foyer, 1998). Las ROS también inactivan el centro de reacción foto químico de PSII causando foto inhibición. Recientemente se ha propuesto que los estreses ambientales inactivan el PSII, inhibiendo los mecanismo de reparación de daño, en lugar de atacar directamente al PSII (Murata et al., 2007). Las ROS generadas por los diferentes estreses inhiben la reparación del PSII suprimiendo la transcripción y traducción del gen psbA que codifica una proteína D1 que pertenece al complejo del PSII (Nishiyama et al., 2001, 2004; Allakhverdiev et al., 2002).

El estad redox del estoma esta involucrado en la regulación de la expresión génica (Pfannschmidt *et al.*, 1999). Las moléculas reactivas-redox (por ejemplo ROS, tiorredoxina y glutatión reducida) generadas por las condiciones ambientales adversas actúan como señales para activar y desactivar la expresión de los genes del cloroplasto y del núcleo. Interesantemente todos los genes que están implicados en el sistema redox están relacionados con la fotosíntesis (Pfannschmidt, 2003). Dado que el estado redox puede regular la actividad kinasa, que a su vez controla la actividad de los factores de transcripción (FTs, Baginsky et al., 1999) de los plastidos este podría ser el vínculo entre el estado redox y la regulación de la expresión génica. Aunque los FTs redox-sensitivos no han sido identificados en las plantas, en animales se ha encontrado un FT que puede ser activados por estímulos dependientes de redox (Balogun *et al.*, 2003).

Además de los efectos sobre la difusión del CO², la síntesis de ATP y el estado reductor, el estrés abiótico también puede afectar negativamente el ciclo de Calvin reduciendo el contenido y la actividad de enzimas del ciclo de reducción del carbono fotosintético, incluyendo a la enzima clave, Rubisco limitando así la asimilación de CO². Se demostró que las temperaturas altas y bajas disminuyen la actividad del funcionamiento de la Rubisco activasa, una chaperona molecular que activa a la Rubisco a través de una reacción dependiente de ATP (Kingston-Smith *et al.,* 1997). Condiciones de sequía muy severa también dan lugar a una fotosíntesis limitada, pruebas de que esto se relaciona con disminución de la disponibilidad de RuBP y no a la falta de CO² (Tezara *et al.,* 1999; Lawlor, 2002; Lawlor y Cornic, 2002), y aun más por la baja concentración de CO² y en consecuencia una disminución de la actividad de Rubisco (Flexas *et al.,* 2006).

Teniendo en cuenta que algunos de los efectos a corto plazo y la mayoría de los efectos a largo plazo causados por los factores abióticos desfavorables para la fotosíntesis implican la regulación de la expresión génica, es evidente que los FTs desempeñan un papel importante en la aclimatación del estrés, mediante la modulación de la expresión de genes en respuesta a estrés. Los FTs se están regulando por señales de estrés abiótico, así como también por ABA, por el estado redox y contenido de ATP/NADPH. Se sabe que la mayoría de las plantas comparten genes ortólogos implicados en respuesta a estrés abiótico, a pesar de las diferentes plantas presentan diferentes magnitudes de tolerancia al estrés. Estos fenotipos son en su mayoría diferentes en la expresión génica mediada por el estrés.

2.11. Tolerancia a la desecación en plantas de resurrección

El fenómeno de tolerancia a la desecación se encuentra en la comunidad microbiana, en hongos, en el reino animal y vegetal (Alpert 2006; Farrat 2007). Dentro del reino vegetal, la tolerancia a la desecación se observa principalmente
en semilla y de plantas no-traqueofitas como algunos musgos (Oliver 2000). La tolerancia a la desecación (a diferencia de la tolerancia a la sequía que consiste en sobrevivir a la pérdida de agua moderada por ejemplo 90% en el contenido de agua relativo RWC), lo cual representa una pérdida casi total del agua intracelular (Farrant 2007). Algunos musgos, líquenes y helechos pueden sobrevivir a la deshidratación de sus órganos vegetativos (por ejemplo hojas), mientras esto es poco común en las traqueofitas (Oliver 2000; Proctor, *et al.*, 2007; Kranner, *et al.*, 2007). Aunque no hay gimnospermas que muestran tolerancia a la desecación, hay varias familias de angiospermas que contienen miembros tolerantes a la desecación (Oliver 2000). Estas especies son referidas como "plantas de resurrección" (Gaff 1971). Tras la deshidratación las plantas de resurrección se marchitan y sus hojas se pliegan hasta que el agua nuevamente este disponible, con la cual estas plantas reviven de una manera notables.

Una rica diversidad de plantas de resurrección se encuentra en el sur de África, en importantes regiones áridas y semiáridas (Gaff 1971). Varias especies como *Myrothamnus flabellifolia* (Moore, *et al.*, 2007), *Craterostigma plantagineum* (Bartels 2005), *Craterostigma wilmsii* (Cooper y Farrant 2002), *Xerophyta viscosa* (Mowla, *et al.*, 2002) *Xerophyta humilis* (Illing, *et al.*, 2005), *Eragrostis nindensis* (Van der Willige, *et al.*, 2003) y *Sporobolus stapfianus* (Le, *et al.*, 2007; Whittaker, *et al.*, 2007) (fig, 4) han sido intensamente estudiadas con el objetivo de identificar los mecanismos responsables de su notable tolerancia. La tolerancia a la desecación parece que no requiere de la presencia de estructuras moleculares novedosas, sin embargo, el desencadenamiento de las rutas de señalización así como los procesos implicados han resultado cruciales para conferir tolerancia a la desecación (Farrant 2007; Bartels 2005).



Figura 3. Ejemplos de plantas de resurrección de Sudáfrica investigadas para determinar los mecanismos de tolerancia a la desecación. *C. wilmsii* deshidratada (a) e hidratada (b), *Eragrostis nindensis* deshidratada (c) e hidratada (d), *X, humilis* deshidratada (e) e hidratada (f) *Myrothamnus flabellifolia* parcialmente hidratada (g) y *C, plantagineum* hidratada (h).

2.11.1 Ajuste metabólico y sistemas antioxidantes

Muchos mRNAs y proteínas identificadas en plantas de resurrección sometidas a rehidratación y deshidratación participan en la fotosíntesis y metabolismo de carbohidratos. Los procesos metabólicos tales como la fotosíntesis y el metabolismo de carbohidratos son sensibles al déficit hídrico (Farrant, et at., 2003; Norwood, et al., 2000). Las plantas de resurrección pueden protege su aparato fotosintético y modificar su metabolismo en repuesta a la desecación (Whittaker, et al., 2007; Deng, et al., 2003). Las plantas de resurrección homoioclorofilas como *M. flabellifolia* conservan su clorofila cuando se deshidrata mientas que las plantas de resurrección poikiloclorofilas degradan su clorofila y la re sintetizan después de la deshidratación (Farrant, et al., 2003). Las homoioclorofilas con llevan un riesgo mayor de daño foto-oxidativo y metabólico ya que los foto sistemas activados desacoplarse de los mecanismos de disipación del metabolismo resultando en el daño oxidativo. Para protegerse contra los daños, estas plantas contienen enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, glutatión reductasa y ascorbato peroxidasa, que se consideran en generan "hosekeeping" protectores ya que no son exclusivas de las plantas de

resurrección (Illing, *et al.*, 2005; Kranner y Birtic 2005). Varios miembros de la familia aldehído deshidrogenasa han sido identificadas en semillas y en los tejidos deshidratados de la planta de resurrección (Velasco, *et al.*, 1994; Kirch, *et al.*, 2001). Se ha demostrado que los niveles de RNAm y proteína de GAPDHc, un miembro de la familia ALDH11 (GAPDH) aumento en respuesta a la desecación en hojas de *C. plantagineum* (Velasco, *et al.*, 1994). En *T. ruralis* el gen *ALDH21A1* (Al305018) se cree que tiene un papel importante en respuesta a la desecación y estrés salino (Chen, *et al.*, 2001). Otra enzima antioxidante es la 1-cis-peroxirredoxina específica de las semillas, se ha demostrado previamente que se expresa abundantemente en las hojas de *X. humilis y X.* viscosa durante la desecación (Mowla, *et al.*, 2002). Interesantemente una 1-cis-peroxirredoxina también se expreso durante la deshidratación así como en la rehidratación de *T. ruralis* (Oliver 1996).

La importancia de los sistemas antioxidantes en la tolerancia a la desecación se ha destacado su estudio recientemente en *M. flabellifolia* (Kranner, *et al.,* 2002). La vía clásica antioxidante "Haliwell-Asada" se demostró estar presente en las plantas *M. flabellifolia* que habían sido desecadas durante largos periodos de tiempo (aproximadamente, 9 meses, Kranner, *et al.,* 2002).

La deshidratación induce la expresión de un gran número de transcritos en las plantas de resurrección. Los productos de estos genes son de función protectora, como las proteínas LEA las cuales están expresadas en altos niveles en el citoplasma o en cloroplastos en tratamientos de deshidratación o de ABA. Al igual que el incremento en la concentración de azúcar se observa al inicio de la desecación de los tejidos de las plantas, dichos azucares son de mucho efecto sobre el ajusto osmótico o bien pueden estabilizar la estructura de la membrana y las proteínas de la misma.

2.12. Briofitas

Las briofitas son un grupo de organismos que se separaron tempranamente del resto de las plantas terrestres dando lugar a tres linajes diferenciados: musgos (Div Bryophyta), hepáticas (Div. Hepatophyta) y antoceros (Div. Anthocerophyta). Aunque estos tres linajes no forman un grupo monofilético presentan caracteres reproductores y estructurales comunes y exclusivos de ellos, por lo que se les denomina "briofritas".

Como el resto de los embriofitos (plantas vasculares). Las briofitas tienen dos generaciones pluricelulares en su ciclo vital (gametofito y esporofito), presentan gametangios femeninos (arquegonio) y masculinos (anteridio) cubiertos con capas de células estériles para proteger las células reproductoras. Sin embargo las briofitas son las únicas plantas terrestres en las que la generación dominante es el gametofito, mientras que el esporofito realiza una fotosíntesis menor. La fase gametofitica se expande mediante procesos de reproducción sexual y asexual aumentando el número de individuos de la población y colonizando nuevas zonas. Desde el punto de vista de adaptación al medio ambiente, las briofitas son diferentes de las plantas vasculares. Las briofitas son poiquilohídricas, es decir pierden y ganan agua a través de las membranas celulares equilibrando rápidamente el agua que contienen sus células con la humedad disponible en el medio.

Algunas briofitas compensan su incapacidad de retener agua siendo tolerantes a la desecación, es decir, la pérdida casi total de agua no daña sus tejidos de manera permanente. En condiciones de desecación extrema permanecen inactivos pero vivos. Cuando reciben agua de la lluvia o del rocío la absorben en pocos minutos y sus niveles de fotosíntesis y respiración recuperan los niveles normales.

2.13. Antecedentes directos del Proyecto

El musgo *C. stenocarpus* presenta las siguientes características de tolerancia a estrés hídrico:

- Fenómeno de resurrección. Esto se ha observado en gametóforos recolectados en campo
- Sus gametóforos pueden equilibrar su contenido de agua de acuerdo al ambiente en que se encuentra.
- Cuando los gametóforos de *C. stenocarpus* son deshidratados a 70% HR apagan su fotosíntesis en un tiempo de 210 minutos y a una 30% HR les toma un tiempo de 110 minutos. En ambas HR los gametóforos son capaces de recuperar sus fotosíntesis en cuestión de minutos cuando son rehidratados.
- Sus gametóforos toleran varios ciclos de hidratación- deshidratación
- Sus esporas son capaces de germinar en condiciones severas de estrés osmótico (hasta 600mM de Sorbitol) y también en estrés salino severo (hasta 300mM de NaCl)
- Se ha desarrollado un sistema de Cultivo y propagación *in vitro* de *C. stenocarpus*

Datos No publicados. Selma Ríos Meléndez. Tesis de Maestría.

III. JUSTIFICACIÓN

En la naturaleza existen plantas que han desarrollado estrategias de tolerancia al déficit hídrico como son las briofitas. La comprensión de las respuestas de las plantas en un ambiente extremo es de importancia para la investigación básica, pero es un punto esencial para mejorar la tolerancia a estrés en plantas de interés agronómico

No obstante no hay estudios de las características que les permiten tal tolerancia en otras especies de briofitas han sido poco estudiados. Resulta de gran interés contribuir con el conocimiento de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos que se detectan y trasmiten la señal del estrés para la activación de genes específicos en respuesta a estrés abiótico.

Para ello se ha tomado como modelo de estudio el musgo *Ceratodon stenocarpus,* sus respuestas fenotipicas y fisiológicas servirán para determinar su capacidad de tolerancia a estrés abiótico. Lo cual permitirá en estudios posteriores comprender los mecanismos que le proporcionan dichas características.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Conocer las respuestas fenotípicas y fisiológicas que presenta *C. stenocarpus* antes los estreses osmótico, salino y congelación en condiciones de cultivo *in vitro*.

4.2 Objetivos Específicos

- Obtener una línea de *C. stenocarpus* cultivada *in vitro*
- Analizar la respuesta fenotípica de C.stenocarpus a estrés osmótico, salinidad y congelación.
- Analizar la participación de ABA en las respuestas del musgo ante el estrés osmótico, salinidad y congelación
- Estudiar las respuestas fotosintéticas de *C.stenocarpus* sometido a estrés osmótico, salinidad y congelación

V. MATERIALES Y METODOS

5.1 Estrategia experimental para la obtención de esporas independientes de *C. stenocarpus*



Figura 4. Obtención de esporas independientes de *C. stenocarpus*. Se muestran los pasos para la aislación de esporas del musgo para generar un cultivo *in vitro* genéticamente homogéneo.

5.2 Estrategia experimental para el análisis fenotípico y fisiológico de *C. stenocarpus* sometido a estrés osmótico y salinidad.



Figura 5. Diagrama de flujo para la evaluación fenotípica y fisiológica de *C. stenocarpus* sometido a estrés osmótico y salinidad.

5.3 Estrategia experimental para el análisis fenotípico y fisiológico de *C. stenocarpus* sometido a estrés por congelación.



Figura 6. Esquematización del tratamiento de congelación para la evaluación de las respuestas fenotípicas y fisiológicas del musgo *C. stenocarpus*

5.4 Obtención de la línea EM4 de Ceratodon stenocarpus

Se realizó la desinfección de un esporofito colectado en las coordenadas: 19-20-03.3N, 98-21-59.9W, 2159 msn. Dentro de un tubo eppendorff de 1.5ml se realizó un pretratamiento del esporofito con agua destilada estéril por 20 min., posteriormente se le retiró el agua, para después agregar el desinfectante NaDCC a una concentración de 0.01% y se incubó por un tiempo de 2hr. Al término de la desinfección, al esporofito se le realizaron 3 lavados con agua destilada estéril. Finalmente se procedió a romper la capsula en 1 ml de agua destilada estéril. A partir de esta suspensión de esporas se llevaron a cabo diluciones seriadas 1:1 (v/v) sobre una caja de Petri. A través de la observación en el estereoscopio (Leica ZOOM 2000) y con una micro pipeta se seleccionó una espora, la cual se sembró en medio MS 0.5X sobre membrana de celofán.

5.5 Propagación de Ceratodon stenocapus

Para la propagación del musgo se partió de tejido protonemal de 20 días de edad generado por la germinación de esporas sembradas en medio MS 0.5X. Se homogenizaron aproximadamente 100mg de tejido en un tubo falcón con 4 ml agua bidestilada estéril, con la ayuda de un homogeneizador (Powergen 125). Se realizaron 5 pulsos de 5 segundos c/u con intervalos de reposo de 15 segundos. Finalmente 500 µl del tejido homogenizado se sembraron en medio MS 0.5X sobre membranas de celofán. *C. stenocarpus* fue sub- cultivado en intervalos de 10 días.

5.6 Tratamiento de estrés para C. stenocarpus

La propagación de tejido protonemal de *C.stenocarpus* utilizado en los experimentos de estrés, se realizó básicamente como se describió anteriormente pero con algunas modificaciones que se describen a continuación. Se sembraron 5 µl de tejido protonemal ya homogenizado sobre minimembranas de celofán (0.6

mm de diámetro) en medio MS 0.5X. Las membranas fueron incubadas en la cámara de crecimiento a una temperatura de 23°C con un fotoperiodo de 16 hrs luz/8hrs oscuridad por 15 días.

Para el estrés osmótico (Manitol y Sorbitol) las plantas fueron transferidas a medio solido MS 0.5X adicionado con los agentes estresantes en concentraciones de 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000mM, permaneciendo en estos medios por 25 días. Como controles se mantuvieron tejidos de *C. stenocarpsu* en medio MS 0.5X sin los agentes estresantes.

Para el estrés salino (NaCl) las plantas fueron transferidas a medio MS sólido 0.5X adicionado con NaCl en concentraciones de 300, 400 y 500 mM permaneciendo por 25 días. De igual forma, como controles se mantuvieron tejidos del musgo en medio MS 0.5X sin el agente salino. Después de haber sido expuesto *C. stenocarpus* a estrés osmótico y/o salino, los tejidos fueron retransferidos a medio control.

5.7 Análisis del papel de ABA en la respuesta a estrés abiótico del protonema de *C. stenocarpus.*

El musgo previamente fue crecido por 15 días en medio control MS 0.5X sobre las mini membranas, con condiciones de temperatura de 23°C y un fotoperiodo de 16/8hrs.

Posteriormente los tejidos se dividieron en dos grupos. Un primer grupo tuvo un pre-tratamiento de 24 hrs en medio solido MS 0.5X suplementado con 10µM de ABA en la cámara de crecimiento. Después del pre-tratamiento las plantas fueron transferidas a medio MS 0.5X adicionado con Sorbitol en concentraciones de 800, 900, 1000, 1250, 1500, 1725 y 2000mM. Para el tratamiento de estrés salino (NaCl) se manejaron concentraciones de 300, 400, 500, 600, 700, 800 y 1000 mM. También fueron transferidas a estrés, las plantas que no tuvieron el pre-tratamiento con ABA. Otros controles fueron los tejidos que se retransfirieron a medio MS 0.5X control tanto aquellos que recibieron el pre-

tratamiento como los que no lo tuvieron. El tiempo de exposición de *C.stenocarpus* a altas concentraciones de los agentes osmótico y salino fue de 10 días y terminando ese tiempo los musgos fueron retransferidos a medio MS 0.5X control para su recuperación del estrés.

Para el caso del estrés por congelación, la propagación del tejido protonemal fue básicamente igual como se describió anteriormente (en el punto 3.2). Posteriormente las plantas fueron aclimatadas a 4°C por 24 hrs con luz continua, al mismo tiempo otro grupo de plantas fueron transferidas a medio solido MS 0.5X adicionado con ABA a concentración de 10µl por 24 hrs e incubadas en la cámara de crecimiento. Una vez que el tejido protonemal recibió los pre-tratamientos, fue sometido a las temperaturas de -10°C, -20°C y -76°C en ausencia de luz por 24 hrs y 7 días respectivamente. Como controles positivos fueron tejidos (con 15 días de desarrollo) que no recibieron ningún pretratamiento y directamente se transfirieron a las diferentes temperaturas de congelación, y como controles negativos se usaron tejidos que continuaron su desarrollo en la cámara de crecimiento, es decir, no recibieron ningún tipo de pre tratamiento y no fueron sometidos a ningún estrés de temperatura.

5.8 Efecto de ABA en el fotosistema II (PSII) de los protonemas estresados de *C. stenocarpus.*

La medición del PSII de *C. stenocarpus* sometido a diferentes estreses (osmótico, salino y congelación) se realizo a través de un fluorometro portátil que permite una medición rápida y precisa de varios parámetro de la fluorescencia de la clorofila (Modelo FluorPen PF100-MAX, Photon Systems Instruments. Rep. Checa). El Fv/Fm (Fv: máxima fluorescencia variable; Fm: máxima intensidad de fluorescencia) es el parámetro más utilizado para la evaluación del estatus de Fotosistema II (PSII) bajo condiciones de estrés. El equipo utilizado es este trabajo tiene la capacidad de medir QY (Quantum Yield), el cual es un parámetro equivalente a Fv/Fm. Antes de ser utilizados para las mediciones, los tejidos fueron preadaptados al menos 10 min bajo condiciones de obscuridad.

La evaluación del PSII (QY) a los tejidos control (con ABA y sin ABA) se realizó a los 15 días de desarrollo (sin estrés), a los 3 días de haber iniciado el estrés y al termino del estrés (a los10 días).

Para la evaluación del PSII (QY) del musgo expuesto a estrés osmótico se realizó en las concentraciones de 800, 1000 y 1250 mM; en el caso del estrés salino (NaCl) se evaluó en las concentraciones de 300, 600 y 1000 mM; se evaluó QY a los 3 y 10 días de estrés.

Después de haber sometido *C. stenocarpus* ha ambos tipos de estrés (osmótico y salino), los tejidos fueron retransferidos a medio control (MS 0.5X) y una vez que los tejidos habían recuperado su pigmentación (en cada una de las concentraciones respectivas de los agentes estresantes) se evaluó nuevamente el estado del PSII tanto en los tejidos que tuvieron un pre-tratamiento con ABA como los que no lo tuvieron. También se midió el PSII de los tejidos control.

La evaluación del PSII del musgo sometido a estrés por bajas temperaturas, se realizó inmediatamente después de haber concluido con el tiempo de exposición de cada una de las temperaturas correspondientes. Posteriormente los tejidos fueron retransferidos a medio control (MS 0.5X) los cuales recuperaron su metabolismo normal, y nuevamente se evaluó el estado del PSII del musgo.

VI. RESULTADOS

6.1 Material Biológico.

Propagación de *C. stenocarpus.* El cultivo y propagación *in vitro* de *C. stenocarpus* se obtuvo en nuestro laboratorio, gracias al trabajo de Maestría de Selma Ríos Meléndez. Dicho sistema *in vitro* fue obtenido a partir de la esterilización superficial de cápsulas maduras de *C. stenocarpus* y posterior siembra de las esporas que contienen en MS 0.5X. El protonema obtenido de la germinación de las esporas puede ser propagado mediante homogenización lo cual provoca el fraccionamiento del tejido protonemal. Una vez homogenizado, el tejido es sembrado en cajas con medio sólido ya descrito. Este sistema es muy eficiente, pero no se trata de un cultivo homogéneo desde el punto de vista genético, ya que las esporas se generan por meiosis, lo cual provoca diversidad genética en la población de esporas de una sola cápsula. A partir de este momento, a este tipo de cultivo se le llamara "mezcla de esporas", debido a que originalmente fue obtenido de esta manera. En la Figura 9 se muestra una caja representativa del cultivo de mezcla de esporas.



Fig. 7. Cultivo *in* vitro de *C. stenocarpus* a partir de mezcla de esporas. El tejido protonemal del musgo fue sub-cultivado en intervalos de 10 días en medio MS 0.5X sobre membrana de celofán. A partir del cual fue utilizado para los experimentos de estrés.

6.2 Obtención de la línea EM4 de Ceratodon stenocarpus.

Con el fin de obtener un cultivo genéticamente homogéneo, se decidió generar un cultivo *in vitro* a partir de una sola espora de *C. stenocarpus* ("cultivo monospórico"). A través de la dilución 1:1 de la suspensión de esporas que se obtuvo al romper el esporofito después de haber sido desinfectado, se logró obtener en un inicio 8 esporas sembradas de manera independiente en medio MS 0.5X.

En la Figura 10 se muestran 5 clonas a los 5 días de crecimiento. Su desarrollo se llevo a cabo en una cámara de crecimiento a una temperatura de 23°C con un fotoperiodo de 16hr/8 hrs.



Fig. 8. Germinación de esporas independientes de *C. stenocarpus* en medio MS0.5X. Se muestran 5 esporas provenientes de un esporofito, con una edad de desarrollo de 5 días. Fotografías tomadas con el estereoscopio Nikon (Modelo SMZ 1500) con aumento de 11.0 X

Lamentablemente la cámara de crecimiento sufrió constantes fallas técnicas durante este periodo, y por lo tanto, no se tuvieron las condiciones favorables para el desarrollo optimo de las clonas. Como consecuencia desafortunadamente 5 clonas no pudieron continuar con su desarrollo. Solo 3 clonas denominadas EM1, EM4 y EM6 continuaron su desarrollo como se muestra en la Figura 11.



EM1

EM6

Figura 9. Desarrollo de las clonas EM1, EM4 y EM6. Se muestra el desarrollo de las clonas a los 32 días de haber sido sembradas en medio MS 0.5X. Fotografías tomadas con la cámara Nikon modelo D80 acoplada al estereoscopio (Modelo SMZ 1500) con aumento de 9.5X.

Actualmente se cuenta con dos clonas (EM4 y EM6) cultivadas intro (Figura 12). Sin embargo el crecimiento de ambas clonas fue lento, posiblemente debido a las condiciones no deseadas generadas por las fallas en la cámara de crecimiento.



Figura 10. Retraso del desarrollo de las Clonas EM4 y EM6. En panel A se muestra la clona EM4 y en panel B se muestra la clona EM6 con una edad de seis meses sembradas en MS 0.5X., fotografías con la cámara Nikon modelo D80 acoplada al estereoscopio (Modelo SMZ 1500) con aumento de 9.5X

A pesar de ello, la clona EM4 mostró un desarrollo más vigoroso. Por ello la clona EM4 pudo ser propagada mediante la homogenización de una fracción de su protonema obtenida por corte con bisturí. En la (Figura 13 A) se observa a la clona EM4 con una edad de 231 días de desarrollo.

El tejido de la clona EM4 propagado a través del homogeneizador y sembrado sobre membrana de celofán, creció exitosamente bajo nuestras condiciones de laboratorio y tuvo un buen desarrollo. A partir de ese momento, la clona EM4 fue seleccionada como nuestra clona "tipo" y fue propagada de manera rutinaria cada 10 días (Figura 13 B).

El tejido obtenido a través de los subcultivos de *C. stenocarpus* fue utilizado para realizar los diferentes tratamientos de estrés osmótico, salino y congelación.



Figura 11. Selección de la Clona EM4 para los tratamientos de estrés osmótico, salino y congelación. En el panel A se observa la clona EM4 con una edad de 231 días de desarrollo y sembrada en medio MS 0.5X. En el panel B se muestra el subcultivo de la clona EM4 con una edad de desarrollo de 10 días sembrada en medio MS 0.5X sobre membrana de celofán. Fotografías tomadas con la cámara Nikon modelo D80.

6.3. Análisis de la respuesta fenotípica del protonema de *C. stenocarpus* ante estrés osmótico y salino bajo condiciones de cultivo in vitro (mezcla de esporas)

6.3.1 C. stenocarpus en estrés osmótico generado por Manitol.

Una vez que los protonemas del musgo crecieron por 15 días en medio MS 0.5X sobre las minimembranas, las plantas fueron transferidas a medio MS 0.5X adicionado con Manitol en concentraciones de 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 mM. Para tener varias muestras, se colocando 4 mini membranas por cada concentración. El análisis fenotípico de *C. stenocarpus* en estrés osmótico se llevo a cabo a través de un registro fotográfico utilizando una cámara Nikon (Modelo D80) acoplada al estereoscopio Nikon (Modelo SMZ 1500).

En la figura 14 panel (A) se muestra una minimembrana representativa de las 4 que fueron colocadas en cada una de las concentraciones de manitol, en el día en que se inició el estrés. En 14 panel (B) se muestran las 4 minimembranas al final del estrés (25 días), en las concentraciones respectivas de manitol.

Estas concentraciones se utilizaron en primera instancia para evaluar la capacidad de tolerancia del musgo *C. stenocarpus* ante un estrés osmótico. Al analizar los tejidos a concentraciones de 400 y 500 mM de manitol se observó que estos presentaban un cambio en su pigmentación, siendo de color verde oscuro en comparación con el control. La intensidad de la pigmentación de los tejidos va disminuyendo conforme aumenta la concentración de manitol. En el caso de 600 mM el musgo tuvo una coloración verde opaco. En cuanto a las concentraciones de 700 a 1000 mM, las plantas se mostraban cloróticas (casi albinas) en comparación con el control. Sin embargo, *C. stenocarpus* mostro repuestas fenotípicas favorables de tolerancia a estrés osmótico ya que a los 25 días de exposición a concentraciones de 400 a 600 mM de manitol la pigmentación disminuye pero nunca se pierde.

Ante estos resultados, surgió la inquietud de evaluar la capacidad de recuperación del musgo después de haber sido sometido por un largo periodo a

altas concentraciones de estrés por manitol. Para ello, los tejidos que fueron expuestos por 25 días a las concentraciones de 800 a 1000 mM de manitol fueron transferidos a medio MS 0.5X. El panel superior de la Figura 15 muestra el estatus fenotípico de los tejidos en el momento en que se transfirieron a medio control. En cambio, el panel inferior de la Figura 12 muestra el estatus de la recuperación de los tejidos, 39 días después de haber sido retransferidos a medio control. A los mencionados días de recuperación, la pigmentación de los tejidos que fueron sometidos a estrés es muy similar a la mostrada por los tejidos control. Así que el protonema de nuestro musgo tiene la capacidad de retomar su metabolismo normal después de haberse sometido a altas concentraciones de manitol por períodos prolongados.



Figura 12. *C. stenocarpus* tolerante a estrés osmótico por Manitol. En el panel A se muestra el musgo en medio MS 0.5X adicionado con manitol, en el inicio del estrés (Día 0). Dicha briofita tuvo 15 días de desarrollo con anterioridad en medio control. En el panel B se muestran los fenotipos del musgo al término del estrés (25 d), en las concentraciones de 400 y 500 mM *C. stenocarpus* mantuvo su pigmentación muy similar al control, sin embargo, los daños en la disminución de su desarrollo disminuye y hay perdida de su pigmentación a partir de 800 mM hasta 1000 mM de manitol.



Figura 13. *C. stenocarpus* recupera su metabolismo de un prolongado tiempo de exposición ante (25d) estrés osmótico (Manitol). Las plantas fueron transferidas a medio control (MS 0.5X) para evaluar su capacidad de recuperación, después de haber sido sometido a altas concentraciones de manitol, panel superior se muestra el inicio de la recuperación del metabolismo. Panel inferior el musgo retomo su pigmentación y desarrollo en comparación que el control, en un tiempo de 39 días.

6.3.2. C. stenocarpus en estrés osmótico por Sorbito

Otra forma de simular el estrés hídrico fue utilizando el agente osmótico Sorbitol en concentraciones de 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000mM. El tejido protonemal usado tenía 15 días de desarrollo en las minimembranas antes de ser transferido a las diferentes concentraciones del agente. En la fig. (16 A) se muestra una minimembrana representativa de las 4 que se colocaron en cada una de las concentraciones, en el día en que se inicio el estrés. En el panel B de la misma figura, se muestran las 4 minimembranas expuestas en las diferentes concentraciones del agente osmótico a los 25 días de estrés. En respuesta a este estrés el protonema del musgo mostró una renuencia a la pérdida de su pigmentación en concentraciones de 400, 500 y 600 mM de Sorbitol. Sin embargo en las concentraciones de 700 a 1000 mM de sorbitol los tejidos se mostraron cloróticos.

Al igual que se hizo anteriormente para Manitol, únicamente los tejidos expuestos a altas concentraciones de Sorbitol se transfirieron a medio control para evaluar su capacidad de recuperación ante el estrés osmótico. El panel superior de la figura 17 muestra el estatus de los protonemas a los 4 días de recuperación. Se puede observar que los tejidos que sufrieron un estrés de 700 y 800 mM por Sorbitol han iniciado la recuperación de su pigmentación. El panel inferior muestra el estatus de recuperación a los 85 días. Respuesta evidente que nuestro musgo es capaz de recuperar completamente su metabolismo y por ende su desarrollo. Sin embargo, este experimento muestra claramente que el límite es de 900 mM de Sorbitol, ya que a pesar del prolongado tiempo de recuperación, el musgo ya no se recupera de una exposición de 1 M.



Figura 14. *C. stenocarpus* muestra fenotipo de tolerancia a estrés osmótico causado por Sorbitol. El musgo tuvo15 días de desarrollo en medio MS 0.5X. Posteriormente fue transferido a las diferentes concentraciones de Sorbitol, en el panel A se muestra el inicio del estrés osmótico (Día 0) con una minimembrana representativa de las cuatro que se colocaron por cada concentración de Sorbitol. En el panel B se muestra la conclusión del estrés osmótico evaluado por 25 días



Figura 15. *C. stenocarpus* tiene la capacidad de recuperar su metabolismo sometido a estrés causado pof Sorbitol. En el panel superior se muestra el inicio de la recuperación del musgo en medio MS 0.5X, a partir de las concentraciones de 700 a 1000 mM de sorbitol. En el panel inferior se muestra *C. stenocarpus* con la renovación de su pigmentación igual que el control, así como la continuación de su desarrollo, solo en las concentraciones de 700 a 900 mM de sorbitol (a las cuales fue expuesto por 25 días) en un tiempo de 85 días. A 1000 mM no tuvo la capacidad de recuperarse

6.3.3. C. stenocarpus en estrés salino causado por Cloruro de Sodio (NaCl)

Al observar que la briofita presentaba tolerancia a estrés osmótico se decidió evaluar su tolerancia a estrés salino causado por NaCl en concentraciones de 200, 300, 400, 500 mM. De manera similar a como anteriormente se describió, el tejido protonemal usado en estos experimento tenía 15 días de crecimiento en medio solido MS 0.5X sobre las minimembranas antes de ser transferido a medio MS 0.5X adicionado con el agente salino. En la Figura 18 (A) se muestra una foto representativa de las cuatro membranas que se colocaron en cada concentración

de NaCl en el día en que se inicio el estrés, y en (B) se muestra el musgo expuesto a sal por un tiempo de 25 días. Puede observarse que los protonemas de *C. stenocapus* son tolerantes a la exposición de 200 mM de NaCl, ya que aparentemente no pierde su pigmentación, aunque su desarrollo se mostro disminuido en comparación con el control. En la concentración de 300 mM de NaCl, el tejido protonemal aun mantenía su pigmentación al tener una coloración verde olivo, sin embargo los tejidos se mostraron cloróticos al ser expuestos a concentraciones mayores de NaCl (400 y 500 mM).

Adicionalmente, se realizó la transferencia de los tejidos de *C. stenocapus* a medio control para evaluar su capacidad de recuperación de un estrés salino Figura 19. Los resultados obtenidos muestran que en un lapso de 4 días de recuperación en medio control, el musgo es capaz de mostrar un estatus fenotípico muy similar a la del control sin estrés, aún a la concentración de 400 mM de NaCl. Además, a los 19 días de recuperación, la similitud entre los fenotipos de los tejidos previamente estresados y los del control se hace más evidente. Sin embargo, fue sorprendente encontrar que los tejidos expuestos a la concentración de 500 mM les tomo 34 días para retomar su metabolismo normal como se muestra en la Figura 20 y continuar su desarrollo.



Figura 16. El musgo *C. stenocarpus* tolerante a estrés salino (NaCl). El tejido protonemal como en los anteriores experimentos tuvo 15 días de desarrollo en medio MS 0.5X antes de ser transferido a las diferentes concentraciones de NaCl. En el cuadro A



Figura 17. Análisis fenotípico de la recuperación metabólica de *C. stenocarpus* del estrés salino. El musgo fue transferido a medio control a partir de 300 a 500 mM de NaCl, ya que los protonemas se mostraron cloróticos. En el panel superior se muestra el musgo con 4 días de recuperación, observándose en su totalidad una renovación de su pigmentación. En el panel inferior la briofita en 19 días recupero su metabolismo normal para continuar su crecimiento en comparación con el control.



Figura 18 . *C. stenocarpus* tiene la capacidad de recuperar su metabolismo a altas concentraciones de NaCl. Se continúo evaluando la recuperación de los protonemas del musgo mostrando una minimembrana representativa de las cuatro que fueron transferidas a medio control. Sorprendentemente a los 29 días el musgo recupero su pigmentación muy similar al control, y a los 34 días *C. stenocarspus* continuo con su desarrollo.

6.4 Participación de ABA en las respuestas de los protonemas de C. stenocarspus ante estrés osmótico y salino (mezcla de esporas)

6.4.1 ABA mejora la respuesta de *C. stenocarpus* cuando es sometido a estrés híper osmótico.

Después de haber evaluado fenotípicamente a *C. stenocapus* en los diversos estrés abióticos, el cual demostró ser tolerante a estrés osmótico en concentración de 600mM al no perder completamente su pigmentación y 900mM de sorbito al presentar la capacidad de recuperación de su fotosíntesis y continuar su desarrollo. Se decidió al musgo someterlo a concentraciones aun mas altas para así buscar su límite de tolerancia ante dicho estrés, por otra se evaluó participación de ABA en esta briofita.

Las concentraciones de sorbitol en las cuales fue evaluado el musgo fueron: 800, 900, 1000, 1250, 1500, 1725 y 2000mM, donde los tejidos tuvieron un pre-tratamiento con ABA 10µM por 24hr antes de ser expuesto en las diferentes concentraciones. De igual forma los controles tuvieron un pre-tratamiento con ABA para nuevamente ser transferidos a medio MS 05X.

En la Figura 21 (A) se muestra el inició del estrés osmótico y en panel (B) se observan la conclusión del estrés causado por Sorbitol (10 días). El ABA sobre los controles no causa ninguna reacción secundaria en su desarrollo ya que se muestran igual como los controles que no tuvieron el pre-tratamiento con la hormona. En cambio los fenotipos observados fueron que el musgo expuesto a las concentraciones de 800 y 1000mM de sorbitol se mostraron igualmente afectados en la perdida de su coloración, es decir la participación de ABA no fue evidente en la tolerancia de la briofita ante dichas concentraciones, pero fue un indicativo que la planta es tolerante ante el estrés sin requerir la presencia del la hormona. Sin embargo cuando *C. stenocapus* fue sometido en las posteriores concentraciones de sorbitol fue muy clara la participación de ABA, para contender a las altas concentraciones osmóticas, ya que los tejidos en las concentraciones

de 1250, 1500, 1725 y 2000mM se apreciaron menos dañados en la perdida de su coloración en comparación con los tejidos que no fueron sometidos al tratamiento con ABA los cuales tuvieron un fenotipo clorótico en la pérdida gradual de la pigmentación.



Figura. 19. La presencia de ABA en *C. stenocarpus* ayuda a contender con las respuestas fenotípicas ante estrés híper osmótico. El tejido protonemal del musgo tuvo 15 días de desarrollo, antes de ser transferido a medio MS 0.5X adicionado con Sorbitol. En el panel A columna izquierda se localizan los tejidos ausentes de la hormona y en la columna derecha del mismo panel se colocaron los tejidos que tuvieron el pretratamiento con ABA, así mismo el panel A indica el inició del estrés osmótico. En el panel B se aprecian los fenotipos resultantes al termino del estrés por 10 días, causado por Sorbitol.

Adicionalmente se realizo la transferencia de los tejidos de *C. stenocapus* a medio control (MS 0.5X) para evaluar la participación de ABA en la recuperación de los tejidos, después de haber sido expuestos a estrés híper-osmótico. El panel A de la Figura 22 muestra el inicio de la recuperación del musgo (Día 0), y en el panel (B) se observan los tejidos en recuperación a los 35 días, las respuestas fenotípicas por parte de los tejidos que no recibieron el pretratamiento con ABA (columna izquierda) sometidos a concentraciones de 800, 1000 y 1250 mM de Sorbito, mostraron una mejor renovación de su pigmentación en comparación con los tejidos que se expusieron al pre-tratamiento con ABA siendo más lenta la recuperación de su metabolismo, es decir la participación de la fitohormona no fue contundente para ayudar al musgo después de haber sufrido un estrés híperosmótico, por lo menos en este experimento. Por otra parte *C. stenocarpus* no tuvo la capacidad de recuperar sus actividades metabólicas normales, a concentraciones superiores de 1250 mM de sorbitol.

Día 0





Figura 20. La participación de ABA en la recuperación de *C. stenocarpus* del estrés híper osmótico no fue contundente. Los tejidos expuestos a altas concentraciones de Sorbito fueron transferidos a medio control (MS 0.5X). En el panel A se muestra el inicio de la recuperación (Día 0) en la columna izquierda del mismo se localizan los tejidos que no fueron pretratados con ABA y en la columna derecha se encuentran los tejidos que recibieron el pretratamiento con la fitohormona, así mismo en la parte superior de cada columna se encuentran los controles (sin ABA y con ABA). En el panel B se observa, el musgo en un tiempo de 35 días ha recuperado su pigmentación y continuado su desarrollo para los tejidos que fueron ausentes de la presencia de la hormona (columna izquierda), en cambio los tejidos con la presencia de ABA su recuperación fue más lenta.

6.4.2. *C. stenocarpus* sometido a estrés híper salino y la participación de ABA (mezcla de esporas)

De igual manera *C. stenocarpus* fue sometido a concentraciones híper salinas para buscar dentro de este estrés abiótico su límite de tolerancia y la participación de ABA en la tolerancia del musgo ante dicho estrés. Las concentraciones que se consideraron fueron: 300, 400, 500, 600, 700, 800 y 1000mM por 10 días.

Los fenotipos que se apreciaron cuando el tejido protonemal expuesto a 300 mM de NaCl y ausente del pretratamiento con ABA al inicio del estrés (Día 0) y al final del estrés (Día 10) no se mostraron cambios en la perdida de pigmentación durante el estrés como se muestra en la Figura 23 panel B, solamente hubo disminución de su desarrollo en comparación con el control (sin ABA), muy similarmente se mostraron fenotipos con los tejidos pretratados con ABA, es decir la participación de la hormona para contender con el estrés salino ante dicha concentración no se vio reflejada, ya que los tejidos mostraron ser tolerantes. Por otra parte al someter los tejidos a 400 mM de NaCl el musgo presento el fenotipo de una ligera pérdida de pigmentación así como la disminución de su desarrollo, para ambos grupos de tejidos con y sin pretratamiento de ABA, hasta esta concentración la participación de la hormona no ha sido contundente para la tolerancia del estrés salino ya que los tejidos han presentado respuestas fenotípicas similares, sin embargo cuando el musgo se expuso a de 500 mM de NaCl, la respuesta de los tejidos ausentes de ABA mostraron un fenotipo clorótico, en comparación de aquellos que recibieron el pre-tratamiento, donde la perdida de la pigmentación fue menor, es decir la hormona ayudo a contender al musgo ante esta concentración de NaCl. Con respecto a las respuestas fenotípicas obtenidas del musgo ante 600, 700 y 1000 mM de NaCl provoco en los tejidos un fenotipo clorótico, tanto aquellos que recibieron el pre-tratamiento con la hormona, es decir, la participación de ABA no favoreció a la tolerancia de C. stenocarpus ante dicho estrés. Sin embargo el musgo en la concentración de 800mM presento una respuesta diferente ya que los tejidos aun mantenían su coloración, en comparación con los tejidos expuestos a 700 y 1000mM que perdieron su coloración.

Continuado con la evaluación de la capacidad de *C. stenocarpus* de recuperar sus condiciones metabólicas, se transfirieron tejidos afectados por las concentraciones de 500, 600, 700, 800 y 1000mM a medio control (MS 0.5X) para su recuperación como se muestra en la Figura 24. Se hace mención que los tejidos expuestos a 500 y 800mM de NaCl sufrieron 20 días más de estrés. Razón por la cual no se muestran en el día 0 de recuperación.

Los fenotipos de recuperación de pigmentación, se evidenciaron en los primeros 15 días para los tejidos que se expusieron a 700 mM de NaCl de manera igualatoria para ambos grupos de tejidos (con y sin pretratamiendo de ABA). En un tiempo de 65 días los tejidos que se expusieron en 500mM de NaCl por 30 días sin tratamiento de ABA se recuperaron mejor que los los tejidos que se sometieron al pre-tratamiento ya que la recuperación de clorofila, fue más lenta. En cuanto los tejidos que sufrieron un estrés de 600mM de NaCI el restablecimiento de la clorofila fue más rápido para aquellos que tuvieron el pre-tratamiento con ABA en comparación con aquellos donde la fitohormona fue ausente, para los tejidos que estuvieron presente en 700mM de sal, su recuperaron de su metabolismo fue excelente en comparación con el control y continuaron con su desarrollo para ambos grupos de tejidos los que estuvieron sometidos con ABA y ausentes de la fitohormona. El estrés salino causo un daño severo para los tejidos expuestos en las concentraciones de 800 y 1000mM ya que estos, se continúo con la observación p $_{\rm A}\,$ rior a los 65 días y no se pre $\,$ B $\,$ o el fenómeno de recuperación $\,$ de los tejidos.



Figura 21. Participación de ABA en *C. stenocarpus* ante estrés híper salino. El tejido protonemal tuvo 15 días de desarrollo en medio MS 0.5X, antes de ser transferido a las distintas concentraciones de NaCl. En el panel A columna izquierda se muestran los tejidos sin pretratamiento y en la columna derecha se localizan los tejidos con pretratamiento de ABA (10µl por 24hr) así mismo el panel indica el inicio del estrés causado por NaCl. En el panel B se muestra los tejidos al término del estrés (Día 10).



Figura 22. Análisis fenotípico de recuperación del musgo *C. stenocarpus* después de un estrés híper salino. En (A) se muestra el inicio de la recuperación de los tejidos y en (B) el fenotipo de recuperación del musgo de un estrés de la concentración de 700mM de NaCI en (C) 65 días de recuperación de la briofita del estrés salino en concentraciones de 500, 600 y 800mM. En el extremo izquierdo tejidos sin pre-tratamiento con ABA a la derecha tejidos que fueron sometidos al pre-tratamiento.

- +: Tejidos con pre-tratamiento con ABA
- -: Tejidos sin pre-tratamiento con ABA

6.5. Línea pura EM4 (monosporica) de *Ceratodon stenocarpus* sometida a estrés osmótico y salino en presencia de la fitohormona acido abscisico (ABA).

6.5.1. Línea pura EM4 de *C. stenocarpus* sometida a estrés híper osmótico y la participación de ABA.

A través de la generación de subcultivos de la línea EM4 de *C. stenocarpus* se realizaron los tratamientos de estrés híper osmótico y salino, esperando la observación de fenotipos iguales, a los que se adquirieron con tejido proveniente de la mezcla de esporas.

El tiempo de desarrollo del tejido de la línea pura fue de 15 días sobre las mini-membranas en medio MS 0.5X las cuales se transfirieron a estrés osmótico en concentraciones de 800, 900, 1000, 1250, 1500, 1725 y 2000mM. En la Figura 25 se muestra el inicio del estrés (Día 0) por sorbito, en el panel (A) columna izquierda se localizan los tejidos que fueron sometidos al pre-tratamiento con ABA y en la columna derecha se encuentran los tejidos que se expusieron directamente al estrés. En el panel (B) se muestran los fenotipos resultantes al termino del estrés por 10 días, pudiendo observar de manera general en los tejidos una disminución en el desarrollo en comparación con el control, también se observo que la línea de C. stenocarpus sometida a las concentraciones de 800 a 1000 mM Sorbitol y en ausente del pre-tratamiento con la fitohormona tuvo una ligera pérdida en su pigmentación en comparación con los tejidos que recibieron el pretratamiento con ABA (panel B columna izquierda), los cuales tuvieron una mejor retención en su pigmentación al final de estrés, por lo tanto la participación de ABA no era tan evidente para ayudar al musgo a contener con el estrés en estas concentraciones, es decir la línea mostraba un límite de tolerancia a estrés osmótico de 1000 mM causado por sorbitol. Con respecto a las concentraciones de 1250 hasta 2000 mM de sorbitol, el tejido protonemal de la clona que recibieron el pre-tratamiento con ABA toleraron el estrés de dichas concentraciones al no perder su pigmentación durante y hasta el final del estrés, sin embargo esta
respuesta fenotípica disminuyo ligeramente en comparación con el control. En contraste el daño en la pérdida de la pigmentación fue gradual (en las concentraciones de 1250 hasta 2000mM) para los tejidos que estuvieron ausentes de la fitohormona como se observa en la Figura 25 panel B columna derecha.



Figura 23. La línea EM4 de *C. stenocarpus* es tolerante a estrés híper osmótico. El tejido protonemal tuvo 15 días de desarrollo en medio MS 0.5X. Posteriormente fueron transferidas las minimembranas a medio MS 0.5X adicionado con Soribitol a diferentes concentraciones mostrándose en el panel A, y en la columna izquierda se localizan los tejidos que fueron sometidos al pretratamiento con ABA, en la columna derecha los tejidos sin pretratamiento de la hormona, así mismo se indica en el panel A el inicio del estrés (Día 0). En el panel B se muestra el final del estrés híper osmótico causado por Sorbitol (Día 10).

6.5.1.1. Medición del fotosintema II (PSII) de la línea EM4 de *C. stnocarpus* sometida a estrés hiper-osmótico y la participación de ABA.

La evaluación del PSII de la línea EM4 de C. stenocarpus sometida a estrés osmótico, se realizó utilizaron 3 muestras de las concentraciones 800, 1000 y 1250 mM de sorbitol. Posteriormente a los 3 días de haber iniciado el estrés se evaluó el estatus de la fotosíntesis al tejido protonemal expuesto a 800 mM el cual no tuvo pretratamiento con ABA la actividad fotosintética del PSII disminuyo de manera significativa en comparación con los controles, en cambio los tejidos tratados con ABA los cambios de actividad fotosintética del PSII fueron de manera similar que los controles y mejor que los tejidos que no tuvieron el pretratamiento con la hormona. La actividad de la fotosíntesis de los tejidos expuestos a 1000 mM (sin pretratamiento) disminuyo aproximadamente en un 50% en comparación con los controles, en cuanto los tejidos que tuvieron el pretratamiento con ABA el estatus del PSII mostraron mejor actividad fotosintética en comparación con los controles. Con respecto al estatus de la fotosíntesis de los tejidos sometidos a 1250 mM de Sorbitol (sin ABA) mostraron una reducción en su fotosíntesis aproximadamente 70%, contrario a los tejidos sometidos a las misma concentración pero que recibieron el pre-tratamiento con ABA, el PSII mostraba actividad fotosintética. Al termino del estrés (día 10) la línea EM4 sometida a 800mM que recibió el pre-tratamiento con ABA la fotosíntesis disminuyo igualando su actividad con la fotosíntesis de los tejidos que no recibieron el pre-tratamiento con la hormona dicho comportamiento se corrobora con el fenotipo (fig. 25 panel B) donde los tejidos (expuestos a 800 mM con pretratamiento) no mostraron daños en la perdida de su pigmentación en la conclusión del estrés osmótico, cuando la clona EM4 fue expuesta a 1000 mM de sorbitol con ABA a pesar de la disminución en la actividad del PSII permitió que los tejidos no perdieran su pigmentación (Figura 25 panel B), en comparación con los tejidos que no recibieron el pre-tratamiento con la hormona, los cambios de actividad fotosintética, disminuyeron significativamente en comparación con los controles,

dicho comportamiento se visualiza en su fenotipo en el cambio de coloración (Figura 25 panel B) y finalmente cuando se evaluó el estatus del PSII de la clona expuesta a 1250mM de sorbitol en presencia de ABA la actividad no disminuyo completamente, contrario a los tejidos ausentes de la fitohormona donde la activada del PSII disminuyo de manera significativa, fenotipicamente los tejidos se mostraron cloróticos (Figura 25 panel B) donde 2 muestra se visualizan con pérdida de pigmentación.

En la Figura 26 se representa el comportamiento de la actividad fotosintética del PSII, en el inició del estrés (Día 0) se evaluó la fotosíntesis a los tejidos control (con y sin pretratamiento de ABA) indicando una excelente actividad fotosintética, así mismo muestra la tendencia de los cambios de actividad del PSII durante el estrés osmótico causado por sorbitol.



Figura 24. Comportamiento del estatus del PSII de la Línea EM4 de *C. stenocarpus* ante estrés híper- osmótico (sorbitol). Se utilizaron 3 muestras de cada concentración con y sin pre-tratamiento de ABA, realizando lecturas de fotosíntesis al inicio del estrés (Día 0), a los 3 días de estrés y en la conclusión del estrés (Día 10). Las plantas se incubaron en oscuridad por 10 minutos antes de realizar las mediciones de fotosíntesis.

Adicionalmente los tejidos de la línea EM4 se transfirieron a medio control (MS 0.5X) para evaluar los cambios fenotípicos de su recuperación, en la figura 27 muestra en el Día 0 claramente los tejidos en ausencia de la fitohormona que fueron dañados en las concentraciones superiores a 1M de sorbitol. En el día 5 un fenotipo que se ha repetido en todos los experimentos ha sido que una vez que los tejidos han sido transferidos a recuperación estos tienden a perder completamente su pigmentación en los tejidos sin pretramiento con ABA y que sufrieron un estrés osmótico a partir de la concentración de 1000 hasta 2000 mM causado por Sorbitol (Figura 27 columna derecha). Con respeto a los tejidos previamente incubados con ABA y expuesto a estrés en concentración de 1725 mM fueron Los únicos que perdieron su pigmentación completamente (Figura 27 columna izquierda).

En el trayecto de 35 días de recuperación los tejidos que sufrieron un estrés en concentraciones superiores de 1000 mM de sorbitol (previamente tratados con ABA) en su mayoría recuperaron su clorofila incluso hasta 2000 mM, en comparación con los tejidos (ausentes del pre-tratamiento) su recuperación fue más lenta, sin embargo de igual forma lograron retomar su metabolismo. Por lo tanto ABA se observo claramente que participa en contender con el estrés osmótico en concentraciones superiores de 1M, si no también participa en una rápida recuperación del daño causado por dicho estrés.



Figura 25. El ABA tiene un papel importante en la recuperación de la vías metabólicas en tejidos dañados por estrés osmótico. El tejido protonemal de la línea EM4 de *C. stenocarpus* fue transferido a medio control (MA 0.5X) para el análisis fenotípico de su recuperación normal, después de 10 días expuesto a altas concentraciones de Sorbitol. En promedio los tejidos se recuperaron en un lapso de 35 días.

6.5.2. Línea pura EM4 de *C. stenocarpus* sometida a estrés híper salino y la participación de ABA.

De acuerdo a los experimento realizados anteriormente con tejido preveniente de la geminación de un conjunto de esporas, se observo que *C. stenocarpus* mostraba un fenotipo de tolerancia de 300mM de NaCl, sin embargo los cambios más representativos que se percibían en cuanto a la perdida de pigmentación fueron en las concentraciones de 400, 600, 800 y 1000mM de sal, evaluar la línea EM4 de *C.stenocarpus* en dichas concentraciones, fue para discernir en la diferencia de carga genética que tiene cada espora.

Al someter el tejido protonemal de la línea EM4 de C. *stenocarpus* mostro ser tolerante a 400 mM de NaCl (independientemente si los tejidos recibieron pretratamiento con ABA) los fenotipos observados en los tejidos al final del estrés (Día 10) preservaron su pigmentación de manera muy semejante (Figura 28 panel B). Además la participación de la hormona sobre los tejidos para contender con el estrés causado por NaCl expuestos en las concentraciones de 600 y 800 mM fue crucial, los fenotipos observados resultaron sorprendentes ya que los tejidos con pretratamiento tuvieron la capacidad de conservar la mayor parte de su pigmentación durante 10 días de estrés (Figura 28 panel B), contrario a los tejidos que no recibieron la incubación con ABA el protonema expuesto a 600 mM de NaCl tuvieron un fenotipo clorótico y el protonema expuesto a 800 mM se observo albino.



Figura 26. La línea EM4 de *C. stenoc*arpus tolerante a estrés hípersalino en presencia de ABA. El tejido protonemal tuvo 15 días de desarrollo en las minimembranas en medio MS 0.5X en la cámara de crecimiento. En el panel A columna izquierda se localizan los tejidos que fueron sometidos a un prevé tratamiento con ABA, antes de ser transferidos a las distintas concentraciones de NaCl. Y en la columna derecha se encuentran los tejidos que no recibieron el tratamiento con la hormona, así mismo el panel A representa el inicio (Día 0) del estrés híper salino. En el panel B se muestran los fenotipos resultantes de los tejidos en la conclusión del estrés (Día 10).

6.5.2.2. Medición del fotosistema II (PSII) de la línea EM4 de *C. stenocarpus* sometida a estrés híper-salino (NaCI).

Durante la evaluación de la fotosíntesis de la línea pura EM4 durante el estrés salino se evaluaron 3 muestras por cada concentración de NaCl (300, 600 y 1000 mM), así mismo muestras que recibieron el tratamiento de ABA y muestras ausentes de la incubación con la hormona. En la Figura 29 la grafica representa el comportamiento del PSII en el trayecto del estrés, mostrándose en el día 0 la actividad de la fotosíntesis de los controles siendo alta con un valor aproximado de 0.75 para las muestras que recibieron el pre-tratamiento con ABA como las que fueron ausentes del pretratamiento.

A los 3 días de estrés salino los cambios en la actividad del PSII en los tejidos expuestos a 300 mM de NaCl (con y sin pretramiento con ABA) no fueron significativos en comparación con los controles, indicando que la línea EM4 de *C. stenocarpus* es tolerante a dicha concentración de NaCl. Al realizar la evaluación de la actividad fotosintética a los tejidos sometidos a 600 mM de sal (sin pretratamiento con ABA) está disminuyó aproximadamente un 50% en comparación con los controles, sin embargo la presencia de ABA sobre los tejidos favoreció a que el PSII mostrara actividad favorable en esta concentración de NaCl. Con respecto al tejido protonemal expuesto a 1000 mM de sal durante 3 días (sin pretratamiento con ABA) los cambios en la actividad del PSII disminuyó drásticamente con valores de cero, dicho comportamiento fue similar para los tejidos que recibieron la incubación con ABA.

Al término del estrés (Día 10) la actividad de la fotosíntesis para los tejidos expuestos a 300 mM de NaCI (con y sin pretraramien con ABA) fue muy semejante a la actividad de la fotosíntesis de los controles en el día 0 dichos resultados confirman la tolerancia de la línea EM4 a 300 mM de NaCI por 10 días de exposición. Al realizar la evaluación de la fotosíntesis a los tejidos (con pretratamiento de ABA) expuestos a 600 mM de sal en el día 10, la actividad del PSII disminuyó considerablemente en comparación con el tercer día de estrés como se muestra en la Figura 29, dichos resultados fisiológicos se corroboran con los fenotipos observados en la Figura 28 panel B, con respecto a la actividad de

fotosíntesis de los tejidos ausentes de la fitohormona está disminuyó a un más en comparación con los tejidos tratados con ABA, razón por la cual los fenotipos de los tejidos se mostraron cloróticos. Finalmente la actividad del PSII para los tejidos expuestos a 1000 mM de NaCI por 10 días con y sin pretratamiento, se mostro nula la fotosíntesis y fenotípicamente los tejidos se mostraron albinos.



Figura 27. Comportamiento de la actividad fotosintética de la línea EM4 de *C. st*enocarpus sometida a estrés híper salino (NaCI). Para la medición de la actividad del PSII se utilizaron 3 muestras por cada concentración de NaCI (300, 600 y 1000 mM) con y sin pretratamiento con ABA. Las lecturas se realizaron al inicio del estrés (Día 0), a los 3 días de haber transcurrido el estrés y al final del estrés (Día 10). Las plantas se sometieron a oscuridad por 10 minutos antes de realizar la medición de la fotosíntesis.

Posterior a la conclusión del tiempo de exposición de los tejidos de la línea EM4 a estrés híper salino, estos se transfirieron a medio MS 0.5X para la evaluación fenotípica de su recuperación, como se aprecia en la Figura 30 panel A en conjunto todas las mini-membranas que fueron sometidas a las distintas concentraciones de sal, así como el fenotipo de tolerancia de los tejidos en presencia de ABA. Continuando con la evaluación fenotípica del proceso de recuperación de la línea pura EM4 y a los 5 días (Figura 30 panel B) se aprecio la degradación total de la clorofila de los tejidos que se expusieron en las concentraciones de 600 y 800mM de sal, a acepción de los que sufrieron un estrés a 400mM.

Sorprendentemente los tejidos tuvieron la capacidad de recuperar su metabolismos normal, el cual represento en resintetisar nueva clorofila, aunque su recuperación se muestre desfasada, es decir los tejidos que sufrieron un estrés de 400mM les tomo menos tiempo en recuperar su metabolismo al no mostrarse tan dañados en su pigmentación, en cuanto a los tejidos expuestos a las concentraciones de 600mM con pre-tratamiento fue más lenta su recuperación, pero más rápida para aquellos tejidos que no recibieron el pre-tratamiento, es decir el papel de la fitohormona no era participe para la recuperación del metabolismo de la célula. El fenotipo se hace evidente en los tejidos que percibieron un estrés de 800mM de sal con pre-tratamiento de ABA los cuales su recuperación fue más rápida que aquellos que fueron ausentes de la fitohormona mostrándose aun cloróticos.

Con respecto a los tejidos que percibieron un estrés salino a la concentración de 1000 mM de NaCl sorprendentemente en un tiempo de 40 días los tejidos (con y sin pretratamiento con ABA) mostraban los primeros indicios de recuperación de metabolismo como se muestra en la Figura 30 panel C, sin embargo una minimembrana de las tres sometidas a observación logro recuperar su metabolismo.



Figura 28. La línea EM4 recupera su metabolismo normal después de un estrés híper salino de 10 días. Los tejidos fueron transferidos a medio control (MS 0.5X) para la evaluación fenotípica de su recuperación. En el panel A se muestra el inicio de la recuperación. Panel B se muestra la degradación total de la clorofila de los tejidos expuestos en concentraciones de 600 y 800 mM de NaCl. Panel C 40 días de recuperación y los tejidos en 95% han restablecido su metabolismo norma.

6.5.3. Línea pura EM4 de *C. stenocarpus* sometida a estrés por congelación y la participación de ABA

6.5.3.1. Línea EM4 de *C. stenocarpus* ante estrés de -10°C por 24 hrs.

Otro tipo de estrés abiótico que las plantas están expuestas es al estrés por bajas temperaturas, al cual la clona EM4 fue sometida a diferentes temperaturas y tiempos. Los tratamientos se procedieron de la siguiente forma: La clona después de haber tenido 15 días de desarrollo en medio MS 0.5X fue sometida a los pre-tratamientos de: ABA 10µM por 24hr y tejidos que recibieron aclimatación a 4°C por 24hr con luz continua, posteriormente se sometieron a -10°C por 24hr en ausencia de luz. Como controles fueron tejidos que se sometieron directamente a dicho estrés y tejidos que no sufrieron ningún estimulo y continuaron su desarrollo.

Como se muestra en la Figura 31 (A), después de que los tejidos sufrieron un estrés a -10°C por 24hr se transfirieron a medio control para evaluar su recuperación, los tejidos no perdieron completamente su pigmentación en comparación con el control negativo (el cual no sufrió ningún estrés). Los tejidos que tuvieron el pre-tratamiento con ABA retomaron su metabolismo para continuar con su desarrollo, tomándoles tan solo 10 días, en cambio los tejidos que se sometieron a la aclimatación de 4°C y ausentes de la fitohormona su recuperación también fue favorable aun que fue más lentas Figura 31 panel B en cuanto al control positivo de igual forma retomo su clorofila en 25 días. De acuerdo a los fenotipos obtenidos confirmamos que ABA también tiene un papel importante para contender en la tolerancia a bajas temperaturas en las briofitas, así como en la recuperación del metabolismo de los tejidos. El pre-tratamiento de aclimatación a 4°C que recibieron los tejidos, estos contendieron con el estrés de congelación de -10°C aun que en un menor grado, en comparación con los tejidos expuestos a ABA.



Figura 29. La línea EM4 es tolerante a estrés por congelación de -10°C. Los tejidos se transfirieron a medio control (MS 0,5X) para evaluar su recuperación. En el panel A se muestra el inicio de la recuperación (Día 0). En el panel B se muestra la recuperación de los tejidos en un tiempo de 25 días.

+/ABA: tejidos que tuvieron el pre-tratamiento con ABA
4ºC: Tejidos que tuvieron una aclimatación a 4ºC por 24hr con luz continua.
C+: control positivo, tejidos que se sometieron directamente a -10ºC
C- Control negativo, el cual continúo su desarrollo en la cámara de crecimiento

Una vez que los tejidos de la línea EM4 fueron sometidos a congelación de -10°C por 24hr, se les realizo la medición de la fotosíntesis, para visualizar el estado del PSII, en la Figura 32, se muestra el comportamiento de la fotosíntesis, observando el control negativo (el cual no sufrió ningún tipo de estrés) mostro actividad fotosintética alta, en comparación con el control positivo donde la fotosíntesis disminuyo, así como también los tejidos que fueron sometidos a una aclimatación de 4°C antes de ser sometidos a -10°C, en contraste los tejidos que recibieron el pre-tratamiento con ABA mostraron una fotosíntesis activa con un valor aproximado de 0.5.



Figura 30. Actividad fotosintética de la línea EM4 de *C. stenocarpus* sometida a estrés por congelación de -10°C por 24 hr. Las barras azules indican la actividad del PSII después del estrés de -10°C por 24hr. Y las barras rojas indican la actividad del PSII de los tejidos después de la recuperación en medio control.

ABA: tejidos que tuvieron el pre-tratamiento con ABA 4ºC: Tejidos que tuvieron una aclimatación a 4ºC por 24hr con luz continua. C+: control positivo, tejidos que se sometieron directamente a -10ºC C- Control negativo, el cual continúo su desarrollo en la cámara de crecimiento

6.5.3.2. Línea EM4 de C. stenocarpus ante estrés de -10°C por siete días.

Por otra parte se sometieron tejidos a la misma temperatura (-10°C) y se aplazó el tiempo de exposición siendo de 7 días. Como se muestra en la Figura 33 donde los tejidos nuevamente fueron transferidos a medio control para evaluar su recuperación. A pesar de que los tejidos estuvieron 7 días a una temperatura de -10°C y sin luz, estos no perdieron su pigmentación bajo estas condiciones. Transcurrido 5 días de recuperación, los tejidos que recibieron el pre-tratamiento con ABA aun mantenían su clorofila para continuar con su desarrollo, en comparación con los tejidos que tuvieron el pretratamiento de aclimatación a 4ºC se mostraron cloróticos, así como el control positivo Figura 33 panel B.



Figura 31. La línea EM4 de *C. stenocarpus* es tolerante a -10°C por 7 días en presencia de ABA. Las células de protonema de la línea EM4 posterior al tratamiento se transfirieron a medio control (MS 0.5X) para evaluar sus respuestas fenotípicas de recuperación. En el panel A se muestra el inicio de la recuperación (Día 0), en el panel B se observan los fenotipos de recuperación de los tejidos a los cinco días y en el panel C se muestran los tejidos con la recuperación normal de su metabolismo en un tiempo de 25 días.

+/ABA: tejidos que tuvieron el pre-tratamiento con ABA 4ºC: Tejidos que tuvieron una aclimatación a 4ºC por 24hr con luz continua. C+: control positivo, tejidos que se sometieron directamente a -10ºC C- Control negativo, el cual continúo su desarrollo en la cámara de crecimiento

Cuando concluyo el estrés de congelación de -10°C por 7 días se realizo la medición del estatus de la fotosíntesis a 3 muestras por cada pre-tratamiento, así como los controles, observando disminución de fotosíntesis para los tejidos del control positivo como las muestras que tuvieron la aclimatación a 4°C en comparación con el control negativo teniendo alta actividad fotosintética, en contraste con los tejidos que recibieron el pre-tratamiento con ABA después de 7 días expuestos a -10°C aun su PSII mostro actividad como se observa en la Figura 34.



Figura 32. Actividad fotosintética de la línea EM4 de *C. stenocarpus* sometida a estrés de -10°C por 7 días. Las barras azules indican el estatus del PSII después del estrés de -10°C por 7 días. Y las barras azul marinas indican el estatus del PSII de los tejidos recuperados en medio control. Para la medición de la fotosíntesis de utilizaron 3 muestras por condición.

ABA: tejidos que tuvieron el pre-tratamiento con ABA

Aclimt 4°C: Tejidos que tuvieron pretratamiento de aclimatación a 4°C por 24hr con luz continua.

C+: control positivo, tejidos que se sometieron directamente a -10°C, después de 15 días de desarrollo

C- Control negativo, el cual continúo su desarrollo en la cámara de crecimiento

6.5.3.3. Línea EM4 de C. stenocarpus ante estrés de -20°C por 24 hrs.

Otro tratamiento de estrés de bajas temperaturas al cual se sometió la línea EM4 fue a -20°C por 24hr y 7dias. Donde los tejidos de igual forma tuvieron el pre-tratamiento con ABA a 10µM por 24 hr, una aclimatación a 4°C por 24hr con luz continua, y los controles se manejaron bajo el mismo esquema del experimento de -10°C.

Como se presenta en la Figura 35 panel A, en el día 0 de la recuperación del estrés de -20°C por 24hrs, los tejidos bajo estas condiciones no perdieron su pigmentación. En el transcurso de 5 días de recuperación el control negativo continúo su desarrollo, en cambio el control positivo mostro un fenotipo clorótico, con respecto a los tejidos de la línea EM4 que fueron sometidos a aclimatación previamente de 4°C no perdieron su pigmentación, como se mostro en los anteriores experimentos, contrario a los tejidos que recibieron el pre-tratamiento con ABA continuaron con su desarrollo favorablemente Figura 35 panel B.

El tejido de protonema de la línea EM4 de *C. stenocarpus* sometida a estrés de -20°C por 24hr recupero su metabolismo normal a los 25 días en medio control Figura 35 panel C. Así mismo a todos los tejidos se les evaluó la actividad fotosintética la cual se presento igual a la actividad del PSII del control negativo como se observa en la Figura 36.



Figura 33. Análisis fenotípico de la recuperación de la clona EM4 después de un estrés de -20°C por 24hr. Panel A los tejidos no perdieron su pigmentación después de haber estado a -20° C por 24hr. Panel B después de 5 días de recuperación solo los tejidos del control positivo perdieron su clorofila y el resto la mantuvo. En el panel C la línea EM4 de *C. stenocarpus* se recupero de un estrés de congelación de -20°C en un tiempo de 25 días.

+/ABA: tejidos que tuvieron el pre-tratamiento con ABA
4ºC: Tejidos que tuvieron una aclimatación a 4ºC por 24hr con luz continua.
C+: control positivo, tejidos que se sometieron directamente a -10ºC
C- Control negativo, el cual continúo su desarrollo en la cámara de crecimiento.

Al termino del tratamiento de -20°C por 24hr al cual fue sometida las células de protonema del la línea EM4 de *C. stenocarpus* se evaluó el estado fisiológico

del PSII. La actividad fotosintética del control positivo disminuyo significativamente en comparación con la actividad del PSII del control negativo. El estatus del PSII de los tejidos (previamente fueron aclimatados a 4ºC con luz continua) disminuyo considerablemente en comparación con el control negativo, sin embargo observamos que el papel de ABA sobre los tejidos del musgo fue favorable para mantener activo al PSII durante el estrés de congelación de -20ºC por un tiempo de 24hrs, como se observa en la Figura 36.



Figura 34. Actividad fotosintética del PSII de la línea EM4 de *C. stenocarpus* sometida a estrés de -20°C por 24hrs. Para la evaluación de la fotosíntesis se utilizaron 3 muestras por condición, las plantas previamente se sometieron a oscuridad por 10 minutos para realizar la medición de la fotosíntesis. Las barras verdes indican la actividad de la fotosíntesis al término del tratamiento de -20°C por 24hrs. Las barras azules indican la actividad del PSII cuando los tejidos se recuperar del estrés de congelación en medio control (MS 0.5X)

6.5.3.4. Línea EM4 de C. stenocarpus ante estrés de -20°C por siete días.

A continuación se muestra en la Figura 37 las respuestas fenotípicas de la línea EM4 de *C. stenocarpus* expuesta al tratamiento de -20°C por 7 días. En el panel A se observa el inicio de la recuperación de los tejidos después del estrés al

ser transferidos a medio control (MS 0.5X) es sorprendente que el tejido protonemal no pierde su pigmentación al haber sido sometida a dicho estrés (Figura 37 panel A). Sin embargo la pérdida de su pigmentación ocurre después de un lapso de 5 días de recuperación como se observa en la Figura 37 panel B. Los cambios fenotípicos contundentes de recuperación en los tejidos se observa en un tiempo de 20 días, a pesar que el control positivo le tomo más tiempo, en cambio los tejidos que fueron previamente aclimatados, una muestra de las dos que se sometieron a estrés de congelación que se incubaron ya había retomado su metabolismo normal, y con respecto a los protonemas incubados con ABA tuvieron la capacidad de recupera su metabolismos normal del estrés de -20°C por 7 días en un tiempo de 20 días como se muestra en la Figura 37 panel C.



Figura 35. La línea EM4 es tolerante a estrés de -20°C por 7 días en presencia de ABA. Al término del estrés los tejidos fueron transferidos a medio control. En el panel A se muestra en el inicio de la recuperación (Día 0). Panel B 5 días de recuperación y los tejidos perdieron su pigmentación. En el panel C se observa la recuperación de los tejidos previamente aclimatados y los que fueron pretratados con ABA.

+/ABA: tejidos que tuvieron el pre-tratamiento con ABA
4ºC: Tejidos que tuvieron una aclimatación a 4ºC por 24hr con luz continua.
C+: control positivo, tejidos que se sometieron directamente a -10ºC
C- Control negativo, el cual continúo su desarrollo en la cámara de crecimiento.

Adicionalmente se evaluó la actividad fotosintética de los tejidos después del estrés de -20°C por siete días, utilizando tres muestras por tratamiento. Sorprendentemente la actividad del PSII de las células de protonema del control positivo, las células que fueron previamente aclimatadas a 4°C y de las células que recibieron el tratamiento con ABA no se mostraron cambios significativos, en

el estatus del PSII de cada uno de los tejidos como se muestra en la Figura 38, a pesar de que la actividad fotosintética disminuyo en comparación con el control negativo, aun se mostro actividad fotosintética. Por otra parte cuando los tejidos fueron transferidos a medio control para su recuperación, el musgo al retomar sus actividades metabólicas normales nuevamente se evaluó el PSII, obteniendo actividad fotosintética igual que el control negativo, como se observa en la Figura 38.



Figura 36. Actividad fotosintética del PSII de la línea EM4 de *C. stenocarpus* ante estrés de -20°C por siente días. Se utilizaron 3 muestras por condición, previamente sometidas a 10 minutos a oscuridad para la medición de la fotosíntesis. Las barras rojas indican la actividad fotosintética del PSII después de estrés de 20°C por siente días. Y las barras rosas indican el estatus del PSII después después de la recuperación de los tejidos en medio MS 0.5X.

+/ABA: tejidos que tuvieron el pre-tratamiento con ABA
4ºC: Tejidos que tuvieron una aclimatación a 4ºC por 24hr con luz continua.
C+: control positivo, tejidos que se sometieron directamente a -10ºC
C- Control negativo, el cual continúo su desarrollo en la cámara de crecimiento.

6.5.3.5. La línea EM4 de *C. stenocarpus* ante estrés de -76°C por 24 hrs.

Otro tratamiento de estrés abiótico de bajas temperaturas la cual se sometió la línea EM4 fue de -76°C por 24hrs. Los tejidos tuvieron una edad de desarrollo en medio MS 0.5X por 15 días sobre las minimembranas, posteriormente recibieron los pretratamientos planteados en el punto 6.5.3.3. Y ser transferidos al tratamiento de -76°C por 24 hrs, en la Figura 39 se observan los fenotipos de la línea EM4 al termino del tratamiento y el inició de la recuperación de los tejidos al ser transferidos a medio control (panel A) a pesar de la temperatura extrema que fueron expuestas las células de protonema del musgo, estas no perdieron su pigmentación completamente solo se observaron cloróticos. En cambio en el transcurso de cinco días de recuperación los tejidos se mostraron albinos en comparación con el control negativo (panel B). Sin embargo la línea EM4 de *C. stenocarpus* presento la capacidad de recuperar su pigmentación y por ende sus actividades metabólicas y continuar con su desarrollo como se observa en la Figura 39 panel C.



Figura 37. La línea EM4 de *C. stenocarpus* es tolerante a estrés de -76°C por 24hrs. En el panel A se observan los fenotipos de la línea EM4 resultantes del tratamiento de congelación. En el panel B se observan las células de protonema de la línea EM4 con cinco días de recuperación en medio control. En el panel C se muestran la recuperación de los tejidos en un tiempo de 25 días.

+/ABA: tejidos que tuvieron el pre-tratamiento con ABA
4ºC: Tejidos que tuvieron una aclimatación a 4ºC por 24hr con luz continua.
C+: control positivo, tejidos que se sometieron directamente a -10ºC
C- Control negativo, el cual continúo su desarrollo en la cámara de crecimiento.

De manera paralela se evaluaron las respuestas fisiológicas de los tejidos al ser sometidos a dicha temperatura, a través del estatus del PSII. Utilizando tres muestras por tratamiento, la actividad fotosintética para el control positivo resulto ser nula en comparación con el control negativo, igualmente fue para los tejidos previamente aclimatados a 4°C, caso contrario para los tejidos que fueron pretratados con la hormona conservando latente la actividad del PSII, sin embargo la actividad fotosintética disminuyo rotundamente en comparación con la actividad del PSII del control negativo como se observa en la Figura 40. A pesar del daño que recibieron las células de protonema de la línea EM4, estas tuvieron la capacidad de recuperar su actividad fotosintética igual que el control negativo como se aprecia en la Figura 40 barras azules.



Figura 38. Actividad fotosintética de la línea EM4 de *C.stenocarpus* ante estrés de -76°C por 24hrs. En la medición de la fotosíntesis se utilizaron 3 muestras por tratamiento y las plantas previamente se sometieron a oscuridad por 10 minutos. Las barras grises indican el estatus del PSII de los tejidos al término del estrés de congelación. Y las barras azules indican la actividad fotosintética de las plantas al final de la recuperación de su metabolismo en medio control.

6.5.3.6. La línea EM4 de C. stenocarpus ante estrés de -76°C por siete días.

La línea EM4 se le evaluaron las respuestas fenotípicas ante estrés de congelación de -76°C por siete días, el desarrollo de los tejidos fue igual como en los anteriores experimentos y los pretratamientos a los cuales fueron sometidos son descritos en el punto 6.5.3.3. Al termino del estrés de congelación el musgo no perdió su pigmentación totalmente en cambio se mostraron cloróticos en comparación con el control negativo como se aprecia en la Figura 41 panel A, así mismo se muestra el inicio de la recuperación de los tejidos en medio control. En el panel B se muestra el musgo con cinco días de recuperación, observándose albino, sin embargo los tejidos con previa incubación con ABA recuperan sus

funciones metabólicas en comparación con el control negativo panel C, la línea EM4 como control positivo muestra las primeras respuestas fenotípicas de recuperación al igual que los tejidos con previa aclimatación.



Figura 39. Respuestas fenotípicas de la línea EM4 de *C. stenocarpus* ante estrés de -76°C por siete días. En el panel A se observan los fenotipos de los tejidos resultantes del estrés de congelación y el inicio de la recuperación. En el panel B el musgo lleva cinco días de recuperación, sin embargo se muestra albino. En el panel C la línea EM4 pretratada con ABA ha recuperado sus funciones metabólicas, en cambio las muestras aclimatadas a 4°C y el control positivo indican el inicio de su recuperación que les tomo más tiempo.

Adicionalmente los tejidos de la línea EM4 de C. stenocarpus se le evaluó la -76°C actividad fotosintética posterior al estrés de por siete días. Sorprendentemente el estatus del PSII de los tejidos del control positivo, los tejidos que fueron previamente aclimatados, así como las tejidos pretratados con ABA presentaron actividad del PSII entre los grupos de muestras mencionados sin cambios significativos, de aproximadamente del 50% de actividad fotosintética en comparación con la actividad del PSII del control negativo, como se muestra en la Figura 42. Posteriormente al transferir los tejidos a medio control para su recuperación metabólica normal, fenotípicamente cuando la línea EM4 presente recuperación total de sus funciones, nuevamente se evaluó el estatus del PSII a todos los tejidos obteniéndose actividad fotosintética igual a la actividad del PSII del control negativo, como se aprecia en la Figura 42 por las barras azules.



Figura 40. Actividad fotosintética de la línea EM4 de *C. stenocarpus* ante estrés de -76°C por siete días. Para la medición de la fotosíntesis se utilizaron tres muestras por tratamiento y las plantas previamente se sometieron a oscuridad por 10 minutos. Las barras de color lila indican la actividad fotosintética posterior al estrés de -76°C por 7 días y las barras azules indican el estatus del PSII después de la recuperación de los tejidos al ser expuesto a dicho estrés.

VII. Discusión

Como organismos sésiles, las plantas resultan ser altamente afectadas por los cambios en las condiciones ambientales. Para contrarrestar los efectos perjudiciales del estrés las plantas has desarrollado mecanismos moleculares y bioquímicos específicos cuya investigación ha sido un tema importante durante varios años. Varias especies de plantas han sido estudiadas para las respuestas a la adaptación del estrés abiótico, las cuales incluyen el sistema de modelo en plantas Arabidopsis thaliana así como especies de interés agronómico como el trigo, cebada y arroz. Además los investigadores han encontrado en las plantas que muestran una alta tolerancia en situaciones de estrés muy particular como Mesembryantumn (Bohnert y Cushman 2000) que es capaz de tolerar altas concentraciones de sal, estudiando los mecanismos subvacentes a la resistencia. Dos ejemplos de especies que han sido modelo de estudio para la resistencia a la pérdida severa de agua son Crasterostigma plantagineum (Bartels et al 1997; Bartels y Salamini 2001) y el musgo Tortula ruralis (Oliver et al 200; Wood et al 2000). Estas son llamadas "plantas de resurrección" ya que sus tejidos vegetativos tienen capacidad de sobrevivir a la desecación y retomar nuevamente su crecimiento normal en la rehidratación.

De acuerdo a resultados obtenidos anteriormente (Ríos Meléndez, S., 2010, datos no publicados) nuestra planta (*C. stenocarpus*) de estudio también mostro las características de ser una planta de resurrección ya que sus tejidos tuvieron la capacidad de sobrevivir a varios ciclos de deshidratación e hidratación en atmosferas de 70% y 30% de humedad relativa.

Así posteriormente usamos el musgo *Ceratodon stenocarpus* para evaluar sus respuestas fenotípicas y fisiológicas sometido a estrés osmótico (manitol y sorbitol), salinidad (NaCl) y congelación (-10°C, -20°C y -76°C) así como la participación de ABA en cada uno de los estreses abióticos. Algunas de las proteínas más estudiadas que se acumulan en respuesta a estrés hídrico en las plantas superiores son las proteínas LEA del grupo 2 o dehidrinas (DHNs; reviewed by Close, 1997; Svensson et al., 2002). Muchas DHNs contienen de 5 a

7 residuos de serina seguido por un segmento de tres aminoácidos, llamado segmento S. Estos residuos pueden ser fosforilados (Godoy et al., 1994; Plana et al., 1991) los cuales pueden actuar a nivel nuclear (Jensen et al., 1998). Sin embargo el segmento K (EKKGIMEKIKEKLPGH) es el único segmento que se encuentra en todas las DHNs y suele estar presente en varias copias. Este motivo has sido propuesto para forma parte de una α -helice anfipática (Duré, 1993) que puede permitir la interacción con las dos membranas y con proteínas desnaturalizadas parcialmente (Close, 1996). En P. patens se ha encontrado un gen que codifica para una DHNA, *PpDHNA* el cual es inducido en las primeras etapas (2hr) del estrés osmótico, dicho gen fue monitoreado en concentraciones de manitol de 0.6, 0.7, 0.8 y 0.9M, ayudando al musgo a tolerar un estrés de 14 días (Saavedra et al., 2006). En base a nuestros resultados obtenidos en los fenotipos de C. stenocarpus presentando la capacidad de tolerancia a estrés osmótico por manitol en concentraciones de 400, 500, 600, 700mM que fueron muy similares a las probadas en *P. patens*, dichos tejidos se mostraron aun con clorofila sin ser cloróticos y que fueron sometidos a estrés por 25 días. Podemos estimar de igual forma la presencia de un gen que codifica para una proteína DHNA, el cual se induce por estrés osmótico.

Saavedra. L et al 2006 reportan en sus estudios cuando transfirieron las plantas de *P. patens* a condiciones normales para evaluar su recuperación del musgo, estas fueron capaces de sobrevivir a sus tratamientos de estrés (0.9M de manitol por 14 días) en un tiempo de 21 días. En nuestros experimentos al transferir de igual manera a *C. stenocarpus* a medio control para evaluar su recuperación, nuestra planta se recupero a partir de las concentraciones de 800, 900 y 1000mM de sorbitol tomándole un tiempo de 39 días, recordando que nuestra planta fue expuesta a estrés por un tiempo más prolongado en comparación con *P.patens* y a una concentración mayor que fue de 1M en cambio *P. patens* solamente fue sometido a 900mM. El hecho de que DHNA se degrada rápidamente después del estrés, siguiere que la proteína tiene un papel importante durante el estrés, pero esta protección se hace evidente cuando las plantas reanudan el crecimiento en condiciones no estresantes (Saavedra, L et al 2006).

En el trabajo de Saavedra L et al., 2006 también analizaron la expresión del gen *PpDHNA* bajo condiciones de salinidad en concentraciones de 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 M por tu tiempo de 14 días, mostrando tolerancia *P.patens* en las concentraciones de 0.2 y 0.3 M, en el resto de las condiciones el musgo mostro un fenotipo clorótico. En base a las concentraciones utilizadas para este musgo se realizaron experimentos con NaCI (200, 300, 400, 500) en nuestra planta de estudio, por un tiempo de 25 días de estrés, observamos la tolerancia de *C. stenocarpus* a la concentración de 200mM, muy semejante a *P.patens* en concentración. Por lo tanto la proteína DHNA también está presente en *C. stenocarpus* sometico a estrés salino para su tolerancia.

Sin embargo dicho gen es inducido por la presencia de ABA (Saavedra, L et al., 2006), así que realizados experimentos de salinidad y osmóticos aumentando las concentraciones y evaluando la presencia de la fitohormona. Las concentraciones para el estrés osmótico fueron: 800, 900, 1250, 1500, 1725 y 2000mM por 10 días, al realizar el análisis fisiológico de los tejidos, bajo estas condiciones, mostraron una mejor actividad de fotosíntesis (grafica 1) en presencia de ABA que fue corroborado con el fenotipo, observándose los tejidos retención de su clorofila (fig. 18 B). En contraste con los resultados fisiológicos del musgo que no tuvo la presencia de la fitohormona, donde su fotosíntesis disminuyo considerablemente a los 10 días, estos datos también se corroboraron con su fenotipo en la perdida de su pigmentación (fig. 18 B). Efectivamente la ruta de señalización de ABA enciende genes específicos para la síntesis de proteínas para favorecer a la tolerancia del estrés osmótico.

En cuanto al estrés por salinidad las concentraciones que se evaluaron fueron: 400, 600, 800 y 1000mM los resultados fisiológicos se mostraron favorables en la presencia de ABA para mantener el PSII activo después de 10 días de estrés bajo dichas condiciones, en comparación con los tejidos que fueron ausente de la hormona donde su fotosíntesis decayó completamente Grafica 2. Estos datos también se corroboraron con los fenotipos observados en la fig. 20., la línea pura EM4 expuesta en las concentraciones de 400, 600, 800mM de NaCl mostro retención de su pigmentación

Nuestros resultados observados de la línea pura EN4 sometida a congelación en presencia de ABA indica que cambia radicalmente el proceso celular para la protección de las membranas plasmáticas de *C. stenocarpus*. En la cebada, la expresión de la proteínas LEA del grupo III son inducidas por ABA y frío, se ha sugerido para desempeñar un papel en el estrés relacionadas con el punto de congelación del agua (Sutton et al., 1992). Dichos datos nos indican la probabilidad de la síntesis de proteínas LEA en *C. stenocarpus* al presentar un fenotipo de tolerancia a estrés de congelación en temperaturas de -10°C, -20°C y - 76°C por 7 días.

Por otra parte en *A. thaliana*, el gen *COR15a* codifica para una proteína LEA, la cual su función radica en el cloroplasto, además esta es inducida por ABA y frío (Wilhelm y Thomashow 1993) y la sobreexpresión constitutiva del gen *COR15a* confiere tolerancia a la congelación en las plantas transgénicas.

Minami, et al 2006 examino la expresión de 14 genes de *P. patens* de respuesta a ABA (*PPAR*) aislados de protonemas tratados con ABA. Dichos protonemas tratados con ABA resultaron en un notable incremento en la expresión de genes *PPAR* en un tiempo de 24horas.

Esto también nos siguiere la existencia de una diversidad de genes regulados por ABA y de esta forma la presencia de la ruta dependiente de ABA presente en las briofitas. La degradación de proteínas mediada por ubiquitinación tiene un papel crucial en la regulación de factores de transcripción rio arriba, como INDUCER OF CBF EXPRESSION 1 (ICE1) y por lo tanto el control de la transcripción en respuesta a frío. El cambio en la expresión de cientos de genes en respuesta a bajas temperaturas también va acompañado por un aumento en los niveles de metabolitos que tienen efectos protectores contra los efectos dañinos del estrés por congelación.

Bibliografía

Allakhverdiev SI, Nishiyama Y, Miyairi S, et al. 2002. Salt stress inhibits the repair of photodamaged photosystem II by suppressing the transcription and translation of psbA genes in Synechocystis. Plant Physiology 130: 1443–1453.

Allen DJ, McKee IF, Farage PK, Baker NR (1997) Analysis of limitations to CO2 a review. Ecotoxicol Environ Saf 60:324–349

Alpert, P. (2006) Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? J. Exp. Biol. 209, 1575–1584

Araus JL (2002) Physiological basis of the process determining barley yield under anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany* **49**: 419-432

Araus JL, Slafer GA, Reynolds MP, Royo **C** (2002a). Plant breeding and water relations in C3 cereals: what should we breed for? *Annals of Botany* **89**: 925-940.

Babu RC, Pathan MS, Blum A, Nguyen HT (1999) Comparison of measurement methods of osmotic adjustment in rice cultivars. *Crop Science* **39**: 150-158

Baginsky S, Tiller K, Pfannschmidt T, Link G. 1999. PTK, the chloroplast RNA polymerase-associated protein kinase from mustard (Sinapis alba), mediates redox control of plastid in vitro transcription. Plant Molecular Biology 39: 1013–1023.

Bailey-Serres, J. Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends Plant Sci.* **1999**, *4*, 142-148.

Balogun E, Hoque M, Gong P, et al. 2003. Curcumin activates the Haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. Biochemical Journal 371: 887–895

Bartels, D. (2005) Desiccation tolerance studied in the resurrection plant Craterostigma plantagineum. Integr. Comp. Biol. 45, 696–701

Berjak, P. and Pammenter, N.W. (2008) From Avicennia to Ziziania: seed recalcitrance in perspective. Ann. Bot. (Lond.) 101, 213–228

Bey. P, Danzin C, JUNG M (1987). Inhibition of basic amino acid decarboxylases

Bonetta. D, McCOURT P. (1998) Genetic analysis of ABA signal transduction

Borsani, O.; Zhu, J.; Verslues, P.E.; Sunkar, R.; Zhu, J.K. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell* **2005**, *123*, 1279-1291.

Branco-Price, C.; Kaiser, K.A.; Jang, C.J.; Larive, C.K.; Bailey-Serres, J. Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **2008**, *56*, 743-755.

Bray E A (2002) Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. *Annals of Botany* **89**: 803-811.

Briscoe RD (1984). Thermocouple psychrometers for water potential measurements. In 'Adavanced Agricultural Instrumentation', Proceedings of the NATO Advanced Study Institute, Pisa (Italy) May 27- June 9, 1984.

Centritto M, Loreto F, Chartzoulakis K. 2003. The use of low [CO2] to estimate diffusional and non-diffusional limitations of photosynthetic capacity of salt-stressed olive saplings. Plant, Cell and Environment 26: 585–594.

Chaves M M (1991). EVects of water deWcits on carbon assimilation, J. Exp. Bot. 42 1–16.

Chaves M M, J.P. Maroco, J.S. Pereira (2003) Understanding plant response to drought: from genes to the whole plant, Funct. Plant Biol. 30 239–264.

Chaves MM, Oliveira MM. 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. Journal of Experimental Botany 55: 2365–2384.

Chen, X. et al. (2002) The stress-responsive Tortula ruralis gene ALDH21A1 describes a novel eukaryotic aldehyde dehydrogenase protein family. J. Plant Physiol. 159, 677–684

Cheng W H, A. Endo, L. Zhou (2002). A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions, The Plant Cell 14 2732–2743.

Cheong YH, KimKN, Pandey GK, Gupta R, Grant JJ, Luan S. CBL1, acalciums ensorthat differentially regulates salt, drought, and cold responses in Arabidopsis. Plant Cell 2003;15:1833–45.

Cominelli E, Galbiati M, Vavasseur A, Conti L, Sala T, Vuylsteke M, et al. 2005. A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. Current Biology 15: 1196–1200.

Cooper, K. and Farrant, J.M. (2002) Recovery of the resurrection plant Craterostigma wilmsii from desiccation: protection versus repair. J. Exp. Bot. 53, 1805–1813

Cossins, A R, Homeoviscous adaptation of biological membranes and its functional signiWcance, in: A.R. Cossins (Ed.), temperature Adaptation of Biological membranes, Portland Press, London, 1994, pp. 63–76.

Deng, X. et al. (2003) A comparison of photosynthetic apparatus of the detached leaves of the resurrection plant Boea hygrometrica with its non-tolerant relative Chirita heterotrichia in response to dehydration and rehydration. Plant Sci. 165, 851–861

Farrant, J.M. (2007) Mechanisms of desiccation tolerance in angiosperm resurrection plants. In Plant Desiccation Tolerance (Jenks, A. and Wood, A.J., eds), pp. 51–90, CAB International Press

Farrant, J.M. et al. (2003) An investigation into the role of light during desiccation of three angiosperm resurrection plants. Plant Cell Environ. 26, 1275–1286

Feder M E, G.E. Hofmann (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology, Ann. Rev. Physiol. 61: 243–282.

Flexas J, Bota J, Escalona JM, Sampol B, Medrano H. 2002. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. Functional Plant Biology 29: 461–471.

Flexas J, Medrano H (2002) Photosynthetic responses of C3 plants to drought. In *Advances in Plant Physiology IV* (Hemantaranjan A Ed.), Scientific Publishers: Jodhpur García J.F. y Fuentes A.O. 1999. Análisis de sequías en México. Cuadernos de investigación nº 46, 72p. CENAPRED

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

Flexas J, Ribas-Carbo M, Bota J, et al. 2006. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO2 concentration. New Phytologist 172: 73–82.

Gaff, D.F. (1971) Desiccation tolerant flowering plants in Southern Africa. Science 174, 1033–1034

Garg A K, J.K. Kim, T.G. Owens, A.P. Ranwala, Y.D. Choi, L.V. Kochian, R.J. Wu (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to diVerent abiotic stresses, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 15898–15903.

Guo. ZJ, CHEN XJ, WU XL, LING JQ, XU P (2004) Overexpression of the AP2/EREBP transcription factor OPBP1 enhances disease resistance and salt

Guy, C L, Q.B. Li, The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family, Plant Cell 10 (1998) 539–556.

Guy, C, D. Haskell, Q.B. Li, Association of proteins with the stress 70 molecular chaperones at low temperature evidence for the existence of cold labile proteins in spinach, Cryobiology 36 (1998) 301–314.

Hanba YT, Shibasaka M, Hayashi Y, et al. 2004. Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO2 conductance and CO2 assimilation in the leaves of transgenic rice plants. Plant Cell Physiology 45: 521–529.

Ho S L, Y.C. Chao, W.F. Tong, S.M. Yu (2001). Sugar co-ordinately and diVerentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms, Plant Physiol. 125 877–890.

Hoekstra F A, E.A. Golovina, J. Buitink (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance, Trends Plant Sci. 6 431–438.

Hua, X.J.; Van de Cotte, B.; Van Montagu, M.; Verbruggen, N. The 5' untranslated region of the At-P5R gene is involved in both transcriptional and post-transcriptional regulation. *Plant J.* **2001**, *26*, 157-169.

Illing, N. et al. (2005) The signature of seeds in resurrection plants: a molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. Integr. Comp. Biol. 45, 771–787

Jang J C, J. Sheen (1997). Sugar sensing in higher plants, Trends Plant Sci. 2 208–214.

Jones, P G, M. Inouye, The cold shock response—a hot topic, Mol. Microbiol. 11 (1994) 811–818.

Kawaguchi, R.; Bailey-Serres, J. Regulation of translational initiation in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2002**, *5*, 460-465.

Kawaguchi, R.; Girke, T.; Bray, E.A.; Bailey-Serres, J. Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **2004**, *38*, 823-839

Kim, J.Y.; Park, S.J.; Jang, B.; Jung, C.H.; Ahn, S.J.; Goh, C.H.; Cho, K.; Han, O.; Kang, H. Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in Arabidopsis thaliana under abiotic stress conditions. *Plant J.* 2007, *50*, 439-451.

Kingston-Smith AH, Harbinson J, Williams J, Foyer CH. 1997. Effect of chilling on carbon assimilation, enzyme activation, and photosynthetic electron transport in the absence of photoinhibition in maize leaves. Plant Physiology 114: 1039–1046.

Kirch,H.H. et al. (2001) NovelABA- and dehydration-inducible aldehyde dehydrogenase genes isolated from the resurrection plant Craterostigma plantagineum and Arabidopsis thaliana. Plant J. 28, 555–567

Knight, H, A.J. Trewavas, M.R. Knight, Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation, Plant Cell 8 (1996) 489–503.

Kranner, I. and Birtic, S. (2005) A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. Integr. Comp. Biol. 45, 734–740

Kranner, I. et al. (2002) Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. Plant J. 31, 13–24

Kranner, I. et al. (2005) Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 8, 3141–3146

Kratsch HA, Wise RR (2000) The ultrastructure of chilling stress. Plant Cell and

Lambermon, M.H.; Fu, Y.; Wieczorek Kirk, D.A.; Dupasquier, M.; Filipowicz, W.; Lorkovic, Z.J. UBA1 and UBA2, two proteins that interact with UBP1, a multifunctional effector of pre-mRNA maturation in plants. *Mol. Cell Biol.* 2002, *22*, 4346-4357.

Lambermon, M.H.; Simpson, G.G.; Wieczorek Kirk, D.A.; Hemmings-Mieszczak, M.; Klahre, U.; Filipowicz, W. UBP1, a novel hnRNP-like protein that functions at multiple steps of higher plant nuclear pre-mRNA maturation. *EMBO J.* 2000, *19*, 1638-1649.

Lawlor DW, Cornic G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. Plant, Cell and Environment 25: 275–294.

Lawlor DW, Tezara W. 2009. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. Annals of Botany 103: 561–579.

Le, N.T. et al. (2007) Desiccation-tolerance specific gene expression in the leaf tissue of the resurrection plant Sporobolus stapfianus. Funct. Plant Biol. 34, 589–600

Lee, B.H.; Kapoor, A.; Zhu, J.; Zhu, J.K. STABILIZED1, a stress-upregulated nuclear protein, is required for pre-mRNA splicing, mRNA turnover, and stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* 2006, *18*, 1736-1749

Leon P, J. Sheen (2003). Sugar and hormone connections, Trends Plant Sci. 8 110–116.

LEVITT J (ED) (1980). Chilling, freezing and high temperature stress. Responses of Plants to Environmental Stress, vol 1. New York: Academic Press.

Li, J.; Kinoshita, T. Pandey, S.; Ng, C.K.; Gygi, S.P.; Shimazaki, K.; Assmann, S.M. Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase. *Nature* 2002, *418*, 793-797.

Liang YK, Dubos C, Dodd IC, Holroyd GH, Hetherington AM, Campbell MM. 2005. AtMYB61, an R2R3-MYB transcription factor controlling stomatal aperture in Arabidopsis thaliana. Current Biology 15: 1201–1206.

Lorkovic, Z.J.; Barta, A. Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res.* 2002, *30*, 623-635.

Lynch, D V, G.A. Thompson Jr., Low temperature-induced alterations in the chloroplast and microsomal membrane of *Dunaliella salina*, Plant Physiol. 69 (1982) 1369–1375.

McCarty DR (1995) Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* **46**, 71-93

McKersie, B.D, S.R. Bowley, Active Oxygen and Freezing Tolerance in Transgenic Plants, Plant Cold Hardiness, Molecular Biology, Biochemistry and Physiology, Plenum, New York, 1997, pp. 203–214.

Moore, J.P. et al. (2007) An overview of the biology of the desiccation tolerant resurrection plant Myrothamnus flabellifolia. Ann. Bot. (Lond.) 99, 211–217

Mowla, S.B. et al. (2002) A novel stress-inducible antioxidant enzyme identified from the resurrection plant Xerophyta viscosa Baker. Planta 215, 716–726

Mullet JE, Whitsitt MS (1996) Plant cellular responses to water deficit. *Plant Growth Regulation* **20**: 41-46.

Munné-Bosch S, Alegre L (2000a) The xanthophyll cycle is induced by light irrespective of water status in field-grown lavender (*Lavandula stoechas*) plants. *Physiologia Plantarum* **108**: 147-151.

Munné-Bosch S, Alegre L (2000b) The significance of □-carotene, □-tocopherol and the xanthophyll cycle in droughted *Melissa officinalis* plants. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**: 139-146.

Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev SI. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. Biochimica et Biophysica Acta 1767: 414–421.

Nicolai, M.; Roncato, M.A.; Canoy, A.S.; Rouquie, D.; Sarda, X.; Freyssinet, G.; Robaglia, C. Large-scale analysis of mRNA translation states during sucrose starvation in arabidopsis cells identifies cell proliferation and chromatin structure as targets of translational control. *Plan Physiol.* **2006**, *141*, 663-673.

Nilsen ET, Orcutt DM (1996) Physiology of plants under stress. Abiotic factors. John Wiley & Sons, INC, New York.

Nishida, I, N. Murata, Chilling sensitivity in plants and Cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipid, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47 (1996) 541–568.

Niyogi KK. 2000. Safety valves for photosynthesis. Current Opinion in Plant Biology 3: 455–460.

Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49: 249–279.

Noll, H. The discovery of polyribosomes. *Bioessays* 2008, 30, 1220-1234.

Olien, C R, M.N. Smith, Ice adhesions in relation to freeze stress, Plant Physiol. 60 (1997) 499–503.

Oliver, M.J. (1996) Desiccation tolerance in vegetative plant cells. Physiol. Plant. 97, 779–787
Oliver, M.J. et al. (2000) The evolution of vegetative desiccation tolerance in plants. Plant Ecol. 151, 85–100

Palusa, S.G.; Ali, G.S.; Reddy, A.S. Alternative splicing of pre-mRNAs of Arabidopsis serine/arginine-rich proteins: regulation by hormones and stresses. *Plant J.* 2007, *49*, 1091-1107.

Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity eVects on plants:

Passioura JB (1996) Drought and drought tolerance. *Plant Growth Regulation* **20**: 79-83.

Passioura JB (2002) Soil conditions and plant growth. *Plant Cell and Environment* **25**: 311-318.

Pego J V, A.J. Kortstee, C. Huijser, S.C.M. Smeekens (2000). Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression, J. Exp. Bot. 51 407–416.

Pfannschmidt T, Nilsson A, Allen JF. 1999. Photosynthetic control of chloroplast gene expression. Nature 397: 625–628.

Pinheiro C, M.M. Chaves, C.P. Ricardo (2001). Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deWcit in the stems and leaves of *Lupinus albus* L., J. Exp. Bot. 52 1063–1070.

Prassad TK (1996) Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant Journal* **10**: 1017-1026.

Proctor, M.C.F. et al. (2007) Desiccation-tolerance in bryophytes: a review. Bryologist 110, 595–621

Raison, J K, G.R. Orr, Phase transition in liposomes formed from polar lipids of mitochondria from chilling sensitive plants, Plant Physiol. 81 (1986) 807–811.

Ramanjulu S, D. Bartels (2002). Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants, Plant Cell Environ. 25 141–151.

Riechmann JL, Heard J, Martin G, et al. 2000. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science 290: 2105–2110

Savitch LV, Barker-Astrom J, Ivanov AG, et al. 2001. Cold acclimation of Arabidopsis thaliana results in incomplete recovery of photosynthetic capacity, associated with an increased reduction of the chloroplast stroma. Planta 214: 295–303.

Savitch LV, Gray GR, Huner NPA. 1997. Feedback-limited photosynthesis and regulation of sucrose-starch accumulation during cold acclimation and low-temperature stress in a spring and winter wheat. Planta 201: 18–26.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Tercera Comunicación Nacional de México ante la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático, SEMARNAT – INE, México, 2006, 75 – 119 pp.

Serraj R, Sinclair TR (2002) Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, Cell and Environment* **25**: 333-341.

Shen B, R.G. Jensen, H.J (1997). Bohnert, Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals, Plant Physiol. 115: 527–532.

Shen B, R.G. Jensen, H.J. Bohnert (1997). Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. Plant Physiol. 113 1177–1183.

Steponkus, P.L, M. Uemura, M.S. Webb, A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat-two species that widely diVer in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition, in: P.L. teponkus (Ed.), Advances in Low-Temperature Biology, vol. 2, JAI Press, London, 1993, pp. 211–312

Taji T, C. Ohsumi, S. Iuchi, M. Seki, M. Kasuga, M. Kobayashi, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki (2002). Important roles of droughtand cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*, Plant J. 29 417–426.

Tardieu F (1997) Drought perception by plants. Do cells of droughted plants experience water stress? In *Drought tolerance in higher plants. Genetical, physiological and molecular biological analysis*' (Belhassen E. Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 15-26.

Tardieu F, Simonneau (1998) Variability among species of stomatal control under

TezaraW, Mitchell VJ, Driscoll SD, Lawlor DW. 1999. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. Nature 401: 914–917.

Trouverie J, C. The'venot, J.P. Rocher, B. Sotta, J.L. Prioul (2003). The role of abscisic acid in the response of a speciWc vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf, J. Exp. Bot. 54 2177–2186.

Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F, Kaldenhoff R. 2003. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO2 pore with physiological functions. Nature 425: 734–737.

Uemura, M, P.L. Steponkus, EVect of Cold Acclimation on Membrane Lipid Composition and Freeze Induced Membrane Destabilization, Plant Cold Hardiness. Molecular Biology, Biochemistry and Physiology, Plenum, New York, 1997, pp. 171–79.

Van der Willigen, C. et al. (2003) An ultrastructural study using anhydrous fixation of Eragrostis nindensis, a resurrection grass with both desiccation-tolerant and - sensitive tissues. Funct. Plant Biol. 30, 1–10

Velasco, R. et al. (1994) Dehydration and ABA increase mRNA levels and enzyme activity of cytosolic GAPDH in the resurrection plant Craterostigma plantagineum. Plant Mol. Biol. 26, 541–546

Vernieri P, Lenzi A, Figaro M, Tognoni F, Pardossi A (2001) How the roots contribute to the ability of *Phaseolus vulgaris* L. to cope with chilling-induced water stress. *Journal of Experimental Botany* **52** (364): 2199-2206.

Waditee R, N.H. Bhuiyan, V. Rai, K. Aoki, Y. Tanaka, T. Hibino, S. Suzuki, J. Takano, A.T. Jagendorf, T. Takabe, T. Takabe (2005). Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycine betaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 1318–1323.

Wang WX, Barak t, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2003). Abiotic resistance and chaperones: possible physiological role of SP1, a stable and stabilizing protein from Populus. In: Vasil IK (ed) Plant biotechnology 2000 and beyond. Kluwer, Dordrecht, pp 439–443

Wang. KLC, LI H, ECKER JR. (2002) Ethylene biosynthesis and signaling

Warren CR, Livingston NJ, Turpin DH. 2004. Water stress decreases the transfer conductance of Douglas-fir (Pseudotsuga menziesii) seedlings. Tree Physiology 24: 971–979.

Whittaker, A. et al. (2007) Sucrose phosphate synthase activity and the coordination of carbon partitioning during sucrose and amino acid accumulation in C4 resurrection plant Sporobolus stapfianus during dehydration. J. Exp. Bot. 58, 3775–3787

Wilkinson S, Clephan AL, Davies WJ. 2001. Rapid low temperature-induced stomatal closure occurs in cold-tolerant Commelina communis leaves but not in

cold-sensitive tobacco leaves, via a mechanism that involves apoplastic calcium but not abscisic acid. Plant Physiology 126: 1566–1578.

Williams, J P, M.U. Kahn, K. Mitchell, G. Johnson, The eVect of temperature on the level and biosynthesis of unsaturated fatty acids in diaglycerols of *Brassica napus* leaves, Plant Physiol. 87 (1988) 904– 910.

Wood, A.J.; Joel Duff, R.; Oliver, M.J. The translational apparatus of Tortula ruralis: polysomal retention of transcripts encoding the ribosomal proteins RPS14, RPS16 and RPL23 in desiccated and rehydrated gametophytes. *J. Exp. Bot.* **2000**, *51*, 1655-1662.

Xiaoqin, Pingfang, Qian G. (2008). Proteomic analiysis of the response to highsalinity etress in *Physcomitrella patens*. Planta (228) 167-177.

Zhu JK. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual Review of Plant Biology 53: 247–273.

Zhu, J.; Dong, C.H.; Zhu, J.K. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2007, *10*, 290-295.