

## ACTIVIDAD DE TREHALOSA 6-FOSFATO SINTASA EN PLANTAS DE *Selaginella lepidophylla* EN RESPUESTA A HIDRATACIÓN Y DESECACIÓN

## CHANGES IN TREHALOSE 6-PHOSPHATE SYNTHASE ACTIVITY IN *Selaginella lepidophylla* PLANTS IN RESPONSE TO HYDRATION AND DESICCATION

Ciria G. Figueroa-Soto<sup>1</sup>, Gabriel Iturriaga<sup>2</sup> y Elisa M. Valenzuela-Soto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Coordinación de Ciencia de los Alimentos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Km. 0.6, Carr. A la Victoria C.P. 83100, Hermosillo, Sonora. Tel. 01 (662) 289-2400, Fax 01 (662) 280-0058. Correo electrónico elisa@cascabel.ciad.mx <sup>2</sup>Departamento de Biotecnología Ambiental, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62210, Cuernavaca, Mor., México.

\* Autor responsable

### RESUMEN

En este trabajo se describen las cinéticas de hidratación y deshidratación en plantas de *Selaginella lepidophylla* y su influencia en la actividad de la trehalosa 6-fosfato sintasa y en los niveles de trehalosa. Al hidratar plantas totalmente secas por 24 h, su contenido relativo de agua aumentó de 3.2 % a 92.7 %, mientras que su potencial hídrico se elevó de niveles indetectables en plantas secas a -0.3 MPa. Las plantas secas mostraron una actividad enzimática de 0.023 U mg<sup>-1</sup> proteína, al aumentar a 0.135 U mg<sup>-1</sup> proteína (581 %) a las 2 h de hidratación; a las 24 h de hidratación la actividad descendió a 0.081 U mg<sup>-1</sup> proteína. La concentración de trehalosa en las plantas secas fue de 11.9 mg g<sup>-1</sup> ps, que se incrementó a 53 mg g<sup>-1</sup> ps durante las primeras 8 h de hidratación. En las plantas totalmente rehidratadas y sometidas a desecación por 24 h, la velocidad de pérdida de agua fue rápida y su contenido relativo de agua se redujo de 94.4 % a 4.8 %; su potencial hídrico descendió de -0.3 a -2.1 MPa durante las primeras 12 h del tratamiento. La actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa disminuyó durante las primeras 2 h de deshidratación, y luego se incrementó hasta alcanzar una actividad máxima de 0.068 U mg<sup>-1</sup> proteína a las 8 h; a las 24 h de desecación la planta conserva la actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa aún con un contenido relativo de agua de 4.4 %. La concentración de trehalosa aumentó de 10.2 a 50.4 mg g<sup>-1</sup> ps a las 8 h de deshidratación, y a las 24 h la concentración de trehalosa se mantiene alta (12 mg g<sup>-1</sup> ps).

**Palabras clave:** *Selaginella lepidophylla*, contenido relativo de agua, estrés hídrico, trehalosa, trehalosa 6-fosfato sintasa.

### SUMMARY

This paper describes the *Selaginella lepidophylla* plant hydration and dehydration kinetics and its influence on trehalose-6-phosphate synthase activity and trehalose levels. After dry plants were fully hydrated for 24 h, their relative water content increased from 3.2 % to 92.7 %, and their water potential increased from undetectable levels to -0.3 MPa. Dry plants had an activity of 0.023 U mg<sup>-1</sup> protein, which increased to 0.135 U mg<sup>-1</sup> protein (581 %) after 2 h of hydration and then it decreased to 0.081 U mg<sup>-1</sup> protein at 24 h. Trehalose concentration in dry plants was 11.9 mg g<sup>-1</sup> dw which increased to 53 mg g<sup>-1</sup> dw during the first 8 h of rehydration. Fully hydrated plants subjected to desiccation for 24 h lost water rapidly, changing their relative water content from 94.4 % to 4.8 %, and their water poten-

tial from -0.3 to -2.1 MPa during the first 12 h. Trehalose 6-phosphate synthase activity decreased during the first 2 h of desiccation and then it increased to 0.068 U mg<sup>-1</sup> protein at 8 h of treatment; after 24 h of desiccation the plant still conserved trehalose-6-phosphate synthase activity with a relative water content of 4.4 %. Trehalose concentration increased from 10.2 to 50.4 mg g<sup>-1</sup> dw after 8 h of desiccation, and after 24 h the concentration is still high (12 mg g<sup>-1</sup> dw).

**Index words:** *Selaginella lepidophylla*, relative water content, water stress, trehalose, trehalose 6-phosphate synthase.

### INTRODUCCIÓN

El fenómeno de desecación casi total es común en estructuras reproductivas de plantas, como granos de polen, esporas y semillas. Sin embargo, es poco común encontrar plantas completas con la capacidad para sobrevivir a la deshidratación. Para que una planta sobreviva a un proceso de deshidratación, se ha propuesto que tenga capacidad para proteger sus estructuras celulares durante la deshidratación, y pueda llevar a cabo el proceso de reparación celular durante la hidratación (Oliver, 1991; Platt *et al.*, 1994).

La trehalosa es un disacárido no reductor ampliamente distribuido en microorganismos e invertebrados (Elbein, 1974), en los que desempeña un importante papel ante el estrés hídrico y térmico (Crowe *et al.*, 1984; Clegg, 1985; Gadd *et al.*, 1987; Hottiger *et al.*, 1994). La trehalosa se sintetiza a partir de la condensación de glucosa 6-fosfato y UDP-glucosa para formar trehalosa 6-fosfato, en una reacción catalizada por la trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS; E.C.2.4.1.15); posteriormente, una trehalosa 6-fosfato fosfatasa (TPP; E.C. 3.1.3.12) defosforila a la trehalosa (Cabib y Leloir, 1958).

Durante una sequía extrema la trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopiranósil-1,1- $\alpha$ -D-glucopiranósido) puede tener un efecto protector sobre las enzimas y membranas celulares, al evitar su desnaturalización (Crowe *et al.*, 1984; Clegg, 1985; Crowe *et al.*, 1998). El mecanismo por el cual este disacárido estabiliza las membranas se ha tratado de explicar a través de dos hipótesis: por remplazamiento de agua y por vitrificación (Burke, 1985; Crowe *et al.*, 1998); existen evidencias de que ambos mecanismos son necesarios para explicar el papel de este disacárido (Crowe *et al.*, 1998).

La planta de resurrección, *Selaginella lepidophylla* (Hook y Grev.), nativa del desierto Chihuahuense y distribuida desde Texas a varios estados de México, es una especie resistente a la desecación (Adams *et al.*, 1990). Es reconocida su habilidad para secarse completamente y sobrevivir durante largos períodos en estado deshidratado.

Se postula que las plantas de *S. lepidophylla* pueden sobrevivir ciclos de deshidratación-hidratación-deshidratación debido a que acumulan trehalosa, la cual protege a las membranas celulares a través de la interacción de los grupos OH de las proteínas y de las cabezas polares de los lípidos que forman las membranas, de acuerdo con la teoría del remplazamiento de agua por trehalosa (Adams *et al.*, 1990; Crowe *et al.*, 1998). Adams *et al.* (1990) encontraron concentraciones de trehalosa que varían entre 71 a 106 mg g<sup>-1</sup>ps en hojas de esta especie.

La acumulación de trehalosa en plantas sólo ha sido reportada en las plantas de resurrección (*S. lepidophylla*) y en *Myrothamnus flabellifolia* (Adams *et al.*, 1990; Drenan *et al.*, 1993). En plantas superiores no se ha detectado acumulación de trehalosa; sin embargo, se ha reportado la presencia de los genes que codifican para las enzimas de síntesis de trehalosa (Blazquez *et al.*, 1998; Goddijn y Smeekens, 1998). Una posible explicación para la falta de acumulación de trehalosa en plantas que contienen los genes y por tanto las enzimas de síntesis, es la alta actividad de trehalasa (enzima que la hidroliza), propuesta por Goddijn y Smeekens (1998).

Se han realizado varios estudios en *S. lepidophylla* para entender los mecanismos que le permiten reasumir su actividad fisiológica después de haber estado en un estado completamente deshidratado (Eickmeier, 1987; Harten y Eickmeier, 1986; Platt *et al.*, 1994; Scott, 2000). Según Platt *et al.* (1994), las hojas de plantas secas de *S. lepidophylla*, mantienen la configuración e integridad estructural de sus membranas y organelos. Harten y Eickmeier (1986) reportaron que 10 enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, conservan un nivel de actividad de aproximadamente 74 % en plantas secas de la misma

especie. Pero aún no se tienen definidos todos los pasos involucrados en el mecanismo que permite a las plantas de resurrección reactivar exitosamente todos sus procesos bioquímicos y fisiológicos al entrar en contacto con el agua.

Los cambios en el volumen celular afectan las reacciones bioquímicas de las células vegetales (Kaiser, 1982). Un parámetro indirecto para determinar cambios en el volumen celular y el estatus hídrico de las plantas es el Contenido Relativo de Agua (CRA) (Slavik, 1974). En este trabajo se investigó el efecto de la hidratación y deshidratación sobre la actividad de la enzima trehalosa 6-fosfato sintasa y los niveles de trehalosa, y su correlación con el CRA de plantas de *S. lepidophylla* durante la toma y pérdida de agua.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Tratamiento de hidratación y deshidratación

Las plantas de *S. lepidophylla* (Hook & Grev. Spring) se colectaron en estado seco en la región árida del estado de Morelos. Todas las plantas se colectaron secas con un desarrollo similar y se almacenaron en el laboratorio a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad.

Posteriormente se colocaron en un recipiente con agua destilada durante 48 h, en fotoperiodo de 10/12 h de luz/oscuridad. Se usaron tres plantas en cada una de las mediciones que se hicieron a 0, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h de iniciada la hidratación. Además, plantas totalmente hidratadas se sometieron a deshidratación retirándoles el agua, en las mismas condiciones de fotoperiodo descritas arriba y a 25 °C; en ellas se hicieron mediciones a las 0, 2, 4, 8, 12 y 24 h, en tres plantas por muestreo.

### Estado hídrico de la hoja

El contenido relativo de agua (CRA) de las plantas se determinó en cada uno de los períodos de rehidratación y desecación. Para la medición se tomó 1 g de hojas de cada uno de los tratamientos (peso fresco), luego se hidrató por 12 h en una caja petri que contenía tiras de hule espuma húmedas, y se selló cada caja con parafilm para saturar el aire dentro de la caja. Al final de las 12 h, se pesó nuevamente el tejido (peso turgente), y se llevó a sequedad en un horno a 40 °C hasta alcanzar peso seco constante (peso seco) (Slavik, 1974). La fórmula empleada para calcular el CRA fue (peso fresco - peso seco / peso turgente - peso seco) x 100 (Slavik, 1974). Cada determinación se llevó a cabo por triplicado.

El potencial hídrico de las plantas en cada tratamiento se evaluó con una bomba de presión, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Scholander pump. Corvallis, Oregon. EE.UU.). De forma general el procedimiento consistió en cortar una sección de la parte interna de la planta, que se colocó en la parte media de un tapón de hule previamente horadado. Este tapón se ensambló en la cámara de presión y se aplicó N<sub>2</sub> gaseoso hasta que emergió la primera gota de agua del pecíolo de la muestra; se registró la presión necesaria para lograr tal efecto. Cada determinación se llevó a cabo por triplicado.

### Extracto enzimático

Veinte gramos de tejido vegetal se homogeneizaron con amortiguador Trizma 0.1 M, pH 8.0, el cual contenía PMSF 1 mM, 0.5 μL mL<sup>-1</sup> de una mezcla de inhibidores de proteasas (v/v) (AEBSF, PMSF, bestatina, pestatina A, leupeptina, 1, 10-fenantrolina), MgCl<sub>2</sub> 12.5 mM, β-mercaptopropano 2 mM (amortiguador A) en una relación 1:2 (p/v). El extracto se filtró a través de seis capas de gasa y se centrifugó a 48 400 g por 1 h a 4 °C. El sobrenadante se llevó a 35 % de saturación con sulfato de amonio sólido y se centrifugó a 35 000 g por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se llevó a 75 % de saturación y se centrifugó como se describió anteriormente.

El precipitado del paso anterior, se resuspendió en el amortiguador A y se desaló por cromatografía de exclusión molecular mediante una matriz de Sephadex G-75, previamente equilibrada con un amortiguador Trizma 0.01 M, pH 8.0, el cual contenía PMSF 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, β-mercaptopropano 2 mM (amortiguador B). La proteína se eluyó con el amortiguador B.

### Ensayo de actividad enzimática

La actividad de la Trehalosa 6-fosfato sintasa se cuantificó por la formación de UDP, mediante un ensayo acoplado como describen Hottiger *et al.* (1987), al ir registrando espectrofotométricamente el cambio de absorbancia a 340 nm.

La mezcla de ensayo de la primera reacción contenía HEPES-KOH 0.05 M, pH 7.1, UDP-glucosa 5 mM, glucosa 6-fosfato 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 12.5 mM, extracto enzimático (5 μg de proteína) en un volumen final de 0.4 mL. Se hicieron dos controles negativos, uno sin UDP-glucosa y el otro sin glucosa 6-fosfato. La mezcla se incubó a 35 °C por 30 min y la reacción se detuvo por calentamiento de la mezcla de reacción a 100 °C por 5 min. Enseguida las muestras se almacenaron en hielo por 10 min y se centri-

fugaron a 2000 g, se tomó el sobrenadante para la segunda reacción.

La segunda reacción se llevó a cabo en una mezcla de reacción con amortiguador HEPES-KOH 0.14 M, pH 7.6, fosfoenol piruvato 2 mM, NADH 0.3 mM, láctico deshidrogenasa (5 U), piruvato cinasa (5U) y 100 μL del extracto enzimático de la primera reacción, en un volumen final de 0.5 mL. La reacción fue iniciada con la adición de piruvato cinasa. Una unidad de actividad es igual a 1 μmol de NADH oxidado por minuto por mililitro. Cada medición se realizó por triplicado.

### Determinación de proteína

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford, con albúmina de suero bovino como estándar (Bradford, 1976).

### Contenido de trehalosa

Para cuantificar la trehalosa se usaron 2.5 g de hoja de cada tratamiento, que se homogeneizaron en 15 mL de agua o de etanol 80 % (p/v) y se incubaron a 50 °C por 8 h. A continuación los extractos se centrifugaron a 15 000 g por 30 min, los sobrenadantes se decantaron y se guardaron a 4 °C para luego determinar su concentración de trehalosa. Para cuantificar la trehalosa se inyectaron 10 μL del extracto a una columna Supelcosil LC-NH<sub>2</sub> 5 μm (4.6 mm x 25 cm) acoplada a un cromatógrafo líquido de alta resolución. Se utilizó una fase móvil de acetonitrilo-agua (80/20) a un flujo de 1.0 mL min<sup>-1</sup>, y un refractómetro diferencial (RI) modelo 350, en una estación de trabajo Star version 5.51 (Varian Associates, Inc.).

La determinación cuantitativa se hizo por comparación de tres análisis sucesivos en cada uno de los extractos y la mezcla de estándares de los azúcares fructosa, glucosa, sacarosa (40 mg mL<sup>-1</sup>) y trehalosa (20 mg mL<sup>-1</sup>).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El CRA de las plantas totalmente secas fue de 3.2 %, y durante el proceso de rehidratación se incrementó rápidamente a 93 % a las 10 h (Figura 1). El potencial hídrico de las plantas totalmente secas no pudo ser determinado con la bomba de presión utilizada en este estudio, cuyo límite máximo es de -10 MPa. A las 5 h de hidratación, el potencial hídrico de la planta fue -4.4 MPa; este valor se incrementó a -0.3 MPa a las 10 h de hidratación (Figura 1). Luego, tanto el CRA como el potencial hídrico se mantuvieron constantes hasta las 24 h de hidratación.

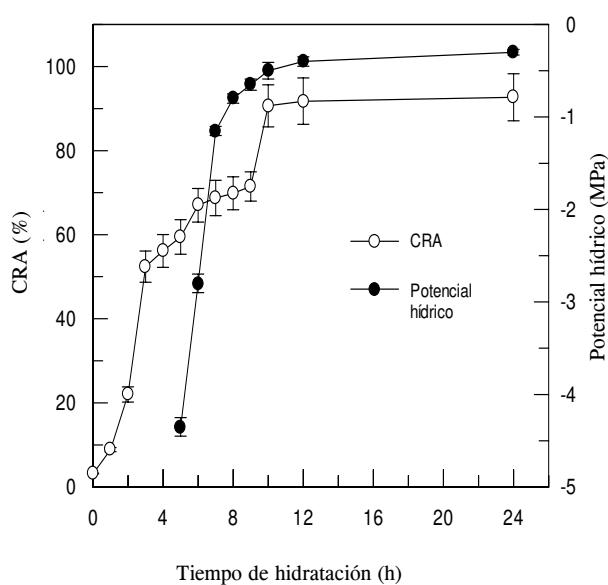


Figura 1. Efecto de la toma de agua sobre el contenido relativo de agua y el potencial hídrico foliar en plantas de *Selaginella lepidophylla* (Medias  $\pm$  SE;  $n = 3$ ).

Al desecar por 24 h a las plantas rehidratadas, el CRA decreció gradualmente desde 94 a 4.8 % (Figura 2), mientras que el potencial hídrico descendió -0.03 MPa a -3.5 MPa en 18 h (Figura 2). Después de 18 h de desecación el potencial hídrico no pudo ser determinado.

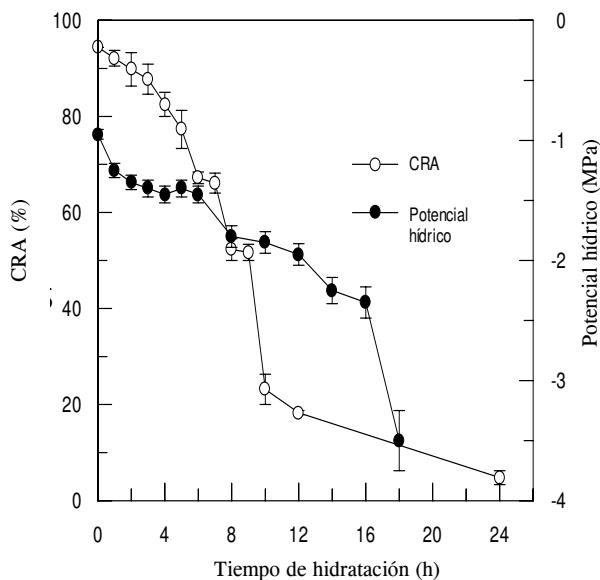


Figura 2. Efecto de la pérdida de agua sobre el contenido relativo de agua y el potencial hídrico foliar en plantas de *Selaginella lepidophylla* (Medias  $\pm$  SE;  $n = 3$ ).

A la fecha no se ha publicado el potencial hídrico que presentan las plantas de resurrección totalmente deshidratadas. De los datos de esta investigación se infiere que di-

cho potencial debe ser extremadamente bajo, muy inferior al límite máximo de la bomba de presión utilizada en este trabajo. Sin embargo, el contenido relativo de agua fue una herramienta muy útil para poder determinar el estado hídrico de las plantas totalmente deshidratadas.

Según Eickmeier (1987), las plantas de *S. lepidophylla* pierden casi toda su agua en 24 h, proceso que lo definió como una cinética de deshidratación rápida. Nuestros resultados comprueban lo reportado por Eickmeier (Figura 2), y además muestra que la cinética de hidratación de la planta (Figura 1) es más rápida que la cinética de deshidratación.

La actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) y la concentración de trehalosa se determinaron a 0, 1, 2, 4, 8, 12, y 24 h de tratamiento de hidratación. Las plantas totalmente secas (0 h) tuvieron una actividad de TPS de  $0.023 \text{ U mg}^{-1}$  proteína, la cual aumentó hasta  $0.135 \text{ U mg}^{-1}$  proteína (581 %) después de 2 h de hidratación y con un CRA de 22 % (Figura 3); a este CRA las hojas más internas de la planta muestran un color verde intenso. Conforme aumentó el CRA, la actividad de la enzima disminuyó a los niveles observados a la primera hora de hidratación (Figura 3). A las 24 h de tratamiento, la actividad fue de  $0.08 \text{ U mg}^{-1}$  proteína, que es superior en 394 % a la de la planta seca (Figura 3), pero es apenas 50 % de la actividad encontrada a las 2 h de hidratación.

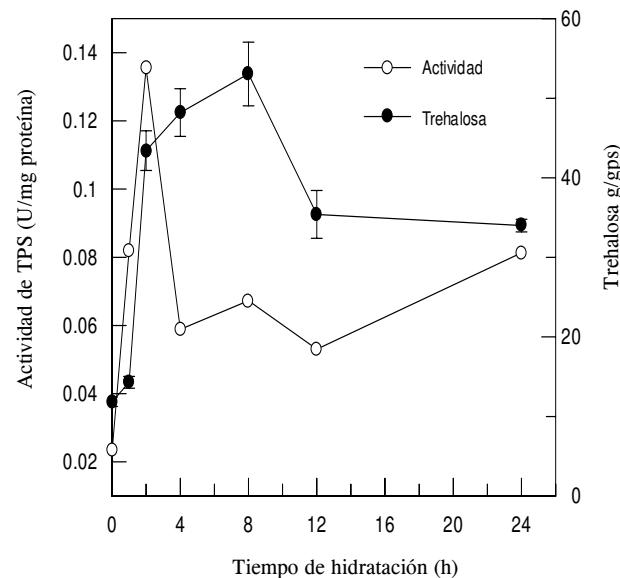


Figura 3. Efecto de la toma de agua sobre la actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa (cada punto representa la media de tres mediciones) y el contenido de trehalosa en plantas de *Selaginella lepidophylla* (Medias  $\pm$  SE;  $n = 3$ ).

En un estudio previo, Harten y Eickmeier (1986) reportaron la conservación de la actividad en 10 enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos en plantas

de *S. lepidophylla* totalmente deshidratadas. Dichos autores no midieron la actividad de TPS, que en este trabajo se muestra que también conserva actividad en plantas deshidratadas (Figura 2). Estos datos en conjunto sugieren que las plantas secas de *S. lepidophylla* conservan varias de sus actividades enzimáticas, lo que les permite recobrar rápidamente su actividad fisiológica en cuanto el agua se encuentra disponible nuevamente.

La concentración de trehalosa en las plantas totalmente secas fue de  $11.85 \text{ mg g}^{-1}$  ps, la cual aumentó hasta alcanzar un máximo de  $53 \text{ mg g}^{-1}$  ps a las 8 h de hidratación (CRA = 70 %). Al final del tratamiento (24 h) la concentración de trehalosa en las plantas totalmente hidratadas disminuyó a  $34 \text{ mg g}^{-1}$  ps (Figura 3). El aumento en la actividad de TPS y la concentración de trehalosa a un CRA tan bajo (Figura 3) se puede explicar con base en la necesidad de la célula de proteger su integridad, principalmente la membranal, durante la hidratación. Esta hipótesis es apoyada por los estudios de Platt *et al.* (1994), quienes reportaron que hojas deshidratadas de *S. lepidophylla* presentan una organización intacta de la bicapa membranal, la cual también debe conservarse a lo largo del proceso de hidratación.

Una concentración mayor de trehalosa en plantas de *S. lepidophylla* hidratadas, en comparación con plantas secas, también fue reportada por Adams *et al.* (1990). Es posible postular que debido a que las plantas de resurrección en condiciones naturales están sujetas a períodos muy cortos de hidratación intensa y a períodos de deshidratación largos y lentos, sintetizan y almacenan trehalosa con el fin de estar preparadas para un proceso de deshidratación. Otra posibilidad es que en condiciones de óptima disponibilidad de agua, la TPS o sus productos trehalosa o trehalosa 6-fosfato estén jugando un papel importante en la regulación del metabolismo de carbohidratos, como ha sido propuesto para levaduras (Müller, 2001; Leyman *et al.*, 2001).

Durante el tratamiento de deshidratación se cuantificó la actividad de TPS y la concentración de trehalosa a las 0, 2, 4, 8, 12, y 24 h. La actividad de TPS en la planta totalmente hidratada fue de  $0.081 \text{ U mg}^{-1}$  proteína, la cual disminuyó drásticamente en las primeras 2 h de deshidratación a  $0.024 \text{ U mg}^{-1}$  proteína (Figura 4). Posteriormente, a las 8 h de desecación con un CRA de 52 %, la enzima alcanzó una actividad máxima de  $0.068 \text{ U mg}^{-1}$  proteína (Figura 4). A mayor grado de pérdida de agua la actividad de TPS disminuyó hasta  $0.01 \text{ U mg}^{-1}$  proteína a las 24 h de deshidratación.

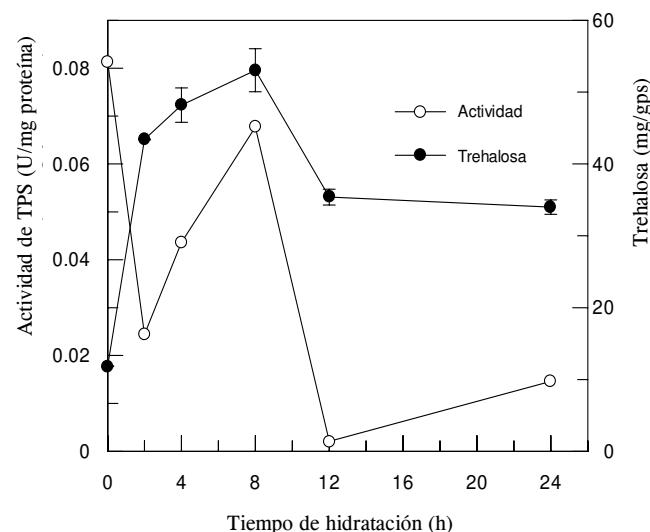


Figura 4. Efecto de la pérdida de agua sobre la actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa (cada punto representa la media de tres mediciones) y el contenido de trehalosa en plantas de *Selaginella lepidophylla* (Medias  $\pm$  SE;  $n = 3$ ).

En cambio, la concentración de trehalosa aumentó durante la deshidratación, al pasar de  $11.85 \text{ mg g}^{-1}$  ps en plantas totalmente hidratadas a  $50.4 \text{ mg g}^{-1}$  ps a las 8 h de deshidratación, con un CRA de 52 % (Figura 4); luego se observó un descenso en el contenido de trehalosa al disminuir la actividad de TPS y aumentar la pérdida de agua del tejido (Figura 4).

A las 8 h de deshidratación, las plantas tenían un CRA de 52 % y un potencial hídrico de  $-1.8 \text{ MPa}$ . En este estado hídrico las células vegetales deben tener un cambio significativo en el volumen celular y probablemente estén llevando a cabo cambios metabólicos para responder a la pérdida de agua. En este punto la trehalosa puede estar desempeñando un papel importante en la protección de las proteínas y lípidos contra la desecación (Clegg, 1985; Gadd *et al.*, 1987; Hottiger *et al.*, 1994). Esta capacidad de respuesta de *S. lepidophylla*, a través de la síntesis de trehalosa, es lo que ha llevado a algunos autores a proponer que estas plantas pueden sobrevivir ciclos de deshidratación-hidratación-deshidratación (Adams *et al.*, 1990).

A las 24 h de deshidratación la actividad de la enzima disminuyó a  $0.02 \text{ U mg}^{-1}$  proteína, mientras que la concentración de trehalosa bajó a  $36.29 \text{ mg g}^{-1}$  ps (Figura 4); en este momento las plantas tenían un CRA del 4.8 % y se observaban totalmente secas. Es interesante que las plantas totalmente secas conservan la actividad de la TPS y correlaciona perfectamente con lo reportado por Harten y Eickmeier (1986), quienes observaron que plantas secas de *S. lepidophylla* conservan 10 enzimas involucradas en el

metabolismo de carbohidratos, con 74 % de actividad. De igual forma, nuestros datos coinciden con lo publicado por Adams *et al.* (1990), quienes reportaron que las plantas hidratadas de *S. lepidophylla* acumulan concentraciones de trehalosa superiores a las de las plantas secas.

A pesar de que se considera que la acumulación de trehalosa es una respuesta a estrés hídrico, recientemente se ha propuesto que este disacárido pudiera estar involucrado en el metabolismo de carbohidratos (Thevelein y Hohmann, 1995), lo que explicaría en parte la acumulación de trehalosa en plantas no estresadas. Dado que *S. lepidophylla* crece en un medio ambiente desértico, la acumulación de trehalosa en plantas no estresadas pudiera ser un mecanismo que le permita adaptarse rápidamente a la desecación.

## CONCLUSIONES

Este es el primer trabajo en el cual se estudia el efecto del estatus hídrico de la planta *Selaginella lepidophylla* y su relación con la vía de síntesis de trehalosa, a través de la actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa y la acumulación de trehalosa. El contenido relativo de agua mostró ser un parámetro adecuado para determinar el estado hídrico de plantas con un potencial hídrico igual o menor a -10 MPa. La cinética de toma de agua de las plantas fue más rápida que la cinética de deshidratación. La actividad de TPS y la concentración de trehalosa varían en función del estatus hídrico de la planta. Las plantas totalmente secas y las totalmente hidratadas presentan actividad de TPS (0.023 y 0.081 U mg<sup>-1</sup> proteína, respectivamente). Sin embargo, la máxima actividad enzimática (0.135 U mg<sup>-1</sup> proteína) se observa a CRA bajos (10 %). Finalmente, las plantas totalmente hidratadas acumulan más trehalosa que las totalmente secas (34 y 11.85 mg g<sup>-1</sup> ps, respectivamente).

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 31248-B). Los autores agradecemos el apoyo del Q.B. Francisco Vázquez por el apoyo en las determinaciones de trehalosa.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adams R P, Kendall E, Kartha K K (1990)** Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Bioch. Syst. Eco.* 18:107-110.
- Blázquez M A, Santos E, Flores C L, Martínez-Zapater J M, Salinas J, Gancedo C (1998)** Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis TPS1* gene, encoding tre-6-phosphate synthase. *Plant J.* 13:685-690.
- Bradford M M (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms of protein utilizing the principle of protein-binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Burke M J (1985)** The glassy state and survival of anhydrous biological systems. In: *Membranes, Metabolism and Dry Organisms*. A C Leopold (ed). Cornell University Press, Ithaca, NY. pp:358-363.
- Cabib E, Leloir L F (1958)** The biosynthesis of trehalose phosphate. *J. Biol. Chem.* 231: 259-275.
- Clegg J S (1985)** The physical properties and metabolic status of *Artemia* cysts at low water contents: "the water replacement hypothesis". In: *Membranes, Metabolism and Dry Organisms*. A C Leopold (ed). Cornell University Press, Ithaca NY. pp: 169-187.
- Crowe J H, Crowe L M, Chapman D (1984)** Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223:701-703.
- Crowe J H, Carpenter J F, Crowe L M (1998)** The role of vitrification in anhydrosis. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 60:73-103.
- Drennan P M, Smith M T, Goldsworthy D, Staden van J (1993)** The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* Welw. *J. Plant Physiol.* 142:493-496.
- Eickmeier W G (1987)** The effects of desiccation rate on enzyme and protein-synthesis dynamics in the desiccation-tolerant pteridophyte *Selaginella lepidophylla*. *Can. J. Bot.* 66:2574-2580.
- Elbein A D (1974)** The metabolism of  $\alpha,\alpha$ -trehalose. *Adv. Carbohydrates Chem.* 30:227-256.
- Gadd G M, Chalmers K, Reed R H (1987)** The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology* 48:249-254.
- Goddijn O, Smeekens S (1998)** Sensing trehalose biosynthesis in plants. *Plant J.* 14:143-146.
- Harten J B, Eickmeier W G (1986)** Enzyme dynamics of the resurrection plant *Selaginella lepidophylla* (Hook. & Grev.) spring during rehydration. *Plant Physiol.* 82:61-64.
- Hottiger T, Schmutz P, Wiemken A (1987)** Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 169:5518-5522.
- Hottiger T, de Virgilio C, Hall M N, Boller T, Wiemken A (1994)** The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins *in vitro*. *Europ. J. Biochem.* 219:187-193.
- Kaiser W M (1982)** Correlation between changes in photosynthetic activity and changes in total protoplast volume in leaf tissue from hydro-, meso- and xerophytes under osmotic stress. *Planta* 154:538-545.
- Leyman B, Van Dijck P, Thevelein J M (2001)** An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant Sci.* 6:510-513.
- Müller J (2001)** Trehalose in higher plants. *Recent Res. Develop. Plant Physiol.* 2:175-186.
- Oliver M J (1991)** Influence of the protoplasmic water loss on the control of protein synthesis in the desiccation-tolerant moss *Tortula ruralis*: ramifications for a repair-based mechanism of desiccation-tolerance. *Plant Physiol.* 97:1501-1511.
- Platt K A, Oliver M J, Thomson W W (1994)** Membranes and organelles of dehydrated *Selaginella* and *Tortula* retain their normal configuration and structural integrity. *Protoplasm* 178:57-65.
- Scott P (2000)** Resurrection plants and the secrets of eternal leaf. *Ann. Bot.* 85:159-166.
- Slavik B. (1974)** Methods of Studying Plant Water Relations. Academy Publishing House, The Czechoslovak Academy of Sciences, Prague. 146 p.
- Thevelein J M, Hohmann S (1995)** Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem.* 20:3-10