

RESPUESTA MOLECULAR DE LAS PLANTAS ANTE EL ESTRÉS POR INUNDACIÓN: LECCIONES APRENDIDAS DEL GEN *SUB1A*

PLANT MOLECULAR RESPONSE TO SUBMERGENCE STRESS: LESSONS FROM *SUB1A* GENE

Julián M. Peña-Castro

Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan. 68301, Tuxtepec, Oaxaca, México. Fax: 01(287)8759240.

Autor para correspondencia (julianp@prodigy.net.mx, julianpc@unpa.edu.mx.)

RESUMEN

La inundación de los campos de cultivo es el segundo estrés más importante que causa pérdidas agrícolas. La inundación limita la concentración de oxígeno en el entorno de la planta, lo que ocasiona un estrés energético al impedir la obtención de energía de los carbohidratos por medio del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la fosforilación oxidativa. De esta manera, la fermentación etílica se convierte en la principal alternativa catabólica, lo que limita el desarrollo de la planta. Una inundación prolongada puede provocar la muerte cuando se agotan las reservas energéticas. Las plantas responden al estrés por inundación mediante una respuesta molecular coordinada que permite detectar la cantidad de oxígeno disponible, inducir la expresión de los genes de respuesta y conservar las reservas de almidón mediante la modulación de su uso en la fermentación. Los pasos anteriores están dirigidos por factores de transcripción llamados *Ethylene Response Factors (ERFs)*, entre los que se encuentra el gen *SUB1A* de arroz (*Oryza sativa L.*). En este trabajo se revisan los avances más recientes en el entendimiento de este campo de la biología molecular vegetal, así como sus aplicaciones biotecnológicas actuales y potenciales.

Palabras clave: Inundación, respuesta molecular, hipoxia, anoxia, estrés abiótico.

SUMMARY

Crop field flooding is the second most damaging phenomenon causing agricultural losses. When plants are submerged, available oxygen is limited causing an energy stress derived from the impediment to use the tricarboxylic acid cycle and oxidative phosphorylation for obtaining energy. This leaves ethanol fermentation as the main catabolic pathway, which has a negative impact on plant development. If the flooding event is long enough, it causes death by depletion of energy reserves. Plants facing submergence stress activate a coordinated molecular response that allows detection of available oxygen, induction of gene expression and conservation of starch reserves through modulation of fermentative pathways. Transcription factors called *Ethylene Response Factors (ERFs)* control these steps; one of them is the *SUB1A* gene in rice (*Oryza sativa L.*). In this work, the most recent advances directed to understand this field of plant molecular biology with current and promising biotechnological applications is reviewed.

Index words: Flooding, molecular response, hypoxia, anoxia, abiotic stress.

INTRODUCCIÓN

La agricultura como actividad económica constituye 4 % del producto interno bruto en México y emplea a 20 % de la población. Los trabajadores y pequeños productores agrícolas se encuentran en el sector más pobre de la población (FAO, 2004; Saldaña-Zorrilla, 2007). Esta posición de pobreza también los hace más vulnerables a las pérdidas económicas debido a factores meteorológicos adversos, de las cuales una quinta parte son ocasionadas por las inundaciones (Agroasemex, 2006).

Las costas mexicanas de los océanos Atlántico y Pacífico reciben cada año decenas de ciclones tropicales y frentes fríos que traen fuertes lluvias (Oropeza y Enríquez, 2007), dejando tras de sí miles de hectáreas sembradas bajo el agua por días y hasta semanas. Las pérdidas económicas pueden ser de 35 % o más por inundación, y por temporada se puede acumular un déficit de cientos de millones de dólares para la economía regional. Esto fomenta la pobreza y la migración, especialmente entre los campesinos más vulnerables que trabajan los campos de temporal o secano (Gutiérrez-Bonilla *et al.*, 2006; Saldaña-Zorrilla, 2007, 2009). Los modelos de predicción indican que aumentarán tanto la intensidad como la frecuencia de estos fenómenos por el calentamiento global; de esta forma, también se acumularán las pérdidas económicas agrícolas por las inundaciones (Rosenzweig *et al.*, 2002; Min *et al.*, 2011).

Las plantas son organismos sésiles, es decir, que pasan la mayor parte de su vida sujetos a un sustrato (generalmente suelo) y no tienen formas de desplazamiento como individuos. A lo largo de la evolución se han desarrollado en ellas mecanismos biológicos para censar las condiciones a su alrededor y poder reaccionar rápidamente ante los retos que les impone el ambiente (Bishopp *et al.*, 2006).

En los organismos vivos, y las plantas no son la excepción, existe un flujo constante de energía, de materia y de

información. Mientras que la bioenergética y la bioquímica estudian a los dos primeros, la biología molecular es la ciencia que estudia a los mecanismos mediante los cuales se codifica, transmite, ejecuta y recibe la información biológica. Estos mecanismos son esencialmente cuatro: la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), la transcripción del ADN para producir ácido ribonucleico (ARN), la traducción del ARN para producir a las proteínas, y la transducción de las señales (Darden y Tabery, 2010; Peña-Castro *et al.*, 2013). Así, el estudio de la biología molecular de las respuestas vegetales puede ayudar a entender y, por tanto, a dirigir la modificación de la información de las plantas con el fin de mejorar diversas características que impacten positivamente la productividad del órgano vegetal de interés (fruto, hoja, tallo, semilla).

La relación de las plantas con el agua puede ser estudiada desde el punto de vista molecular, es decir, desde la perspectiva de la información que se altera cuando la planta se encuentra en un estado hídrico no óptimo. Hay dos estados hídricos anormales, la sequía y su contraparte extrema, la inundación. Aquí se revisa el estado actual del conocimiento sobre la respuesta vegetal durante la inundación, sus desarrollos biotecnológicos y sus posibles direcciones futuras.

EL ESTRÉS POR INUNDACIÓN Y LA CÉLULA VEGETAL

La inundación es un estrés abiótico que disminuye la concentración de oxígeno disponible (hipoxia) y obstruye la captación de energía luminosa en las hojas (Bailey-Serres y Voesenek, 2008; Lee *et al.*, 2011), como se ilustra en las Figuras 1A y B. La hipoxia ocurre cuando la concentración de oxígeno en el ambiente celular es inferior a la condición normoxica (21 % O₂, p/p) (Bailey-Serres y Voesenek, 2008). La hipoxia causa una severa crisis energética en las plantas al disminuir o limitar la eficiencia de las rutas aeróbicas de síntesis de ATP (ciclo de los ácidos tricarboxílicos y cadena de transporte de electrones) (Branco-Price *et al.*, 2008; Bailey-Serres *et al.*, 2012) como se muestra en la Figura 2. Los síntomas del estrés por inundación incluyen clorosis, retraso en el crecimiento, necrosis de tejidos y pueden llegar a ocasionar la muerte (Figura 3A). Aún cuando el estrés termine antes de ocasionar la muerte, el retraso en el crecimiento y el daño a los tejidos hacen que la planta que lo sufrió continúe en desventaja con respecto a las que no lo tuvieron que enfrentar (Figura 3B).

Existen plantas aparentemente tolerantes a la inundación que crecen en ambientes acuáticos (pantanos, manglares, ríos) debido a que han desarrollado mecanismos adaptativos que permiten la aireación de sus tejidos, por ejemplo, la formación de aerénquimas (tubos internos en los tallos) y raíces adventicias (Voesenek *et al.*, 2006). No obstante, es-

tos no representan mecanismos de tolerancia y la mayoría de las especies vegetales de interés agrícola carecen de tales mecanismos.

LA RESPUESTA MOLECULAR VEGETAL ANTE LA HIPOXIA E INUNDACIÓN

Ante el estrés por hipoxia la célula vegetal limita la síntesis proteica, salvo la de un conjunto de enzimas y factores de transcripción llamados originalmente “péptidos anaeróbicos” (Andrews *et al.*, 1994). Los péptidos anaeróbicos, ahora conocidos como *Genes Centrales de Hipoxia* (GCH), son un conjunto de factores de transcripción, transductores, chaperonas, hemoglobinas, proteínas de identidad desconocida (50 % de los inducidos por el estrés) y enzimas del metabolismo fermentativo, por ejemplo, alcohol deshidrogenasa y piruvato descarboxilasa (Ismond *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005; Branco-Price *et al.*, 2008; Mustroph *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011).

La presencia de las proteínas codificadas por los GCH durante el estrés se debe a que se induce su transcripción, aumenta su reclutamiento en el ribosoma para su traducción y disminuye su representación en gránulos que excluyen de la traducción a la mayoría de los mensajeros de ARN no necesarios para sobrevivir (Sorenson y Bailey-Serres, 2014). Las proteínas GCH permiten que la célula cambie de la respiración oxidativa mitocondrial al metabolismo anaeróbico para obtener ATP y NAD⁺ vía la glicólisis y la fermentación (Mustroph *et al.*, 2010; Lakshmanan *et al.*, 2013), como se ilustra en las Figuras 2C y D. No obstante estos esfuerzos metabólicos dirigidos para aumentar la supervivencia (Figura 2), cuando el estrés es muy prolongado (días), los carbohidratos de reserva se utilizan completamente (Lakshmanan *et al.*, 2013), lo que ocasiona la muerte celular por una deficiencia energética irreversible (Fukao *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011) que aquí se muestra en la Figura 3A.

El manejo de las reservas de carbohidratos durante el estrés por inundación es un paso esencial para la supervivencia de las plantas (Fukao *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Lakshmanan *et al.*, 2013). En las plantas que no tienen adaptaciones naturales a los ambientes acuáticos, se han descrito dos mecanismos para administrar las reservas de carbohidratos bajo el estrés por inundación. El primer mecanismo (Figura 1C) funciona limitando el uso de las reservas de carbohidratos (tanto almidón como sacarosa y otros azúcares libres) a un mínimo para mantener las funciones vitales más esenciales (Xu *et al.*, 2006). Esto ocasiona que la planta detenga su elongación (Fukao *et al.*, 2006), retrase su floración (Peña-Castro *et al.*, 2011), y permanezca en un estado de pausa en espera de que la inundación desaparezca para entonces reiniciar el crecimiento. El segundo mecanismo (Figura 1D) consiste en movilizar las reservas de carbohidratos

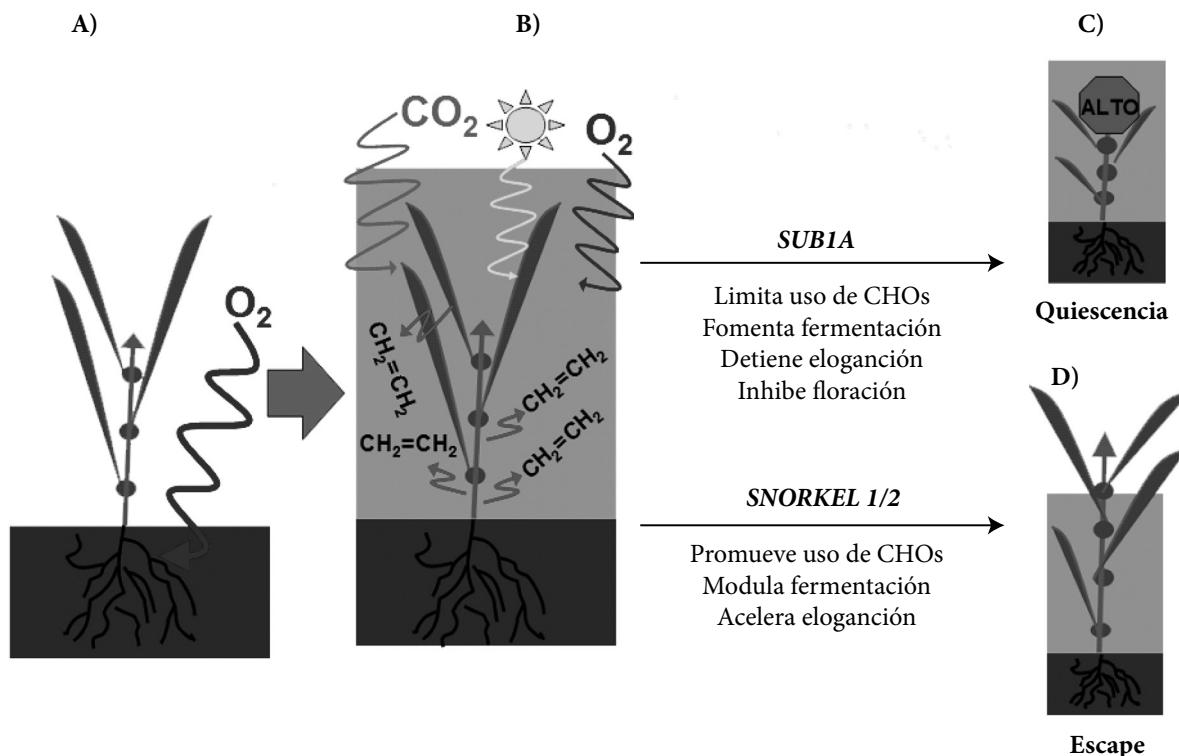


Figura 1. Las plantas tienen dos mecanismos para sobrevivir al estrés por inundación: quiescencia y escape. A) Las raíces vegetales son consumidoras de oxígeno durante la oxidación de los carbohidratos fotosintetizados en las hojas. B) Sin embargo, ante un estrés por inundación se excluye el oxígeno, el dióxido de carbono y la luz, lo que limita la fotosíntesis y se acumula etileno que inducirá la expresión de los factores de transcripción *ERFs*. C) El gen *ERF SUB1A* induce la respuesta llamada quiescencia donde la planta limita la elongación, el uso de carbohidratos y la floración, además de modular y promover la fermentación para conservar energía. D) Los genes *ERF SNORKEL 1* y *2* median la estrategia de escape, donde se acelera el consumo energético para formar estructuras capaces de emerger de la inundación y reiniciar la fotosíntesis.

y dirigir el flujo energético hacia la elongación de la parte aérea para escapar (lo más rápido posible) de la inundación, al exponer las hojas al aire y facilitar la difusión del oxígeno (Hattori *et al.*, 2009).

El primer mecanismo se ha nombrado quiescencia (Lat. *quiscere*, estar quieto) y el segundo como síndrome de escape (Bailey-Serres y Voesenek, 2008). La especie donde mejor se han caracterizado estas respuestas es el arroz (*Oryza sativa L.*) y la selección de uno u otro mecanismo es un reflejo de su hábitat, especialmente en el contexto geográfico y meteorológico del sureste de Asia, su centro genético de origen. Así, la quiescencia se encuentra en plantas que sufren inundaciones eventuales y profundas. Por otra parte, el síndrome de escape es útil en las plantas que enfrentan inundaciones constantes pero de baja profundidad (Pucciarieillo y Perata, 2013).

Actualmente, se conocen los genes responsables tanto de

la respuesta de escape como de quiescencia en arroz. Los genes *SNORKEL* (*SNK1* y *SNK2*) son responsables de la respuesta de escape al promover la biosíntesis de ácido gibерélico (GA) y así inducir la elongación de los entrenudos (Hattori *et al.*, 2009). Por su parte, el locus *SUBMERGEN-CE1* (*SUB1*) y en específico el gen *SUB1A-1* es el responsable de la respuesta de quiescencia al limitar de forma reversible la elongación (Fukao *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006), inhibir la floración (Peña-Castro *et al.*, 2011), y detener la movilización de los carbohidratos (Fukao *et al.*, 2012).

A pesar de tener funciones opuestas, *SNK1/2* y *SUB1A* pertenecen al grupo VII de la familia génica de los *Ethylene Response Factors* (*ERFs*), los cuales codifican proteínas de unión al ADN del tipo AP2 que funcionan como factores de transcripción (Nakano *et al.*, 2006). Estos *ERFs* son transductores de señales hormonales que forman una red compleja de competencia de acción, especialmente entre el GA, que es responsable de la elongación y uso de reservas

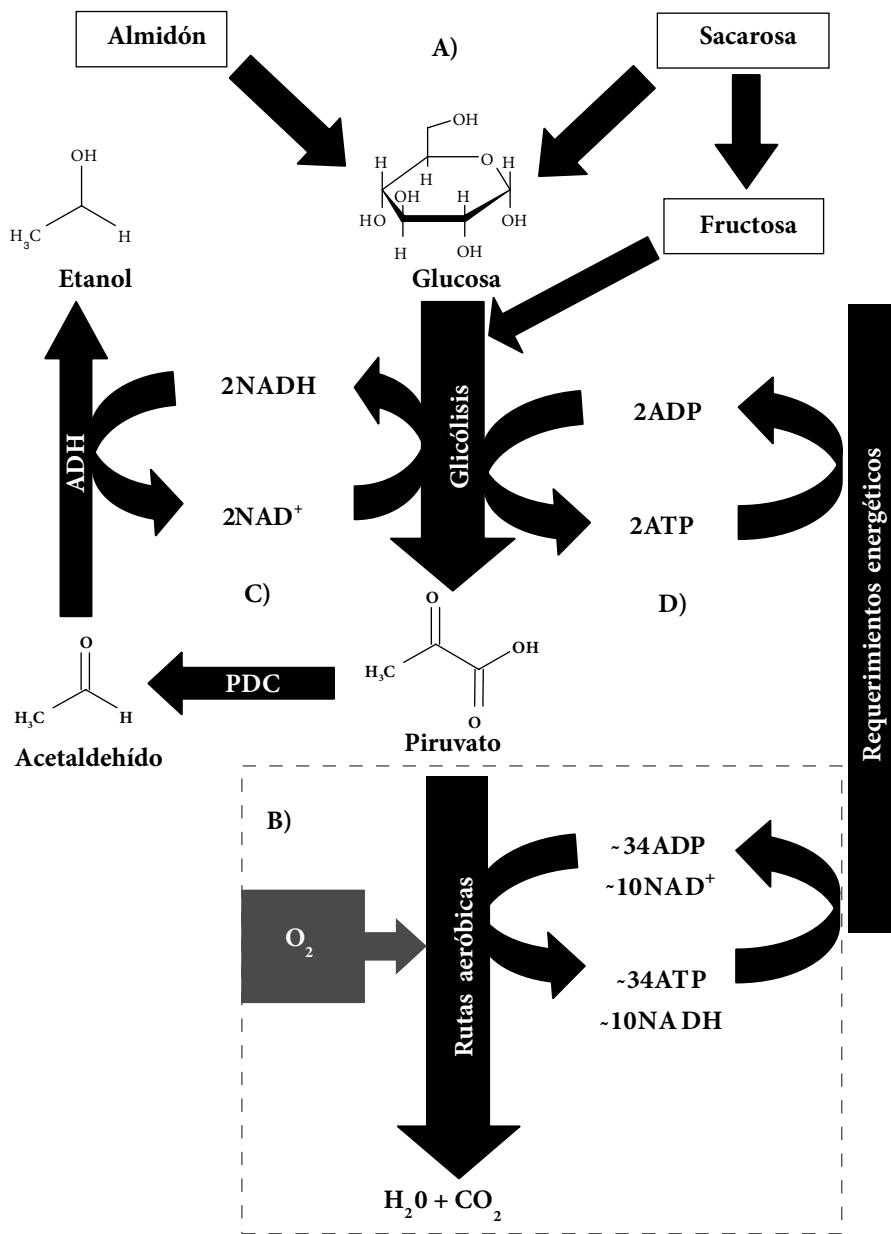


Figura 2. El estrés por inundación causa una crisis energética en las plantas. A) La energía captada durante la fotosíntesis se almacena en carbohidratos polimerizados (almidón) o solubles (sacarosa, fructosa, glucosa) y se procesan por la glucólisis. B) Mediante las rutas aeróbicas (ciclo de los ácidos tricarboxílicos y fosforilación oxidativa) el piruvato se oxida hasta CO_2 y H_2O . Sin embargo, al ser el oxígeno el receptor final de los electrones, estas rutas no funcionan óptimamente en la hipoxia. C) El flujo de carbono se desvía a partir del piruvato hacia la fermentación, donde la piruvato descarboxilasa (PDC) y la alcohol deshidrogenasa (ADH) permiten que la glucólisis continúe funcionando durante la hipoxia. D) La célula puede sobrevivir abasteciendo el mínimo de sus requerimientos energéticos con el ATP producido durante la glicólisis, mientras tenga reservas de carbohidratos disponibles.

de carbohidratos, el ácido abscísico (ABA) que generalmente funciona como antagonista del GA, y el etileno que parece ser la molécula de señalización primaria del estrés por inundación (Bailey-Serres y Voesenek, 2010).

Mediante el estudio metabolómico comparativo de plantas de arroz que poseen al gen *SUB1A* y las que no lo tienen, se ha podido observar los resultados bioquímicos de la actividad de este *ERF*. Además de confirmar que la presencia de *SUB1A* permite retener sacarosa y glucosa libres por más

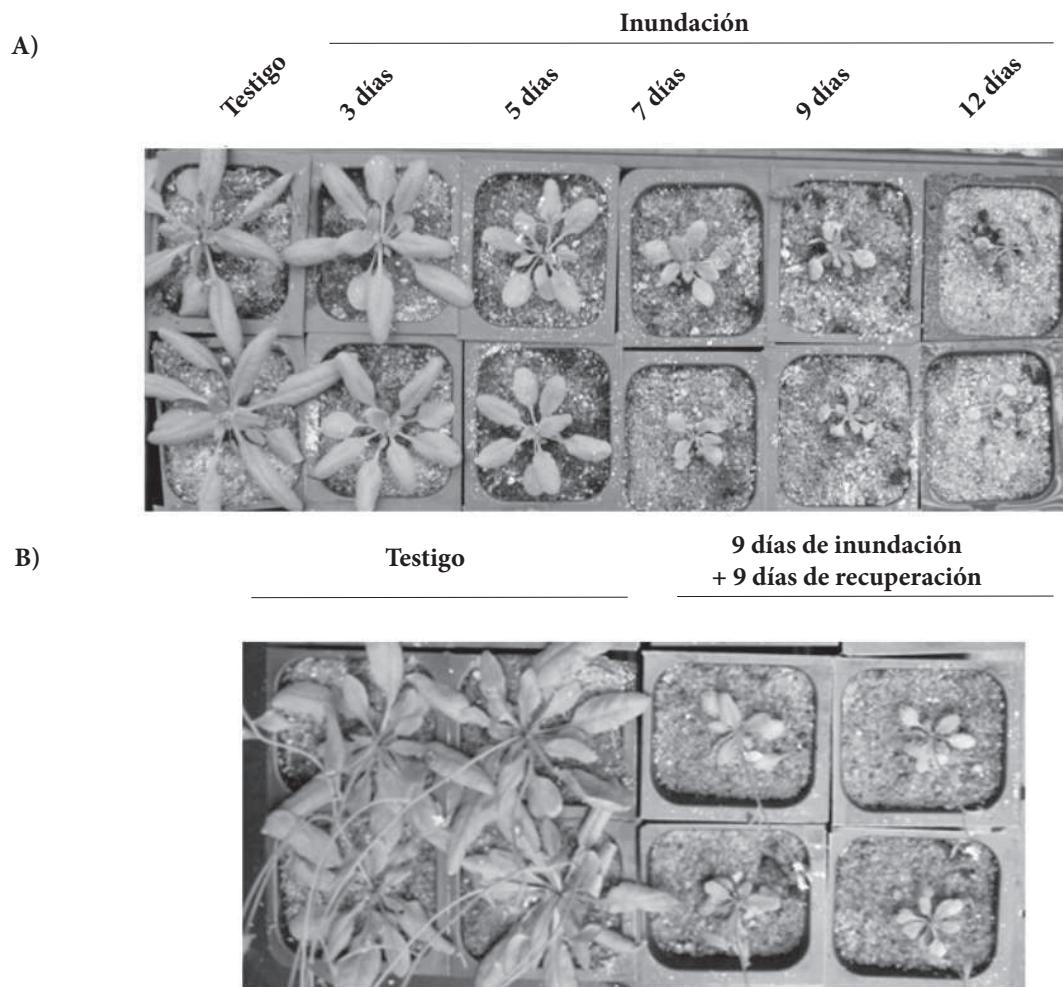


Figura 3. Síntomas del estrés por inundación en la planta modelo dicotiledónea *Arabidopsis thaliana*. A) Las plantas (18 d) fueron inundadas previo a la floración por una cama de agua de 20 cm y rescatadas del estrés al día que se indica. Se puede observar la aparición de amarillamiento, falta de crecimiento, retraso en la floración y la muerte del organismo proporcional a la intensidad del estrés. B) Aún cuando las plantas sobrevivan al estrés, éste tiene efectos a largo plazo como reducción de tamaño, lesiones y retraso en la floración.

tiempo, se pudo observar que este gen limita el desvío de átomos de carbono de la glucólisis hacia los aminoácidos derivados del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (principalmente alanina), lo que ayuda a alimentar a la ruta fermentativa durante la inundación (Bardings *et al.*, 2012, 2013).

Recientemente, en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se demostró que los ortólogos de *SUB1A* forman parte integral del sistema de percepción del oxígeno disponible. La proteínas similares a *SUB1A* son susceptibles a un sistema de degradación (mediado por el proteosoma) en condiciones de normoxia o de estabilización en condiciones de hipoxia. Así, cuando se estabilizan son capaces de dirigir la expresión de los genes del *GCH* y promover su acción concertada ante el estrés (Gibbs *et al.*, 2011; Licausi *et al.*, 2011), lo que se ilustra en la Figura 4.

A pesar de los avances recientes en el campo de la respuesta vegetal a la inundación, todavía existen muchas preguntas por resolver. Aún se desconocen otros factores moleculares que sean responsables de la respuesta fisiológica. También es de interés caracterizar a los factores corriente abajo de los *ERFs* (Jung *et al.*, 2010). Un aspecto que expandirá el conocimiento de la respuesta a la inundación es descubrir la función de los múltiples *GCH* de identidad desconocida (Mustroph *et al.*, 2010; Peña-Castro *et al.*, 2011). Para los ecólogos resulta interesante saber por qué cerca de 25 % de los genes inducidos por el estrés no son comunes entre las diferentes especies vegetales estudiadas (Mustroph *et al.*, 2010). Finalmente, es necesario comprender cómo se relaciona el estrés por inundación con otros tipos de estrés abiótico como la sequía (Fukao *et al.*, 2011), cómo se coordina el desarrollo vegetal con la respuesta anaeróbica en

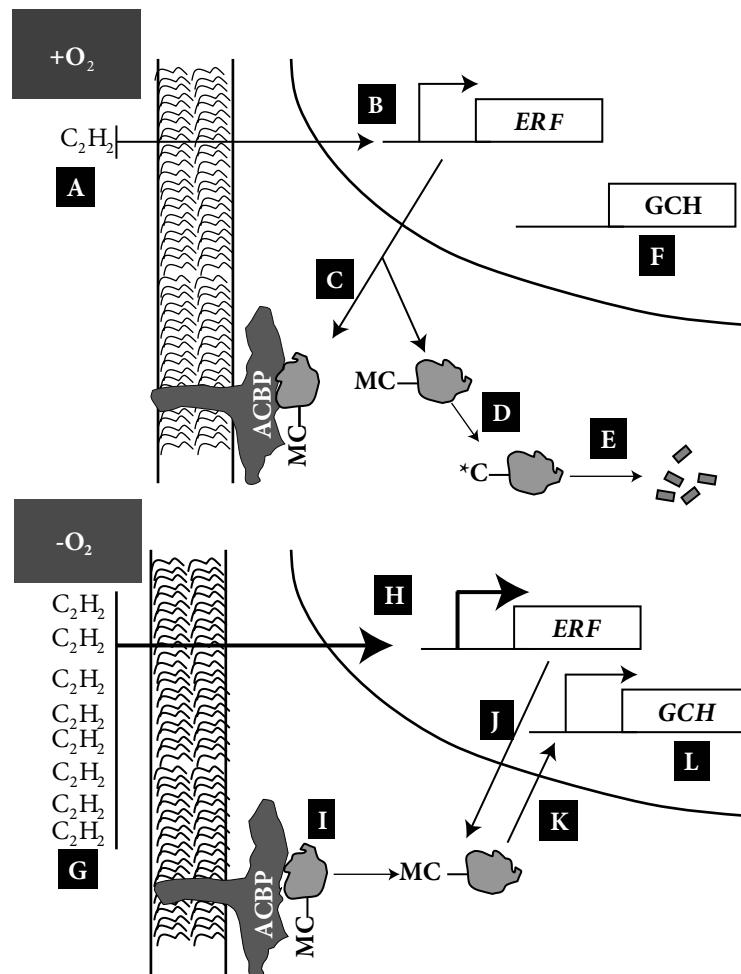


Figura 4. Los *ERFs* ortólogos de *SUB1A* en *Arabidopsis* son factores de transcripción que modulan la respuesta al estrés por hipoxia. En condiciones normales donde hay difusión libre de gases, el etileno se encuentra en bajas concentraciones (A), por lo que la transcripción de los *ERFs* es basal y mínima (B), además que la proteína ERF es secuestrada en la membrana celular por la proteína ACBP (C), o se oxida por las enzimas de la ruta N-terminal (D) donde la cisteína en la posición 2 constituye una señal para proceder a la degradación en el proteosoma (E). De esta forma, el grupo de los genes *GCH* no se transcribe (F). En condiciones de hipoxia, el etileno se acumula en la periferia de la planta (G) y promueve fuertemente la transcripción de los *ERFs* (H). La proteína ERF producida constitutivamente (I) y la capturada en la membrana (I) cambian su localización al citoplasma, donde se suman a *ERF* recién sintetizadas (J). Este conjunto de proteínas *ERF* se estabiliza por la ausencia de oxígeno (K), y pueden efectivamente dirigir la transcripción de los genes (L) del núcleo *GCH* y modular la respuesta molecular de la célula.

los tipos celulares que experimentan episodios de hipoxia como parte normal de su desarrollo (ej., células de línea germinal; Kelliher y Walbot, 2014) y cuál es el rol del ciclo diurno y circadiano en el estrés (Peña-Castro *et al.*, 2011).

Este conocimiento básico ofrece posibilidades para explorar aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento de la tolerancia al estrés por inundación de especies vegetales de importancia agrícola, pero también en otras aplicaciones donde la administración de reservas energéticas es importante, por ejemplo, el estrés por contaminación con

petróleo (Peña-Castro *et al.*, 2006), el estrés por sequía (Fukao *et al.*, 2011), así como el aumento de las reservas de carbohidratos en los pastos útiles para la producción de biocombustibles (Chuck *et al.*, 2011).

LA BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA Y EL GEN *SUB1A*

El locus *SUB1* ha sido extensamente aplicado en la biotecnología del arroz para generar nuevas variedades tolerantes a la inundación mediante su introgresión a

variedades comerciales por medio de cruzas y selección molecular, todo sin involucrar el uso de construcciones transgénicas, y evitar así la necesidad de estudios subsecuentes de bioseguridad para su liberación al ambiente y lograr su inmediata distribución y rápida aceptación entre los productores (Septiningsih *et al.*, 2009). Esto ha tenido un impacto social positivo entre los pequeños productores asiáticos al disminuir la necesidad de resembrar después de la inundación, al estabilizar la productividad y permitir la planeación económica del siguiente ciclo agrícola (Singh *et al.*, 2009, 2013).

El mecanismo del locus *SUB1* reside en que el etileno acumulado durante la inundación induzca la expresión de *SUB1A*. El etileno es una fitohormona gaseosa que al disminuir su difusión por la presencia de agua, se acumula alrededor de la planta durante el estrés (Xu *et al.*, 2006). Una vez inducido, la proteína *SUB1A* incrementa la sensibilidad de los tejidos al ABA, lo que ocasiona que la acción de GA disminuya. Esto trae como consecuencia la inhibición de la elongación y de la movilización de carbohidratos (Fukao *et al.*, 2006, 2011). De esta manera, las concentraciones de almidón y azúcares libres se mantienen altas y permiten a la planta sobrevivir por períodos de tiempo más largos bajo el agua que las plantas que no poseen al gen *SUB1A* (Fukao *et al.*, 2006).

El ABA es una fitohormona que coordina la tolerancia a la sequía en las plantas y se ha encontrado que el transcriptoma movilizado por *SUB1A* incluye a varios genes de respuesta a ABA. De esta forma, su aplicación biotecnológica en arroz se ha dirigido además a mejorar la tolerancia al estrés por sequía (Fukao *et al.*, 2011) y la atenuación de la senescencia (Fukao *et al.*, 2012). Potencialmente, esta aplicación puede extenderse a otros miembros de la familia *Poaceae*, una de las más importantes para la humanidad pues sus semillas o extractos aportan 50 % de las calorías consumidas globalmente (FAO, 2013), principalmente de cuatro especies: arroz, trigo (*Triticum ssp.*), maíz (*Zea mays*) y la caña de azúcar (*Saccharum ssp.*).

Desde que el locus *SUB1* fue asociado por primera vez al estrés por inundación, se observó que su presencia explicaba 70 % de la variabilidad en la respuesta al estrés; el restante 30 % no fue explorado en su momento (Xu y Mackill, 1996). Recientemente se retomó este trabajo y se realizó un escrutinio de 109 colecciones domesticadas y no domesticadas de arroz presentes en el International Rice Research Institute, con el fin de buscar nuevos factores de tolerancia adicionales a *SUB1A* (Niroula *et al.*, 2012). Aún en un escrutinio tan extenso, *SUB1A-1* continuó siendo el principal factor que confiere tolerancia al estrés y se pudo encontrar en especies diferentes a *O. sativa* que se sospecha son los ancestros del arroz (*Oryza nivara* y *Oryza rufipogon*).

Sin embargo, en un pequeño grupo de genotipos no domesticados pero tolerantes a la inundación y con características fisiológicas de la quiescencia, no se encontró evidencia del alelo *SUB1A-1* pero sí de un grupo de 7 alelos que tienen mayor similitud con *SUB1C-1* (>85 % en aminoácidos), un gen que también se encuentra en el locus *SUB1* pero que en las plantas domesticadas de arroz no ha demostrado ser un factor que sume a la tolerancia al estrés por inundación (Xu y Mackill, 1996; Xu *et al.*, 2006). No obstante, en las plantas domesticadas *SUB1C* también se expresa en respuesta a la acumulación del etileno y a la inundación, pero su función exacta no ha sido determinada (Fukao *et al.*, 2006). Cuando *SUB1C* se sobreexpresa en *Arabidopsis*, moviliza una parte del transcriptoma que también responde a *SUB1A* y confiere algunas características fenotípicas similares a *SUB1A*, como la esterilidad, la hipersensibilidad a diferentes hormonas, y la inhibición discreta de la elongación en los pecíolos y los filamentos florales (Peña-Castro *et al.*, 2011).

Lo anterior abre la puerta a que la versión de *SUB1C* encontrado en ancestros del arroz pueda conferir una respuesta quiescente primitiva pero eficiente para sobrevivir al estrés. En apoyo a esta hipótesis, Fukao *et al.* (2008) concluyeron que los tres genes que forman parte del locus *SUB1* (*SUB1A*, *SUB1B* y *SUB1C*) surgieron por duplicación genética, y que *SUB1C* es el más antiguo de ellos al ser el que mayor variabilidad presenta. Mediante el análisis geográfico de la variabilidad de los genes en el locus *SUB1*, se ha propuesto que la presencia de *SUB1A-1* como factor preponderante de la tolerancia a la inundación en plantas no domesticadas y domesticadas, es un caso de introgresión de este alelo a los cultivares modernos donde la migración humana parece ser el factor más importante de movilidad (Pucciariello y Perata, 2013).

El locus *SUB1* fue descubierto utilizando variedades marcadamente contrastantes en sus capacidades de tolerar a la inundación (Xu y Mackill, 1996). Con el fin de encontrar factores diferentes de *SUB1* se realizó la búsqueda de locus cuantitativos (QTL) pero ahora utilizando como fondos genéticos a variedades con tolerancia moderada (Septiningsih *et al.*, 2012). De manera muy interesante se detectó un fenómeno de vigor híbrido y se pudieron aislar familias con tolerancia similar o superior a las variedades *SUB1A*, pero donde el factor de tolerancia no se encontró en el cromosoma 9 (*SUB1*) sino en otros cromosomas (1, 2 y 12). Será de sumo interés la caracterización molecular de estos nuevos loci para encontrar los factores de tolerancia y analizar su potencial biotecnológico que pudiera ser aditivo con *SUB1*.

SUB1A se encuentra en la primera línea de detección del estrés que desencadena la activación de la transcripción de los GCH (Figura 4). Jung *et al.* (2010) describieron que corriente abajo de *SUB1A* se encuentran otros factores

de transcripción, que de manera interesante son también ERFs. Hay otras siete proteínas ERF potencialmente involucradas en subsecciones de la respuesta a la inundación, como la sensibilidad aumentada al ABA y al etileno, de inducción de la respiración anaeróbica, y la regulación negativa de la respuesta al GA (Jung *et al.*, 2010). En *Arabidopsis* también se confirmó la mediación de múltiples factores de transcripción entre los ortólogos de *SUB1A* y la respuesta transcriptómica, incluso con una mayor diversidad de familias génicas involucradas que incluyen factores como SQUAMOSA-LIKE, WRKY, bZIP, MYB, JAZ y bHLH (Licausi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011; Peña-Castro *et al.*, 2011). La disección de esta red puede ser aplicada a mejorar alguna de las respuestas a la inundación, o incluso con otros fines biotecnológicos, como son la tolerancia a la sequía, la inhibición de la floración para obtener biomasa y la conservación de almidón (que se discuten en la siguiente sección).

En plantas dicotiledóneas también se han realizado estudios de plantas silvestres para investigar si los mecanismos de quiescencia y de escape están presentes como en el arroz. En *Arabidopsis* se encontró una relación positiva entre la tolerancia y la quiescencia como mecanismo de defensa (Vashisht *et al.*, 2011). La variedad estándar 'Col-0' de *Arabidopsis* donde se han realizado todos los estudios moleculares de hipoxia e inundación descritos, resultó ser una variedad de tolerancia intermedia. Se espera que el estudio molecular de los ecotipos con posiciones extremas en el rango de tolerancia pueda aportar información sobre alelos superiores o mecanismos alternativos.

Otra dicotiledónea silvestre que se caracterizó de forma fisiológica y molecular en su respuesta a la inundación es *Rumex* (van-Veen *et al.*, 2013). Al usar dos especies con hábitat contrastante como *R. palustris* (endémica de ambientes con inundaciones bajas pero frecuentes, estrategia fisiológica de escape) y *R. acetosa* (endémica de ambientes con menor propensión a la inundación, estrategia fisiológica quiescente), se encontró que el transcriptoma fue muy diferente entre ambas, tanto en el tipo de genes movilizados como en su dinámica de acumulación, lo cual permitió descubrir una nueva respuesta ante la inundación en *R. palustris*, que se denominó Sensibilización al Etileno (Ethylene Priming). En este mecanismo la planta posee una estrategia fisiológica de escape pero sólo en el pecíolo, donde proteínas de la familia de los ERFs permitirían la rápida detección del etileno y la pronta elevación del tejido fotosintético sobre el agua.

De forma muy destacada, van-Veen *et al.* (2013) invocan por primera vez al metabolito trehalosa-6-fosfato (T6P) como un integrador metabólico en la respuesta quiescente. T6P es un disacárido fosforilado de dos monómeros de glucosa, que se encuentra presente en las plantas,

generalmente a bajas concentraciones, y su acumulación es proporcional a la disponibilidad de sacarosa. Así, se ha demostrado en *Arabidopsis* que cuando T6P se encuentra elevado (de forma natural durante el desarrollo o mediante la manipulación genética de las enzimas biosintéticas), funciona como indicador de madurez y promueve la síntesis de almidón y la floración (Delatte *et al.*, 2011; Wahl *et al.*, 2013).

T6P se sintetiza por la enzima trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) y usa como sustratos a glucosa-6-fosfato y UDP-glucosa. Ambos metabolitos provienen directamente del ciclo de Calvin y son intermediarios de la síntesis de almidón y de sacarosa (Figura 5A). La T6P es desfosforilada e inactivada como molécula de señalización por la enzima trehalosa fosfato fosfatasa (TPP) para producir trehalosa (Figura 5B). Cuando *R. acetosa* se inunda, se sobreexpresa el transcripto de TPP que desactiva a T6P, lo que indicaría falta de solidez en el anabolismo y promoción de la quiescencia como respuesta de conservación energética, pero no sucede así en la *R. palustris* que usa el mecanismo de escape (van-Veen *et al.*, 2013). De esta forma, el metabolito T6P puede ser el punto de control de la conservación de las reservas de almidón característica de la quiescencia, y tiene el potencial de generar novedosas aplicaciones dirigidas al control de la acumulación de almidón y de la floración (que son revisadas en la siguiente sección).

LA BIOTECNOLOGÍA DE LA SACARIFICACIÓN Y EL GEN *SUB1A*

Tradicionalmente, los pastos constituyen una fuente calórica importante para humanos y animales. Recientemente, los pastos se han propuesto como materia prima para la sacarificación, un procedimiento que consiste en la hidrólisis química o enzimática de la celulosa y almidón para producir monómeros de carbohidratos, especialmente glucosa y xilosa (BEFSSP, 2010). Estos monosacáridos son sustrato de levaduras o bacterias que los fermentan para producir bioetanol, un biocombustible líquido empleado como fuente de energía para realizar trabajo mecánico, especialmente como sustituto de la gasolina en automotores (Cotula *et al.*, 2008).

Cuando se usa como materia prima de la sacarificación a especies vegetales de consumo humano se le llama bioetanol de primera generación. Cuando se emplean especies vegetales no utilizadas directamente para la alimentación o residuos agroindustriales se le llama de segunda generación (Cotula *et al.*, 2008; Vanholme *et al.*, 2013).

El bioetanol de primera generación se obtiene de la fermentación de la sacarosa de la caña de azúcar o de la glucosa sacarificada del almidón de la semilla de maíz (BEFSSP,

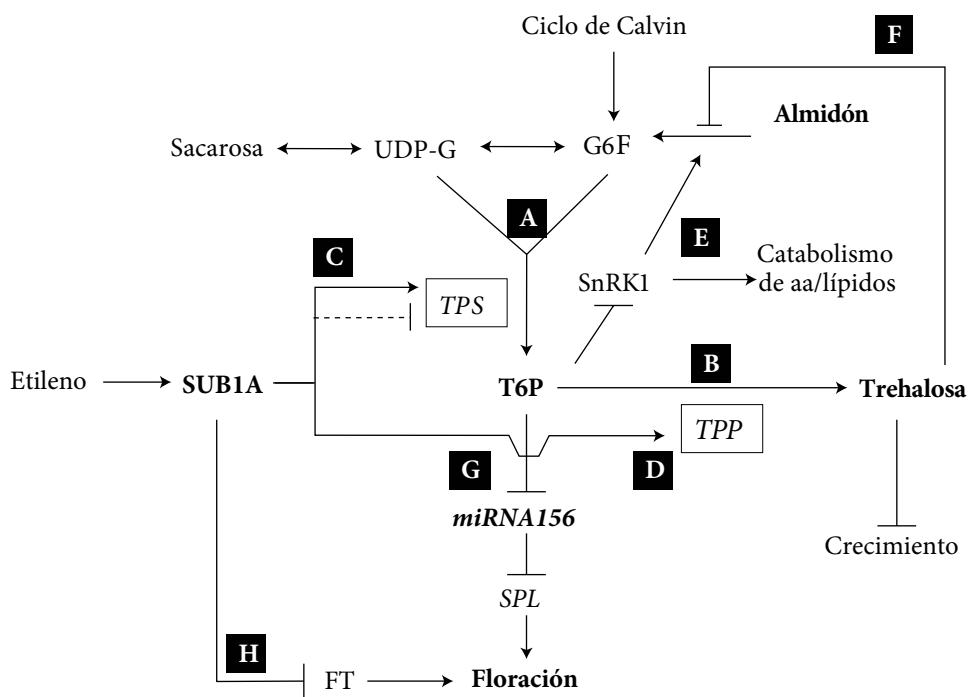


Figura 5. La proteína SUB1A tiene como factores corriente abajo a miembros de la ruta de síntesis de trehalosa-6-fosfato (T6P) lo que le permite mediar entre el catabolismo y el anabolismo durante el estrés por inundación. T6P se sintetiza por la enzima trehalosa fosfato sintasa (TPS) a partir de UDP-Glucosa y G6F, fotoasimilados derivados del ciclo de Calvin (A). T6P es sustrato de la trehalosa fosfato fosfatasa (TPP) para producir trehalosa (B). En la etapa temprana del estrés por inundación, SUB1A activa la transcripción de TPS (C, línea sólida) y de TPP (D), lo que ocasiona el consumo de T6P y la liberación de SnRK1 de la represión para activar procesos catabólicos y permitir la supervivencia (E). Al ser la trehalosa un inhibidor de la degradación de almidón, se crea un bucle de modulación (F). En el estrés tardío, SUB1A inhibe a TPS para liberar totalmente las rutas catabólicas (C, línea punteada). El consumo de T6P por la activación transcripcional de TPP permite liberar de su inhibición al *miRNA156* para promover la pausa en los procesos de floración a través de la destrucción de los mensajeros de los factores de transcripción de la familia *SPL* (H). Independientemente, SUB1A también inhibe a la floración a través de la represión del florígeno FT (H).

2010). El uso de estas materias primas es una preocupación social constante, pues cabe la posibilidad de que al utilizarse partes comestibles de los pastos se podrían encarecer los alimentos derivados de ellos (Cotula *et al.*, 2008; Henry *et al.*, 2010). En México, el uso del maíz para este fin es especialmente sensible debido a que es el principal consumidor *per capita* de este grano y es un importador neto del mismo, por lo que su uso para la fabricación de bioetanol añadiría un factor de presión económica adicional (FAO, 2013).

El bioetanol de segunda generación se produce a partir de la sacarificación de la celulosa y el almidón de pastos silvestres (ej., pasto varilla, *Panicum virgatum*; pasto elefante, *Miscanthus sp.*), y de residuos agroindustriales o de árboles jóvenes. Estas plantas tendrían ciclos económicos independientes de la alimentación siempre y cuando se tenga cuidado de que no compitan por áreas de cultivo de las especies alimenticias (Cotula *et al.*, 2008; FAO, 2013), y se desarro-

llen esquemas agroindustriales de aprovechamiento que incluyan la fermentación para la producción de bioetanol, la digestión anaerobia para producir biogás y la pirólisis para producir mejoradores de suelo (Vanholme *et al.*, 2013).

Ya sea que la materia prima vegetal sea sacarosa, almidón, celulosa o cualquier combinación de las anteriores, la biotecnología vegetal puede incidir positivamente en la producción de bioetanol en dos puntos: (I) aumentando la tolerancia al estrés biótico y abiótico de los pastos, y (II) diseñando estrategias para dirigir el flujo energético de la fotosíntesis hacia la acumulación de estos carbohidratos (USDE, 2006; Chundawat *et al.*, 2011; Bahaji *et al.*, 2013).

Uno de los procesos vegetales donde la administración de las reservas de carbohidratos y la tolerancia al estrés abiótico de las plantas se relacionan íntimamente es el estrés por inundación. De esta forma, los factores de transcripción que

permiten a las plantas responder al estrés por inundación, como *SUB1A*, potencialmente pueden ser reprogramados con promotores inducibles (debido a que la expresión constitutiva tiene efectos negativos en la germinación y la fertilitad) y ser utilizados en el ahorro de energía al inhibir la floración (Peña-Castro *et al.*, 2011), y al encauzamiento del trabajo fotosintético vegetal hacia la acumulación de reservas de carbohidratos y así mejorar su calidad como materia prima para la fermentación y producción de bioetanol (Chuck *et al.*, 2011). Con base en los resultados de diversas investigaciones recientes, es posible proponer que *SUB1A* y otros factores asociados pueden tener un uso biotecnológico para aumentar la sacarificación de la biomasa vegetal. De especial interés es la disección de las rutas de señalización de inhibición de la floración y del uso del almidón.

Parece ser que T6P es una señal central en esta aplicación pues tanto T6P como la trehalosa son más que simples metabolitos: son potentes reguladores del crecimiento vegetal que mantienen a los carbohidratos en una concentración homeostática óptima de acuerdo con la etapa de desarrollo y con el estado energético (Delatte *et al.*, 2011; Wahl *et al.*, 2013), lo que se ilustra en la Figura 5.

El primer indicio de la importancia de T6P en el estrés por inundación se obtuvo cuando se contrastó la respuesta transcriptómica de dos variedades casi isogénicas de arroz que difieren sólo en la presencia o ausencia del locus *SUB1* (Jung *et al.*, 2010). Se observó que *SUB1A* tiene dos efectos sobre la ruta de la trehalosa, el primero de ellos es incrementar la transcripción de TPS y TPP durante el estrés temprano (1 día), el segundo es disminuir la transcripción de TPS pero elevar la de TPP durante el estrés intermedio (6 días) (Figuras 5C y D). El análisis metabólico de T6P y de trehalosa determinó que tal y como se esperaba, la concentración de T6P disminuye después de 24 h bajo estrés por inundación (Com. Pers.¹), pero la de trehalosa también disminuyó, tanto en inundación (Barding *et al.*, 2013) como en hipoxia (Narsai *et al.*, 2009). Desafortunadamente, los autores no hicieron mediciones previas a las 24 h.

Las consecuencias de lo anterior son que al agotar a T6P en las etapas tempranas del estrés, la cinasa SnRK1 se activará desencadenando la respuesta de hambre, que consiste en movilizar el transcriptoma del catabolismo para la obtención de ATP (Figura 5E) (Baena-González *et al.*, 2007). Esto explicaría la movilización del almidón durante la inundación (Fukao *et al.*, 2006) y el aumento del catabolismo de aminoácidos (Barding *et al.*, 2012) y de lípidos (Peña-Castro *et al.*, 2011).

¹Barding G. A. (2013) Metabolomics of Complex Biological Systems to Uncover Molecular Mechanisms in Rice and Other Organisms. PhD Dissertation, University of California Riverside. 298 pp. <http://escholarship.org/uc/item/6009j852>. (abril 2014).

Una pregunta sin resolver es ¿por qué la célula vegetal mantiene transcripcionalmente activada a TPP aún cuando ya no hay T6P en la célula? Existen varias posibilidades. Es probable que pueda ser un vestigio molecular y su expresión molecular carezca de sentido. Tal vez podría ser relevante sólo en ciertos órganos vegetales o que adquiera sentido en un contexto subcelular, principalmente en el cloroplasto. También podría ser necesaria la presencia de TPP para mantener la concentración de T6P lo más baja posible y obtener una alta respuesta de hambre. Otra explicación podría ser que la respuesta en una inundación en el campo no sucede súbitamente como lo simulan los trabajos anteriormente citados. Una inundación real es un proceso que va exacerbándose lentamente y puede demorar días en llegar a su máxima intensidad.

Bajo este escenario, la concentración de T6P disminuiría gradualmente al ser usada por TPP para modular la respuesta de hambre. Al mismo tiempo la trehalosa podría mantenerse en una concentración donde pudiera inhibir el catabolismo del almidón (Figura 5E) (Delatte *et al.*, 2011). El estudio transcriptómico de las plantas de arroz *SUB1* sugiere que existe un esfuerzo por mantener la homeostasis de trehalosa en las etapas tempranas del estrés (Jung *et al.*, 2010), y de esta manera se proveería un mecanismo para disminuir el catabolismo del almidón y promover el de aminoácidos y lípidos. La confirmación de esta hipótesis tiene que esperar la medición de T6P y trehalosa en la etapa inicial del estrés o durante un estrés menos abrupto.

Este mecanismo tendiente a disminuir el consumo de almidón y mantener el transcriptoma de la síntesis de trehalosa durante la inundación parece ser exclusivo de las plantas *SUB1A*. En múltiples estudios donde se estudiaron los transcriptomas de arroz sin *SUB1*, *Arabidopsis*, álamo (*Populus* ssp) y soya (*Glycine max* Merr.) bajo estrés por inundación, se observó que se aumenta la expresión de TPS y se disminuye la de TPP (Jung *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011; Narsai y Whelan, 2013; Tamang *et al.*, 2014). Esto provocaría que estas plantas tarden más en detectar la disminución de sus reservas de carbohidratos que las que poseen a *SUB1A* (Figura 5E). Sin embargo, la respuesta ante el estrés por oscuridad y anoxia (más rápidos y más agresivos que la inundación) sí inducen simultáneamente a TPS y a TPP en todas las plantas estudiadas (Mustroph *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011).

T6P también es un promotor primario de la ruta de floración que depende de la edad de la planta, pues su acumulación es un indicador de la madurez de la capacidad fotosintética (Wahl *et al.*, 2013). La señalización implica la represión de los micro ARN (miRNA) de la familia 156 que a su vez inhiben la transcripción de genes de la familia SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE (SPL), cuya

identidad es de factores de transcripción inductores de la floración en el meristemo (Figura 5G) (Wahl *et al.*, 2013).

Los miRNA de la familia 156 y de la relacionada 157 se inducen durante el estrés por hipoxia, lo que da como resultado la represión de varios de sus genes blanco *SPL* (Moldovan *et al.*, 2009). Lo anterior concuerda con la observación de que la abundancia de diversos azúcares tiene el efecto contrario (Yang *et al.*, 2013). Durante un estrés por inundación o por hipoxia, la floración se vuelve parte integral de la respuesta quiescente al ser reprimida por *SUB1A* mediante dos caminos: la represión de la transcripción del florígeno *FLOWERING LOCUS T* (Figura 5H) (Peña-Castro *et al.*, 2011) y el agotamiento de T6P por la inducción de TPP (Jung *et al.*, 2010).

La hipótesis de que al descontextualizar a la ruta de T6P del estrés se puede reprimir la floración y mejorar la sacarificación de la materia prima vegetal, se demostró con el mutante natural de maíz *Corngrass1* (*CG1*). Las plantas *CG1* tienen una floración atrasada, acumulan hojas y tallos juveniles debido a que sobreexpresan al miRNA156 (Chuck *et al.*, 2011), un factor genético que regula negativamente a la floración y que se inhibe por altas concentraciones de T6P (Figura 5G) (Wahl *et al.*, 2013). Al sobreexpresar al miRNA156 en el pasto varilla, se inhibió la floración y se mejoró la digestibilidad de la celulosa y la acumulación de almidón, y como resultado global se tuvo hasta 300 % más rendimiento de azúcares fermentables que en las plantas silvestres (Chuck *et al.*, 2011).

De esta forma, la conexión de la ruta T6P con *SUB1A* y factores asociados (Figura 5) se incorpora a las opciones disponibles para aumentar la concentración de almidón en las plantas y mejorar la digestibilidad de las paredes celulares, ya sea por medio de la transgénesis o bien de la búsqueda e introgresión de características de interés presentes en mutantes o variedades naturales.

CONCLUSIÓN

El estudio de la biología molecular de la respuesta vegetal ante el estrés por inundación ha permitido saber que se trata primariamente de un estrés energético. En la célula vegetal se realizan ajustes en la expresión génica para mantener el metabolismo aún en la ausencia de oxígeno, a través de la fermentación. Los principales orquestadores de esta respuesta son los genes de la familia de los *ERFs*, de los cuales el gen *SUB1A* es el mejor caracterizado. A través de los *ERFs*, las plantas pueden medir la concentración de oxígeno y promover la transcripción de los principales genes de respuesta a hipoxia. Lo anterior ha permitido desarrollar aplicaciones biotecnológicas para obtener nuevas variedades de arroz tolerantes a la inundación y a la sequía. En el

futuro se espera que este entendimiento del manejo energético pueda expandirse a otras especies agrícolas y utilizarse en aplicaciones novedosas, como el mejoramiento de las propiedades de sacarificación de las plantas destinadas a la producción de biocombustibles.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Julia Bailey-Serres y al Dr. Takeshi Fukao, por compartir sus interesantes opiniones sobre el campo de la biología molecular del estrés por inundación. La investigación del autor es apoyada por los proyectos SEP-CONACyT (152643) y SEP-PROMEP (103.5/11/6720).

BIBLIOGRAFÍA

- Agroasemex, Aseguradora Agrícola Mexicana (2006)** La Experiencia Mexicana en el Desarrollo y Operación de Seguros Paramétricos Aplicados a la Agricultura. México. 42 p.
- Andrews D. L., D. M. MacAlpine, J. R. Johnson, P. M. Kelley, B. G. Cobb and M. C. Drew (1994)** Differential induction of mRNAs for the glycolytic and ethanolic fermentative pathways by hypoxia and anoxia in maize seedlings. *Plant Physiology* 106:1575-1582.
- Baena-González E., F. Rolland, J. M. Thevelein and J. Sheen (2007)** A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling. *Nature* 448:938-942.
- Bahaji A., J. Li, A. M. Sánchez-López, E. Baroja-Fernández, F. J. Muñoz, M. Ovecka, G. Almagro, M. Montero, I. Ezquer, E. Etxeberria and J. Pozueta-Romero (2013)** Starch biosynthesis, its regulation and biotechnological approaches to improve crop yields. *Biotechnology Advances* 32:87-106.
- Bailey-Serres J. and L. A. C. J. Voesenek (2008)** Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annual Reviews in Plant Biology* 59:313-339.
- Bailey-Serres J. and L. A. C. J. Voesenek (2010)** Life in the balance: a signaling network controlling survival of flooding. *Current Opinion in Plant Biology* 13:489-494.
- Bailey-Serres J., T. Fukao, D. J. Gibbs, M. J. Holdsworth, S. C. Lee, F. Licausi, P. Perata, L. A. C. J. Voesenek and J. T. van-Dongen (2012)** Making sense of low oxygen sensing. *Trends in Plant Science* 17:129-138.
- Bardening G. A., S. Béni, T. Fukao, J. Bailey-Serres and C. K. Larive (2013)** Comparison of GC-MS and NMR for metabolite profiling of rice subjected to submergence stress. *Journal of Proteome Research* 12:898-909.
- Bardening G. A., T. Fukao, S. Béni, J. Bailey-Serres and C. K. Larive (2012)** Differential metabolic regulation governed by the rice *SUB1A* gene during submergence stress and identification of alanylglucine by 1H NMR spectroscopy. *Journal of Proteome Research* 11:320-330.
- BEFSSP, Bio Energy and Food Safety Security Project (2010)** Bioenergy and Food Security. Food and Agriculture Organization. USA. 92 p.
- Bishopp A., A. P. Mahonen and Y. Helariutta (2006)** Signs of change: hormone receptors that regulate plant development. *Development* 133:1857-1869.
- Branco-Price C., K. A. Kaiser, C. J. H. Jang, C. K. Larive and J. Bailey-Serres (2008)** Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 56:743-755.
- Chuck G. S., C. Tobias, L. Sun, F. Kraemer, C. Li, D. Dibble, R. Arora, J. N. Bragg, J. P. Vogel, S. Singh, B. A. Simmons, M. Pauly and S. Hake (2011)** Overexpression of the maize *Corngrass1* microRNA prevents flowering, improves digestibility, and increases starch content of switchgrass. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:17550-17555.
- Chundawat S. P., G. T. Beckham, M. E. Himmel and B. E. Dale (2011)**

- Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annual Reviews in Chemical and Biomolecular Engineering* 2:121-145.
- Cotula L., D. Dyer and S. Vermeulen (2008)** Fuelling Exclusion? The Biofuels Boom and Poor People Access to Land. Ed. International Institute for Environment and Development. London, United Kingdom. 72 p.
- Darden L. and J. Tabery (2010)** Molecular biology. In: The Stanford Encyclopedia of Philosophy. Zalta E. N. (ed). Standford, USA.
- Delatte T. L., P. Sedjani, Y. Kondou, M. Matsui, G. J. de-Jong, G. W. Somsen, A. Wiese-Klinkenberg, L. F. Primavesi, M. J. Paul and H. Schluepmann (2011)** Growth arrest by trehalose-6-phosphate: an astonishing case of primary metabolite control over growth by way of the SnRK1 signaling pathway. *Plant Physiology* 157:160-174.
- FAO, Food and Agriculture Organization (2004)** Desarrollo sectorial agrícola. In: Tendencias y Desafíos en la Agricultura, los Montes y la Pesca en América Latina y el Caribe. Oficina regional para Latinoamérica y el Caribe. Santiago, Chile. pp:115-237.
- FAO, Food and Agriculture Organization (2013)** FAO Statistical Yearbook. Roma, Italia. Libro en línea. <http://bit.ly/16IBMNk>. (abril 2014).
- Fukao T., E. Yeung and J. Bailey-Serres (2011)** The submergence tolerance regulator *SUB1A* mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice. *The Plant Cell* 23:412-427.
- Fukao T., E. Yeung and J. Bailey-Serres (2012)** The submergence tolerance gene *SUB1A* delays leaf senescence under prolonged darkness through hormonal regulation in rice. *Plant Physiology* 160:1795-1807.
- Fukao T., T. Harris and J. Bailey-Serres (2008)** Evolutionary analysis of the *Sub1* gene cluster that confers submergence tolerance to domesticated rice. *Annals of Botany* 103:143-150.
- Fukao T., K. Xu, P. C. Ronald and J. Bailey-Serres (2006)** A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *The Plant Cell* 18:2021-2034.
- Gibbs D. J., S. C. Lee, N. M. Isa, S. Gramuglia, T. Fukao, G. W. Bassel, C. S. Correia, F. Corbineau, F. L. Theodoulou, J. Bailey-Serres and M. J. Holdsworth (2011)** Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature* 479:415-418.
- Gutiérrez-Bonilla L. A., F. Montfort y E. López (2006)** Impacto económico en el sector agrícola. In: Inundaciones 2005 en el Estado de Veracruz. A. Tejeda y C. Welsh (eds). Universidad Veracruzana, México. pp:135-158.
- Hattori Y., K. Nagai, S. Furukawa, X. J. Song, R. Kawano, H. Sakakibara, J. Wu, T. Matsumoto, A. Yoshimura, H. Kitano, M. Matsuoka, H. Mori and M. A. Ashikari (2009)** The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature* 460:1026-1030.
- Henry R. J. (2010)** Evaluation of plant biomass resources available for replacement of fossil oil. *Plant Biotechnology Journal* 8:288-293.
- Ismond K. P., R. Dolferus, M. De-Pauw, E. S. Dennis and A. G. Good (2003)** Enhanced low-oxygen survival in *Arabidopsis* through increased metabolic flux in the fermentative pathway. *Plant Physiology* 132:1292-1302.
- Jung K. H., Y. S. Seo, H. Walia, P. Cao, T. Fukao, P. E. Canlas, F. Amonpant, J. Bailey-Serres and P. C. Ronald (2010)** The submergence tolerance regulator *SUB1A* mediates stress-responsive expression of AP2/ERF transcription factors. *Plant Physiology* 152:1674-1692.
- Kelliher T. and V. Walbot (2014)** Maize germinal cell initials accommodate hypoxia and precociously express meiotic genes. *The Plant Journal* 77:639-652.
- Lakshmanan M., Z. Zhang, B. Mohanty, J. Y. Kwon, H. Y. Choi, H. J. Nam, D. I. Kim and D. Y. Lee (2013)** Elucidating rice cell metabolism under flooding and drought stresses using flux-based modeling and analysis. *Plant Physiology* 162:2140-2150.
- Lee K. W., P. W. Chen, C. A. Lu, S. Chen, T. H. D. Ho and S. M. Yu (2009)** Coordinated responses to oxygen and sugar deficiency allow rice seedlings to tolerate flooding. *Science Signaling* 2:1-9.
- Lee S. C., A. Mustroph, R. Sasidharan, D. Vashisth, O. Pedersen, T. Oosumi, L. A. C. J. Voesenek and J. Bailey-Serres (2011)** Molecular characterization of the submergence response of the *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *New Phytologist* 190:457-471.
- Licausi F., J. T. van-Dongen, B. Giuntoli, G. Novi, A. Santaniello, P. Geiingerberger and P. Perata (2010)** HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 62:302-315.
- Licausi F., M. Kosmacz, D. A. Weits, B. Giuntoli, F. M. Giorgi, L. A. C. J. Voesenek, P. Perata and J. T. van-Dongen (2011)** Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* 479:419-422.
- Liu F., T. VanToai, L. P. Moy, G. Bock, L. D. Linford and J. Quackenbush (2005)** Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 137:1115-1129.
- Min S. K., X. Zhang, F. W. Zwiers and G. C. Hegerl (2011)** Human contribution to more-intense precipitation extremes. *Nature* 470:378-381.
- Moldovan D., A. Spriggs, J. Yang, J. B. Pogson, E. S. Dennis and I. W. Wilson (2009)** Hypoxia-responsive microRNAs and trans-acting small interfering RNAs in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 61:165-177.
- Mustroph A., S. C. Lee, T. Oosumi, M. E. Zanetti, H. Yang, K. Ma, A. Yaghoubi-Masihi, T. Fukao and J. Bailey-Serres (2010)** Cross-kingdom comparison of transcriptomic adjustments to low oxygen stress highlights conserved and plant-specific responses. *Plant Physiology* 152:1484-1500.
- Nakano T., K. Suzuki, T. Fujimura and H. Shinshi (2006)** Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology* 140:411-432.
- Narsai R., K. A. Howell, A. Carroll, A. Ivanova, A. H. Millar and J. Whelan (2009)** Defining core metabolic and transcriptomic responses to oxygen availability in rice embryos and young seedlings. *Plant Physiology* 151:306-322.
- Narsai R. and J. Whelan (2013)** How unique is the low oxygen response? An analysis of the anaerobic response during germination and comparison with abiotic stress in rice and *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* 4:349.
- Niroula R. K., C. Pucciariello, V. T. Ho, G. Novi, T. Fukao and P. Perata (2012)** *SUB1A*-dependent and -independent mechanisms are involved in the flooding tolerance of wild rice species. *The Plant Journal* 72:282-293.
- Oropeza O. y C. Enríquez (2007)** Zonas susceptibles a inundaciones. NA-XIV-2. mapa escala 1:4,000,000. In: Proyecto Institucional: Nuevo Atlas Nacional de México. Instituto de Geografía, UNAM. México.
- Peña-Castro J. M., B. E. Barrera-Figueroa, L. Fernández-Linares, R. Ruiz-Medrano and B. Xoconostle-Cázares (2006)** Isolation and identification of up-regulated genes in bermudagrass roots (*Cynodon dactylon* L.) grown under petroleum hydrocarbon stress. *Plant Science* 170:724-731.
- Peña-Castro J. M., O. Gregorio-Ramírez y B. E. Barrera-Figueroa (2013)** Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación Química* 24:237-246.
- Peña-Castro J. M., M. van-Zanten, S. C. Lee, M. R. Patel, T. Fukao, L. A. C. J. Voesenek and J. Bailey-Serres (2011)** Expression of rice *SUB1A* and *SUB1C* transcription factors in *Arabidopsis* uncovers flowering inhibition as a submergence-tolerance mechanism. *The Plant Journal* 67:434-446.
- Pucciariello C. and P. Perata (2013)** Quiescence in rice submergence tolerance: an evolutionary hypothesis. *Trends in Plant Science* 18:377-381.
- Rosenzweig C., F. N. Tubiello, R. Goldberg, E. Mills and J. Bloomfield (2002)** Increased crop damage in the US from excess precipitation under climate change. *Global Environmental Change* 12:197-202.
- Saldaña-Zorrilla S. O. (2007)** Socioeconomic Vulnerability to Natural Disasters in Mexico: Rural Poor, Trade and Public Response. Comisión Económica para América Latina y el Caribe. México. 64 p.
- Saldaña-Zorrilla S. O. (2009)** Spatial econometric model of natural disasters impact on human migration in vulnerable regions of

- Mexico. *Disasters* 33:591-607.
- Septiningsih E. M., A. M. Pamplona, D. L. Sanchez, C. N. Neeraja, G. V. Vergara, S. Heuer, A. M. Ismail and D. J. Mackill (2009)** Development of submergence-tolerant rice cultivars: the *Sub1* locus and beyond. *Annals of Botany* 103:151-160.
- Septiningsih E. M., D. L. Sanchez, N. Singh, P. M. D. Sendon, A. M. Pamplona, S. Heuer and D. J. Mackill (2012)** Identifying novel QTLs for submergence tolerance in rice cultivars IR72 and Madabaru. *Theoretical and Applied Genetics* 124:867-874.
- Singh S., D. J. Mackill and A. M. Ismail (2009)** Responses of *SUB1* rice introgression lines to submergence in the field: yield and grain quality. *Field Crops Research* 113:12-23.
- Singh U. S., M. H. Dar, S. Singh, N. W. Zaidi, M. A. Bari, D. J. Mackill, B. C. Y. Collard, V. N. Singh, J. N. Reddy, R. K. Singh and A. M. Ismail (2013)** Field performance, dissemination, impact and tracking of submergence tolerant (*Sub1*) rice varieties in South Asia. *SABRAO. Journal of Breeding and Genetics* 45:112-131.
- Sorenson R. and J. Bailey-Serres (2014)** Selective mRNA sequestration by oligouridylate-binding protein 1 contributes to translational control during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:2373-2378.
- Tamang B. G., J. O. Magliozzi, M. A. S. Maroof and T. Fukao (2014)** Physiological and transcriptomic characterization of submergence and reoxygenation responses in soybean seedlings. *Plant, Cell and Environment*, En Prensa, doi: 10.1111/pce.12277.
- USDE, United States Department of Energy (2006)** Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol. United States Department of Energy, USA. 216 p.
- van-Veen H., A. Mustroph, G. A. Barding, M. Vergeer-van-Eijk, R. A. M. Welschen-Evertman, O. Pedersen, E. J. W. Visser, C. K. Larive, R. Pierik, J. Bailey-Serres, L. A. C. J. Voesenek and R. Sasidharan (2013)** Two *Rumex* species from contrasting hydrological niches regulate flooding tolerance through distinct mechanisms. *The Plant Cell* 25:4691-4707.
- Vanholme B., T. Desmet, F. Ronsse, K. Rabaey, F. Van-Breusegem, M. De-Mey, W. Soetaert and W. Boerjan (2013)** Towards a carbon-negative sustainable bio-based economy. *Frontiers in Plant Science* 4:174.
- Vashisht D., A. Hesselink, R. Pierik, J. M. Ammerlaan, J. Bailey-Serres, E. J. Visser, O. Pedersen, M. van-Zanten, D. Vreugdenhil, D. C. Jamar, L. A. C. J. Voesenek and S. Sasidharan (2011)** Natural variation of submergence tolerance among *Arabidopsis thaliana* accessions. *New Phytologist* 190:299-310.
- Voesenek L. A. C. J., T. D. Colmer, R. Pierik, F. F. Millenaar and A. J. M. Peeters (2006)** How plants cope with complete submergence. *New Phytologist* 170:213-226.
- Wahl V., J. Ponnus, A. Schlereth, S. Arrivault, T. Langenecker, A. Franke, R. Feil, J. E. Lunn, M. Stitt and M. Schmid (2013)** Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 339:704-70.
- Xu K. and D. J. Mackill (1996)** A major locus for submergence tolerance mapped on rice chromosome 9. *Molecular Breeding* 2:219-224.
- Xu K., X. Xu, T. Fukao, P. Canlas, R. Maghirang-Rodriguez, S. Heuer, A. M. Ismail, J. Bailey-Serres, P. C. Ronald and D. J. Mackill (2006)** *SUB1A* is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* 442:705-708.
- Yang L., M. Xu, Y. Koo, J. He and R. S. Poethig (2013)** Sugar promotes vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by repressing the expression of MIR156A and MIR156C. *eLife* 2:e002fs60.