



Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Área: Biología

Subárea: Bioquímica

Tesis de Maestría

**ANALISIS DE MARCADORES FUNCIONALES  
ASOCIADOS A LA EFICIENCIA EN EL USO DEL AGUA  
EN SOJA**

Lic. Esteban Casaretto

Orientador: Dr. Omar Borsani

Laboratorio de Bioquímica  
Facultad de Agronomía

2013

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mi tutor Omar por el apoyo en la realización de la tesis, y por incentivar-me a continuar con mi formación.

A Jorge por permitirme incorporarme al Laboratorio y por todo el apoyo.

A mis actuales compañeros y amigos del Laboratorio de Bioquímica, Santiago, Flor, Gastón, Máximo, Francisco, Pedro, Yolanda. A los que pasaron por el Laboratorio en algún momento como Susana, Soledad, Marianita, Danny y Leticia. A los que están volviendo, Martita y Mariana. A los que se fueron pero siguen bajando de Micro, Germán, Gastón y Pilar.

A Juan Pablo y Ana Paula del grupo de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias, con quienes realice parte de los ensayos.

A PEDECIBA por la oportunidad de formación.

A mis padres por todo.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>AO</b>	Ajuste osmótico
<b>AQPs</b>	Acuaporinas
<b>AR</b>	Agua retenida en el sustrato
<b>BHT</b>	Butil hidroxitolueno
<b>CE</b>	Conductancia estomática
<b>CIAP</b>	<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i>
<b>CRA</b>	Contenido relativo de agua
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>EUA</b>	Eficiencia del uso del agua
<b>GLP</b>	Acuagliceroporinas
<b>Km</b>	Kanamicina
<b>MCA</b>	Metanol-Cloroformo-Agua
<b>MIP</b>	<i>Major Intrinsic Proteins</i>
<b>MOPS</b>	Ácido 4-morpholinopropanesulfónico
<b>MMS</b>	Medio Murashige y Skoog
<b>MS</b>	Materia seca
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NIPs</b>	Proteínas intrínsecas tipo NOD26
<b>PA</b>	Parte aérea
<b>PDB</b>	<i>Pee Dee Belemnite</i>
<b>PF</b>	Peso fresco
<b>PS</b>	Peso seco
<b>Psat</b>	Peso saturado en agua
<b>PIP</b>	Proteínas intrínsecas de membrana plasmática
<b>Rf</b>	Rifampicina
<b>RP</b>	Rigaud y Puppo
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>TBARS</b>	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

<b>TIPs</b>	Proteínas intrínsecas de tonoplasto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SIP</b>	Proteínas intrínsecas básicas pequeñas
<b>SSH</b>	<i>Suppression Subtractive Hybridization</i>
<b>Wt</b>	<i>Wild type</i> – tipo salvaje
<b>XIP</b>	Proteínas intrínsecas X

**INDICE**

<b>INDICE</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
1. DÉFICIT HÍDRICO.....	7
2. PARÁMETROS ASOCIADOS A TOLERANCIA A DÉFICIT HÍDRICO EN SOJA .....	8
2.1. Marchitamiento lento y desarrollo radicular.....	8
2.2. Conductancia estomática y epidérmica .....	9
2.3. Eficiencia del Uso del Agua.....	12
2.4. Osmolitos Compatibles .....	13
2.5. Transporte de agua por acuaporinas .....	14
3. MEJORAMIENTO A DÉFICIT HÍDRICO EN SOJA .....	17
<b>OBJETIVOS</b> .....	20
1. OBJETIVO GENERAL .....	20
2. OBJETIVOS ... ..	20
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	21
1.1. Material vegetal .....	21
1.2. Bacterias y plásmidos.....	21

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO .....	22
2.1. Condiciones y medios de crecimiento de plantas .....	22
2.2. Condiciones y medios de crecimiento de bacterias .....	26
3. INDICADORES TEMPRANOS Y TARDÍOS Y PARAMETROS DE RESPUESTA A DÉFICIT HÍDRICO.....	27
3.1. Conductancia estomática y epidérmica.....	27
3.2. Potencial hídrico de hoja .....	27
3.3. Contenido relativo de agua .....	27
3.4. Extracción y cuantificación de prolina .....	28
3.5. Peróxidos de lípidos por TBARS .....	28
3.6. Identificación de genes inducibles por déficit hídrico.....	29
4. PARÁMETROS DE RESPUESTA EN DOS GENOTIPOS DE SOJA CONTRASTANTES AL DÉFICIT HÍDRICO .....	30
5. EFICIENCIA DEL USO DEL AGUA EN SOJA .....	31
6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE UN GEN DE ACUAPORINA.....	32
6.1. Extracción de ARN .....	32
6.2. Determinación de la concentración e integridad del ARN .....	33
6.3. Cuantificación de la expresión por Northern Blot .....	34
6.4. Cuantificación de la expresión por RT-qPCR .....	34
7. TRANSFORMACIÓN DE ARABIDOPSIS CON UN GEN DE ACUAPORINA DE SOJA.....	35
7.1. Amplificación del gen de interés .....	35
7.2. Electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa.....	36
7.3. Cuantificación y purificación de los productos de PCR .....	37
7.4. Digestión de ADN .....	37
7.5. Extracción de fragmentos de ADN del gel de agarosa.....	38

7.6. Ligación del gen de interés en el vector de entrada pEntr2B .....	38
7.7. Transformación de células de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con el producto de ligación.....	38
7.8. Identificación de células de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ transformadas con el gen de interés por Colony PCR .....	39
7.9. Extracción del plásmido por lisis alcalina .....	40
7.10. Recombinación del plásmido de entrada (pEntr2B + gen) con el plásmido de sobreexpresión pMDC45 .....	41
7.11. Transformación de células de agrobacterium con el plásmido de sobreexpresión recombinante .....	42
7.12. Transformación de arabisopsis mediada por agrobacterium por inmersión floral .....	43
8. EVALUACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS .....	46
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	47
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	48
1. INDICADORES TEMPRANOS Y TARDÍOS DE DÉFICIT HÍDRICO .....	48
2. RESPUESTAS TEMPRANAS Y TARDÍAS EN DOS GENOTIPOS DE SOJA CONTRASTANTES A DÉFICIT HIDRÍCO .....	51
3. EFICIENCIA DEL USO DEL AGUA EN LOS GENOTIPOS CONTRASTANTES. ....	53
4. IDENTIFICACIÓN DE UN GEN ASOCIADO A TOLERANCIA A DÉFICIT HÍDRICO .....	56
5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LA ACUAPORINA .....	56

6. EVALUACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LA ACUAPORINA DE SOJA MEDIANTE SOBREENPRESIÓN EN ARABIDOPSIS .....	58
6.1 Localizacion de la acuaporina en raíces.....	58
6.2 Respuesta a déficit hídrico mediada por acuaporina .....	59
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>63</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>64</b>

## **RESUMEN**

Las plantas se ven sometidas a condiciones ambientales desfavorables que son factores de estrés, frente a los cuales son capaces de responder a nivel fisiológico, bioquímico y molecular. El estrés puede ser biótico, si es causado por otros organismos o compuestos derivados de ellos, o abiótico si los factores que lo promueven son ambientales. Dentro de los estreses abióticos, el déficit hídrico provoca las mayores pérdidas en el rendimiento de los cultivos. Dependiendo de la duración y severidad del déficit hídrico se generan distintas respuestas, que pueden ser diferentes en genotipos tolerantes y sensibles a este tipo de estrés.

En este trabajo se realizó inicialmente una caracterización de las respuestas tempranas y tardías de soja al déficit hídrico. El cierre estomático fue la primera respuesta asociada con un déficit hídrico inicial, evidenciándose antes que otros síntomas visibles de estrés o la caída significativa de parámetros fisiológicos como el potencial hídrico o el contenido relativo de agua de las hojas. Por otro lado, la acumulación de prolina se presenta en condiciones de déficit hídrico tardío, en plantas que presentaban pérdida de turgencia y caída significativa del potencial hídrico y contenido relativo de agua en hojas.

Según los resultados obtenidos de la caracterización de respuestas tempranas y tardías a déficit hídrico, se evaluaron dos genotipos de soja contrastantes respecto a su tolerancia. Los resultados mostraron que los potenciales hídricos de hoja en condiciones de estrés, así como la conductancia estomática en condiciones control fueron menores en el genotipo tolerante respecto al sensible.

La eficiencia del uso del agua en condición control fue mayor en el genotipo sensible, que presentó mayor producción de biomasa asociada a una mayor conductancia estomática. En condición de déficit hídrico la eficiencia del uso del agua y la conductancia estomática disminuyeron en ambos genotipos, pero más en el sensible.

El análisis de expresión de una acuaporina, obtenida a partir de poblaciones de mRNA de plantas de soja sometidas a déficit hídrico y de plantas control, mostró en los genotipos contrastantes una mayor expresión en raíz respecto a hoja. En ambos genotipos la expresión de la acuaporina en raíz se incrementó en condiciones de estrés inicial, para descender en condiciones de estrés final.

La evaluación de plantas transgénicas de arabisopsis que sobreexpresan el gen de la acuaporina de soja, mostró que tienen mayor área foliar y conductancia estomática respecto a los genotipos salvajes de arabisopsis cuando el suministro de agua no es limitante. El mayor desarrollo del área foliar en las plantas que sobreexpresan la acuaporina podría estar explicado por el incremento del flujo de agua hacia la parte aérea. El mayor flujo de agua favorecería el incremento de la conductancia estomática a través de un aumento de la presión de vapor sobre la superficie foliar, lo que explicaría la menor temperatura foliar en las plantas transgénicas en condiciones no limitantes de agua. Sin embargo este mayor flujo de agua hacia la parte aérea parece tener un efecto negativo en condiciones de déficit hídrico, lo que se manifiesta en una mayor velocidad de pérdida de agua. A su vez, con microscopia confocal se localizó la acuaporina en raíces de plantas transformadas con GFP::ACUAPORINA, lo que mostró un claro incremento en la zona central de la raíz. Esta evidencia concuerda con la función asignada a estas moléculas, la cual se vuelve adversa en condiciones de déficit hídrico. La estrategia experimental utilizada en esta tesis, permitió generar información acerca de los procesos claves en la tolerancia a sequía en soja, además de suministrar herramientas metodológicas que facilitan la mejora de su tolerancia a déficit hídrico.

## **INTRODUCCIÓN**

### **1. DÉFICIT HÍDRICO**

Las plantas se encuentran sometidas a estreses bióticos y abióticos, que desencadenan un amplio rango de respuestas, que van desde variación de la expresión génica y cambios en el metabolismo, hasta las que afectan su tasa de crecimiento y disminuyen el rendimiento. Las respuestas se inician cuando la planta percibe el estrés a nivel celular, y se activan vías de transducción de señales que transmiten la información dentro de las células y a través de toda la planta. A su vez la duración y severidad del estrés, determinan la forma en que la planta va a responder. Cuando las condiciones adversas se combinan, se desencadenan respuestas distintas a la que daría cada tipo de estrés por separado (Bray et al., 2000).

El déficit hídrico es un factor abiótico importante, por los efectos negativos que tiene sobre el rendimiento de los cultivos a nivel mundial (Sharma y Lavanya, 2002). En días calurosos y soleados las plantas pueden presentar déficit hídrico, debido a que la velocidad de transpiración es mayor a la de absorción de agua. Esta situación genera un déficit hídrico que se conoce como déficit hídrico no aparente. Por otro lado, déficits hídricos a largo plazo, son provocados por una disminución de la disponibilidad de agua en el suelo.

Los mecanismos de resistencia al déficit hídrico en plantas se pueden agrupar en tres categorías: de escape, de evasión y de tolerancia. Los mecanismos de escape maximizan la capacidad de la planta para completar su ciclo de vida, antes de que ocurra un déficit hídrico grave. Este mecanismo consiste en un desarrollo fisiológico rápido como el inicio de floración y removilización de los asimilados desde pre-antesis hasta la formación de semillas. El mecanismo de evasión consiste en el mantenimiento del potencial hídrico relativamente alto en los tejidos, a pesar de la escasez de humedad del suelo. Las plantas que utilizan este mecanismo, mantienen la turgencia al

reducir la pérdida de agua mediante la disminución de la conductancia estomática, y el enrollado o plegado de las hojas lo que reduce la superficie de evaporación, también tienen mayor capacidad de absorción de agua al tener sistemas radiculares más profundos, y conductancias hidráulicas mayores. El mecanismo de tolerancia al déficit hídrico es la capacidad de las plantas de sobrevivir con bajos potenciales de agua en los tejidos e involucran el mantenimiento de la turgencia a través del ajuste osmótico, aumento de la plasticidad de las células y disminución del tamaño celular (Carrow, 1996).

Enfoques moleculares y genómicos han mostrado que los mecanismos de resistencia al déficit hídrico en plantas, incluyen la expresión de genes que responden específicamente al déficit hídrico (Liu y Baird, 2004; Hazen et al., 2005; Talamè et al., 2007). Las funciones de muchos genes se han asignado según la similitud de sus secuencias con proteínas de función conocida en diferentes especies. Algunos de ellos desempeñan un papel importante en la protección de las plantas al déficit hídrico, a través de la percepción del estrés, transducción de señales, redes de regulación transcripcional en la respuesta celular, o tolerancia a la deshidratación (Zhang et al., 2004; Nakashima y Yamaguchi-Shinozaki, 2006; Umezawa et al., 2006).

La tolerancia al déficit hídrico, si bien es genética, no es consecuencia de la acción de un gen específico sino que la capacidad de las plantas de soportar el estrés hídrico es una característica multigénica. Así, las rutas bioquímicas responsables de productos o procesos que mejoran la tolerancia en general, actúan aditivamente, y es posible que también sinérgicamente (Bohnert et al., 1995).

## **2. PARÁMETROS ASOCIADOS A TOLERANCIA A DÉFICIT HÍDRICO EN SOJA**

### **2.1. Marchitamiento lento y desarrollo radicular**

El marchitamiento de la canopia es el primer síntoma visible de déficit hídrico en soja, y existen diferencias entre genotipos sensibles y tolerantes en el momento del inicio y

gravedad del mismo (Sloane et al., 1990; Carter et al., 1999). Este parámetro ha sido utilizado como un rasgo que permite predecir tolerancia al déficit hídrico en soja (Charlson et al., 2009).

Otro rasgo particularmente importante en la respuesta a la sequía en plantas es el sistema radicular (Hoogenboom et al., 1987). Raíces más fibrosas tienen mayor superficie de absorción, y por ende son más eficientes en la absorción del agua disponible (Hudak y Patterson, 1995; Pantalone et al., 1996). Varias evidencias indican que un enraizamiento más profundo, es un mecanismo de resistencia a la sequía para genotipos tolerantes de soja, al relacionarse positivamente este carácter con el rendimiento en condiciones de déficit hídrico (Brown et al., 1985; Cortés y Sinclair, 1986; Hudak y Patterson, 1995).

En estudios de campo en condiciones de déficit hídrico, el genotipo de soja PI416937 de origen japonés y progenitores desconocidos, tuvo un marchitamiento más lento de la canopia que los cultivares de élite. Sus hojas mostraron potenciales hídricos más negativos, mayor turgencia, y mayor contenido relativo de agua (CRA), lo cual resultó en una reducción del rendimiento relativamente pequeño en comparación a las variedades élite evaluadas (King et al., 2009; Sloane et al., 1990). La morfología fibrosa de la raíz del genotipo PI416937, además de permitir una mayor exploración del suelo, le confiere la capacidad de continuar el crecimiento en suelos compactados (Busscher et al., 2000). Estas características radiculares y de tolerancia al déficit hídrico han determinado la utilización del genotipo PI416937 como uno de los progenitores en muchos programas de mejoramiento (Abdel-Haleem et al., 2011).

### **2.2. Conductancia estomática y epidérmica**

Al ser la conductancia estomática una variable clave en el intercambio de gases, entre ellos el vapor de agua, el cierre estomático es uno de los primeros eventos fisiológicos que ocurre en respuesta al déficit hídrico. La caída de la tasa fotosintética bajo condiciones de estrés hídrico medio y moderado, se debe mayormente a la

disminución de la difusión de CO<sub>2</sub> a través de los estomas, y no a una pérdida de la capacidad bioquímica de asimilar CO<sub>2</sub> (Flexas et al., 2004).

Los efectos del déficit hídrico sobre el crecimiento de las hojas, la conductancia estomática y las relaciones hídricas han sido bien estudiados en soja (Bennett et al., 1987; Ray y Sinclair, 1998). En esta leguminosa, se ha demostrado que el déficit hídrico disminuye la tasa relativa de expansión de las hojas, su turgencia y conductancia estomática, mientras que aumenta el contenido de ácido abscísico (ABA) en las hojas y el xilema (Liu et al., 2003). La disminución de la conductancia estomática coincide con un aumento de la concentración de ABA en el xilema y se produce antes que cualquier cambio significativo sea detectado en la turgencia de las hojas, lo que indica que las señales químicas como el ABA de origen radicular, controlan el comportamiento de los estomas bajo déficit hídrico moderado. La conductancia estomática disminuye exponencialmente con el aumento de la concentración de ABA en el xilema ( $r^2 = 0,98$ ) (Liu et al., 2003).

El control de la conductancia estomática en condiciones de déficit hídrico, es un rasgo fisiológico prometedor para el mejoramiento de la tolerancia al déficit hídrico, teniendo en cuenta el carácter no destructivo de la medición y la disponibilidad de instrumentos precisos para la determinación de la misma. Diferencias genotípicas en la capacidad de mantener los estomas abiertos, bajo condiciones de déficit hídrico, ya han sido reportadas en soja (Vignes et al., 1986). Sin embargo, una mejor comprensión de la herencia cuantitativa de este rasgo es fundamental para poder ser utilizado con este propósito (Manavalan et al., 2009).

La ventaja o desventaja relativa de un cierre estomático temprano, puede depender de la duración del estrés hídrico. Cultivares con un cierre estomático prematuro podrían ahorrar agua y aumentar sus posibilidades de supervivencia. Sin embargo, en un estrés a corto plazo estarían en desventaja, porque implicaría limitarles una potencial asimilación de carbono (Hufstetler et al., 2007).

La pérdida de vapor de agua foliar es la suma de la difusión a través de los estomas y de la cutícula, que ocurren simultáneamente (van Gardingen y Grace, 1992). Cuando los estomas están abiertos, la conductancia cuticular es una fracción menor de la conductancia total. Sin embargo, con escasez de agua o en adaptación a la oscuridad, los estomas se cierran, y la pérdida de agua a través de la cutícula puede exceder a la pérdida a través de los estomas (Boyer et al., 1997). Bajo condiciones severas de déficit hídrico el cierre de los estomas es máximo, y la conductancia cuticular determina la tasa de pérdida de agua de las hojas, y por lo tanto, la caída del contenido de agua. Las especies adaptadas a ambientes áridos tienden a tener baja conductancia cuticular (Riederer y Schreiber, 2001), y los cultivos o variedades con menor conductancia cuticular suelen ser los que sobreviven más tiempo en suelos con déficit severos de agua (Sinclair y Ludlow, 1986; Jovanovi et al., 1996).

Se ha reportado una correlación negativa significativa ( $R = -0.74$ ) entre la conductancia cuticular, y la eficiencia del uso del agua bajo condiciones de déficit hídrico, lo que apoya la hipótesis de que la reducción de la conductancia cuticular es un rasgo deseable para una mayor tolerancia a la sequía (Hufstetler et al., 2007).

Las diferencias en la cantidad de ceras cuticulares (Clark y Levitt, 1956; Blum, 1975), así como en su estructura y composición (Rama Das et al., 1979), se han propuesto para explicar las variaciones en la conductancia cuticular entre líneas con diferente tolerancia a sequía.

Entre los genotipos de soja, los adaptados a regiones tropicales exhiben las más bajas conductancias cuticulares, y los potenciales osmóticos más negativos, si se comparan con genotipos adaptados a regiones templadas, lo cual sugiere que la capacidad de adaptación de los genotipos tropicales podría haber resultado de la selección por supervivencia en ambientes más secos (James et al., 2008a).

### **2.3. Eficiencia del Uso del Agua**

La eficiencia del uso del agua (EUA) de una planta se define como la cantidad de biomasa producida por agua consumida. Variaciones en la EUA entre genotipos se han reportado para muchos cultivos, incluyendo soja (Mian et al., 1996). La correlación positiva entre la EUA y la producción de biomasa total en ambientes con déficit hídrico, sugiere que una mejor EUA puede resultar en un rendimiento superior bajo estas condiciones (Wright, 1996). Generalmente una mayor EUA se ha asociado a genotipos con mayor reducción de la conductancia estomática promedio, bajo cierto nivel de déficit hídrico (Liu et al., 2005). Esta disminución de la conductancia estomática puede ocurrir a diferentes contenidos de agua, dependiendo de la especie (Earl, 2003). Otro parámetro asociado a cultivares con mayor EUA bajo condiciones de déficit hídrico es la menor conductancia epidérmica (Hufstetler et al., 2007).

La EUA también puede ser evaluada mediante la relación isotópica del carbono presente en los tejidos. En la naturaleza existen dos isótopos estables del carbono, el  $^{12}\text{C}$  (6 neutrones y 6 protones) y el  $^{13}\text{C}$  (6 protones y 7 neutrones). El primero, es el isótopo más abundante, 98,89 %, mientras que el segundo tiene una abundancia natural de 1,11%. Cuando estos isótopos del C forman el  $\text{CO}_2$ , dan lugar al  $^{12}\text{CO}_2$  y  $^{13}\text{CO}_2$  (liviano y pesado respectivamente) que se comportan diferente en ciertos procesos físicos y bioquímicos. En el caso de las plantas C3 existe una discriminación física al momento de difundir el  $\text{CO}_2$  hacia el interior de la hoja, dado que el  $^{13}\text{CO}_2$  difunde en forma mas lenta que el  $^{12}\text{CO}_2$ . Por otro lado, en la fijación del  $\text{CO}_2$  la Rubisco discrimina fuertemente en contra del  $^{13}\text{CO}_2$  cuando hay disponibilidad de  $^{12}\text{CO}_2$ , es decir cuando los estomas están completamente abiertos (Schlesinger., 1997). Sin embargo, esta discriminación es menor cuando los estomas se cierran, ya que la planta debe usar el  $\text{CO}_2$  disponible contenido en el interior de la hoja.

Debido a que el mecanismo de apertura y cierre estomático es una respuesta al estado hídrico de la planta, la discriminación isotópica del carbono puede representar a mediano y largo plazo un índice confiable del historial del estado hídrico y grado de

apertura estomática (Dupouey et al., 1993). De esta forma, mientras que los valores de conductancia estomática son resultados de una medición en un momento dado, los valores de discriminación isotópica son acumulativos del periodo de evaluación, lo cual da una visión global del movimiento estomático durante la etapa de desarrollo vegetativo evaluada. Así los tejidos vegetales estarán más enriquecidos en  $^{13}\text{CO}_2$  si los periodos con los estomas cerrados son más largos y frecuentes.

#### **2.4. Osmolitos compatibles**

El ajuste osmótico (AO), se define como la acumulación activa de solutos en el citosol de células vegetales, en respuesta al déficit hídrico. Los osmolitos compatibles, son sustancias que se acumulan e impiden la disminución del potencial hídrico, sin interferir con el funcionamiento celular incluso a altas concentraciones. Estas moléculas por lo general no presentan carga neta a pH neutro, y tienen una elevada solubilidad en agua. Se ha demostrado que los osmolitos permiten mantener la conductancia estomática y la fotosíntesis con potenciales de agua bajos, retardan la senescencia y muerte de las hojas, reducen el aborto floral, mejoran el crecimiento de la raíz, y aumentan la extracción de agua del suelo cuando la misma comienza a faltar (Turner et al., 2001).

Existe una amplia variedad de osmolitos compatibles, como algunos oligosacáridos (raffinosa, sacarosa, trehalosa y sorbitol), polioles (manitol), y moléculas nitrogenadas (glicín betaína, poliaminas y prolina), (Umezawa et al., 2006; Seki et al., 2007).

La acumulación de prolina a partir de síntesis *de novo*, es una respuesta común en una amplia variedad de organismos frente a distintos tipos de estrés, entre ellos el déficit hídrico. Por esto se ha propuesto que puede contribuir con el mantenimiento del potencial hídrico celular. Pero su actividad como osmolito compatible no ha sido confirmada. Es probable que la acumulación de prolina haya permanecido como un mecanismo de respuesta al estrés presente desde las bacterias hasta las plantas,

debido a sus múltiples funciones relacionadas con la protección ante tal situación (Samaras et al., 1995).

En siete genotipos de soja se observó una alta correlación ( $r = 0.98$ ) entre la caída del CRA y el AO. Los genotipos con altos potenciales osmóticos fueron los que mostraron una caída mas leve del CRA, lo que indicaría la capacidad de mantener la turgencia por periodos mas largos (James et al., 2008b).

### **2.5. Transporte de agua mediada por acuaporinas**

Existen dos vías para el flujo osmótico del agua entre los tejidos de las plantas: la vía apoplástica, conformada por los espacios intercelulares y el xilema, y la vía simplástica conformada por el continuo citoplasmático y la vacuola (transporte a través de membranas y plasmodesmos). El agua se mueve permanentemente, utilizando de forma simultánea las dos vías. La vía más utilizada depende de la especie, el órgano y la condición fisiológica de la planta (Chrispeels y Maurel, 1994).

El transporte por la vía apoplástica es impulsado por fuerzas físicas, y está regulado principalmente por las diferencias en el potencial hídrico entre el suelo, la planta y la atmósfera (Munns, 1993; Maurel, 1997), lo que determina que esta vía esté acoplada a la tasa transpiratoria (Steudle y Frensch, 1996).

En plantas bajo condición de sequía, cuando los estomas se cierran y la tasa transpiratoria disminuye para evitar la pérdida de agua, la vía simplástica dominaría el transporte de agua (Steudle y Peterson, 1998; Steudle, 2000). A nivel celular, la mayor parte de los estudios sobre las respuestas de las plantas al déficit hídrico, se llevaron a cabo desde el punto de vista del ajuste osmótico (Bray, 1997), mientras que al flujo de agua a través de las membranas se le prestó menos atención. Se asumía que el agua pasaba a través de las membranas; sin embargo a partir del descubrimiento de las acuaporinas vegetales, fue ampliamente aceptado que este pasaje estaba regulado biológicamente y que estas proteínas están involucradas en el transporte y la

absorción de agua en las plantas. Las acuaporinas pueden aumentar el transporte de agua a través de las membranas en un factor aproximado de 10 veces (en un rango de 0 a 30) (Maurel, 1997; Tyerman et. al., 1999).

Las acuaporinas son pequeñas proteínas intrínsecas de membrana (24-30 kDa), pertenecientes a la familia de las Major Intrinsic Proteins (MIP), caracterizadas por tener 6 hélices transmembrana que permiten el pasaje selectivo del agua y otras moléculas pequeñas sin carga. Proteínas relacionadas con las acuaporinas se encuentran en todos los organismos, desde las arqueas hasta los mamíferos y numerosas “isoformas” se han detectado tanto en organismos uni como multicelulares. Algunas acuaporinas son expresadas constitutivamente, mientras que otras están controladas en tejidos específicos o por las condiciones ambientales (Alexandersson et al., 2005; Boursiac et al., 2005 ).

En base a los resultados de secuenciación y en la caracterización funcional, la familia MIP se dividió en acuaporinas (AQPs), que son estrictamente selectivas de agua y acuagliceroporinas (GLP) transportadoras de pequeñas moléculas como glicerol y urea, además de agua (Heymann y Engel, 1999; Zardoya, 2005).

Los genes MIP son particularmente abundantes en plantas, donde presentan una mayor diversidad funcional, lo cual se atribuye al mayor grado de compartimentación de las células vegetales, y a su mayor necesidad de ajustar el control del movimiento del agua (Johanson et al., 2001).

Las acuaporinas vegetales forman cinco grupos principales: proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIP), proteínas intrínsecas de tonoplasto (TIPs), proteínas intrínsecas tipo NOD26 (NIPs), donde NOD26 es una acuaporina descubierta en la membrana peribacteroidea de nódulos de raíces de soja, proteínas intrínsecas básicas pequeñas (SIP), y las últimas en identificarse, las proteínas intrínsecas X (XIP),

encontradas ampliamente en musgos, hongos y plantas dicotiledóneas, pero sin una caracterización funcional (Danielson y Johanson, 2008).

La subfamilia PIP se puede subdividir en dos grupos, PIP1 y PIP2, los cuales difieren en la longitud de sus extremos amino y carboxilo, el extremo amino es más largo en las proteínas PIP1. En general las PIP1 presentan poca o ninguna actividad como canal de agua *in vitro*, mientras que las PIP2 muestran alta permeabilidad al agua cuando se expresan en oocitos de *Xenopus laevis* (Chaumont et al., 2000). Las SIP son las acuaporinas más divergentes en plantas, donde muestran una alta diversidad, incluso dentro de la subfamilia, y han sido localizadas en membranas del retículo endoplásmico (Ishikawa et al., 2005). Las NIPs, fueron encontradas inicialmente en la membrana peribacteroidal de nódulos de raíces de leguminosas (Sandal y Marcker, 1988), y estudios con inhibidores sugieren que las NIPs están involucradas en la permeabilidad del NH<sub>3</sub> (Niemiety y Tyerman, 2000) y en el intercambio de nutrientes entre la planta huésped y la bacteria endosimbiótica.

La primera evidencia de una participación de las proteínas PIP en la absorción y en el transporte de agua celular en vegetales se obtuvo a partir de plantas que expresaban ARN antisentido para esas proteínas, que desarrollaron un sistema radicular mayor que las control (Kaldenhoff et al., 1998). Esto parece ser consecuencia de un efecto compensatorio de la baja expresión de acuaporinas de membrana plasmática, que reducen la permeabilidad de algunas células. Estudios en plantas con una expresión alterada de dos acuaporinas (PIP1 y PIP2), demostró que estas proteínas son importantes en la recuperación de las mismas después de un periodo de déficit hídrico (Martre et al., 2002). Además, plantas con una expresión alterada de la acuaporina PIP1, mostraron diferencias, no sólo en el transporte de agua (Siefritz et al., 2002) sino también en procesos limitados por CO<sub>2</sub> como la fotosíntesis y la conductancia estomática (Uehlein et al., 2003).

Una disminución de la conductancia de CO<sub>2</sub> en el mesófilo, luego del tratamiento con HgCl<sub>2</sub>, inhibidor inespecífico de acuaporinas, fue una de las primeras evidencias en sugerir la capacidad de las acuaporinas de transportar CO<sub>2</sub> (Terashima y Ono, 2002). La primera evidencia directa de esta habilidad se constató con la acuaporina de tabaco (NtAQP1) expresada en ovocitos de *Xenopus* (Uehlein et al., 2003). Estos autores también indujeron la expresión de NtAQP1 en plantas de tabaco y reportaron aumentos significativos en la tasa de fotosíntesis, la apertura de estomas, y la tasa de crecimiento de la hoja. El papel de NtAQP1 en el mecanismo fotosintético se ha informado en plantas de tabaco con sobreexpresión de NtAQP1, que mostraron un aumento del 20 % en la tasa de fotosíntesis en relación a los controles, mientras que plantas con *NtAQP1* antisentido mostraron una disminución de la tasa fotosintética del 13 % (Flexas et al., 2006).

Trabajos de Sade et al., (2010) revelaron actividades independientes pero estrechamente relacionadas en raíces y hojas de plantas transgénicas de tomate y *arabidopsis* con expresión constitutiva de NtAQP1, bajo condiciones control y de estrés salino. Esta doble actividad mejora la EUA mediante la combinación de tres rasgos independiente pero complementarios: aumento de la permeabilidad del mesófilo al CO<sub>2</sub>, lo que resulta en un aumento de la tasa fotosintética, aumento de la apertura de los estomas, y mantenimiento de la conductividad hidráulica de la raíz casi constante, lo cual previene fallas hidráulicas bajo altas tensiones del xilema. Esta estrategia no sería eficiente con un estrés hídrico severo.

### **3. MEJORAMIENTO A DÉFICIT HÍDRICO EN SOJA**

La soja [*Glycine max* (L.) Merril.] pertenece a la familia Fabaceae, subfamilia Papilionoideas. Originaria de China, se ha convertido en uno de los principales cultivos a nivel mundial, debido a su alto contenido de proteína (40%), aceites (20%) y calidad nutritiva (Thuzar et al., 2010). Las proteínas de soja son nutricionalmente equivalentes a las de la carne y el huevo, a excepción de su deficiencia en aminoácidos azufrados,

especialmente metionina (Young, 1991). También es rica en metabolitos fisiológicamente activos tales como isoflavonas, lecitinas, tocoferoles y saponinas (Sugano, 2005).

Su producción se ha expandido a todos los continentes poblados, incluyendo los de climas cálidos caracterizados por altas temperaturas y escasas o irregulares precipitaciones (Thuzar et al., 2010). Dependiendo de las características híbridas, la soja usa cerca de 450-700 mm (litros/m<sup>2</sup>) diarios de agua durante el periodo de crecimiento (Dogan et al., 2007). Bajo condiciones de déficit hídrico, se ve afectada su producción de semillas como producto final (Korte et al., 1983; Dornbos y Mullen, 1992) reduciendo el rendimiento hasta un 40% (Specht et al., 1999).

Para el desarrollo de variedades de alto rendimiento en condiciones de déficit hídrico, el criterio más ampliamente empleado ha sido el de la selección directa por estabilidad del rendimiento en varias localidades. Sin embargo los avances en mejorar la resistencia al déficit hídrico han sido lentos por una serie de razones: i) La identificación de líneas con mayores potenciales de rendimiento se ha realizado en condiciones de humedad óptima. Por el contrario, la evaluación de líneas en ambientes de bajo rendimiento y condición de déficit hídrico no se han considerado, porque las diferencias de rendimiento entre ellas es pequeñas, y no se discriminan los genotipos de alto y bajo rendimiento. ii) Históricamente, el énfasis en el mejoramiento del cultivo de soja se centró en la resistencia al estrés biótico, en lugar del estrés abiótico como el déficit hídrico, debido a la complejidad de su evaluación. Esto dio lugar a una estrecha base genética para iniciar programas de mejoramiento de tolerancia al déficit hídrico. iii) La resistencia al déficit hídrico se rige por varios factores, incluyendo el genotipo, el medio ambiente y la interacción de ambos (Carter et al., 1999).

La estrategia alternativa de selección indirecta por rasgos secundarios ha tenido éxito sólo en unos pocos cultivos, debido a problemas de repetibilidad y a la falta de

estrategias de fenotipado, especialmente para los rasgos relacionados con la raíz. Se han dirigido grandes esfuerzos hacia la identificación de rasgos asociados con tolerancia al déficit hídrico en soja. Con la disponibilidad de la totalidad de su genoma secuenciado, de mapas físicos, herramientas de genética y genómica funcional, enfoques integrados que utilizan mejoramiento molecular e ingeniería genética, se abren nuevas oportunidades para mejorar la tolerancia al déficit hídrico en soja (Manavalan et al., 2009).

A principios de 2010 se publicó el primer genoma ordenado de un cultivo de referencia de soja (Schmutz et al., 2010), lo cual fue seguido por la re-secuenciación de varios genomas de sojas silvestres y domesticadas (Lam et al., 2010). La disponibilidad de estos datos genómicos permitió iniciar rápidos e intensos estudios comparativos de genómica funcional (Ching Chang et al., 2012). El análisis de genética de poblaciones usando los datos de secuenciación de genomas completos, demostraron que las sojas silvestres poseen una mayor diversidad genética respecto a las sojas domesticadas, lo cual apoya la idea de que estos germoplasmas son una fuente importante de nuevos genes o alelos para los programas de mejoramiento (Jackson et al., 2011; Lam et al., 2010; Stupar, 2010).

A pesar de los grandes avances en la comprensión de la fisiología, bioquímica y genética molecular de las respuestas de las plantas al déficit hídrico, y al número creciente de trabajos acerca de los factores que contribuyen a mejorar las tasas de desarrollo y crecimiento (Herve y Serraj, 2009), estos han tenido poco éxito en la mejora de la producción de las plantas (Passioura, 2010).

## **OBJETIVOS**

### **1. OBJETIVO GENERAL**

Analizar los mecanismos de tolerancia/sensibilidad a sequía en soja, a través de la identificación de marcadores funcionales asociados a la eficiencia del uso del agua.

### **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

A partir de la previa identificación de parámetros fisiológicos y bioquímicos asociados a respuestas tempranas y tardías a sequía, se plantean los siguientes objetivos:

**2.1.** Identificar respuestas bioquímicas y fisiológicas en cultivares de soja con diferente tolerancia a sequía.

**2.2.** Establecer parámetros bioquímicos y genéticos asociados a la eficiencia en el uso del agua en genotipos tolerantes y sensibles.

**2.3.** Analizar funcionalmente un gen relacionado al uso del agua, mediante su sobreexpresión del mismo en plantas de arabidopsis.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. MATERIAL BIOLÓGICO**

#### **1.1. Material vegetal**

La determinación de indicadores tempranos y tardíos de déficit hídrico se realizó en *Glycine max* (soja) genotipo INIA Andrea 60. Para la caracterización de las respuestas tempranas y tardías a déficit hídrico y para determinar la eficiencia del uso del agua (EUA) se usaron genotipos contrastantes en su estabilidad de rendimiento bajo condiciones de déficit hídrico, el N7001 tolerante a déficit hídrico (derivado de la selección F4 de la cruce de la línea de reproducción USDA-ARS, N77-114 y PI 416937) y TJ2049 catalogado como sensible a déficit hídrico.

Para la transformación y sobreexpresión génica se usó *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia. Los mutantes *knock-out* de arábidoopsis (T-DNA) en el gen homólogo fueron obtenidos de la colección del SALK Institute (USA).

#### **1.2. Bacterias y plásmidos**

Para la multiplicación de plásmidos se utilizó *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$ , y para la transformación de arábidoopsis, *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101, resistente a rifampicina.

El clonado de genes se realizó mediante el plásmido de entrada pEntr2B (Invitrogen Co. USA). Para la sobreexpresión constitutiva de genes se usó el plásmido pMDC45 el cual presenta un promotor 2X35S y permite la fusión de GFP al extremo C terminal (Curtis y Grossniklaus, 2003). Los mapas de los plásmidos se representan en la figura 1.

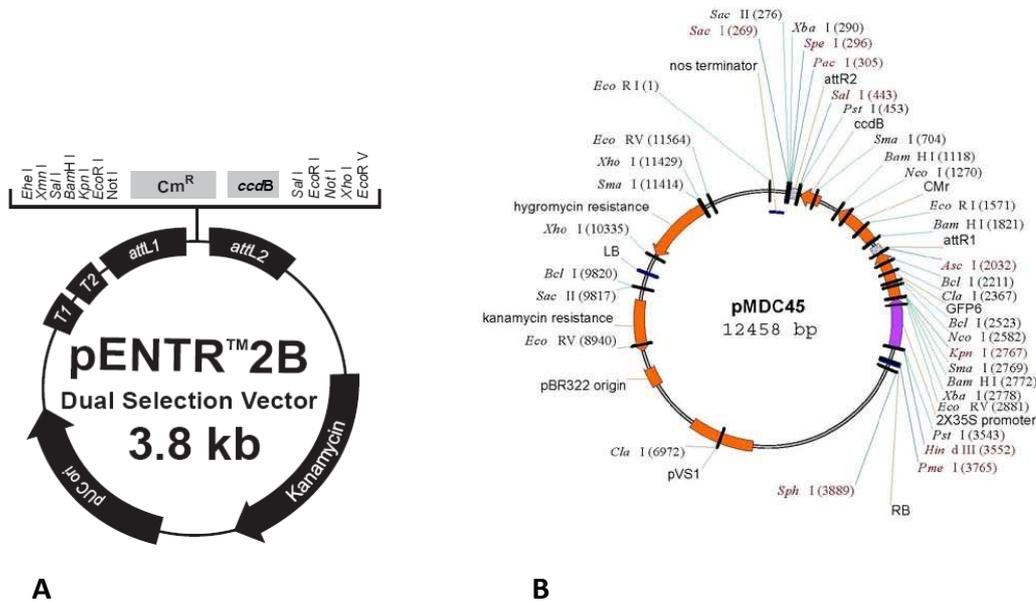


Figura 1. Esquema de los plásmidos usados. **A.** pEntr2B (Invitrogen Co. USA), **B.** pMDC45 (Curtis y Grossniklaus, 2003).

## 2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

### 2.1. Condiciones y medios de crecimiento de plantas

#### Soja

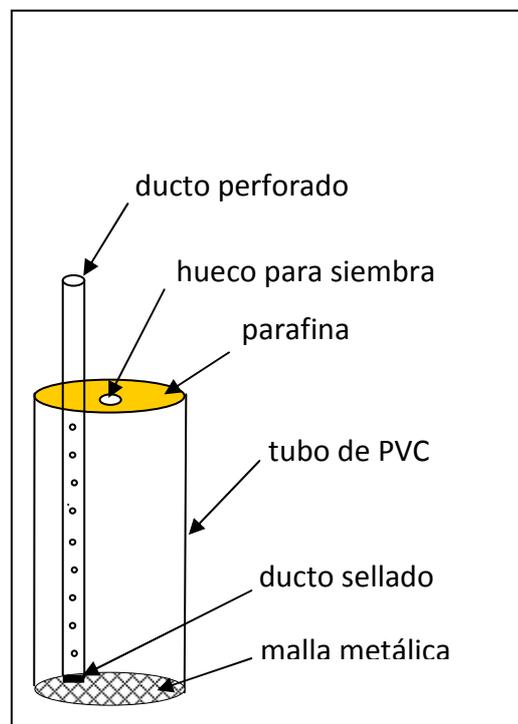
Las plantas de soja se crecieron en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16/8 h (luz/oscuridad), con 30°C/20°C (día/noche) y una radiación de 800  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ , que se alcanzaron con el uso de lámparas de halogenuro metálico (400 W) y lámparas de sodio (70 W). Además, la cámara de crecimiento contaba con suplemento de luz natural para complementar la demanda lumínica de la soja.

Los dispositivos de crecimiento (fig. 2) consistieron en caños de PVC, de 11 cm de diámetro por 30 cm de alto, cerrados en su extremo inferior con una malla metálica. Este dispositivo permitió el crecimiento y desarrollo de la planta por 40 días, sin observarse interferencias en el desarrollo radicular.

Como sustrato para el crecimiento se utilizó una mezcla de arena vermiculita en una relación 1:1. Las plantas se regaron diariamente con medio RP (Rigaud y Puppo, 1975), suplementado con  $\text{KNO}_3$  10 mM, hasta la máxima capacidad de retención de líquido del sustrato, (cuadro 1). El riego se realizó a través de ductos que recorrían toda la longitud de los dispositivos de crecimiento (fig. 2). Estos ductos de 3 cm de diámetro se sellaron en el extremo inferior y perforaron para permitir una distribución homogénea de la solución nutritiva en todo el perfil del sustrato.

Para llevar el sustrato a su máxima capacidad de retención de agua se agregó agua en exceso a cada dispositivo, y se dejó escurrir el excedente de agua por 24 h. Se determinó el volumen de agua retenido, y sobre ese volumen se refirió el porcentaje de agua perdida.

Para determinar la EUA, la superficie de cada cilindro se cubrió con una capa de 5 a 10 mm de parafina para evitar la evapotranspiración del sustrato.



**Figura 2.** Dispositivo para el crecimiento de soja.

**Cuadro 1.** Composición del Medio RP

<u>Macronutrientes</u>	<u>mg/L</u>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	200
KCl	200
CaSO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	120
Na <sub>2</sub> FeEDTA	25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	4
KNO <sub>3</sub>	1010 (se agregó como fuente de nitrógeno)

<u>Micronutrientes</u>	<u>mg/L</u>
MnSO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	2.2
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	2.4
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2.9
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.8

### **Arabidopsis**

Las plantas de arabidopsis se crecieron en macetas de 300 mL con turba KEKKILÄ® como sustrato y se regó con agua corriente. Previo a la siembra las semillas se colocaron a 4°C por 24 h para romper la dormancia. Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16/8 h (luz/oscuridad), a 23°C/20°C (día/noche) y una radiación de 50  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ . Las plantas utilizadas en la transformación con agrobacterium por el método de inmersión floral (Clough y Bent, 1998), se crecieron con un fotoperíodo de 8/16 h (luz/oscuridad) para evitar la inducción de la floración y obtener un mejor desarrollo vegetativo. Luego de 40 días de crecimiento el fotoperíodo se cambió a 16/8 h (luz/oscuridad) para inducir la floración y proceder a la transformación.

Para los ensayos en placa de Petri las semillas se esterilizaron en tubos de microcentrífuga agregando etanol 70 % (v/v) por 2 min con agitación constante. El etanol se retiró y se enjuagó con agua estéril, se añadió hipoclorito de sodio comercial al 20 % (v/v) y se incubó por 5 min. en agitación constante. Se retiró la solución de hipoclorito de sodio y las semillas se lavaron 5 veces con agua estéril. Las semillas se incubaron en agua estéril por 24 h a 4°C y después se sembraron en placas de Petri de 14 cm de diámetro con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (Cuadro 2). Las plántulas se crecieron por 15 días en estas condiciones.

**Cuadro 2.** Composición del medio MS

<u>Macronutrientes</u>	<u>mg/L</u>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1640
KNO <sub>3</sub>	1900
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
CaCl <sub>2</sub>	440
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370

<u>Micronutrientes</u>	<u>mg/L</u>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.0
CoCl <sub>2</sub>	0.023
CuSO <sub>4</sub>	1.6
Na <sub>2</sub> EDTA	37.2
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27.8
KI	0.83
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	15.1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.24
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8.6

El pH se ajustó a 5.7.

El medio sólido se preparó añadiendo 7 g/L de agar y se suplemento con 5 g/L de sacarosa

## 2.2. Condiciones y medios de crecimiento de bacterias

*E. coli* y *agrobacterium* se crecieron en medio LB (Sambrook et al., 1989), (Cuadro 3). Cuando las bacterias portaban genes de resistencia a uno o varios antibióticos, estos se añadieron al medio estéril en las concentraciones finales que aparecen en el cuadro 4.

**Cuadro 3.** Composición del medio LB

<u>Componentes</u>	<u>g/L</u>
NaCl	10
Bacto-triptona	10
Extracto de levadura	5

El medio sólido se preparó añadiendo 16 g/L de agar.

**Cuadro 4.** Concentración de los antibióticos

<u>Antibiótico</u>	<u>Concentración de la solución stock (mg/mL)</u>	<u>Concentración final (µg/mL)</u>
Kanamicina (Km)	50	50
Rifampicina (Rf)	50	50

La Km y Rf se disolvieron en agua destilada y en metanol respectivamente, y se esterilizaron por filtración (0.45 µM). Las soluciones stock se conservaron a – 20 °C.

### **3. INDICADORES TEMPRANOS Y TARDÍOS Y PARAMETROS DE RESPUESTA A DÉFICIT HÍDRICO**

El tratamiento de déficit hídrico se indujo mediante la suspensión del riego a plantas en estado vegetativo V4, crecidas previamente en un sustrato a su máxima capacidad de retención de agua (100 %). A partir de la suspensión del riego, y durante 7 días, se realizaron determinaciones diarias del contenido de agua en el sustrato, conductancia estomática, potencial hídrico, CRA en hojas y acumulación de prolina. Los parámetros evaluados se describen a continuación.

#### **3.1. Conductancia estomática y epidérmica**

La conductancia estomática se determinó con un Porómetro Modelo SC-1 (Decagon Device, Inc) sobre la cara abaxial de la tercera hoja trifoliada luego de 6 h de encendida la luz, siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada medición se realizó por quintuplicado.

La conductancia epidérmica se estimó a través de los cambios en el contenido relativo de agua (CRA) de plantas sometidas a oscuridad por 48 h para asegurar el cierre estomático total, atenuando el ciclo circadiano de apertura y cierre. El CRA se determinó diariamente como se describe en el ítem 3.3.

#### **3.2. Potencial hídrico de hoja**

El potencial hídrico de hoja ( $\Psi_H$ ) se determinó con una Bomba de Presión tipo Sholander, Modelo 600 (PMS Instrument Company) sobre la tercer hoja trifoliada luego de determinada la conductancia estomática, según las instrucciones del fabricante.

#### **3.3. Contenido relativo de agua**

El contenido relativo de agua (CRA) se determinó según Antolín et al (1995). Para esto se determinó el peso fresco (PF) de la tercer hoja trifoliada, separada en sus tres folíolos, y se colocaron en placas de Petri de 14 cm con agua destilada a temperatura

ambiente durante 12 h, determinándose el peso saturado (Psat). Las muestras se secaron en estufa a 105°C hasta peso constante y se determinó el peso seco (PS). El CRA se calculó como:

$$\text{CRA} : [(PF - PS) / (Psat - PS)] \times 100$$

### **3.4. Extracción y cuantificación de prolina**

La extracción de prolina se realizó por quintuplicado según Charest y Phan (1990). Se maceraron 10 mg de muestra en 1 mL de una mezcla de metanol-cloroformo-agua (MCA, 12:5:1). El homogenado se centrifugó a 5.000 x g por 2 min a temperatura ambiente, y se recogió el sobrenadante en otro tubo. Se adicionó 250 µL de cloroformo, 375 µL de agua y se centrifugó a 5000 x g por 1 min. La fase superior (acuosa) se utilizó para la determinación de prolina.

La prolina se cuantificó según Troll y Lindsley (1955). A la fase acuosa que contenía la prolina se le agregó 1 mL de ácido acético y 1 mL de reactivo de ninhidrina ácida consistente en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 6 M; ácido acético 12.6 M y ninhidrina 0.14 M. Los tubos tapados se calentaron en baño de agua a 90°C durante 1 h y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se adicionó a cada tubo 1 mL de tolueno, se agitó vigorosamente durante 3 min y se dejó decantar hasta la formación de dos fases (aproximadamente 12 h). Para cuantificar la prolina se tomaron muestras de la fase superior y se leyó la absorbancia a 515 nm. Como estándar se usó L-prolina.

### **3.5. Peróxidos de lípidos por TBARS**

Los lípidos peroxidados se determinaron a través de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) según Minotti y Aust (1987). Se maceraron en frío 100 mg de hojas con 1 mL de ácido metafosfórico al 5 % (p/v) y 20 µL de butil hidroxitolueno (BHT) al 2 % (p/v) disuelto en etanol. El homogeneizado se centrifugó a 15.000 x g por 20 min a 4°C. Para el desarrollo del cromógeno se mezclaron 0.5 mL del sobrenadante con 50 µL de BHT al 2 %, 250 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1 % (p/v) disuelto en

NaOH 50 mM, y 250  $\mu$ L de HCl al 25 % (v/v). La mezcla se incubó a 95°C durante 30 min. Para la cuantificación de los TBARS, el cromógeno fue extraído agregando 1.5 mL de n-butanol. Los tubos se agitaron y se separó la fase orgánica mediante centrifugación a 2.000 x *g* durante 2 min. Se determinó la absorbancia a 532 nm y se restó la absorbancia inespecífica a 600 nm. La concentración de peróxidos de lípidos se realizó según Rusterucci et al (1996) y se expresó como la cantidad de malondialdehído formado ( $\epsilon_{532} = 156 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### **3.6. Identificación de genes inducibles por déficit hídrico**

La identificación de genes inducibles por déficit hídrico se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias de la UdelaR, como parte del proyecto BiotecSur Soja.

Para comparar las poblaciones de mRNA de plantas sometidas a déficit hídrico y plantas control se utilizó el Clontech PCR-Select cDNA Substraction kit (Clontech, Paso Alto, CA). Con este procedimiento fue posible sustraer secuencias diferencialmente expresadas entre ambas poblaciones (Diatchenko et al., 1996; Gurskaya et al., 1996). El genotipo contrastante utilizado para la realización de la biblioteca SSH (Suppression Subtractive Hybridization) fue el N7001. Para la misma se utilizaron simultáneamente poblaciones de ARNm correspondientes a estadios iniciales y finales de estrés, por lo tanto los genes representados en la biblioteca corresponden tanto a genes de expresión temprana como tardía.

La secuenciación de los clones seleccionados mediante análisis de restricción fue realizada por el servicio Macrogen Inc (World Meridian Venture Center, Korea , Seoul ) a partir de *minipreps* ajustadas a una concentración de 100 ng/ $\mu$ L, utilizando el cebador SP6. Las secuencias obtenidas fueron analizadas en las bases de datos Phytozome (<http://www.phytozome.net>) y en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Con la información

recabada se clasificaron los clones en diferentes grupos funcionales y se determinó la redundancia de las secuencias obtenidas.

#### **4. PARÁMETROS DE RESPUESTA EN DOS GENOTIPOS DE SOJA CONTRASTANTES AL DÉFICIT HÍDRICO**

Una vez determinadas las condiciones hídricas necesarias para alcanzar el déficit hídrico inicial o temprano y el final o tardío (punto 3), se procedió a realizar la caracterización de las respuestas tempranas y tardías al déficit hídrico en el genotipo N7001 (tolerante) y TJ2049 (sensible).

Plantas de ambos genotipos en estado vegetativo V4, crecidas en un sustrato a su máxima capacidad de retención de agua (100 %), se dejaron de regar hasta llegar a las condiciones de estrés inicial y final. En otro grupo de plantas se continuó con el riego diario y se utilizó como control. Se considero estrés inicial el momento en el que el sustrato alcanzó un 50 % de su máxima capacidad de retención de agua, cuando las plantas a pesar de no presentar síntomas visibles de estrés comenzaban a evidenciar cierre estomático, y un estrés final cuando las plantas presentaban marchitamiento o pérdida de turgencia y el sustrato contenía aproximadamente un 25 % de su máxima capacidad de retención de agua. Una vez alcanzado el nivel de estrés inicial se determinó la conductancia estomática (parámetro no destructivo), para posteriormente determinar el potencial hídrico de hoja y realizar muestreos de raíz y parte aérea; conservándose a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para la evaluación de parámetros bioquímicos (Acumulación de Prolina y Peroxidación de Lípidos) y moleculares (Identificación de genes inducibles por déficit hídrico y Análisis de expresión génica).

Los tratamientos de estrés final se mantuvieron sin riego hasta que las plantas comenzaron a evidenciar pérdida de turgencia. Una vez alcanzado el estrés final, se procedió al muestreo y medición de parámetros, del mismo modo que el descrito para el estrés inicial.

## 5. EFICIENCIA DEL USO DEL AGUA EN SOJA

La EUA se determinó por el método gravimétrico y por discriminación isotópica del carbono.

Para la determinación gravimétrica se utilizaron plantas en estado vegetativo V4. Los tratamientos fueron: plantas crecidas en sustrato al 100 % de su máxima capacidad de retención de agua (control) y al 35 % de su máxima capacidad de retención de agua (estrés), con 4 repeticiones cada uno. El primer día de estrés se determinó la materia seca (MS) de la parte aérea (PA) en 4 repeticiones de cada genotipo. Durante 18 días posteriores al inicio del estrés se registró diariamente el consumo de agua y se repuso el agua consumida. Seguidamente se evaluó la MS de PA acumulada en ambos genotipos en los distintos tratamientos. La MS se determinó secando las muestras a 105°C hasta peso constante. La EUA se calculó como:

$$\text{EUA (g /kg)} = \frac{\text{MS Final PA (g / maceta)} - \text{MS inicial PA (g / maceta)}}{\text{Agua consumida}}$$

Después de pesadas las muestras de MS se maceraron en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino, y se secaron en horno 24 h. Muestras de 1.5 mg se colocaron en cápsulas de estaño para determinar por discriminación de isotópica de carbono la cantidad de  $^{13}\text{C}$  y  $^{12}\text{C}$  en un analizador elemental (Flash<sup>®</sup> EA, 1112 Series) acoplado a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (Thermo Finnigan Delta Plus<sup>®</sup>). El valor R (relación de abundancia molar  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de la muestra) se expresa en relación al estándar *Pee Dee Belemnite* (PDB). El procedimiento utilizado fue el indicado por el Laboratorio de Isótopos Estables de la Facultad de Agronomía, UdelaR.

Los valores de la relación isotópica del carbono ( $\delta^{13}\text{C}\%$ ) fueron obtenidos a través de la comparación de las abundancias molares  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de muestras de hojas de los distintos tratamientos respecto al estándar PDB según O'Leary (1993):

$$\delta^{13}\text{C} (\%) = [(R_{\text{muestra}}/R_{\text{PDB}}) - 1] \times 1000 \%$$

donde  $\delta^{13}\text{C}$  es la proporción de isótopos del carbono,  $R_{\text{muestra}}$  es la relación de la abundancia molar  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de la muestra vegetal (planta) y  $R_{\text{PDB}}$  es la relación de la abundancia molar  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  del estándar (PDB), la cual es igual a 0,0112372 (Squeo y Ehleringer, 2004).

La discriminación isotópica del carbono ( $\Delta$ ) se expresa como una diferencia entre el valor  $\delta^{13}\text{C}$  de la fuente (aire) y el producto (planta), la misma se calculó utilizando la ecuación descrita por O'Leary (1993):

$$\Delta = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{fuente}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{producto}}}{1 + (\delta^{13}\text{C}_{\text{producto}}/1000)}$$

donde el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  de la fuente (aire) se lo tomó como - 8 ‰.

Al momento de levantar el ensayo se determinó la conductancia estomática que presentaban los distintos tratamientos según se detalla en 3.1.

## **6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE UN GEN DE ACUAPORINA**

### **6.1. Extracción de ARN**

Se maceraron de 0.2 a 2 g de raíz y hoja (óptimo 1 g), en un mortero con nitrógeno líquido, sin dejar descongelar la muestra. El macerado se colocó inmediatamente en tubos Falcon de 50 mL conteniendo 2.5 mL de fenol y 3 mL de NTES (0.1 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 % SDS) y se agitó vigorosamente (Vortex) por 3 min. Se adicionaron 2.5 mL de cloroformo y se agitó en Vortex por 20 seg. Se centrifugó a 5.000 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos de vidrio Corex® grandes (tratados con DEPC o esterilizados en horno a 200-280°C por al menos 4 h). Se adicionó 1/10 del volumen final del sobrenadante obtenido de acetato de sodio 3 M pH 5.2 (RNasa free) y 2.5 volúmenes de etanol al 95 % y se incubó por 3 h a -20 °C. Se

centrifugó por 15 min a 8.000 rpm y 4 °C. El pellet obtenido se secó y resuspendió en 0.8 mL de agua DEPC, manteniéndose en hielo por 10 min agitándose con Vortex frecuentemente. El resuspendido obtenido se transfirió a tubos de microcentrífuga, se le adicionaron 0.8 mL de LiCl 4 M y se incubó toda la noche en hielo. Luego de la incubación se centrifugó a 12.000 rpm a 4 °C por 20 min. El pellet se secó y resuspendió en 200 µL de agua libre de nucleasas, adicionándose 20 µL de NaAc 3 M pH 5.2, y 500 µL de etanol 95 %. Se precipitó por dos horas a -20 °C y se recuperaron los ácidos nucleicos luego de una centrifugación de 12.000 rpm por 20 min a 4 °C y. El pellet se lavó con EtOH 70 % durante 5 min a 4 °C, se secó al aire y se resuspendió en H<sub>2</sub>O MiliQ libre de nucleasas, y almacenado a -80 °C hasta su uso.

El ARN fue tratado con DNAsa libre de RNAsas (Fermentas, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se chequeó el tratamiento con DNAsas mediante un PCR sobre el ARN.

## **6.2. Determinación de la concentración e integridad del ARN**

La absorbancia de la solución de ARN se midió a 260 nm y se calculó su concentración utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{ARN}] = 40 \mu\text{g/mL} \times A_{260} \times \text{factor de dilución}$$

La integridad del ARN fue evaluada en gel de agarosa desnaturalizante. Para la preparación del gel desnaturalizante se disolvieron 0.7 g de agarosa en 50.4 mL de H<sub>2</sub>O, se agregaron 7 mL de MOPS 10X, se dejó enfriar y se agregaron 12.6 mL de formaldehído.

2.7 µL de cada muestra fueron desnaturalizados agregando 1.75 µL de formaldehído, 1 µL de MOPS 10X, 5 µL de formamida y calentando a 65°C por 10 min.

Para la preparación del MOPS: Se disolvieron 41.85 g de ácido 4-morpholinopropanesulfónico (MOPS) y 6.80 g de acetato de sodio trihidratado en 800

mL de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC. Se agregaron 20 mL de una solución de 0.5 M de EDTA pH 7.0 y se ajustó el volumen a 1 L con H<sub>2</sub>O.

### **6.3. Cuantificación de la expresión por Northern Blot**

Para la transferencia del ARN a las membranas, 15 µg de ARN total por muestra se corrieron en un gel desnaturalizante y se realizó la transferencia con 20X SSC a una membrana Hidrobond N+ (Amersham, NJ, USA) por capilaridad. La sonda se marcó partiendo de 50 ng de ADNc y se mezcló con 1.2 µL de P<sup>32</sup> 3000 Ci/µL. El marcaje se realizó utilizando el kit de marcado Ready Prime II® (GE) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección de los ARNs la membrana se pre-hibridó por 2 h a 68°C con 20 mL de buffer de prehibridación [5X SSPE (0.9 M NaCl, 50 mM NaPO<sub>4</sub>, 5 mM EDTA, pH 7.5), 0.2% SDS, 500 µg/mL ssDNA, 5X Denhardtts (1 mg/mL Ficoll 400, 1 mg/mL polyvinyl pyrrolidona, 1 mg/mL BSA)]. Pasado ese tiempo se agregó la sonda desnaturalizada y se hibridó durante 16 h. Para eliminar la radioactividad no específica se procedió a lavar la membrana dos veces en una solución de 5X SSC y 0.5 % SDS por 20 min cada uno, seguido de dos lavados en 1X SSC y 0.5 % SDS por 20 min. La membrana fue expuesta en el Fuji Imager FLA-3000 a -80°C durante 3 días.

### **6.4. Cuantificación de la expresión por RT-qPCR**

Los ADNc utilizados en los Ensayos se sintetizaron con el Kit Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) (Promega). Los análisis por RT-qPCR se realizaron por medio del LineGene K System (Bioer Technology CO.,LTD) usando el sistema de detección por SYBR-green. La cuantificación se normalizó en función de los niveles de ARNm del gen Metalloprotease (Housekeeping). Las expresiones relativas se calcularon por el método del  $\Delta\Delta CT$  (Livak y Schmittgen, 2001).

Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

*GEN de INTERES (ACUAPORINA)*

Forward 5`-CTC AGG GGG ACA CAT AAA CC-3`

Reverse 5`-GTA ACC AGG GGC AAC AAA GT-3`

*HOUSEKEEPING (METALLOPROTEASE)*

Forward 5`-ATG AAT GAC GGT TCC CAT GTA-3`

Reverse 5`-GGC ATT AAG GCA GCT CAC TCT-3`

## **7. TRANSFORMACIÓN DE ARABIDOPSIS CON UN GEN DE ACUAPORINA DE SOJA**

### **7.1. Amplificación del gen de interés**

Los PCR para el clonado de la secuencia de interés se hicieron a partir de ADNc proveniente del genotipo N7001, usándose la ADN polimerasa de alta fidelidad AccuSure™ Mix (Bioline). Los cebadores se diseñaron para una amplificación completa de los genes de interés. Dichos cebadores, contienen sitios de restricción para la posterior ligación del producto de PCR con el vector de entrada.

La reacción, programa y cebadores usados fueron los siguientes

**Reacción:** 25 µl AccuSure mix

2 µl Cebador F

2 µl Cebador R

4 µl ADNc ( 15 ng/µL)

17 µl Agua MQ estéril

**Programa de PCR:** Activación 95°C, 7 min

40 CICLOS: 94°C 30 seg

58°C 30 seg

72°C 90 seg

1 CICLO: 72°C 120 seg

**Cebador**

F- CAGTCGACAGCAAAAAGAAAGAATCCCAGGC sitio diana: Sal I

R- CCGAATTCGATTAAGCATGAACCGTTTGATTG sitio diana: EcoR I

Las reacciones se realizaron en un termociclador Corbett Research, modelo Palm-Cycler.

**7.2. Electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa**

El ADN se analizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1 %. El tampón para los geles y la electroforesis fue TBE 1X.

Tampón TBE (5X) pH8.2: Tris-base.....54 g/L  
Ácido bórico.....27.5 g/L  
EDTA-Na<sub>2</sub> 0.5M pH 8.....20mL

En los geles se agregó Goodview (SDS, China) (GVII) en la cantidad indicada por el fabricante. Para la aplicación de las muestras en el gel se utilizó tampón de carga 5X:

Glycerol 50 % (v/v)  
Xilencianol 0.25 %  
Azul de bromofenol 0.25 % (p/v)

Las muestras se mezclaron con el volumen de tampón de carga 5X necesario para dar una concentración 1X. Como marcador de tamaño molecular se utilizó 1 Kb *Ladder* plus (Fermentas). Las electroforesis se realizaron a 100 V y el ADN se visualizó en un transiluminador con luz UV (Dynalight Dual intensity UV transilluminator), registrando y almacenándose las imágenes (Kodak Gel Logic 100, Imagine System).

### **7.3. Cuantificación y purificación de los productos de PCR**

La cuantificación espectrofotométrica de la concentración y pureza del ADN se realizó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop2000 Spectrophotometer (Thermo scientific). En el análisis de los datos, una unidad de absorbancia a 260 nm (ABS260 = 1) equivale a una concentración de 50 µg/mL ADN (Berger 1987).

Los productos de PCR fueron purificados mediante una columna de purificación QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Qiagen), según las recomendaciones del fabricante. Los buffers utilizados fueron suministrados por el kit comercial.

### **7.4. Digestión de ADN**

Para realizar la construcción de sobreexpresión los genes amplificados y el vector de entrada pEntr2B fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes (Fermentas, USA) generándose de esta manera los extremos cohesivos necesarios para la posterior ligación.

Las digestiones con las enzimas de restricción se efectuaron de la siguiente manera:

*Reacción:* Agua 33 µL  
Buffer 5 µL  
ADN 8 µL (aprox. 5 µg de ADN)  
Enzima 2 µL de cada enzima

Cada reacción se incubó 2 h a 37°C, luego se agregó enzima nuevamente y se incubó otras 2 h. La reacción se inactivó a 65 °C por 20 min. La mezcla de digestión se desfosforiló con 1 µL de la enzima CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) (Fermentas) a 37°C por 30 min y se inactivó a 85°C por 15 min.

Los fragmentos de ADN resultantes se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

### **7.5. Extracción de fragmentos de ADN del gel de agarosa**

Una vez realizadas las electroforesis se escindieron las bandas correspondientes al vector y al inserto. El ADN fue aislado en columnas de purificación QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante.

### **7.6. Ligación del gen de interés en el vector de entrada pEntr2B**

Las ligaciones fueron realizadas en relación inserto/vector de 3:1, en un volumen final de 20 µl utilizando el Kit T4 Ligasa (Biolab). La reacción de ligación se realizó en tubos de microcentrifuga enfriados en hielo (la T4 DNA Ligasa se agregó al final).

Buffer T4 DNA ligasa 10X	2 µL
Vector pEntr2B (3.8 Kb)	3.5 µL (40ng)
Insertos (genes) (1.0 Kb)	5 µL (50ng)
Agua estéril	8.5 µL
T4 DNA ligasa	1 µL

Las reacciones de ligación se incubaron toda la noche a 4 °C.

### **7.7. Transformación de células de *E. coli* DH5α con el producto de ligación**

#### *Preparación de células competentes*

En 10 mL de medio LB líquido estéril se sembró una colonia de *E. coli* DH5α y se incubó toda la noche a 37°C, en agitación constante de 250 rpm. A partir de ese cultivo fresco se inoculó 1 L de medio LB líquido estéril y se incubó a 37 °C en agitación constante de 250 rpm hasta una DO<sub>600</sub> de 0.5-0.8, correspondiente a la fase exponencial de crecimiento. Para cosechar las bacterias se enfrió el inóculo en hielo por 15-30 min y se centrifugó a 7.000 x g a 4°C durante 15 min. El pellet resultante se resuspendió en 1 L de agua fría estéril, y se centrifugó como en el paso anterior. El pellet se resuspendió en 500 mL de agua fría estéril y se centrifugó nuevamente en las condiciones indicadas anteriormente. El pellet ahora se resuspendió en 20 mL de glicerol frío estéril al 10 %

(v/v) y se centrifugó como en paso el paso anterior. Por último el pellet se resuspendió en un volumen final de 2 mL de glicerol frío estéril al 10 % (v/v). El cultivo se separó en alícuotas de 50  $\mu$ L y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### *Transformación de células competentes por electroporación*

Para la electroporación las cubetas se pre-enfriaron en hielo y 50  $\mu$ L de células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  con 2  $\mu$ L (50 ng aprox.) del plásmido pEntry2B con el inserto se incubaron en hielo por 1 o 2 min, se homogeneizó bien dentro de la cuba, evitando la formación de burbujas y se secó cuidadosamente la base de la cubeta antes de electroporar. La electroporación se llevó a cabo con un electroporador Eppendorf Multiporator<sup>®</sup>, aplicándose un pulso eléctrico de 2.5 Kv por 25 ms. Inmediatamente se añadió 1 mL de medio LB estéril con Kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se transfirió la suspensión bacteriana a un tubo de vidrio. Se incubó en agitación durante 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$  para permitir la recuperación de la bacteria y la expresión de la resistencia al antibiótico que lleva el plásmido. Posteriormente se sembró 100  $\mu$ L en placas de Petri con medio LB con Kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El resto de la transformación se centrifugó 10 seg a 12.000 x g, se eliminó el sobrenadante dejándose un volumen pequeño para resuspender las células y se sembró el concentrado en las mismas condiciones que las anteriores. Las placas se incubaron en estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  toda la noche y las colonias portadoras del gen de interés se identificaron por Colony PCR, según se detalla en 7.8, previa extracción del plásmido por lisis alcalina según se detalla en 7.9.

#### **7.8. Identificación de células de *E. coli* DH5 $\alpha$ transformadas por Colony PCR**

Se partió de una colonia que se picó con un *tip* estéril, y se sembró en un microtubo de PCR con 25  $\mu$ L de buffer TE estéril, y se homogeneizó bien. El resto de la colonia se la identificó en la placa.

Se tomaron 2  $\mu$ L del homogenizado obtenido y se realizó la PCR con los cebadores indicados, y reactivos de la firma Fermentas USA.

<i>Reacción:</i> Buffer	2.5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	1.5 $\mu$ L
dntps (10 mM)	0.4 $\mu$ L
primer F (10 mM)	0.5 $\mu$ L
primer R(10 mM)	0.5 $\mu$ L
Enzima taq	0.2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	17.4 $\mu$ L

*Programa de PCR:* Activación 95 °C, 4 min.

40 CICLOS:	94°C	30 seg
	58°C	30 seg
	72°C	90 seg
1 CICLO:	72°C	120 seg

Los productos de PCR se chequearon por electroforesis en gel de agarosa al 1% según se detalla en 7.2. La amplificación positiva fue indicador de que la colonia seleccionada está transformada con el gen de interés.

### **7.9. Extracción del plásmido por lisis alcalina**

Se inocularon 3 mL de medio LB con Kanamicina (50 ug/mL), con una colonia aislada y se incubó toda la noche a 37°C. El cultivo se centrifugó 30 seg a 12.000 x *g* y 4°C, el pellet se resuspendió en 200  $\mu$ L de solución I. Se adicionaron 200  $\mu$ L de solución II preparada en el momento y se mezcló por inversión. A esta mezcla se adicionaron 150  $\mu$ L de solución III, se mezcló por inversión y se dejó 5 min en hielo. Luego se centrifugó 15 min a 12.000 x *g* a 4°C, se recuperó el sobrenadante y este se incubó 30 min a 37°C con RNAsa a una concentración final de 10  $\mu$ g/mL. El ADN plasmídico se precipitó con dos volúmenes de etanol al 95 % (v/v), en presencia de Acetato de sodio 0.3 M y se centrifugó 10 min a 12000 x *g*. El precipitado se lavó con etanol 70 % (v/v) vertiéndose lentamente por las paredes del tubo de microcentrífuga sin agitar. Se volvió a

centrifugar 15 min y descartó el sobrenadante y se permitió que se evapore todo el etanol. El pellet se resuspendió en 50 µL de buffer TE estéril.

La composición de las soluciones I, II y III es:

I: 50 mM tris-HCL, 20 mM EDTA (pH 8), 50 mM Glucosa.

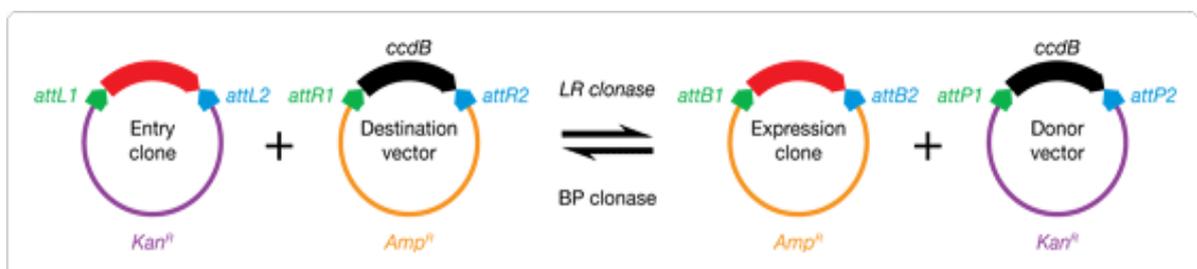
II: 0.2 N NaOH, 1 % SDS (preparado en el momento).

III: 60 mL Acetato de potasio 5 M, 11.5 mL ácido acético glacial, 28.5 mL H<sub>2</sub>O.

El análisis de los productos de las extracciones se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % como se detalla en 7.2

### 7.10. Recombinación del plásmido de entrada (pEntr2B + gen) con el plásmido de sobreexpresión pMDC45

Para la obtención de la construcción de sobreexpresión portando el gen de interés se utilizó el sistema de clonado Gateway® (Invitrogen Co.) Este sistema se basa en las propiedades de recombinación sitio-específica del bacteriófago Lambda, proporcionando un método rápido y altamente eficiente para mover secuencias de ADN entre múltiples sistemas de vectores. La tecnología Gateway® se puede resumir según lo esquematizado en la figura 3.



**Figura 3.** Recombinación sitio-específica por el sistema de clonado Gateway®.

Los sitios *att* son secuencias homologas en ambos vectores, de entrada y destino, entre las que ocurre la recombinación. La reacción de recombinación *attL* x *attR* se catalizó por la clonasa LR (Invitrogen Co., USA).

La reacción consistió en: 1 µL (150 ng) del vector de entrada pENTR2B + gen, 1 µL (150 ng) del vector destino pMDC45, 6 µL de buffer TE (Tris-EDTA; pH 8.0) 2 µL del mix LR clonasa II. La reacción de recombinación fue incubada a 25 °C durante 2 h y para detener la reacción se adicionaron 2 µL de solución de proteinasa K (Invitrogen Co.) y se incubó a 37°C durante 10 min.

#### **7.11. Transformación de células de agrobacterium electrocompetentes con el plásmido de sobreexpresión recombinante**

##### *Preparación de células electrocompetentes*

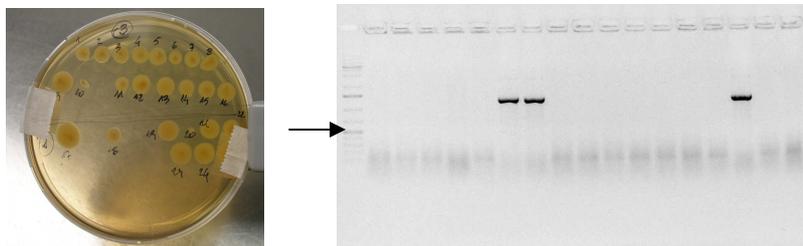
Una colonia de la cepa de agrobacterium seleccionada se creció en 10 mL de medio LB estéril en agitación constante de 250 rpm hasta saturación de la DO (24-36 h). A partir de ese cultivo se inoculó 1 L de medio LB estéril y se incubó a 28 °C hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.8 (aproximadamente 14 h). Para cosechar el cultivo se enfrió el Erlenmeyer conteniendo el medio LB inoculado en hielo por 15-30 min y se centrifugó a 7.000 x g a 4°C por 15 min. El pellet obtenido se resuspendió en 1 L de agua fría estéril y se centrifugó nuevamente. El nuevo pellet obtenido se resuspendió en 500 mL de agua fría estéril y se centrifugó nuevamente. El pellet obtenido se resuspendió en 20 mL de glicerol frío estéril al 10% (v/v) y se centrifugó nuevamente. El pellet se resuspendió en un volumen final de 2 mL de glicerol frío estéril al 10 % (v/v). A partir de este último resuspendido se tomaron alícuotas de 50 µL y se almacenaron a -80°C.

##### *Transformación de células electrocompetentes por electroporación*

Las cubetas del electroporador se pre-enfriaron en hielo y se incubó en hielo por 1 ó 2 min 50 µL de células electrocompetentes con 2 µL (50 ng aproximadamente) del plásmido de sobreexpresión, homogeneizándose bien dentro de la cubeta para evitar

la formación de burbujas y secándose bien la base de la cubeta antes de electroporar. La electroporación se llevó a cabo con un electroporador (Eppendorf Multiporator®), aplicándose un pulso eléctrico de 2.5 Kv por 25 ms. Inmediatamente, se añadió 1mL de medio LB estéril con Rifampicina y Kanamicina (50 µg/mL) y se transfirió la suspensión bacteriana a un tubo de vidrio. El cultivo se incubó en agitación durante 2 h a 28°C, para permitir la recuperación de la bacteria y la expresión de la resistencia a los antibióticos que lleva el plásmido. Posteriormente se incubó 4 h a 28°C y se sembró 100 µL en placas de Petri, con medio LB suplementado con Rifampicina y Kanamicina (50 µg/mL). El resto de la transformación se centrifugó 10 seg a 12.000 x g, se eliminó el sobrenadante dejándose un volumen pequeño para resuspender las células, este concentrado también se sembró en las mismas condiciones.

Las placas se incubaron en estufa a 28°C por 24 h. Las colonias portadoras del gen de interés se identificaron por Colony PCR como se detalla en 7.8 (fig. 4)



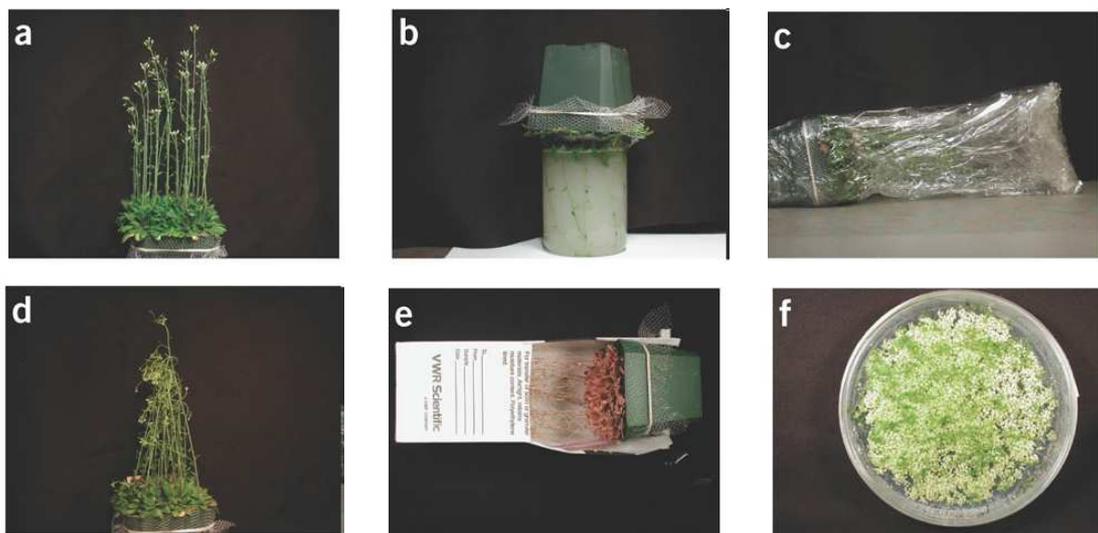
**Figura 4.** Identificación por Colony PCR de colonias de agrobacterium transformadas. Tres colonias (carriles 6, 7 y 15) presentan fuertes bandas, indicando la presencia del gen de interés.

### **7.12. Transformación de arabidopsis mediada por agrobacterium por inmersión floral**

Células de agrobacterium portando el plásmido de sobreexpresión con el gen de interés, se crecieron en 4 mL de medio LB líquido estéril con Rifampicina y Kanamicina (50 µg/mL), a 28°C y en agitación constante de 250 rpm. Alcanzada la fase estacionaria dicho inóculo se incorporó a 400 mL de medio LB estéril con Rifampicina y Kanamicina

(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se creció bajo las mismas condiciones anteriores hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600}$  aproximada de 0.8 (24 h aproximadamente). El cultivo se centrifugó a  $5.500 \times g$  por 15 min el pellet obtenido se resuspendió en 400 mL de medio de infiltración, conteniendo 0.5 % (p/v) de sacarosa y 0.05 % (v/v) de surfactante Silwet L-77 (Vac-In-Stuff, Lehle Seeds). Para la transformación se utilizaron plantas de arabidopsis con buen desarrollo vegetativo y abundante floración.

Para la inmersión floral, las plantas de arabidopsis florecidas se sumergieron en un vaso de Bohemia conteniendo el medio de infiltración con agrobacterium durante 10 seg. Dichas plantas se dejaron en oscuridad toda la noche dentro de bolsas de nylon cerradas para mantener la humedad y luego se llevaron a cámara de crecimiento hasta la cosecha de semillas (T0) (fig. 5).



**Figura 5.** Pasos para la transformación de arabidopsis mediada por agrobacterium por inmersión floral. a) Plantas de arabidopsis con buen estado de floración. b) Inmersión de arabidopsis por 10 segundos en una suspensión de agrobacterium. c) Envoltura de las plantas en bolsas plásticas y mantenimiento de las mismas en oscuridad por 24 h para mantener humedad. d) Remoción de las bolsas plásticas y crecimiento de las plantas en cámara de crecimiento hasta la obtención de semillas. e) Colecta de semillas. f) Selección primaria de plantas transformadas en medio MS con Higromicina a una concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las plantas transformadas se seleccionaron por su resistencia a Higromicina al producir hojas verdes y raíces bien implantadas.

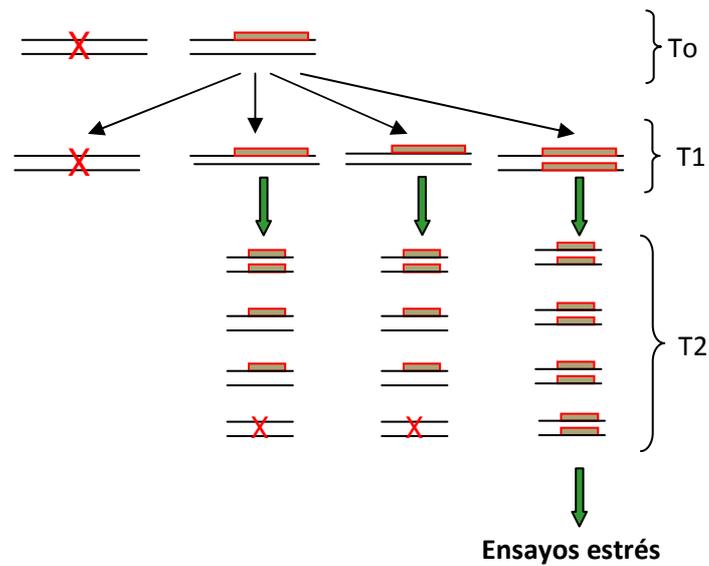
La selección de las semillas transformadas se realizó mediante el crecimiento en placas de Petri, con medio MS e Higromicina a una concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se utilizó una solución stock de Higromicina (Invitrogen™) disuelta en PBS con una concentración de 50  $\text{mg}/\text{mL}$  conservada a 4°C. Las plantas transformadas se seleccionaron por su resistencia a Higromicina al producir hojas verdes y raíces bien implantadas (fig. 6).



**Figura 6.** Selección semillas arabidopsis transformadas.

La flecha indica una planta transgénica germinada y crecida 10 días en medio MS con 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Higromicina.

La selección de plantas homocigotas para el gen de interés se comenzó a partir de plantas T0 resistentes a Higromicina (fig. 6), las cuales se transfirieron a macetas y se cosecharon las semillas resultantes de la autofecundación, repitiéndose la metodología hasta obtener la segunda generación (T2). Las plantas T2 en las que el 100 % de una muestra de 60 semillas provenientes de la misma madre fueron resistentes a Higromicina, se seleccionaron como potenciales homocigotas para el gen de interés (fig. 7). Otras plantas que no mostraban una segregación de tipo homocigota, pero si una relación más alta a 3:1 se mantuvieron como posibles homocigotas o con alto número de copias.



**Figura 7.** Esquema seguido para la selección de plantas homocigotas para el gen de interés. A partir de plantas transformadas por el método de inmersión floral (T0, heterocigotas y resistentes a Higromicina), se transfirieron a macetas y se cosecharon las semillas resultantes de la autofecundación, repitiéndose la metodología hasta obtener la segunda generación (T2). Las plantas en las que el 100 % de una muestra de 60 semillas provenientes de una misma madre fueron resistentes a Higromicina, se seleccionaron como homocigotas para el gen de interés.

## 8. EVALUACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

Plantas de *arabidopsis* seleccionadas como homocigotas para el gen de interés (fig. 7) se transfirieron de forma individual de placas de Petri, a tubos Falcon de 50 mL conteniendo turba como sustrato. Las condiciones ensayadas fueron control (100 % de agua retenida) y déficit hídrico (30 % de agua retenida), con 3 repeticiones por tratamiento. Las plantas transgénicas obtenidas se evaluaron conjuntamente con plantas salvajes del genotipo usado en la transformación (ecotipo Columbia) y mutantes *knockout* para el gen de interés. Las plantas se crecieron en condiciones control durante 35 días y posteriormente se suspendió el riego a los tratamientos de

estrés hasta alcanzar el 30 % de agua retenida. A los 35 días se evaluó el contenido relativo de agua (idem 3.3), el área foliar utilizando el programa Image-Pro plus, la conductancia estomática (idem 3.1) y la temperatura foliar con una cámara termográfica FLIR E50, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Por otro lado se comprobó la presencia del promotor 35S por PCR en cada planta ensayada, así como la fluorescencia de la proteína GFP en un microscopio Confocal Leica TCS-SP5, utilizándose una longitud de onda de excitación de 450-490 nm y emisión de 515 nm.

## **9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los resultados obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico InfoStat<sup>®</sup> versión 2008 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). La comparación de medias entre tratamientos se realizó a través de la prueba de comparación de medias LSD-Fisher.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

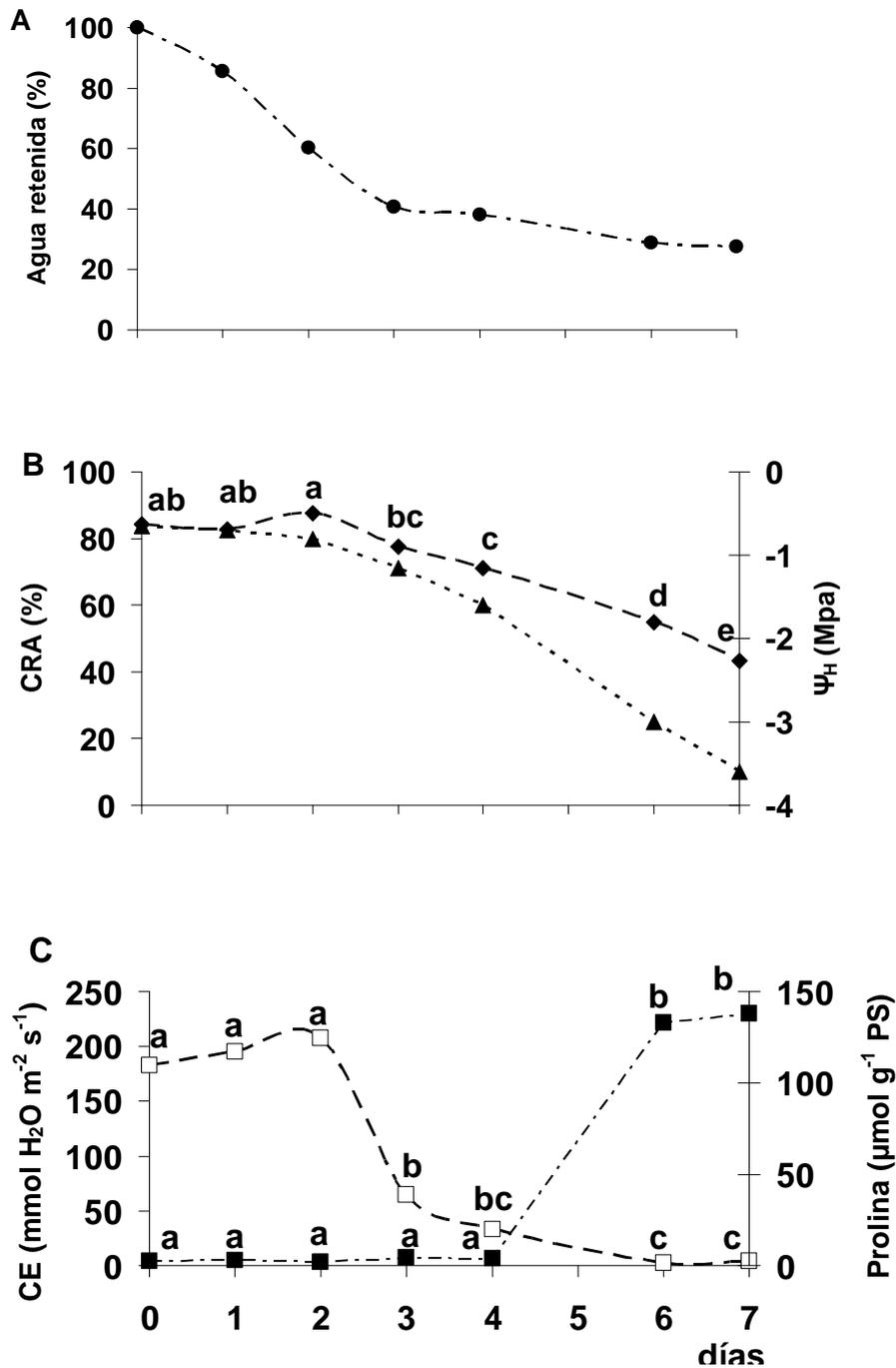
### **1. INDICADORES TEMPRANOS Y TARDÍOS DE DÉFICIT HÍDRICO**

Para identificar parámetros bioquímicos y moleculares de expresión temprana y tardía bajo condiciones de déficit hídrico en soja, fue necesario determinar el momento en que las plantas se encontraban en condiciones de déficit hídrico inicial y final. Para ello se realizó un ensayo dirigido a ese fin.

La primera respuesta detectada en plantas de soja genotipo INIA Andra 60, frente al déficit hídrico fue el cierre estomático (fig. 8C), en este sentido se observó una disminución significativa de la conductancia estomática (más del 60 %) aún cuando parámetros como el potencial hídrico y el CRA en hoja recién comenzaban a disminuir. Esta disminución significativa de la conductancia estomática se dio antes de la presencia de síntomas visibles de déficit hídrico y cuando el porcentaje de agua retenida en el sustrato era del 50 % (fig. 8A). Estos resultados concuerdan con trabajos previos encontrados en otras especies del tipo C3 (Flexas et al., 2004).

En contraposición al cierre estomático, la acumulación de prolina (fig. 8C) comenzó al final del periodo de déficit hídrico, cuando el porcentaje de agua retenida en el sustrato era del 25 % (fig. 8A). En ese momento el potencial hídrico y el CRA en hojas habían disminuido significativamente (fig. 8B), y las plantas presentaban una pérdida de turgencia foliar evidente. Se ha planteado, si bien no probado que la acumulación de prolina está relacionada con el ajuste osmótico necesario para mantener el potencial hídrico y la viabilidad celular. Estos resultados concuerdan con los resultados encontrados en soja por Fukutoku y Yamada, (1981) y Silvente et al (2012), donde no se registra acumulación de prolina bajo estrés moderado.

La recuperación de los parámetros evaluados en plantas bajo condiciones de déficit hídrico final, luego de 24 h de rehidratación (cuadro 5), confirmaron que las plantas no habían ingresado en una etapa de marchitez permanente.



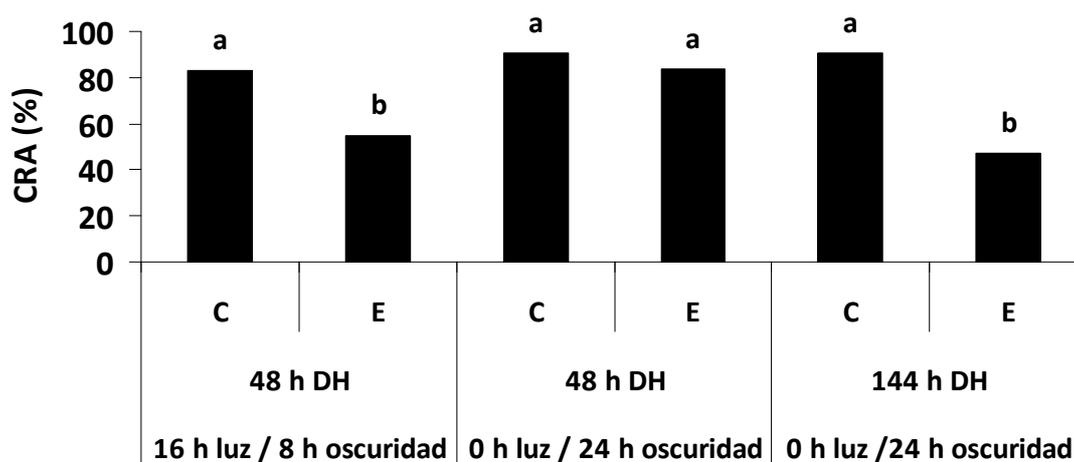
**Figura 8.** Parámetros fisiológicos de plantas de soja genotipo INIA Andrea 60 sometidas a déficit hídrico. **A.** Porcentaje de agua retenida en el sustrato (% AR). **B.** Contenido Relativo de Agua en hoja (CRA) y Potencial hídrico de hoja ( $\Psi_H$ ). **C.** Conductancia estomática (CE) y contenido de prolina en hojas. (●) %AR. (◆) CRA. (▲)  $\Psi_H$ . (□) CE. (■) Prolina. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ , LSD-Fisher)

**Cuadro 5.** Efecto de la rehidratación en plantas de soja genotipo INIA Andrea 60 en condición de déficit hídrico final.

	<b>C</b>	<b>Df</b>	<b>Rh</b>
<b>AR (%)</b>	100	28.9	100
<b><math>\Psi_H</math> (Mpa)</b>	-0.65	-3.0	-0.75
<b>CRA (%)</b>	84.3a	54.9b	75.8a
<b>CE (<math>\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}</math>)</b>	182.4a	2.4c	126b
<b>Prolina (<math>\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}</math>)</b>	2.67a	132.8c	22.3b

**C:** Control **Df:** Déficit hídrico final **Rh:** Rehidratación por 24 h  
**AR:** Agua retenida en el sustrato,  **$\Psi_H$ :** Potencial hídrico de hoja,  
**CRA:** Contenido relativo de agua en hoja, **CE:** Conductancia Estomática. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ , LSD-Fisher).

Plantas de soja (INIA Andrea 60) en las cuales el cierre estomático fue inducido por oscuridad, y por lo tanto la pérdida de agua es solo a través de epidermis, mostraron una caída mas lenta del CRA. Estas plantas necesitaron de 96 horas más para igualar la cantidad de agua perdida en plantas con un ciclo normal luz / oscuridad (16h/8h) (fig. 9). De acuerdo a los valores de perdida de agua encontrados, la soja tendría una importante pérdida de agua vía no estomática, que se encontraría entre el 20 y 25% del total del agua perdida.



**Figura 9.** CRA de plantas de soja genotipo INIA Andrea 60 crecidas con ciclos de luz/oscuridad de 16h/8h y 0h/24h y sometidas a déficit hídrico (DH). **C:** Control **E:** Estrés. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ , LSD-Fisher).

## **2. RESPUESTAS TEMPRANAS Y TARDÍAS EN DOS GENOTIPOS DE SOJA CONTRASTANTES A DÉFICIT HÍDRICO**

Luego de definidas las condiciones hídricas necesarias para alcanzar el déficit hídrico inicial y el final (fig. 8), se caracterizaron las respuestas tempranas y tardías al déficit hídrico en el genotipo N7001 (tolerante) y TJ2049 (sensible).

El movimiento del agua del suelo a las hojas está determinado por las diferencias de potencial hídrico entre el suelo, la planta y el aire. Los potenciales hídricos de hoja fueron mas negativos en el genotipo tolerante bajo condiciones control y de déficit hídrico (cuadro 6). Esto podría derivar en una mayor capacidad de absorción de H<sub>2</sub>O, lo que le conferiría a la planta, una ventaja adaptativa, principalmente frente a situaciones de déficit hídrico (Nobel, 2009).

Por otro lado, la apertura y cierre estomático regula el pasaje de H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub>, por lo tanto el cierre de los mismos evita la pérdida de H<sub>2</sub>O. Sin embargo también tiene como consecuencia la disminución de la entrada de CO<sub>2</sub>, lo que afecta negativamente la tasa fotosintética (Flexas et al., 2004; Lawlor y Tezara, 2009). Se estima que los altos rendimientos de los cultivos están asociados a plantas con altas conductancias estomáticas porque esto permite una mayor entrada y fijación de CO<sub>2</sub> por unidad de superficie. En general, una reducción de la conductancia estomática del 33 % resulta en una disminución de la tasa fotosintética del 14 % (Gilbert et al., 2011). Sin embargo, altas conductancias estomáticas en períodos de déficit hídrico son negativas al momento de minimizar la pérdida de agua.

Las conductancias estomáticas de los genotipos tolerante y sensible, bajo condiciones de déficit hídrico inicial y final, no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo en condiciones control el genotipo tolerante presentó menor conductancia estomática (cuadro 6), lo cual tendría un efecto negativo en la tasa fotosintética en condiciones no limitantes de agua. Esto fue confirmado mediante la evaluación de la EUA, donde se observó una mayor producción de biomasa del genotipo sensible bajo condiciones control como se observa en la figura 10.

El rol de la prolina en la tolerancia al déficit hídrico es controversial, algunos autores asignan altos niveles de prolina en cultivares sensibles bajo condiciones de déficit hídrico (Premachandra et al., 1995; Sundaresan y Sudhakaran, 1995), mientras que otros observan lo contrario (Hien et al., 2003). Se ha propuesto que la prolina es un buen indicador del estatus hídrico de la planta, pero no de su grado de tolerancia (Lazcano-Ferrat y Lovatt, 1999). En nuestro caso no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos genotipos, pero sí una mayor acumulación bajo condiciones de déficit hídrico final en el genotipo tolerante (cuadro 6).

El déficit hídrico induce daño en membranas, provocado en la mayoría de los casos por la peroxidación de lípidos (Smirnoff, 1993). Probablemente los lípidos de membrana son oxidados por la generación del radical  $\cdot\text{OH}$  que se da próximo a dichas membranas cuando se saturan los sistemas de defensa antioxidante (Shewfelt y Purvis, 1995). Entre los genotipos contrastantes no se encontraron diferencias significativas en la concentración de TBARS. Solo hubo un aumento significativo de los mismos en condiciones de déficit hídrico final (cuadro 6).

**Cuadro 6.** Parámetros fisiológicos y bioquímicos en los genotipos contrastantes a déficit hídrico en dos situaciones de déficit hídrico.

	N7001			TJ2049		
	C	Di	Df	C	Di	Df
<b>AR (%)</b>	100	50	25	100	50	25
<b><math>\Psi_H</math> (Mpa)</b>	-0.69	-0.70	-2.25	-0.63	-0.65	-2.10
<b>CE (mmol H<sub>2</sub>O · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>)</b>	198a	124b	3.96c	243a	119b	3.88c
<b>Prolina (μmol · g<sup>-1</sup> PS)</b>	0.81b	2.35b	66.6a	3.15b	2.03b	55.1a
<b>TBARS (nmol · g PS)</b>	74.1bc	75.8b	102.3a	77.12b	75.2b	96.5a

**C:** Control **Di:** Déficit hídrico inicial **Df:** Déficit hídrico final. **%AR:** Porcentaje de agua retenida en el sustrato,  **$\Psi_H$ :** Potencial hídrico de hoja, **CE:** Conductancia Estomática, **TBARS:** Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. **N7001** (genotipo tolerante), **TJ2049** (genotipo sensible). Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05, LSD-Fisher)

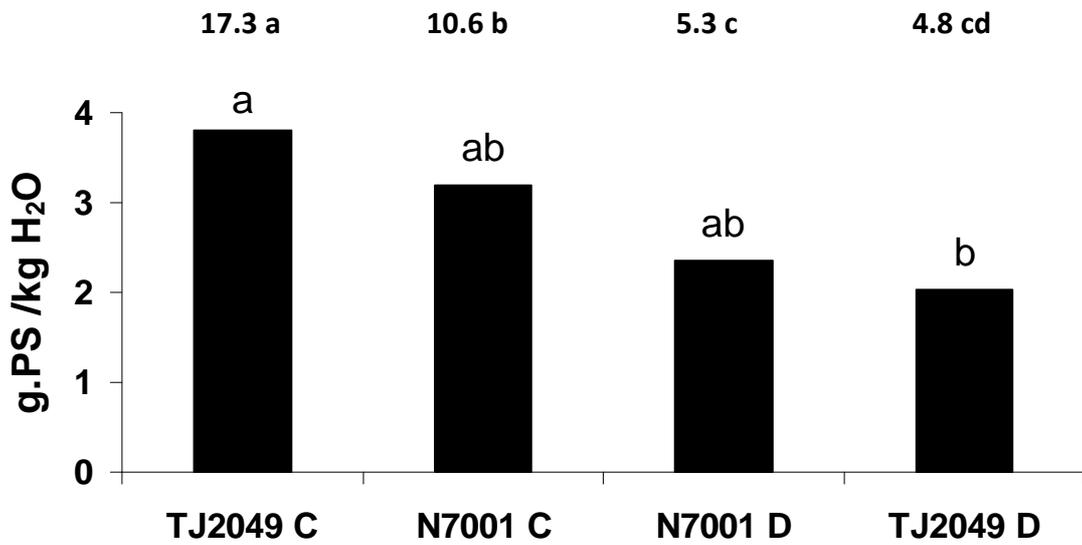
### **3. EFICIENCIA DEL USO DEL AGUA EN LOS GENOTIPOS CONTRASTANTES**

Correlaciones positivas entre la EUA y biomasa total producida en ambientes con déficit hídrico, revelan que una mayor EUA puede resultar en un rendimiento superior en esas condiciones (Wright, 1996). La mejora en la EUA está asociada con una reducción de la conductancia estomática promedio, y puede ocurrir con diferentes contenidos de agua en el suelo dependiendo de las especies (Earl, 2003; Liu et al., 2005).

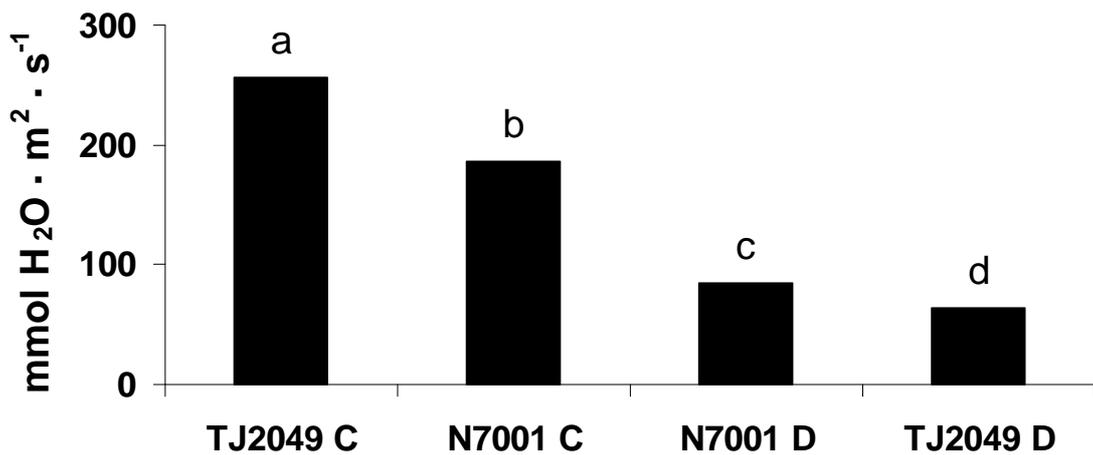
La EUA, determinada por el método gravimétrico, es decir por la cantidad de biomasa producida por unidad de agua consumida (fig. 10), correlacionó positivamente con los valores de conductancia estomática determinados al momento de levantar el ensayo (fig.11).

En condiciones control, el genotipo sensible presentó mayor conductancia estomática lo cual se relaciona con la mayor producción de biomasa en parte aérea (fig. 10). La notoria diferencia en la biomasa producida por el genotipo sensible, más del 60 % respecto al tolerante, determina que la EUA de dicho genotipo (fig. 10) sea superior a pesar de presentar una mayor conductancia estomática y por ende mayor pérdida de agua.

En condiciones de déficit hídrico, el genotipo sensible presentó los mayores descensos en los parámetros evaluados. La conductancia estomática disminuyó un 75 % contra un 55 % del genotipo tolerante (fig.11), lo que se relacionó con una mayor disminución en la producción de biomasa de parte aérea (73 y 50 % respectivamente), como también de la EUA (46.3 y 26.3 % respectivamente). Esto indica una mayor capacidad del genotipo tolerante bajo condiciones de déficit hídrico, de amortiguar la caída de parámetros que disminuyen el rendimiento. Los resultados encontrados en el genotipo tolerante concuerdan con la mayor estabilidad de rendimiento observado en este genotipo en campo.



**Figura 10.** EUA en los genotipos contrastantes bajo condiciones control y de déficit hídrico. **N7001** (genotipo tolerante), **TJ2049** (genotipo sensible). **C:** Control (100 % Agua retenida en sustrato) **D:** Déficit hídrico (35 % Agua retenida en el sustrato). Los números sobre cada barra corresponden a la producción de biomasa al final del ensayo de EUA, expresada en gramos de materia seca de parte aérea por planta. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ , LSD-Fisher)

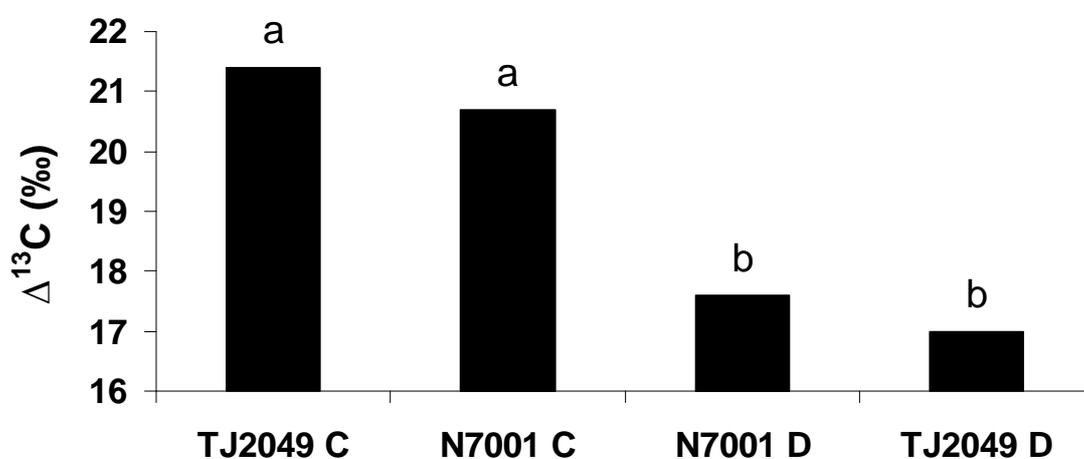


**Figura 11.** Conductancia estomática en los genotipos contrastantes, al final del ensayo de EUA. **N7001** (genotipo tolerante), **TJ2049** (genotipo sensible). **C:** Control (100 % Agua retenida en el sustrato) **D:** Déficit hídrico (35 % Agua retenida en el sustrato). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ , LSD-Fisher).

En las mismas plantas en las que se evaluó la EUA por el método gravimétrico y la conductancia estomática, se analizó la discriminación isotópica del  $^{13}\text{C}$  ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) (fig.12). Los resultados obtenidos mostraron una buena correlación con los encontrados por el método gravimétrico.

Una mayor  $\Delta^{13}\text{C}$  del genotipo sensible bajo condiciones control (fig.12), se asocia a una mayor cantidad de tiempo con los estomas abiertos, lo cual favorece una mayor incorporación de  $\text{CO}_2$  y explica su mayor producción de biomasa (fig. 10).

Bajo condiciones de déficit hídrico, los resultados se invierten y es el genotipo tolerante el que presentó mayor  $\Delta^{13}\text{C}$ , aunque tampoco en esta ocasión llegó a diferenciarse estadísticamente del sensible.



**Figura 12.** Discriminación isotópica del  $^{13}\text{C}$  ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) en los genotipos contrastantes **N7001** (genotipo tolerante), **TJ2049** (genotipo sensible). **C:** Control (100 % Agua retenida) **D:** Déficit hídrico (35 % Agua retenida). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ , LSD-Fisher).

Por otro lado, un parámetro que debería ser considerado al momento de evaluar genotipos de soja EUA es la conductancia epidérmica, que en soja parece tener una relevancia significativa.

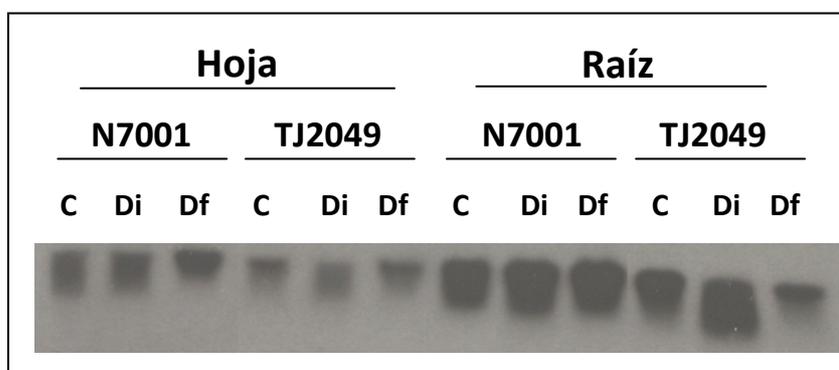
Estos resultados reflejan el problema al que se enfrentan los programas de mejoramiento al seleccionar plantas tolerantes a déficit hídrico, porque las plantas con mayor rendimiento en esa condición tendrían bajo rendimiento en condiciones no limitantes de agua.

#### 4. IDENTIFICACION DE UN GEN ASOCIADO A TOLERANCIA A DÉFICIT HÍDRICO

Se identificaron 768 secuencias génicas específicas de déficit hídrico, de las cuales se seleccionó como gen de interés una secuencia codificante para una MIP (*Glyma14g06680*), una acuaporina de tipo PIP.

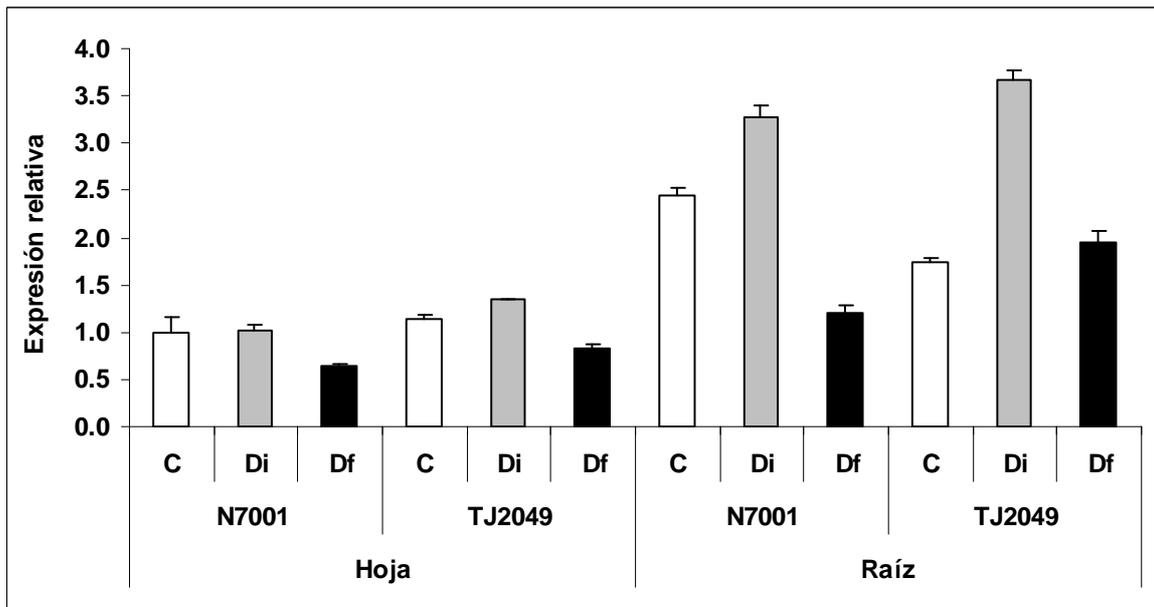
#### 5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE UNA ACUAPORINA

Los análisis de expresión génica realizados por *Northern Blot* (fig.13) muestran mayor expresión del gen de la acuaporina en raíz respecto a hoja en ambos genotipos, tanto en condiciones control como en las de déficit hídrico inicial y final. Este resultado concuerda con los obtenidos bajo condiciones control reportados para otras plantas como espinaca (Johansson et al., 1996), tabaco (Biela et al., 1999; Zhang et al., 2008), maíz (Chaumont et al., 2000), uva (Baiges et al., 2001) y *Nicotiana glauca* (Smart et al., 2001). Esto evidencia por un lado que hay mayor expresión de acuaporinas en raíz que en hoja, y por otro que se trata de una respuesta extendida entre diferentes y distantes especies.



**Figura 13.** Expresión de la acuaporina en hoja y raíz. La expresión se determinó por *Northern Blot* en los genotipos contrastantes **N7001** (tolerante) y **TJ2049** (sensible). **C:** Control **Di:** Déficit hídrico inicial **Df:** Déficit hídrico final.

A su vez, se cuantificó la expresión del mismo gen (*Glyma14g06680*) mediante RT-qPCR. Este análisis permitió evidenciar que la expresión en raíz y en hoja de ambos genotipos desciende en condición de déficit hídrico final, después de un aumento significativo en condición de déficit hídrico inicial, principalmente en raíz (fig. 14).



**Figura 14.** Expresión de la acuaporina en hoja y raíz. La expresión se determinó por RT-qPCR en los genotipos contrastantes **N7001** (tolerante) y **TJ2049** (sensible). **C:** Control, **Di:** Déficit hídrico inicial, **Df:** Déficit hídrico final. El resultado es la media de 3 repeticiones de 4 diluciones. Las líneas verticales indican el desvío estándar.

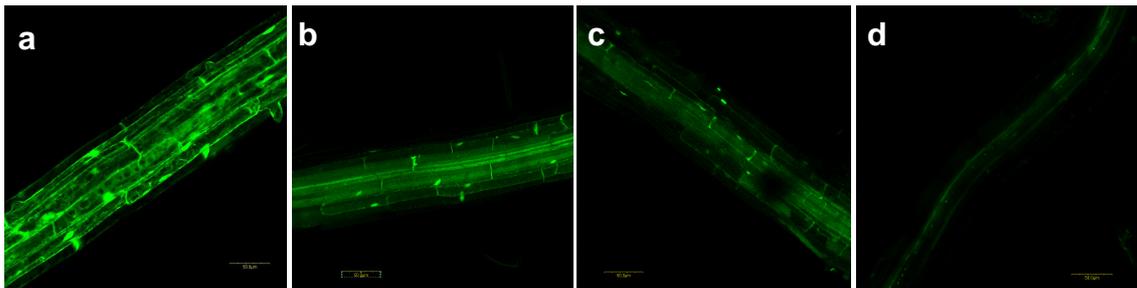
Las acuaporinas se han relacionado con el movimiento simplástico de agua, y en condiciones limitantes de ésta su incremento podría ser una ventaja. Sin embargo una alta expresión en situaciones de baja disponibilidad de agua podría aumentar su velocidad de pérdida, como se ha visto en plantas que sobreexpresan esta proteína (Aharon et al., 2003). En la raíz de los dos genotipos de soja analizados, bajo condición de déficit hídrico inicial cuando los estomas se cierran (cuadro 6) y el movimiento apoplástico de agua se resiente, la acuaporina se expresa más que en condición control (fig. 14). Esto permitiría aumentar el movimiento simplástico de agua (Morillon y Chrispeels, 2001), lo que mantendría el flujo de agua a la parte aérea con estomas cerrados

En nuestro caso se observó que el genotipo sensible mantiene una expresión elevada del gen *Glyma14g06680* cuando se evaluó por RT-qPCR, aún cuando la situación de déficit hídrico fue severa. En este sentido sería interesante evaluar la expresión de este gen a lo largo del establecimiento del déficit hídrico en ambos genotipos, para confirmar la relación entre una alta expresión en estrés severo y la sensibilidad a sequía en soja.

## 6. EVALUACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LA ACUAPORINA DE SOJA MEDIANTE SOBREEXPRESIÓN EN ARABIDOPSIS

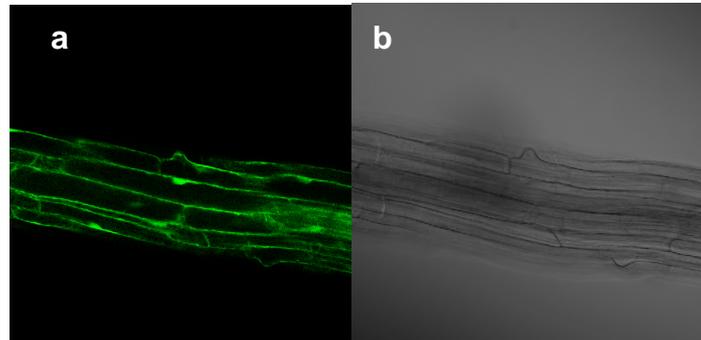
### 6.1 Localización de la acuaporina en raíces

La localización celular de la proteína GFP::ACUAPORINA en raíces se determinó por microscopía confocal. En la figura 15 se observa una clara localización de esta proteína en los haces vasculares (fig.15 b, c y d), mientras que en la construcción sin acuaporina la localización del GFP no es específica (fig. 15 a.). De esta forma, en condiciones no limitantes de agua, en las que hay mayor movimiento hacia las hojas, una mayor localización de las acuaporinas es específica en torno al cilindro central de la raíz. Los núcleos celulares se ven particularmente intensos (fig. 15 a, b y c), hecho común cuando se usa la fusión con GFP.



**Figura 15.** Raíces de arabidopsis observadas mediante microscopía confocal. a. Plantas transformadas con la construcción 2X35S::GFP, que no lleva asociada la acuaporina. b, c,y d plantas transformadas con la construcción 2X35S GFP::ACUAPORINA.

El análisis de la microscopía confocal de un región específica de la raíz mostro una clara localización de la proteína a nivel de membrana plasmática (fig. 16), lo que relaciona con la localización de las acuaporinas de tipo PIP (Danielson y Johanson, 2008).



**Figura 16.** Raíces de plantas de arabidopsis transformadas con la construcción 2X35S::GFP vistas con microscopía confocal. a. Visualización de la 2X35S GFP::ACUAPORINA b. Imagen de campo claro

## **6.2 Respuesta a déficit hídrico mediada por acuaporina**

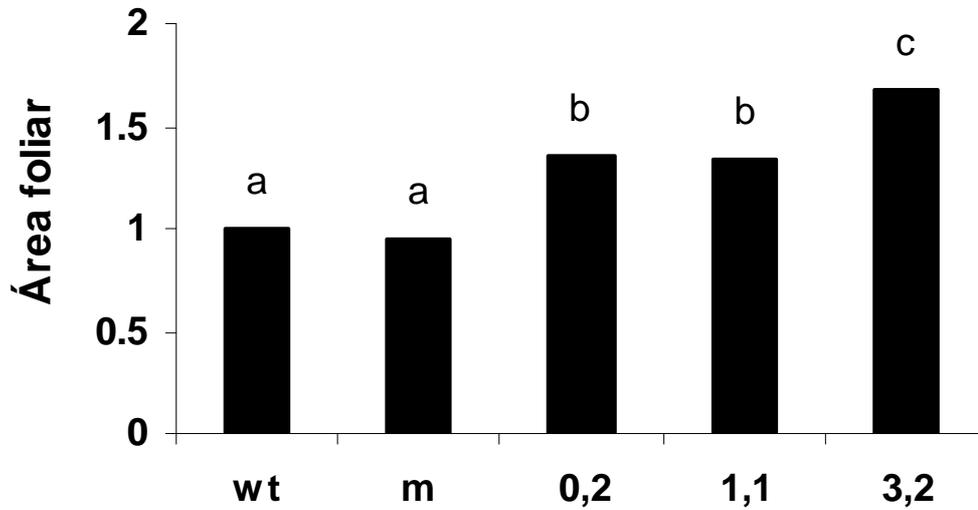
La respuesta a déficit hídrico mediada por la acuaporina de soja, se evaluó en plantas transgénicas de arabidopsis que sobrepresan dicho gen y en mutantes *knockout* en el gen homólogo. Los parámetros evaluados fueron la conductancia estomática, el área y la temperatura foliar.

Las acuaporinas están involucradas en el crecimiento foliar debido a su mayor expresión en las zonas de elongación celular, donde se requiere un continuo flujo de agua, que favorece el crecimiento (Fricke y Chaumont, 2007). El análisis del área foliar de las plantas transgénicas que sobrepresan la acuaporina, evidenció que desarrollaron mayor área foliar respecto al genotipo wt y al mutante *knockout* (fig. 17). Además, esas plantas tuvieron mayor conductancia estomática en condiciones control respecto a la del genotipo wt y el mutante *knockout* (fig. 18), lo que favorecería la mayor incorporación de CO<sub>2</sub> para sustentar el mayor desarrollo foliar. De esta forma, nuestros resultados permiten plantear que la sobrepresión de la acuaporina sea la

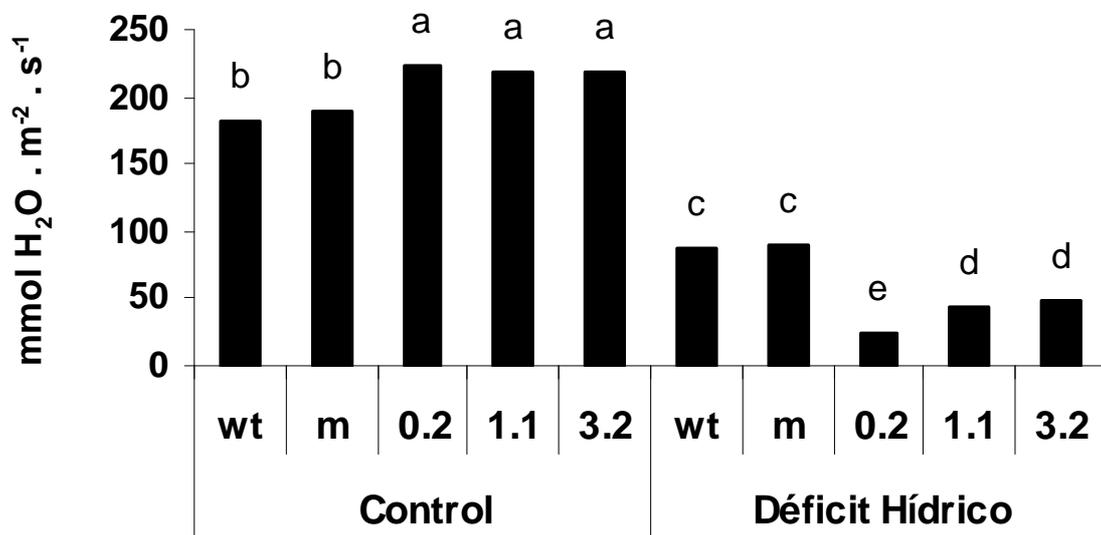
causa del aumento de la conductancia estomática y ésta del mayor desarrollo del área foliar en las plantas de arabis que sobreexpresaron el gen de la acuaporina de soja.

Otra consecuencia de la sobreexpresión de la acuaporina en condición control fue la temperatura foliar. Las plantas presentaron mayor porcentaje de área foliar y la temperatura en su superficie fue entre 20.0 y 20.5 °C respecto a las plantas salvaje en las que la temperatura promedio de las superficie foliar fue entre 21.0 y 21.5 °C (fig. 19). La menor temperatura se puede atribuir al aumento en el transporte de agua mediado por la acuaporina y a la mayor evapotranspiración debida a la mayor conductancia estomática (fig.18).

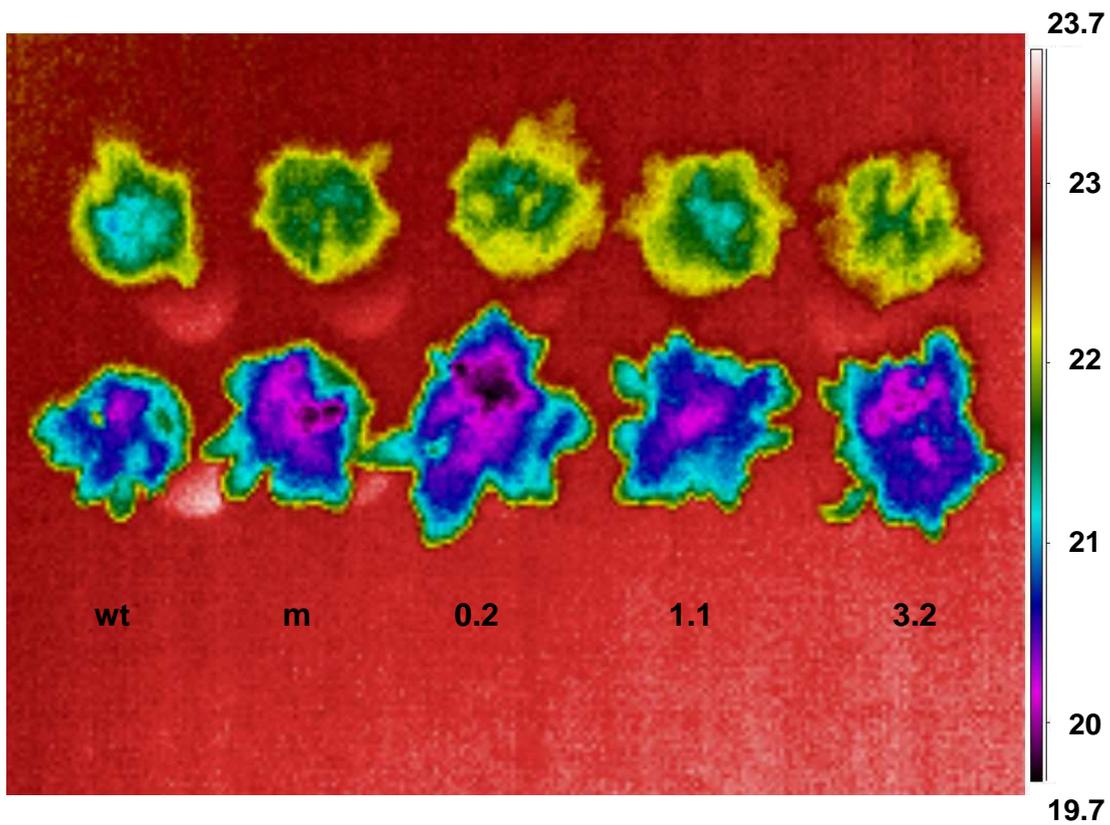
En condiciones de déficit hídrico las plantas transgénicas presentaron mayor temperatura foliar entre 21.5 y 22.2 °C al momento de alcanzar la condición de déficit hídrico (30 % agua retenida en el sustrato), mientras que en las plantas wt y mutantes *knockout* la temperatura se situó entre 21.0 y 21.4 °C en esa condición (fig. 19). La mayor temperatura foliar de las transgénicas puede estar asociada a la menor conductancia estomática que presentaron en ese momento. Este cambio de la temperatura en la superficie foliar respecto a las condiciones control, puede deberse a que las plantas transgénicas llegaron a la condición de déficit hídrico antes, debido a que presentaron mayor evapotranspiración. Esto determinó que estas plantas estuvieran sometidas a déficit hídrico por un periodo mayor que el wt y el mutante, los cuales llegaron al 30 % de agua retenida 4 días después. Estos resultados reflejan la desventaja que puede representar la alta expresión de acuaporinas en condiciones de déficit hídrico severo, debido a que la mayor velocidad de pérdida de agua por evapotranspiración hace que se alcance antes la situación de déficit hídrico y posterior estrés.



**Figura 17.** Área foliar en plantas de arabis en condiciones Control (100% agua retenida en el sustrato). *wild type* (**wt**), mutantes *knockout* para el gen de la acuaporina (**m**) y transgénicas con sobreexpresión del gen de la acuaporina (**0.2**, **1.1** y **3.2**). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ , LSD-Fisher)



**Figura 18.** Conductancia estomática en plantas de arabis en condiciones Control (100% agua retenida en el sustrato) y de déficit hídrico (30 % agua retenida en el sustrato). *wild type* (**wt**), mutantes *knockout* para el gen de la acuaporina (**m**) y transgénicas con sobreexpresión del gen de la acuaporina (**0.2**, **1.1** y **3.2**). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ , LSD-Fisher).



**Figura 19.** Temperatura foliar en plantas de arabisopsis en condiciones Control (100% agua retenida en el sustrato, imágenes inferiores) y de déficit hídrico (30% agua retenida en el sustrato, imágenes superiores). *wild type* (**wt**), mutantes *knockout* para el gen de la acuaporina (**m**) y transgénicas con sobreexpresión del gen de la acuaporina (**0.2, 1.1 y 3.2**)

La ausencia de variación de la conductancia estomática, temperatura y área foliar del mutante *knockout* respecto al wt puede ser consecuencia del efecto compensatorio generado por la existencia en arabisopsis de 35 genes de diferentes acuaporinas (Johanson et al., 2001). Es decir, la mutación nula de un gen puede no tener un efecto significativo en el total de la actividad de acuaporinas.

## **CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en relación a la caracterización de las respuestas tempranas y tardías al déficit hídrico en soja permiten proponer que el cierre estomático es una respuesta temprana inducida por déficit hídrico, mientras que la acumulación de prolina y CRA son indicadores de estrés tardío.

La caracterización de las respuestas tempranas y tardías en el genotipo tolerante N7001 y el sensible TJ2049 y de la EUA permite concluir que los menores potenciales hídricos de hoja en todas las condiciones, así como la menor conductancia estomática en condición control le conferirían a N7001 una ventaja adaptativa frente al déficit hídrico al tener una menor pérdida de agua por evapotranspiración. Sin embargo esto incide negativamente en la producción de biomasa y EUA.

La evaluación de plantas de arabidopsis que sobreexpresan el gen de la acuaporina de soja permite plantear que ésta juega un rol en el mantenimiento del flujo de agua hacia la parte aérea en condiciones de déficit hídrico moderado. Sin embargo su sobreexpresión provoca mayor pérdida de agua y la hace más sensible en condiciones de déficit hídrico severo.

**BIBLIOGRAFÍA**

**Abdel-Haleem H, Lee GJ, Boerma RH.** 2011. Identification of QTL for increased fibrous roots in soybean. *Theor Appl Genet.* **122**, 935-946.

**Aharon R, Shahak Y, Wininger S, Bendov R, Kapulnik Y, Galili G.** 2003. Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell* **15**, 439-447.

**Alexandersson E FL, Sjovall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P.** 2005. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol. Biol.* **59**, 469-484.

**Baiges I, Schaffner AR, Mas A.** 2001. Eight cDNA encoding putative aquaporins in Vitis hybrid Richter-110 and their differential expression. *Journal of Experimental Botany.* **52**, 1949-1951.

**Bennett JM, Sinclair TR, Muchow RC, Costello SR.** 1987. Dependence of stomatal conductance on leaf water potential, turgor potential, and relative water content in field-grown soybean and maize. *Crop Sci.* **27**, 984 – 990.

**Berger SL, Kimmel AR.** 1987. Guide to molecular cloning techniques. *Ed. Elsevier.* **152**.

**Biela A, Grote K, Otto B, Hoth S, Hedrich R, Kaldenhoff R.** 1999. The Nicotiana tabacum plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *The Plant Journal.* **18** 565-570

**Blum A.** 1975. Effect of the bm gene on epicuticular wax and the water relations of Sorghum bicolor. *Isr. J. Bot.* **24**.

**Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG.** 1995. Adaptations to Environmental Stresses. *Plant Cell* **7**, 1099-1111.

**Boursiac Y, Chen S, Luu DT, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C.** 2005. Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol.* **139**, 790-805.

**Boyer JS, Wong SC, Farquhar GD.** 1997. CO<sub>2</sub> and water vapour exchange across leaf cuticle (epidermis) at various water potentials. *Plant Physiol.* **114**, 185 – 191.

**Bray EA.** 1997. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* **2**, 48–54.

**Bray E, Bailey-Serres J, Weretilnyk E.** 2000. Responses to abiotic stresses. *Biochemistry and molecular biology of plants: American Society of Plant Physiologists USA.* Eds: Buchanan, B. B. Gruissem, W. Jones, R. L., 1158-1203

**Brown E, Cavines CE, Brown DA.** 1985. Response of selected soybean cultivars to soil moisture deficit. *Agron. J.* **77**, 274–278.

**Busscher WJ, Lipiec J, Bauer PJ, Carter TE.** 2000. Improved root penetration of soil hard layers by selected genotypes. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* **31** 19 – 20.

**Carrow RN.** 1996. Drought avoidance characteristics of diverse tall fescue cultivars. *Crop Sci.* **36**, 371-377.

**Carter TE, D Souza PI, Purcell LC.** 1999. Recent advances in breeding for drought and aluminium resistance in soybean. *Proceedings at the World Soybean Research Conference VI Chicago, IL. Superior Printing, Champagne, IL.*, 106 - 125.

**Charest C, Phan C.** 1990. Cold acclimation of wheat (*Triticum aestivum*): Properties of enzymes involved in proline metabolism. *Physiol Plant.* **80**, 159-168.

**Charlson DV, Bhatnagar S, King CA, Ray JD, Sneller CH, Carter TEJ, Purcell LC.** 2009. Polygenic inheritance of canopy wilting in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Theor. Appl. Genet.* **119**, 587-594.

**Chaumont F, Barrieu F, Jung R, Chrispeels MJ.** 2000. Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol.* **122**, 1025-1034.

**Ching Chan XQ, Man-Wah Li, Fuk-Ling Wong, Hon-Ming Lam.** 2012. Recent Developments of Genomic Research in Soybean. *Journal of Genetics and Genomics* **39**, 317-324.

**Chrispeels MJ, Maurel C.** 1994. Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells? *Plant Physiol.* **105**, 9-13.

**Clark A, Levitt J.** 1956. The basis of drought resistance in the soybean plant. *Physiol. Plant.* **9**, 598–606.

**Clough SJ, Bent AF.** 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.

**Cortes PM, Sinclair TR.** 1986. Gas-exchange of field-grown soybean under drought. *Agron. J.* **78**, 454–458.

**Curtis MD, Grossniklaus U.** 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* **133**, 462-469.

**Danielson JA, Johanson U.** 2008. Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol.* **8**.

**Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD.** 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 6025-6030.

**Dogan E, Kirnak H, Copur O.** 2007. Deficit irrigations during soybean reproductive stages and CROPGRO-soybean simulations under semi-arid climatic conditions. *Field Crops Res.* **103**, 154 – 159.

**Dornbos DL, Mullen RE.** 1992. Soybean seed protein and oil contents and fatty-acid composition adjustments by drought and temperature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 228–231.

**Dupouey JL, Leavitt S, Choisnel E, Jourdain S.** 1993. Modelling carbon isotope fractionation in tree rings based on effective evapotranspiration and soil water status. *Plant, Cell & Environment* **16**, 939-947.

**Earl HJ.** 2003. A precise gravimetric method for simulating drought stress in pot experiments. *Crop Sci.* **43**, 1868 - 1873.

**Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G, Sharkey TD.** 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C<sub>3</sub> plants. *Plant Biol. (Stuttg).* **6**, 269-279.

**Flexas J, Ribas-Carbo M, Hanson DT, Bota J, Otto B, Cifre J, McDowell N, Medrano H, Kaldenhoff R.** 2006. Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> in vivo. *Plant J.* **48**, 427-439.

**Fricke W, Chaumont F.** 2007. Solute and water relations of growing plant cells. In: Verbelen JP, Vissenberg K, eds. *The expanding cell*, Vol. 5. Berlin, Heidelberg: Springer, 7–31.

**Fukutoku Y, Yamada Y.** 1981. Sources of Proline-nitrogen in Water-stressed Soybean (*Glycine max* L.) I. Protein Metabolism and Proline Accumulation. *Plant Cell Physiol.* **22**, 1387-1404.

**Gilbert ME, Zwieniecki MA, Holbrook NM.** 2011. Independent variation in photosynthetic capacity and stomatal conductance leads to differences in intrinsic water use efficiency in 11 soybean genotypes before and during mild drought. *J. Exp. Bot.* **62**, 2875-2887.

**Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert PD, Khaspekov GL, Lukyanov KA, Vagner LL, Ermolaeva OD, Lukyanov SA, Sverdlov ED.** 1996. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem.* **240**, 90-97.

**Hazen SP, Pathan MS, Sanchez A, Baxter I, Dunn M, Estes B, Chang HS, Zhu T, Kreps JA, Nguyen HT.** 2005. Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. *Funct. Integr. Genomics.* **5**, 104-116.

**Herve P, Serraj R.** 2009. Gene technology and drought: A simple solution for a complex traits? *African J. Biotech.* **8**, 1740-1749.

**Heymann JB, Engel A.** 1999. Aquaporins: Phylogeny, Structure, and Physiology of Water Channels. *News Physiol. Sci.* **14**, 187-193.

**Hien DT, Jacobs M, Angenon G, Hermans C, Thu TT.** 2003. Proline accumulation and D1-pyrroline-5-carboxylase synthetase gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance. *Plant Sci.* **165**, 1059-1068.

**Hoogenboom G, Huck MG, Peterson C.** 1987. Root-growth rate of soybean as affected by drought stress. *Agron. J.* **79**, 607-614.

**Hudak CM, Patterson RP.** 1995. Vegetative growth analysis of a drought-resistant soybean plant introduction. *Crop Sci.* **35**, 464-471.

**Hufstetler EV, Boerma HR, Carter TE, Earl HJ.** 2007. Genotypic Variation for Three Physiological Traits Affecting Drought Tolerance in Soybean. *Crop Sci.* **47**, 25-35.

**Ishikawa F, Suga S, Uemura T, Sato MH, Maeshima M.** 2005. Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **579**, 5814-5820.

**Jackson SA, Iwata A, Lee SH, Schmutz J, Shoemaker R.** 2011. Sequencing crop genomes: approaches and applications. *New Phytol.* **191**, 915-925.

**James AT, Lawn RJ, Cooper M.** 2008a. Genotypic variation for drought stress response traits in soybean. I. Variation in soybean and wild *Glycine* spp . for epidermal conductance, osmotic potential, and relative water content. *Aust. J. Agric. Res.* **59**, 656 - 669.

**James AT, Lawn RJ, Cooper M.** 2008b. Genotypic variation for drought stress response traits in soybean. II. Inter-relations between epidermal conductance, osmotic potential, relative water content, and plant survival. *Aust. J. Agric. Res.* **59**, 670 – 678

**Johansson I, Larsson C, Ek B, Kjellbom P.** 1996. The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca<sup>2+</sup> and apoplastic water potential. *The Plant Cell*. **8**, 1181–1191.

**Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjovald S, Fraysse L, Weig AR, Kjellbom P.** 2001. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol*. **126**, 1358-1369.

**Jovanovi Z, Proki L, Stiki R, Peki S.** 1996. Cuticular characteristics in maize lines differing in drought resistance and maturity grouping. *J. Exp. Bot.* **47**, 59 - 60.

**Kaldenhoff R, Grote K, Zhu JJ, Zimmermann U.** 1998. Significance of plasmalemma aquaporins for water-transport in Arabidopsis thaliana. *Plant J*. **14**, 121-128.

**King CA, Purcell LC, Brye KR.** 2009. Differential wilting among soybean genotypes in response to water deficit. *Crop Sci*. **49**, 290-298.

**Korte LL, Specht JE, Williams JH, Sorensen RC.** 1983. Irrigation of soybean genotypes during reproductive ontogeny. II. Yield component responses. *Crop Sci*. **23**, 528-533.

**Lam HM, Xu X, Liu X, Chen W, Yang G, Wong FL, Li MW, He W, Qin N, Wang B, Li J, Jian M, Wang J, Shao G, Sun SS, Zhang G.** 2010. Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection. *Nat Genet*. **42**, 1053-1059.

**Lazcano-Ferrat I, Lovatt CJ.** 1999. Relationship between relative water content, nitrogen pools, and growth of Phaseolus vulgaris L. and P. acutifolius A. Gray during water deficit. *Crop Sci*. **39**, 467–475.

**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. *Ann. Bot.* **103**, 561-579.

**Liu F, Andersen MN, Jensen CR.** 2003. Loss of pod set caused by drought stress is associated with water status and ABA content of reproductive structures in soybean. *Funct. Plant Biol.* **30**, 271 - 280.

**Liu X, Vance Baird W.** 2004. Identification of a novel gene, HAABRC5, from *Helianthus annuus* (Asteraceae) that is upregulated in response to drought, salinity, and abscisic acid. *Am. J. Bot.* **91**, 184-191.

**Liu Y, Gai JY, Lu HN, Wang YJ, Chen SY.** 2005. Identification of drought tolerant germplasm and inheritance and QTL mapping of related root traits in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Yi Chuan Xue Bao.* **32**, 855-863.

**Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta CT)</sup> Method *Methods* **25**, 402-408.

**Manavalan LP, Guttikonda SK, Tran LS, Nguyen HT.** 2009. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant Cell Physiol.* **50**, 1260-1276.

**Martre P, Morillon R, Barrieu F, North GB, Nobel PS, Chrispeels MJ.** 2002. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiol.* **130**, 2101-2110.

**Maurel C.** 1997. Aquaporins and Water Permeability of Plant Membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 399-429.

**Mian MAR, Mailey MA, Ashley DA, Wells R, Carter TE, Parrot WA.** 1996. Molecular markers associated with water use efficiency and leaf ash in soybean. *Crop Sci.* **36**, 1252 - 1257.

**Minnoti G, Aust SD.** 1987. An investigation into the mechanism of citrate-Fe<sup>2+</sup>-dependent lipid peroxidation. *Free Rad. Biol. Med.* **3**, 379-387.

**Morillon R, Chrispeels MJ.** 2001. The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98** (24), 14138-43

**Munns R.** 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: Some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.* **16**, 15-24.

**Murashige T, Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.* **15**, 473-497.

**Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K.** 2006. Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. *Physiol. Plant.* **126**, 62-71.

**Niemietz CM, Tyerman SD.** 2000. Channel-mediated permeation of ammonia gas through the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS Lett.* **465**, 110-114.

**Nobel PS.** 2009. Physicochemical and Environmental Plant Physiology, 4th edition, San Diego, CA Academic Press/Elsevier 1-582.

**O'Leary MH.** 1993. Biochemical basis of carbon isotope fractionation. *Stable Isotopes and Plant Carbon-Water Relations.* New York: Academic Press. Ed: Ehleringer, J.R. Hall, A.E. Farquhar, G.D., 19-28.

**Pantalone VR, Rebetzke GJ, Burton JW, Carter TE.** 1996. Phenotypic evaluation of root traits in soybean and applicability to plant breeding. *Crop Sci.* **36**, 456-459.

**Passioura JB.** 2010. Scaling up: the essence of effective agricultural research. *Func. Plant Biol.* **37**, 585-591.

**Premachandra GS, Hahn DT, Rhodes D, Joly RJ.** 1995. Leaf water relations and solute accumulations in two grain sorghum lines exhibiting contrasting drought tolerance. *J. Exp. Bot.* **46**, 1833-1841.

**Rama Das VS, Reddy KR, Krishna CHM, Murthy SS, Rao JVS.** 1979. Transpirational rates in relation to quality of leaf epicuticular waxes. *Indian J. Exp. Biol.* **17**, 158-163.

**Ray JD, Sinclair TR.** 1998. The effect of pot size on growth and transpiration of maize and soybean during water deficit stress. *J. Exp. Bot.* **49**, 1381 - 1386.

**Riederer M, Schreiber L.** 2001. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *J. Exp. Bot.* **52**: 2023 – 2032.

**Rigaud J, Puppo A.** 1975. Indole-3-acetic catabolism by soybean bacteroids. *Journal of General Microbiology.* **88**, 223-228.

**Sade N, Gebretsadik M, Seligmann R, Schwartz A, Wallach R, Moshelion M.** 2010. The Role of Tobacco Aquaporin1 in Improving Water Use Efficiency, Hydraulic Conductivity, and Yield Production Under Salt Stress. *Plant Physiology.* **152**, 245-254.

**Samaras Y, Bressan R, Csonka M, Garcia-Rios R, D'Urzo P, Rhodes D.** 1995. Proline accumulation during drought and salinity. En: Environment and Plant Metabolism Flexibility and Acclimation. W.J. Davies Bios Scientific Publisher UK. (Ed.) pp.161-187.

**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

**Sandal NN, Marcker KA.** 1988. Soybean nodulin 26 is homologous to the major intrinsic protein of the bovine lens fiber membrane. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9347.

**Sharma KK, Lavanya M.** 2002. Recent developments in transgenics for abiotic stress in legumes of the semi-arid tropics. *JIRCAS Working Report*, 61 - 73.

**Shewfelt RL, Purvis AC.** 1995. Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. *HortScience.* **30**, 213–218.

**Schlesinger WH.** 1997. *Biogeochemistry: an Analysis of Global Change.* . 2nd ed. Academic Press, San Diego. 558p.

**Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J, Xu D, Hellsten U, May GD, Yu Y, Sakurai T, Umezawa T, Bhattacharyya MK, Sandhu D, Valliyodan B, Lindquist E, Peto M, Grant D, Shu S, Goodstein D, Barry K, Futrell-Griggs M, Abernathy B, Du J, Tian Z, Zhu L, Gill N, Joshi T, Libault M, Sethuraman A, Zhang XC, Shinozaki K, Nguyen HT, Wing RA, Cregan P, Specht J, Grimwood J, Rokhsar D, Stacey G, Shoemaker RC, Jackson SA.** Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature.* **463**, 178-183.

**Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K.** 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 296-302.

**Siefritz F, Tyree MT, Lovisolo C, Schubert A, Kaldenhoff R.** 2002. PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell.* **14**, 869-876.

**Silvente S, Sobolev AP, Lara M.** 2012. Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. *PLoS ONE* 7(6): e38554. doi:10.1371/journal.pone.0038554 **7**, e38554.

**Sinclair TR, Ludlow MM.** 1986. Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grain legumes. *Aust. J. Plant Physiol.* **13**, 329 - 341.

**Sloane RJ, Patterson RP, Carter TE.** 1990. Field drought tolerance of a soybean plant introduction. *Crop Sci.* **30**, 118-123.

**Smart LB, Moskal WA, Cameron KD, Bennett A.** 2001. MIP genes are down-regulated under drought stress in *Nicotiana glauca*. *Plant and Cell Physiology.* **42**, 686-693.

**Smirnoff N.** 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist.* **125**, 27-58.

**Specht JE, Hume DJ, Kumudini SV.** 1999. Soybean yield potential - a genetic and physiological perspective. *Crop Sci.* **39**, 1560 - 1570.

**Squeo FA, Ehlereinger JR.** 2004. Isótopos estables; una herramienta común para la ecofisiología vegetal y animal. *Fisiología ecológica en plantas mecanismos y respuestas a estrés en los ecosistemas. Valparaíso, EUV. Ed: Cabrera, H. M.,* 59-80.

**Steudle E, Frensch J.** 1996. Water transport in plants: Role of the apoplast. *Plant Soil.* **187**, 67-79.

**Steudle E, Peterson CA.** 1998. How does water get through roots?. *J. Exp.Bot.* **49**, 775-788.

**Steudle E.** 2000. Water uptake by roots: effects of water deficit. *J. Exp. Bot.* **51**, 1531-1542.

**Stupar RM.** 2010. Into the wild: The soybean genome meets its undomesticated relative. *Proc Natl Acad Sci. U S A* **107**, 21947-21948.

**Sugano M.** 2005. Soy in Health and Sugano Disease Prevention, CRC Press, New York, USA.

**Sundaresan S, Sudhakaran PR.** 1995. Water stress-induced alternations in the proline metabolism of drought-susceptible and tolerant cassava (*Manihot esculenta*) cultivars. *Physiol. Plant.* **94**, 635-642.

**Talame V, Ozturk NZ, Bohnert HJ, Tuberosa R.** 2007. Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *J. Exp. Bot.* **58**, 229-240.

**Terashima I, Ono K.** 2002. Effects of HgCl<sub>2</sub> on CO<sub>2</sub> dependence of leaf photosynthesis: evidence indicating involvement of aquaporins in CO<sub>2</sub> diffusion across the plasma membrane. *Plant Cell Physiol.* **43**, 70-78.

**Thuzar M, Puteh AB, Abdullah NAP, Lassim MB, Jusoff K.** 2010. The effects of temperature stress on the quality and yield of soya bean. *J. Agric. Sci.* **2**, 172-179.

**Troll W, Lindsley J.** 1955. A photometric method for the determination of proline. *J Biol Chem.* **215**, 655-660.

**Turner NC, Wright GC, Siddique KHM.** 2001. Adaptation of grain legumes (pulses) to water limited environments. *Adv. Agron.* **71**, 193 - 123.

**Tyerman SD, Bohnert HJ, Maurel C, Steudle E, Smith JAC.** 1999. Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *J. Exp. Bot.* **50**, 1055-1071.

**Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F, Kaldenhoff R.** 2003. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions. *Nature.* **425**, 734-737.

**Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 2006. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 113-122.

**van Gardingen PR, Grace J.** 1992. Vapour pressure deficit response of cuticular conductance in intact leaves of *Fagus sylvatica* L. *J. Exp. Bot.* **43**, 1293 - 1299.

**Vignes D, Djekoun A, Planchon C.** 1986. Responses de differents genotypes de soja au deficit hydrique. *Can. J. Plant Sci.* **66**, 247 - 255.

**Wright G.** 1996. Review of ACIAR selection for water use efficiency in legumes project recommends further research. *ACIAR Food Legume Newslett.* 2 - 3.

**Young VR.** 1991. Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. *J. Am. Diet. Assoc.* **91**, 828-835.

**Zardoya R.** 2005. Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biology of the Cell.* **97**: 397–414.

**Zhang JZ, Creelman RA, Zhu JK.** 2004. From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiology.* **135**, 615-621.

**Zhang Y, Wang Z, Chai T, Wen Z, Zhang H.** 2008. Indian mustard aquaporin improves drought and heavy-metal resistance in tobacco. *Molecular Biotechnology* . **40**, 280-292.