

**Doctorado en Ciencias Biológicas PEDECIBA**

**Área: Biología**

**Subárea: Biología Celular y Molecular**



## **Identificación y caracterización funcional de genes de tolerancia a sequía en soja**



**MSc. Juan Pablo Gallino Malcuori**

**Orientador: Dra. Sabina Vidal**

**Coorientadores: Dr. Jorge Monza y Dr. Omar Borsani**

**Laboratorio de Biología Molecular Vegetal**

**Facultad de Ciencias-UDELAR**

**Montevideo, 2013.**

<b>Índice</b> .....	1
<b>Resumen</b> .....	3
<b>Introducción</b> .....	4
Características del estrés hídrico en plantas .....	7
Daños causados por el déficit hídrico .....	7
Respuestas frente al estrés .....	8
Rol del ácido abscísico en las respuestas al estrés hídrico .....	11
Percepción del ABA .....	12
Intermediarios de la señal .....	13
Factores de transcripción .....	14
Vía mediada por AREB/ABF .....	16
Vía mediada por MYC /MYB.....	17
Vía mediada por CBF/DREB .....	19
Vía mediada por NAC.....	21
Estrategias para la obtención de plantas tolerantes .....	22
<b>Objetivos</b> .....	24
<b>Materiales y métodos</b> .....	25
Material vegetal .....	25
Condiciones de crecimiento.....	25
Extracción de ácidos nucleicos.....	27
Extracción de ARN total y mensajero .....	27
Extracción de ADN genómico .....	28
Biblioteca SSH (Sustracción por supresión e hibridación).....	28
Síntesis de ADNc doble hebra y digestión con <i>Rsa</i> I.....	29
Hibridaciones y PCR.....	29
Clonación y transformación de las secuencias sustraídas .....	30
Análisis de los clones por digestión con <i>Eco</i> RI.....	31
Análisis de los clones por secuenciación.....	31
Análisis de expresión .....	32
Análisis global de la expresión por macroarreglos.....	32
Ensayos de <i>Northern Blot</i> .....	33
Construcciones para sobre-expresión y determinación de la localización subcelular .....	34

Construcciones para sobre expresión .....	34
Construcciones para la determinación de la localización subcelular .....	35
Transformación de <i>Agrobacterium</i> .....	37
Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	37
Agroinfiltración de tabaco y microscopía .....	38
Evaluación molecular de líneas de <i>Arabidopsis</i> transgénicas .....	39
Evaluación fenotípica de <i>Arabidopsis</i> .....	39
<b>Resultados</b> .....	41
Identificación de genes de respuesta a déficit hídrico.....	41
Caracterización de la biblioteca de ADNc.....	42
Análisis de la expresión global de genes por macroarreglos .....	44
Análisis de la expresión de genes seleccionados .....	50
Caracterización funcional de los genes candidatos .....	61
Evaluación del rol de <i>GmIFiso4G</i> en la respuesta a sequía.....	61
Análisis de la localización subcelular de GmIFiso4G.....	65
Generación y caracterización molecular de líneas de <i>Arabidopsis</i> con expresión condicional del gen <i>GmIFiso4G</i> .....	66
Caracterización fenotípica de plantas transgénicas.....	69
(I) Respuesta frente a estrés osmótico y sequía .....	70
(II) Respuesta frente a estrés salino .....	76
Caracterización funcional de <i>GmSEOa</i> .....	79
Determinación de la localización subcelular de GmSEOa.....	82
Generación y caracterización molecular de líneas de <i>Arabidopsis</i> con expresión condicional del gen <i>GmSEOa</i> .....	83
Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas .....	85
(I) Respuesta frente a estrés osmótico y sequía .....	85
(II) Respuesta frente a estrés salino .....	91
<b>Discusión</b> .....	94
Rol de <i>GmIFiso4G</i> en la tolerancia al estrés abiótico .....	98
Rol de <i>GmSEOa</i> en la tolerancia al estrés abiótico .....	103
<b>Conclusiones y Perspectivas</b> .....	105
<b>Bibliografía</b> .....	107

**RESUMEN**

Entre los aspectos inherentes a la producción agrícola, los factores de estrés abiótico como la sequía limitan la distribución geográfica de las plantas y acarrear reducciones significativas en el crecimiento y productividad de especies económicamente importantes. La obtención de información relacionada con el genoma, incluyendo su secuencia, la función y los mecanismos de control de la expresión de los genes de plantas sometidas a condiciones de estrés, puede contribuir al desarrollo de especies más tolerantes. Esta información es útil para el diseño y utilización de marcadores moleculares en programas de mejoramiento convencional o para la obtención de genotipos tolerantes mediante transgénesis. En esta tesis se identificaron y caracterizaron genes de respuesta al déficit hídrico en un genotipo de soja tolerante a la sequía. A partir del ARN extraído del genotipo tolerante N7001 se obtuvo una biblioteca sustraída de ADNc enriquecida en secuencias expresadas diferencialmente en condiciones de déficit hídrico. Se realizó un análisis de expresión global de los genes representados en la biblioteca, utilizando sondas sustraídas generadas a partir de ARN de los genotipos N7001 y TJ2049. En el genotipo N7001 se observó una inducción temprana en condiciones de estrés de un porcentaje mayor de genes que para la planta susceptible TJ2049, mientras que en el genotipo tolerante Munasqa se observó la expresión constitutiva de varios genes de respuesta a déficit hídrico. A partir del análisis de expresión global se seleccionaron dos genes que exhibieron una expresión diferencial entre las plantas tolerantes y susceptibles, para profundizar en su función. El *GmeIFiso4G* que codifica un factor de iniciación de la traducción y el gen *GmSEOa* que codifica una proteína de la familia de las "*Sieve Element Occlusion*", cuyos miembros residen generalmente en el floema de las plantas vasculares. Para esto se generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* utilizando construcciones génicas que permitieron la expresión condicional de los genes mencionados, mediada por el agregado de  $\beta$  estradiol. Los resultados de los análisis fenotípicos de plantas sometidas a condiciones de estrés determinaron que la expresión heteróloga de *GmSEOa* y de *GmeIFiso4G* en *Arabidopsis* aumentó sensiblemente la tolerancia al estrés osmótico y salino de esta planta.

## INTRODUCCIÓN

La naturaleza sésil de las plantas hace que estas estén expuestas a un amplio espectro de condiciones ambientales y como consecuencia hayan evolucionado mecanismos que les permiten adaptarse a ellas, y a limitar el daño fisiológico que pueda generarse. Las plantas responden a los distintos tipos de estrés induciendo una serie de eventos que comienzan con la percepción del estrés y llevan a la activación de una batería de genes. Los componentes clave en la respuesta al estrés son el propio estímulo, las moléculas señal, transductores, reguladores de la transcripción, genes de respuesta y las propias respuestas al estrés, que incluyen cambios morfológicos, metabólicos y fisiológicos. Las plantas responden a estímulos específicos haciendo uso de vías en común para adaptarse a un amplio rango de factores de estrés (Pastori y Foyer, 2002).

Entre las condiciones ambientales que ocasionan daño a los vegetales, se encuentran las inundaciones, la sequía, las temperaturas extremas, la salinidad del suelo, una inadecuada cantidad de nutrientes y el exceso o la falta de luz, entre otras. Los distintos grados de tolerancia y sensibilidad al estrés dependen de la especie, el genotipo y la etapa de desarrollo en la que se encuentre la planta en el momento de exposición a un estrés determinado. La duración, severidad, y la frecuencia a la cual se impone el estrés, influyen en como la planta responde (Buchanan *et al.*, 2001).

Varios factores de estrés ambiental causan una alteración en el estado hídrico de la planta. Esto puede ocurrir tanto en la sequía, donde la disponibilidad del agua es baja en el ambiente, durante el estrés salino, cuando se ve afectado el contenido iónico y durante el estrés por congelamiento, en el cual la deshidratación celular es causada por la formación de hielo extracelular.

El estrés generado por factores ambientales como el frío, la sequía y la alta salinidad representan la primera causa de pérdidas de cultivos en el mundo (Bray *et al.*, 2000). Los trabajos de las últimas décadas han revelado que estos tipos de estrés en plantas pueden ocasionar respuestas fisiológicas y moleculares similares (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2000; Shinozaki *et al.*, 2003; Haake *et al.*, 2002; Nakashima *et al.*, 2009).

La soja (*Glycine max* (L.) Merr.), es una leguminosa originaria del este de Asia, obtenida a partir de la domesticación de la especie salvaje *Glycine soja* Seib. et Zucc. (Gai, 1997; Gai y Guo, 2001). Tiene un genoma alotetraploide diploidizado que sufrió por lo menos dos eventos de duplicación (Schlueter *et al.*, 2004; Schlueter, 2007; Gill *et al.*, 2009). El genoma de soja es relativamente grande en comparación con otras especies de plantas secuenciadas, ~1,150 millones de pares de bases (más de 8 veces el genoma de *Arabidopsis*), y codificaría para 46.400 genes aproximadamente distribuidos en 20 cromosomas (Schmutz *et al.*, 2010; Sterck *et al.*, 2007).

La soja tiene un fuerte impacto en la economía de los países de la región. El 50 % de la producción de este cultivo a nivel mundial se lleva a cabo en el Mercosur. En Uruguay en particular, la soja ocupa actualmente la mayor superficie de siembra, cerca de 900 mil hectáreas en 2011, según estadísticas publicadas recientemente por el MGAP en su sitio web ([www.mgap.gub.uy](http://www.mgap.gub.uy)) y está ubicada entre los primeros lugares de productos de exportación del país. Es un cultivo atractivo desde varios puntos de vista. La soja representa la principal fuente de aceite vegetal y de proteínas para el consumo alimenticio a nivel mundial y se le reconocen numerosas características beneficiosas desde el punto de vista nutricional, como su alto contenido de ciertos metabolitos secundarios (Sakai y Kogiso, 2008). Por otro lado, esta especie tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Burris y Roberts 1993) y por lo tanto requiere menor consumo de fertilizantes. La soja también es un cultivo atractivo para la obtención de biodiesel (Pimentel y Patzek, 2008).

Las condiciones de sequía afectan el rendimiento del cultivo de soja a lo largo de prácticamente todos los estadios de su crecimiento (Abdel-Haleem *et al.*, 2011). En condiciones de déficits hídricos, la planta de soja reduce su metabolismo para sobrevivir el estrés, y reinicia su actividad metabólica normal cuando retoma las condiciones de crecimiento normales (Dornbos y Mullen, 1992). De todas formas la sequía reduce los rendimientos en aproximadamente un 40 % en comparación con la planta en condiciones óptimas (Specht *et al.*, 1999). Incluso si ocurren periodos cortos de estrés hídrico durante la etapa del

llenado de semillas, pueden producir una disminución del rendimiento de más del 20 % (Brevedan y Egli, 2003). Según el genotipo, la planta utiliza entre 450 y 700 mm de agua durante su ciclo de crecimiento (Dogan *et al.*, 2007).

La eficiencia del uso de agua (WUE; *Water Use Efficiency*) es una característica de la planta que define la cantidad de biomasa acumulada por unidad de agua utilizada (gramos de peso seco por litro de agua consumido). Se han reportado variaciones genéticas en la WUE para varios cultivares, incluyendo la soja (Mian *et al.*, 1996). La asociación positiva entre WUE y el rendimiento total de biomasa en condiciones de sequía sugiere que una mejora en la WUE debería resultar en incrementos de los rendimientos (Wright, 1996). En estudios realizados por Hufstetler y colaboradores se determinó la WUE para 24 genotipos de soja, y se obtuvieron valores que van desde 2.7g/L a 3.4 g/L (Hufstetler *et al.*, 2007b). Se ha propuesto que la apertura estomática podría ser regulada de tal manera que bajo condiciones de déficit hídrico, se realice un cierre estomático parcial, lo que lleva a un incremento de la WUE (Liu *et al.*, 2005b).

La historia del mejoramiento genético de soja para la tolerancia al estrés hídrico es relativamente reciente. Hasta 1990 no había genotipos de soja identificados con tolerancia agronómica a la sequía. La primera fuente identificada de tolerancia a estrés hídrico se produjo con la descripción de líneas de marchitamiento lento "*slow wilting genotypes*" (Sloane *et al.*, 1990; Hudak *et al.*, 1995). Fletcher y colaboradores (Fletcher *et al.*, 2007) observaron que estos genotipos no incrementan su tasa de transpiración una vez que el VPD (déficit de presión de vapor) alcanza 2 kPa, mientras que las otras variedades continuaron aumentando su transpiración a medida que la VPD aumentaba. La característica *slow wilting* es especialmente deseable en ambientes de baja humedad (altos VPD). Por otra parte, algunos estudios describen a la soja cultivada como una especie de escasa variabilidad genética, lo cual explica las pocas referencias al carácter de tolerancia a sequía comparado con otros cultivos sembrados en las mismas regiones geográficas (Hyten *et al.*, 2006).

La elección de soja como modelo para la prospección de genes involucrados en la tolerancia al estrés hídrico responde a varios factores. Primero, este

cultivo es sensible a la sequía (Spetch *et al.*, 1999). Por otra parte, dada su importancia agronómica, se cuenta con varias herramientas para su estudio a nivel fisiológico y molecular. Su genoma está secuenciado y se cuenta con datos de estudios transcriptómicos para diferentes condiciones fisiológicas y de desarrollo (Libault *et al.*, 2010). A su vez la soja representa un modelo interesante para el estudio de la evolución génica puesto que presenta un genoma que contiene varios bloques de genes duplicados (Schmuzt *et al.*, 2010). Un mayor número de genes con una misma función implica una mayor complejidad (He y Zhang, 2005), en este sentido la soja se presenta como un excelente modelo para estudiar la diversificación génica.

### **Características del estrés hídrico en plantas**

La sequía puede definirse como un periodo de precipitaciones por debajo de lo normal, que limita la productividad en un sistema natural o agronómico (Boyer, 1982; Kramer y Boyer, 1995). El componente del estrés que define a la sequía es un decrecimiento en la disponibilidad del agua en el suelo. Este puede ser cuantificado como una baja en el potencial hídrico ( $\psi_w$ ) (Kramer y Boyer, 1995). El potencial hídrico se refiere a la energía libre que poseen las moléculas de agua y cuantifica la tendencia del agua de fluir desde un lugar determinado a otro. La dirección del flujo de agua dentro o fuera de la célula vegetal depende del gradiente entre el  $\psi_w$  externo y el interno. Para que una planta pueda adquirir agua del suelo u otro medio de crecimiento, ésta debe poseer un  $\psi_w$  menor al mismo. El  $\psi_w$  de una célula vegetal con pared se puede calcular mediante la ecuación simplificada:  $\psi_w = \psi_s + \psi_p$ , donde  $\psi_s$  representa el potencial osmótico y  $\psi_p$  el potencial de presión (presión de turgencia).

### **Daños causados por el déficit hídrico**

En las plantas sensibles a la deshidratación, la falta de agua causa agregación de estructuras subcelulares, degradación de las membranas cloroplásticas y mitocondriales, una disminución en la tasa de fotosíntesis y en la de respiración. La clorofila a menudo se degrada y el almidón y las proteínas insolubles en agua se hidrolizan. Debido a la reducción en el contenido de



agua, se acumulan iones dañinos y se inactivan proteínas por desaminación, oxidación o disrupción de su estructura tridimensional. El estrés hídrico limita la difusión de  $\text{CO}_2$  desde el aire a los sitios de carboxilación (Lawlor y Cornic, 2002; Chaves *et al.*, 2003). Bajo condiciones moderadas de estrés, la conductancia estomática es reducida por la deshidratación de las células guarda y/o por señales químicas procedentes de la raíz. La conductancia de  $\text{CO}_2$  en el mesófilo también es afectada durante el estrés hídrico (Flexas y Medrano, 2002), lo cual se traduce a una limitación adicional de  $\text{CO}_2$  en los cloroplastos (Bongi y Loreto, 1989). A medida que el estrés hídrico se intensifica se observa una limitación bioquímica del fotosistema (Lawlor y Cornic, 2002) y finalmente se produce un daño irreversible a estos (Havaux *et al.*, 1986), fundamentalmente a nivel del fotosistema II (PSII). Esto último ocurre probablemente como resultado del estrés oxidativo inducido por la luz y no directamente por el estrés hídrico (Navari-Izzo y Rascio, 1999). Esto se debe a un aumento en el número de electrones que escapan de la cadena transportadora y reaccionan con el oxígeno en los cloroplastos (El-baky, *et al.*, 2003), originando especies reactivas del oxígeno (ROS), tales como: el oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), el superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). El desequilibrio entre la producción y el metabolismo de las ROS es el causante del daño de lípidos, ácidos nucleicos y proteínas (Mahalingam y Fedoroff, 2003).

### **Respuestas frente al estrés**

Las respuestas finales de la planta frente al estrés hídrico pueden ser agrupadas en tres categorías: escape, evasión y tolerancia (Carrow, 1996).

El mecanismo de escape a la sequía tiende a maximizar la capacidad de la planta de completar su ciclo de vida antes de experimentar un serio déficit hídrico. Este mecanismo involucra rápidos cambios fisiológicos y en el desarrollo que incluyen la madurez y floración prematura y la dormancia o latencia en la estación seca.

Los mecanismos de evasión por su parte, se caracterizan por la capacidad de la planta de mantener en los tejidos un contenido hídrico relativamente alto, a pesar de la baja disponibilidad de agua en el suelo. Dentro de este grupo podemos encontrar respuestas fisiológicas que están asociados al aumento de la profundidad y de la eficiencia del sistema radicular, así como con estrategias para la conservación del agua, como el cierre estomático, la baja conductancia cuticular, la reducción del área foliar y la baja absorción de luz. A nivel tisular los mecanismos de evasión incluyen la acumulación de solutos compatibles (ajuste osmótico) y el engrosamiento de la pared celular (Zhang *et al.*, 1999)

Como se mencionó anteriormente, para que una célula pueda adquirir agua del entorno, esta debe poseer un  $\psi_w$  menor al mismo. De esta manera la acumulación de solutos en respuesta a  $\psi_w$  externos bajos determina una disminución del  $\psi_w$  interno debido a la disminución de  $\psi_s$ , y por lo tanto permite que se continúe adquiriendo agua del medio. Es importante que los solutos acumulados no interfieran con las funciones celulares. Varias plantas acumulan uno o varios tipos de solutos, llamados solutos compatibles. Estos pueden acumularse en altos niveles sin interferir en el metabolismo (Yancey *et al.*, 1982). Los solutos compatibles son generalmente compuestos hidrofílicos con pesos moleculares pequeños y sin carga neta a pH 7, lo que permite su acumulación a las altas concentraciones intracelulares, sin perturbar en gran medida las estructuras de las macromoléculas celulares. Químicamente se dividen en cuatro clases: compuestos aniónicos (por ejemplo glicina betaína), azúcares o polialcoholes (por ejemplo manitol, D-ononitol, pinitol y trealosa), aminoácidos (por ejemplo la prolina), y alcaloides (como por ejemplo trigonelina) (Hanson y Hitz, 1982; Bohnert y Jensen, 1996; Sakamoto y Murata, 2000; Shabala y Cuin, 2006). Los solutos compatibles también pueden tener una función protectora de proteínas y membranas (Hincha y Hagemann, 2004).

Las propiedades de la pared celular también juegan un rol importante en la evasión de la deshidratación. La elasticidad de la pared celular puede ser cuantificada por el módulo de elasticidad  $\epsilon$  ( $\epsilon = V \Delta\psi_p / \Delta V$ ), donde V corresponde al volumen celular, lo cual es equivalente al contenido hídrico relativo (CHR)

(Kramer y Boyer, 1995; Murphy y Ortega, 1995). Cuando  $\varepsilon$  es bajo, la pared celular se deforma más fácilmente, por lo que una pérdida de agua en la célula causa un marcado cambio en el volumen celular, pero esto resulta sólo en un pequeño cambio en la turgencia, ya que la pared celular se achica y continúa comprimiendo el citoplasma. En contraste, cuando  $\varepsilon$  es alto, una pequeña pérdida de agua no causa mayores cambios en el volumen celular pero sí determina una disminución rápida de  $\psi_p$ .

A medida que el estrés se hace más severo es difícil para las plantas evadir la deshidratación por lo que cuentan con estrategias que tienden a mantener la integridad de las células en condiciones de restricción hídrica severa. Estas se consideran mecanismos de tolerancia a la sequía. La mayoría de los mecanismos de tolerancia a la deshidratación estudiados hasta la fecha funcionan principalmente en la protección de la estructura celular de los efectos de la deshidratación. Existen varios tipos de proteínas protectoras, entre las cuales las dehidrinas y otras proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*) tienen un rol preponderante. Estas se acumulan en respuesta a la pérdida de agua, tanto frente al estrés abiótico como durante la maduración de las semillas (Close, 1997). A pesar de que no se conoce completamente como actúan estas proteínas, se postula que entre las funciones que cumplen actúan como chaperonas protegiendo proteínas y estructuras de membranas (Bravo *et al.*, 2003; Hara *et al.*, 2001). Otro aspecto de la tolerancia a la deshidratación y a otros factores de estrés, es el control de los niveles de las especies reactivas de oxígeno y/o la limitación del daño causado por las mismas. Para ello la planta cuenta con enzimas detoxificantes que catalizan la degradación rápida de estas especies. Estas enzimas involucran superóxido dismutasas (SOD), catalasas (CAT) y un gran número de peroxidasas reductoras del  $H_2O_2$ . Otros antioxidantes no enzimáticos, como el glutatión, el ascorbato, los carotenoides, los flavonoides, el tocoferol, los ácidos ureico y lipoico, varios aminoácidos, poliaminas y una variedad de compuestos fenólicos también cumplen un rol importante en la red de antioxidantes que protegen a las células del estrés (Shannon *et al.*, 1966; Larson, 1988; Navrot *et al.*, 2006).

En los últimos años se ha hecho evidente que varios de los eventos moleculares iniciados por un estrés hídrico, pueden actuar en más de una forma. Por ejemplo, la acumulación de prolina podría jugar un rol en la evasión de la deshidratación, disminuyendo el  $\psi_s$  a nivel intracelular y por lo tanto el  $\psi_w$ , permitiendo así el ingreso de agua en condiciones de  $\psi_w$  externos bajos (Verslues *et al.*, 2006). A su vez, también se ha planteado que la acumulación de prolina protegería las membranas y proteínas, regulando el estado redox y actuando como captador de ROS (Hare *et al.*, 1998; Hinch y Hagemann, 2004; Smirnov y Cumbes, 1989; Verslues y Sharp, 1999; Szabados y Savouré, 2010). Si bien existen ejemplos extremos de tolerancia a la deshidratación, la mayoría de las plantas mesófitas no son capaces de recuperarse de una desecación extrema, es decir de un 50 % o más de pérdida del contenido hídrico relativo.

Actualmente se considera que las respuestas al estrés causado por bajos potenciales hídricos, conforman una red reguladora compleja, que responde tanto a los estímulos causados por condiciones externas (pérdida de turgencia, reducción del contenido hídrico relativo, etc), como estímulos internos, tales como son la producción de ROS y los estímulos hormonales (Verslues y Zhu, 2005). A pesar de que varios componentes moleculares permanecen sin ser caracterizados, es conocido que el ácido abscísico (ABA) juega un rol clave en la regulación de las respuestas a varios estreses.

### **Rol del ácido abscísico en las respuestas al estrés hídrico**

El ABA es una fitohormona que juega un rol como regulador en varios procesos fisiológicos, tales como la maduración de embriones, el desarrollo de las semillas, la dormancia de brotes y semillas, la geminación, el crecimiento radicular, la maduración del fruto, la regulación de la apertura y cierre estomático y la activación de genes de respuesta al estrés (Leung y Giraudat, 1998; Rock 2000; Rohde *et al.*, 2000; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2000; Agarwal y Jha, 2010). En *Arabidopsis*, el 14 % de los genes se encuentran

regulados por ABA (Huang *et al.*, 2007), resaltando la importancia de esta hormona en la fisiología de la planta. Los factores de estrés ambientales como la sequía, la salinidad, el frío, el calor y las heridas disparan niveles elevados de esta hormona. La acción del ABA no sólo involucra la regulación de vías de desarrollo, sino también la activación de genes responsables del ajuste osmótico, la compartimentarización de iones, la conductividad hidráulica radicular y la regulación del crecimiento aéreo y radicular (Verslues y Zhu, 2005; Pospíšilová *et al.*, 2009). Varios genes que son inducidos en respuesta al estrés por deshidratación y frío, también pueden ser inducidos mediante tratamiento con ABA exógeno (Zhu, 2002; Shinozaki *et al.*, 2003). Sin embargo muchos genes no responden al ABA, a pesar de ser inducidos en condiciones de estrés (Zhu, 2002; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005). Esto indica la existencia de más de una vía de transducción de señales, siendo algunas dependientes y otras independientes del ABA.

### **Percepción del ABA**

Luego de la percepción del estrés, la síntesis de ABA es inducida principalmente en tejidos vasculares y a partir de los cuales, la hormona es exportada desde el sitio de biosíntesis hacia otras partes de la planta a través del xilema (Christmann *et al.*, 2007).

Trabajos recientes permitieron identificar 3 posibles tipos de receptores de ABA. Uno de ellos, ABAR/CHLH, corresponde a la subunidad H de la Mg-quelatasa, de localización cloroplástica y nuclear, para la cual no hay un consenso en su función como receptor de la hormona (Shen *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009; André y Hansson, 2009; Du *et al.*, 2012). El segundo tipo de receptores corresponde a proteínas G tipo GPCR (*G protein coupled receptor*) asociadas a la membrana plasmática (Liu *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2009). Por último, los candidatos más certeros a receptores de ABA son las proteínas pertenecientes a la familia RCAR/PYR1/PYL, de localización nuclear y citosólica (Park *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009). Estas últimas presentan un dominio denominado START que es capaz de unirse a

moléculas pequeñas hidrofóbicas (Park *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009). De acuerdo con el modelo propuesto por Klingler y colaboradores (Klingler, *et al.*, 2010), la unión del ABA a los receptores RCAR/PYR1/PYL lleva a la interacción de los mismos con la fosfatasa 2C (PP2C: *protein phosphatase 2C*). La PP2C unida al receptor no puede ejercer su función inhibitoria sobre la quinasa SnRK2, la cual está involucrada en la fosforilación del factor ABF2. A su vez los factores ABF2 fosforilados son capaces de unirse a los elementos de respuesta ABRE y determinar la activación de la transcripción de los genes controlados por estos promotores.

El descubrimiento de los receptores de la familia PYR, no solo aportó al conocimiento de la regulación de genes de respuesta a ABA, sino que también dio indicios de cómo se lleva a cabo el control de los canales iónicos en las células guarda. Tanto la sequía como el ABA inducen el cierre estomático, el cual está regulado por la turgencia de las células guarda. Se ha identificado un sistema similar al descrito anteriormente, conformado por una fosfatasa 2C (ABI1) que suprime la acción de la quinasa SnRK2E/OST1 (*open stomata 1*), la cual interactúa directamente y fosforila al canal aniónico SLAC1 (*slow anion channel-associated 1*) activándolo y permitiendo el flujo de iones  $\text{Cl}^-$  hacia el apoplasto (Negi *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009). Por otra parte existen canales de  $\text{K}^+$  llamados KAT1 que están involucrados en la apertura estomática, estos pueden ser fosforilados a nivel de su extremo C-terminal por la quinasa SnRK2E/OST1, pero el resultado, a diferencia que para SLAC1, es la inactivación del mismo y por lo tanto una reducción del flujo hacia el interior de iones  $\text{K}^+$  (Sato *et al.*, 2009).

### **Intermediarios de la señal**

Se han detectado varias quinasas implicadas en la señalización del ABA que afectan la regulación del movimiento estomático y/o la expresión de diversos genes. Algunas de estas tienen una expresión inducida por ABA (Hwang y Goodman, 1995; Hong *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998; Mikami *et al.*, 1998; Gómez-Cadenas *et al.*, 1999; Piao *et al.*, 1999), mientras que otras se

encuentran expresadas constitutivamente pero se activan con ABA (Li y Assmann, 1996; Burnett *et al.*, 2000). Una de las quinasas encontradas que se encuentran involucradas en la traducción de la señal es la codificada por el gen *AAPK*, la cual es una proteína quinasa Ser/Thr activada por ABA, específica de la célula guarda, que actúa en la regulación de la apertura del estoma (Li *et al.*, 2000). La expresión de una AAPK defectuosa en la unión a ATP, inhibe el cierre del estoma inducido por ABA mediante la prevención de la activación de canales aniónicos, pero no afecta la inhibición del ABA en la apertura del estoma.

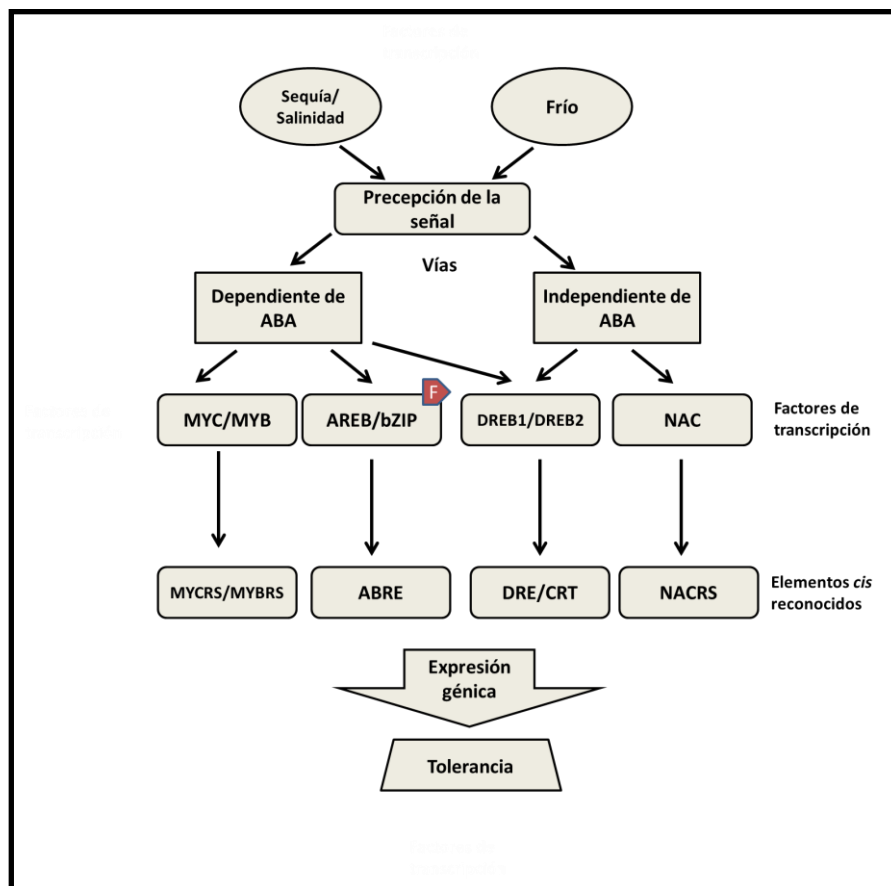
Uno de los componentes más estudiados de la vía de señalización del ABA es la PP2C (*protein phosphatase 2C*) (Gosti *et al.*, 1999; Sheen, 1998). La identificación de los loci insensibles a ABA, *ABI1* y *ABI2* (*ABA insensitive 1* y *2* respectivamente), los cuales codifican para PP2Cs, han permitido generar información acerca de la importancia de PP2C y los eventos de fosforilación de proteínas en las vías de señalización del ABA (Finkelstein *et al.*, 2002). *ABI1* y *ABI2* actúan como reguladores negativos en la vía de señalización de ABA (Ma *et al.*, 2009, Park *et al.*, 2009), inhibiendo la acción de quinasas que forman parte de la vía de señalización.

### **Factores de transcripción**

Por medio de análisis moleculares y genómicos, se han identificados varios elementos *in cis* de genes de respuesta al estrés hídrico y los correspondientes factores de transcripción que los reconocen. Existen al menos cuatro sistemas de regulación de la expresión génica frente al estrés hídrico (Shinozaki *et al.*, 2003), dos de los cuales son dependientes de ABA y dos independientes.

El ABA regula la adaptación al estrés mediante la activación de por lo menos 2 sistemas de regulación: el AREB/ABF (*ABA-responsive element-binding protein/ABA-binding factor*) y el MYC/MYB (Abe *et al.*, 1997; Busk y Page's, 1998). Por otra parte, las vías independientes del ABA involucran a los sistemas CBF/DREB (*cold-binding factor/dehydration responsive element*

*binding*) y NAC/ZF-HD (NAM, ATAF y CUC/*Zinc-finger homeodomain*) (Saibo *et al.*, 2009). Muchos de los genes involucrados en estas cascadas de señalización son inducidos por diferentes tipos de estrés, lo que sugiere la existencia de puntos de interacción o entrecruzamiento entre las distintas vías que regulan la expresión génica (Figura 1). Por otra parte, existen otros factores de transcripción identificados en las respuestas al estrés que no están involucrados en estas vías, como son los factores de transcripción WRKY, HARDY, proteínas con dedos de zinc, entre otros, que son de importancia para la adaptación de la planta al estrés.



**Figura 1.** Representación esquemática de las vías de regulación transcripcional involucradas en las respuestas a estrés abiótico, dependiente e independientes del ABA. Se muestran los elementos *cis* y las familias de factores de transcripción que conforman las diferentes vías. Se identifica con la letra “F” el factor de transcripción cuya actividad está regulada por la fosforilación dependiente de ABA. Modificado de Lata y Prasad (2011).



### Vía mediada por AREB/ABF

Se han identificado elementos *cis* llamados de respuesta a ABA (ABRE; ABA *responsive element*), cuya secuencia es PyACGTGG/TC (Bray, 1994; Giraudat *et al.*, 1994; Busk y Page, 1998) que están involucrados en la regulación de la transcripción de varios genes. La activación de los genes en respuesta al estrés requiere de la presencia de varios de estos elementos, o de una combinación de estos con otros elementos denominados *coupling elements* (CEs) (Yoshida *et al.*, 2010). Los AREB (ABA-responsive element binding protein) o ABFs (ABA *responsive element binding factor*) son factores de transcripción de la familia bZIP (*basic leucine zipper*), que se unen a los motivos ABRE y activan la expresión génica dependiente de ABA (Choi *et al.*, 2000; Uno *et al.*, 2000). Estos factores de transcripción actúan en respuesta a distintos tipos de estrés (Cuadro 1). Por ejemplo, ABF1 actúa en respuesta al frío; ABF2 en la respuesta a sequía, salinidad y calor; ABF3 en el estrés salino y ABF4 en respuesta al frío, salinidad y sequía (Kim *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2005). Los AREB/ABFs son fosforilados por una quinasa de 42 kDa que responde a ABA. Esta fosforilación dependiente de ABA estaría involucrada en la activación de las proteínas AREB (Uno *et al.*, 2000; Mustilli *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2010). La sobreexpresión de genes de esta familia resulta en una reducción de la transpiración y una mejora en la tolerancia a la sequía, alta salinidad y al calor (Kang *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2007; Xiang *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2010).

**Cuadro 1.** Factores de transcripción de la familia bZIP involucrados en la vía dependiente de ABA identificados en diferentes especies y bajo diferentes condiciones de estrés abiótico.

Familia	Factor Transcripción	Inducido por ABA	Condición de estrés	Especie	elemento cis	referencia
bZIP	ABF1	SI	frío	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABREs (CACGTGGC/CGCGTGCC)	Choi et al., 2000
	ABF2	SI	salinidad, estrés hídrico	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABREs (CACGTGGC/CGCGTGCC)	Choi et al., 2000
	ABF3	SI	salinidad	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABREs (CACGTGGC/CGCGTGCC)	Choi et al., 2000
	ABF4	SI	estrés hídrico, salinidad, frío	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABREs (CACGTGGC/CGCGTGCC)	Choi et al., 2000
	GmbZIP44	SI	estrés hídrico, salinidad	<i>Glycine max</i>	GLM (GTGAGTCAT)	Liao et al., 2008a
	GmbZIP62	SI	frío, estrés hídrico, salinidad	<i>Glycine max</i>	ABRE (CCACGTGG)	Liao et al., 2008a
	GmbZIP78	SI	estrés hídrico, salinidad	<i>Glycine max</i>	(TGAAAA)	Liao et al., 2008a
	GmbZIP132	SI	frío, estrés hídrico, salinidad	<i>Glycine max</i>	(GTGAGTCAT)	Liao et al., 2008b
	Wlip19	SI	frío, estrés hídrico	<i>Triticum aestivum</i>	No determinado	Kobayashi et al., 2008
	OsABI5	SI	salinidad	<i>Oryza sativa</i>	G-box element (CACGTG)	Zou et al., 2008
	ZmbZIP17	SI	estrés hídrico, calor, salinidad	<i>Zea mays</i>	No determinado	Jia et al., 2009c
	OsZIP23	SI	estrés hídrico, salinidad, PEG	<i>Oryza sativa</i>	No determinado	Xiang et al., 2008
	OsAREB1	SI	estrés hídrico, calor	<i>Oryza sativa</i>	ABRE cis-element (ACGTGCC)	Jin et al. 2010

### Vía mediada por MYC /MYB

La familia de las proteínas MYC/MYB comprende a factores de transcripción que se encuentran tanto en plantas como en animales y que están involucrados en una multiplicidad de respuestas. Los factores de transcripción de la familia MYB presentan un dominio constituido por uno a tres repetidos imperfectos, cada uno de 52 aminoácidos, que adoptan una conformación hélice-vuelta hélice (*helix-turn-helix*; HTH) permitiendo la interacción de la proteína con el ADN a nivel del surco mayor, y reconociendo la secuencia consenso YAAC(G/T)G (Biedenkapp *et al.*, 1988; Yanhui *et al.*, 2006).

Los factores de transcripción la familia MYC presentan un dominio conformado por 60 residuos aminoacídicos, que forman dos hélices anfipáticas unidas por una secuencia de longitud variable que forma un bucle. El dominio completo recibe el nombre de bHLH (*basic hélix-loop-helix*), y estaría implicado en la formación de homo y heterómeros. Adyacente al dominio HLH se encuentra

una región básica de 15 residuos aminoacídicos que reconocen la secuencia consenso E-box (CANNTG) (Bailey *et al.*, 2003; Heim *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). En plantas, estos factores de transcripción contienen 2 dominios amino terminales, uno de aproximadamente 190 residuos aminoacídicos (MIR; *Myb-interacting-region*), que interactúa con los factores de transcripción MYB y un dominio de activación ácido (Grotewold *et al.*, 2000; Hernandez *et al.*, 2004).

Los factores de transcripción MYB/MYC cumplen importantes funciones en varios procesos fisiológicos en condiciones de crecimiento normales y adversas (Jin y Martin, 1999; Chen *et al.*, 2006; Yanhui *et al.*, 2006), como en el metabolismo (Paz-Ares *et al.*, 1987), la morfogénesis celular (Higginson *et al.*, 2003), la formación de meristemas, el desarrollo de semillas y de flores (Kirik *et al.*, 1998), el control del ciclo celular (Araki *et al.*, 2004) y las respuestas frente al estrés biótico y abiótico (Abe *et al.*, 2003) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Factores de transcripción de la familia MYC/MYB involucrados en la vía dependiente de ABA identificados en diferentes especies y bajo diferentes condiciones de estrés abiótico.

Familia	Factor Transcripción	Inducido por ABA	Condición de estrés	Especie	elemento <i>cis</i>	referencia
MYC /MYB	AtMYC2	SI	estrés hídrico, salinidad, frío	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(CACATG)	Abe <i>et al.</i> , 2003
	AtMYB2	SI	estrés hídrico, salinidad	<i>Arabidopsis thaliana</i>	No determinado	Abe <i>et al.</i> , 2003
	AtMYB4	SI	salinidad, etileno, JA,	<i>Arabidopsis thaliana</i>	No determinado	Yanhui <i>et al.</i> , 2006
	AtMYB6	SI	salinidad, etileno, JA,	<i>Arabidopsis thaliana</i>	No determinado	Yanhui <i>et al.</i> , 2006
	AtMYB7	SI	salinidad, etileno, JA,	<i>Arabidopsis thaliana</i>	No determinado	Yanhui <i>et al.</i> , 2006
	AtMYB44	SI	salinidad, etileno, JA,	<i>Arabidopsis thaliana</i>	No determinado	Yanhui <i>et al.</i> , 2006
	AtMYB73	SI	salinidad, etileno, JA,	<i>Arabidopsis thaliana</i>	No determinado	Yanhui <i>et al.</i> , 2006
	MYB15	SI	estrés hídrico, salinidad, frío	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MYBII	Agarwal <i>et al.</i> , 2006; Ding <i>et al.</i> , 2009
	GmMYB76	NO	salinidad	<i>Glycine max</i>	MBSI (TATAACGGTTTTTTT)	Liao <i>et al.</i> , 2008c
	GmMYB92	NO	frío, salinidad	<i>Glycine max</i>	(TCTCACCTACC)	Liao <i>et al.</i> , 2008c
	GmMYB177	NO	estrés hídrico, salinidad	<i>Glycine max</i>	MBSI	Liao <i>et al.</i> , 2008c
OsMYB3R-2	No determinado	estrés hídrico, salinidad, frío	<i>Oryza sativa</i>	No determinado	Dai <i>et al.</i> , 2007	

### Vía mediada por CBF/DREB

Los factores de transcripción de la familia DREB (*dehydration responsive element binding*) corresponden a proteínas de la familia AP2/ERF que se unen específicamente a los elementos *cis* DRE (*dehydration responsive element*) (TACCGACAT) y regulan la expresión de varios genes implicados en la tolerancia al estrés, dependiente e independientemente de ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1993; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994; Kizis y Page 2002; Dubouzet *et al.*, 2003). Se han identificado también elementos *cis* llamados CRT (*C-repeat responsive element*) (A/GCCGAC), presentes en promotores de genes inducibles por frío en *Arabidopsis* (Saleh *et al.*, 2005). Esta secuencia está relacionada con la de los elementos DRE y es reconocida por factores de transcripción de la familia DREB. Las proteínas DREB, fundamentalmente las que corresponden al grupo DREB1 y DREB2, están involucradas en vías de transducción de señales frente a diferentes tipos de estrés. La expresión de genes DREB1 en *Arabidopsis* está, en la mayoría de los casos, inducida por bajas temperaturas, mientras que la expresión de los genes DREB2 está inducida por deshidratación, alta salinidad y calor (Liu *et al.*, 1998; Shinwari *et al.*, 1998; Nakashima *et al.*, 2000). Sin embargo, existen reportes de genes pertenecientes al grupo DREB1, como el DREB1/DDF1 que es inducido por estrés osmótico, lo que sugiere la existencia de intercomunicación entre las vías mediadas por DREB1 y por DREB2 (Haake *et al.*, 2002; Nakashima *et al.*, 2009) (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Factores de transcripción de la familia CBF/DREB involucrados en las vías de señalización de respuesta a diferentes condiciones de estrés abiótico, identificados en diferentes especies.

Familia	Factor Transcripción	Inducido por ABA	Condición de estrés	Especie	elemento cis	referencia
CBF/DREB	DREB1A	NO	frío	<i>Arabidopsis thaliana</i>	DRE (TACCGACAT)	Liu et al., 1998
	DREB2A	NO	estrés hídrico, salinidad	<i>Arabidopsis thaliana</i>	DRE (TACCGACAT)	Liu et al., 1998
	DREB2C	NO	salinidad, Manitol, frío	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CRT/DRE	Lee et al., 2010
	CBF1	NO	frío	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CRT/DRE	Gilmour et al., 1998
	CBF2	No determinado	frío	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CRT/DRE	Gilmour et al., 1998
	CBF3	No determinado	frío	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CRT/DRE	Gilmour et al., 1998
	CBF4	SI	estrés hídrico	<i>Arabidopsis thaliana</i>	No determinado	Haake et al., 2002
	OsDREB1A	NO	frío, salinidad,	<i>Oryza sativa</i>	GCCGAC	Dubouzet et al., 2003
	OsDREB1B	NO	frío	<i>Oryza sativa</i>	CRT/DRE	Dubouzet et al., 2003
	OsDREB1C	SI	estrés hídrico, salinidad, frío,	<i>Oryza sativa</i>	CRT/DRE	Dubouzet et al., 2003
	OsDREB1D	NO	No determinado	<i>Oryza sativa</i>	CRT/DRE	Dubouzet et al., 2003
	OsDREB1F	NO	estrés hídrico, salinidad, frío	<i>Oryza sativa</i>	CRT/DRE	Wang et al., 2008
	OsDREB2A	NO	calor, frío	<i>Oryza sativa</i>	CRT/DRE	Dubouzet et al., 2003
	OsDREB2B	NO	No determinado	<i>Oryza sativa</i>	CRT/DRE	Matsukura et al., 2010
	OsDREB2C	NO	No determinado	<i>Oryza sativa</i>	CRT/DRE	Matsukura et al., 2010
	OsDREB2E	NO	frío, estrés hídrico	<i>Oryza sativa</i>	CRT/DRE	Matsukura et al., 2010
	TaDREB1	NO	estrés hídrico, salinidad, frío	<i>Triticum aestivum</i>	DRE (TACCGACAT)	Shen et al., 2003a
	WDREB2	SI	estrés hídrico, salinidad	<i>Triticum aestivum</i>	No determinado	Egawa et al., 2006
	HvDRF1	SI	estrés hídrico, salinidad, frío	<i>Hordeum vulgare</i>	T(T/A)ACCGCCTT	Xue and Loveridge, 2004
	HvDREB1	NO	estrés hídrico, salinidad, frío	<i>Hordeum vulgare</i>	CRT/DRE	Xu et al., 2009
	ZmDREB2A	NO	estrés hídrico, salinidad, frío, calor	<i>Zea mays</i>	DRE (TACCGACAT)	Qin et al., 2007
	PgDREB2A	NO	estrés hídrico, salinidad, frío	<i>Pennisetum glaucum</i>	DRE (TACCGACAT)	Agarwal et al., 2007
	SbDREB2	No determinado	estrés hídrico	<i>Sorghum bicolor</i>	No determinado	Bihani et al., 2011
	SiDREB2	NO	estrés hídrico, salinidad	<i>Setaria italica</i>	No determinado	Lata et al., 2011
	CaDREB-LP1	NO	estrés hídrico, salinidad	<i>Capsicum annum</i>	No determinado	Hong and Kim, 2005
	AhDREB1	No determinado	salinidad	<i>Artiplex hortensis</i>	DRE (TACCGACAT)	Shen et al., 2003b
	GmDREBa	NO	frío, estrés hídrico, salinidad	<i>Glycine max</i>	DRE (TACCGACAT)	Li et al., 2005
	GmDREBb	SI	frío, estrés hídrico, salinidad	<i>Glycine max</i>	DRE (TACCGACAT)	Li et al., 2005
	GmDREBc	NO	estrés hídrico, salinidad	<i>Glycine max</i>	DRE (TACCGACAT)	Li et al., 2005
	GmDREB2	NO	estrés hídrico, salinidad	<i>Glycine max</i>	DRE (TACCGACAT)	Chen et al., 2007
	DmDREBa	SI	frío	<i>Dendronthema x moriflorium</i>	DRE (TACCGACAT)	Yang et al., 2009
	DmDREBb	SI	frío	<i>Dendronthema x moriflorium</i>	DRE (TACCGACAT)	Yang et al., 2009
PNDREB1	NO	estrés hídrico, frío	<i>Arachis hypogea</i>	DRE (TACCGACAT)	Mei et al., 2009	
CAP2	SI	estrés hídrico, salinidad, auxina	<i>Cicer arietinum</i>	CRT/DRE	Shukla et al., 2006	
DvDREB2A	SI	estrés hídrico, calor, frío	<i>Dendratheuma</i>	DRE (TACCGACAT)	Liu et al., 2008	

### Vía mediada por NAC

Los factores de transcripción pertenecientes a la familia NAC (NAM, ATAF y CUC) contienen un dominio de unión al ADN N- terminal y un dominio C terminal variable (Hu *et al.*, 2008). El nombre de la familia proviene de los 3 primeros genes identificados: NAM (*no apical meristem*), ATAF1-2 y CUC2 (*cup-shaped cotyledon*). La región amino terminal de estas proteínas contiene un dominio NAC altamente conservado, que puede formar una conformación de hélice vuelta hélice que permite la unión específica al ADN (Souer *et al.*, 1996; Aida *et al.*, 1997). La región carboxilo terminal consiste en una región probablemente de activación de la transcripción y presenta una alta divergencia en su secuencia aminoacídica. El elemento *cis* reconocido por estos factores también fue identificado en *Arabidopsis* y recibe el nombre de NACRS (*NAC recognized sequence*) (CATGTCCACG) (Tran *et al.*, 2004). Numerosos estudios han determinado que varios genes de esta familia están involucrados en el desarrollo (Sablowski y Meyerowitz 1998; Xie *et al.*, 2000; Weir *et al.*, 2004), resistencia a enfermedades (Collinge y Boller, 2001; Oh *et al.*, 2005; Nakashima *et al.*, 2007) y varios tipos de estrés ambiental (Tran *et al.*, 2004; Hegedus *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2006; Tran *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008) (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Factores de transcripción de la familia NAC involucrados en las vías de señalización de respuesta a diferentes condiciones de estrés abiótico, identificados en diferentes especies.

Familia	Factor Transcripción	Condición de estrés	Especie	elemento cis	referencia
NAC	ATAF1	estrés hídrico	<i>Arabidopsis thaliana</i>	No determinado	Lu et al., 2007
	AtNAC2	salinidad	<i>Arabidopsis thaliana</i>	No determinado	He et al., 2005
	AtNAC019	estrés hídrico, salinidad	<i>Arabidopsis thaliana</i>	motivo CATGTG	Tran et al., 2004
	AtNAC055	estrés hídrico, salinidad	<i>Arabidopsis thaliana</i>	motivo CATGTG	Tran et al., 2004
	AtNAC072	estrés hídrico, salinidad	<i>Arabidopsis thaliana</i>	motivo CATGTG	Tran et al., 2004
	OsNAC6	frío, estrés hídrico, salinidad	<i>Oryza sativa</i>	NACRS (CATGTCCACG)	Nakahsima et al., 2007
	SNAC1	frío, estrés hídrico, salinidad	<i>Oryza sativa</i>	NACRS (CATGTCCACG)	Hu et al., 2006
	SNAC2	frío, estrés hídrico, salinidad	<i>Oryza sativa</i>	No determinado	Hu et al., 2008
	CarNAC5	estrés hídrico, calor	<i>Cicer arietinum</i>	No determinado	Peng et al., 2009
	TaNAC4	frío, salinidad,	<i>Triticum aestivum</i>	No determinado	Xia et al., 2010
	GhNAC2	frío, estrés hídrico	<i>Gossypium hirsutum</i>	No determinado	Meng et al., 2009
	GhNAC3	frío	<i>Gossypium hirsutum</i>	No determinado	Meng et al., 2009
	GhNAC4	frío, estrés hídrico, salinidad	<i>Gossypium hirsutum</i>	No determinado	Meng et al., 2009
	GhNAC5	frío, estrés hídrico	<i>Gossypium hirsutum</i>	No determinado	Meng et al., 2009
	GhNAC6	frío, estrés hídrico, salinidad	<i>Gossypium hirsutum</i>	No determinado	Meng et al., 2009
	SINAC	estrés hídrico, salinidad,	<i>Setaria itálica</i>	No determinado	Meng et al., 2009

En suma existen varios factores de transcripción que participan en las vías de regulación de la expresión génica en respuesta al estrés. Estas vías pueden intercomunicarse, como en el caso de la vía mediada por los factores de transcripción del tipo DREB, que participan en la respuesta a diferentes tipos de estrés de manera dependiente e independiente de ABA.

### Estrategias para la obtención de plantas tolerantes

La obtención de información relacionada con el genoma, la función de sus genes y los mecanismos de control de la expresión de los mismos en organismos sometidos a condiciones de estrés, contribuye al desarrollo de organismos más tolerantes, a través del diseño de marcadores moleculares para asistir en los programas de mejoramiento o la producción de plantas genéticamente modificadas. Se conoce un gran número de genes que son

activados y reprimidos bajo condiciones de estrés hídrico (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000). El control de la activación/desactivación ocurre a diferentes niveles y el estudio de cómo la expresión individual de genes contribuye a la respuesta final en términos celulares, fisiológicos y agronómicos ha posibilitado el uso de estrategias para el desarrollo de plantas tolerantes al déficit hídrico. Existen varios ejemplos exitosos de la aplicación de la ingeniería genética en cultivares para obtener una mejora en la tolerancia al estrés hídrico (Hu *et al.*, 2006, Nakashima *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2009). La introducción del gen *SNAC1* y *ZmNF-YB2* en arroz y maíz respectivamente, resultó en un aumento de la tolerancia frente a este estrés en estudios de campo (Hu *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2007). Plantas de arroz que expresan el gen de trealosa 6 fosfato sintetasa/fosfatasa bajo el control de un promotor inducible muestran altos niveles de tolerancia a la sequía, salinidad y bajas temperaturas, sin efectos negativos sobre el crecimiento y rendimiento de granos (Garg *et al.*, 2002). A pesar de existir varios reportes acerca de plantas transgénicas resistentes a sequía, en soja sólo un estudio ha sido reportado hasta la fecha. Plantas de soja modificadas genéticamente que sobreexpresan el gen *P5CR* de *Arabidopsis*, que codifica para la Pirrolin-5-carboxilato reductasa, involucrada en la síntesis de prolina, muestran una tolerancia aumentada a la sequía (de Ronde *et al.*, 2004a; de Ronde *et al.*, 2004b; Kocsy *et al.*, 2005). La mayoría de los esfuerzos para mejorar la tolerancia de soja a la sequía se han dirigido a aislar genes de respuesta al estrés hídrico, en especial factores de transcripción y sus promotores, que puedan utilizarse como candidatos en los programas de mejoramiento genético de esta especie.



## OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

Identificar y caracterizar genes que permitan comprender mecanismos de tolerancia a la sequía en soja

### **Objetivos específicos:**

1. Identificar genes inducidos en respuesta al déficit hídrico en un genotipo tolerante a sequía.
2. Identificar genes con patrones de expresión diferencial entre genotipos susceptibles y tolerantes.
3. Caracterizar funcionalmente a los genes candidatos seleccionados y determinar la localización de sus productos proteicos, mediante expresión heteróloga en especies modelo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron 3 genotipos contrastantes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill); el cultivar de alto rendimiento N7001, definido como tolerante a la sequía y que presenta el fenotipo "*slow wilting*" en condiciones de estrés hídrico (Carter *et al.*, 2003; Hufstetler *et. al.*, 2007) y el cultivar TJ2049 definido como susceptible a la sequía según los datos obtenidos por estudios llevados a cabo en el marco del proyecto BiotecSur UE 127119. Para algunos análisis de expresión se usó el cultivar Munasqa (primera variedad de soja resistente al glifosato liberada por una institución pública en la Argentina, EEAOC). Esta es tolerante a la sequía según datos del equipo de investigación de la EEAOC, corroborados por el grupo del Dr. Omar Borsani (Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Agronomía). Para la obtención de líneas sobreexpresantes y para la comparación fenotípica bajo condiciones de estrés y control, se usó *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0. Para la comparación fenotípica también se utilizaron los mutantes: SALK\_072365, SALK\_042288, SALK\_047166 y SALK\_008677 (centro ABRC: *Arabidopsis* Biological Resource Center, The Ohio State University, Rightmire Hall 1060 Carmack, RoadColumbus, OH 43210 USA). Estos son mutantes "*knock out*" obtenidos mediante mutación insercional por T-DNA para los genes ortólogos en *Arabidopsis* de *GmIFiso4G*, *GmSEOa*, *GmNrx-C1* y *GmA20/AN1* respectivamente.

Para realizar los análisis de localización subcelular mediante agroinfiltración se usó *Nicotiana tabacum* cv. Samsun.

### Condiciones de crecimiento

Las plantas de soja se cultivaron en cámara de crecimiento con las siguientes condiciones: 800  $\mu\text{mol}$  fotones  $\text{m}^{-2}$   $\text{seg}^{-1}$  de intensidad lumínica (lámparas de halogenuro metálico y lámparas de vapor de sodio a alta presión), fotoperiodo 16 h luz / 8 h oscuridad, 30°C/20°C (día/noche) y humedad relativa 60-40%.

Como dispositivos de crecimiento se usaron caños de PVC de 11 cm de diámetro por 30 cm de altura, cerrados en su extremo inferior con una malla metálica. El sustrato utilizado fue suelo mezclado con  $\frac{1}{4}$  de arena, cubierto con perlita para disminuir la evaporación. Como solución de riego se utilizó medio RP (Rigaud y Puppo, 1975). Las plantas se regaron diariamente hasta capacidad de campo y una vez alcanzado el estado vegetativo V5 incipiente, se dejaron de regar los tratamientos correspondientes a estrés, continuando el riego diario de los tratamientos control y una vez alcanzado el nivel de estrés inicial y final, se recolectaron hojas y raíces y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se tomaron en dos niveles de estrés, el inicial o temprano definido cuando el sustrato se encuentra a 50% de la capacidad de campo (para esta condición hídrica del sustrato el  $\psi$  de la hoja era de  $-0.70$  MPa) y el estrés final o tardío, cuando se encuentra a 25% de la capacidad de campo (para esta condición hídrica del sustrato el  $\psi$  en hoja era de  $-2.25$  MPa).

Las plantas de *Arabidopsis* y tabaco se cultivaron en cámara de crecimiento con  $100 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  de intensidad lumínica y fotoperiodo 16 h luz / 8 h oscuridad a  $24^{\circ}\text{C}$ . Para las plantas de *Arabidopsis* crecidas *in vitro* se utilizó el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con la mitad de concentración ( $\frac{1}{2}$  MS) pH 5.7, 0.7% agar, sin el agregado de sacarosa. Se esterilizó la superficie de las semillas sumergiéndolas primero en 70% EtOH por un máximo de 5 min y luego en una solución de hipoclorito de sodio y Triton X-100 (25 g/L y 0.1% respectivamente) durante 15 minutos con agitación. Se realizaron 4 lavados de 5 min con agua destilada estéril y se procedió a sembrarlas en el medio mencionado anteriormente. Las semillas se estratificaron durante 2 días en heladera a  $4^{\circ}\text{C}$  y se transfirieron a cámara de crecimiento.

Para las plantas de *Arabidopsis* y tabaco crecidas *ex vitro* se utilizaron las mismas condiciones de crecimiento con turba rubia como sustrato. Como solución de riego se utilizó agua destilada, suplementando con  $\frac{1}{2}$  MS una vez a la semana.

## Extracción de ácidos nucleicos

### Extracción de ARN total y mensajero

El ARN total fue extraído a partir de un 1 a 2 g de muestra pulverizado en nitrógeno líquido utilizando 6 mL de buffer NTES (0.1 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% SDS) y 6 mL de phenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Las muestras se centrifugaron a 5.000 rpm durante 20 min y los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa fueron precipitados con 0.1 volúmenes 3M de acetato de sodio (NaAc) pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol anhidro. Luego de 3 h de incubación a -20°C se centrifugó durante 20 min a 8.000 rpm, a 4°C. El pellet se resuspendió en agua miliQ tratada con 0.1% DEPC (Dietilpirocarbonato) y se transfirió a tubos de microcentrífuga. Se agregó un volumen igual de 4 M LiCl y el ARN se dejó precipitar toda la noche en hielo. Se centrifugó durante 20 min a 14.000 rpm a 4°C, y los pellets se resuspendieron en H<sub>2</sub>O-DEPC. La concentración y calidad del ARN se estimó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm. El ARN se visualizó resuspendiendo 3 µg de ARN total en una solución de formaldehído 2.2 M, 50% (v/v) formamida, 1 X buffer MOPS pH 7 (0.2 M MOPS, 0.05 M NaAc y 0.01 M EDTA), Bromuro de Etidio (BET) 70 ng/µ y 1X buffer de carga (buffer de carga 6X: 0.25 % azul de bromofenol, 0.25% xylencianol y 15% ficol). Las muestras se desnaturalizaron a 55°C durante 10 min y se separaron en geles de agarosa desnaturalizante con 2.2 M formaldehído utilizando 1X MOPS como buffer para la electroforesis.

El ARNm se aisló con el kit *MicroPoly(A)Purist* (Ambion, inc, Austin, TX, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante, partiendo de 400 µg de ARN total para cada muestra.

### Extracción de ADN genómico

El ADN genómico fue extraído a partir de 100 mg de muestra pulverizada en nitrógeno líquido utilizando 600 µL de buffer de extracción (200 mM Tris-HCl pH 9, 500 mM NaCl, 25 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8, 1% SDS, 2% PVP40, 0.1% Triton X-100 y 0.3% mercaptoetanol, agregado en el momento). Se mezcló por inversión e incubó durante 30 min a 65°C, se dejó enfriar, se agregaron 200 µL de 5M acetato de potasio (Kac) pH 6, se incubó en hielo 20 min y se centrifugó 10 min a 13.000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un tubo, se agregaron 600 µL de isopropanol y se incubó en hielo durante 20 min. Posteriormente se centrifugó 5 min a 13.000 rpm y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se lavó con 1 mL de 70% EtOH, se centrifugó 5 min a 13.000 rpm y se dejó secar. El pellet se resuspendió en 100 µL de 1X buffer Tango (Fermentas) y se agregó 1 µL de RNasa A (10 mg/mL) e incubó 1 h a 37°C. Se agregó 100 µL de agua MiliQ y el ADN se extrajo una vez con 1 volumen de fenol y otra vez con 1 volumen de cloroformo. La fase acuosa fue transferida a otro tubo y se agregó 40 µL de 3 M NaAc pH 8 y 180 µL isopropanol. Se centrifugó 20 min a 13.000 rpm, se lavó el pellet con 1 mL de 70% EtOH y se resuspendió en 80 µL de agua MiliQ.

### **Biblioteca SSH (Sustracción por supresión e hibridación)**

Para comparar las poblaciones de ARNm de plantas sometidas a déficit hídrico y plantas control, se utilizó el *Clontech PCR-Select cDNA Subtraction kit* (Clontech, Paso Alto, CA). El genotipo contrastante utilizado para la realización de la biblioteca SSH fue 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.

### Síntesis de ADNc doble hebra y digestión con *Rsal*.

Se realizó la transcripción reversa de ARNs de plantas N7001 en condiciones de estrés y control. Para la síntesis de ADN copia de plantas en estrés se usó 1 µg de ARNm extraído de plantas en estrés inicial ( $e_i$ ) y 1 µg de ARNm de plantas en estrés final ( $e_f$ ). Para la síntesis de ADNc de las plantas control se usó 1 µg de ARNm correspondiente a las plantas control inicial ( $c_i$ ) y 1 µg de ARNm correspondiente a plantas control final ( $c_f$ ). En cada reacción se utilizaron 20 U de la Transcriptasa Reversa AMV, 10 mM dNTPs y buffer de síntesis 5X y se incubó 1 h 30 min a 42°C. El cebador utilizado para la síntesis de la primera hebra fue el 5'TTTTGTACAAGCTT<sub>30</sub>N<sub>1</sub>N '3, que contiene un sitio de corte para *Rsal* y *HindIII*. La síntesis de la segunda hebra se llevó a cabo con el cocktail enzimático 20X (6 U/µL ADN Polimerasa I, 0.25 U/µL RNAsa H y 1.2 U/µL ADN ligasa de *E.coli*), 10 mM dNTPs y buffer de síntesis de la segunda hebra 5X. La mezcla se incubó a 16°C durante 2 h. Luego se agregaron 6 U de Polimerasa T4 y se incubó a 16°C durante 30 min. Por último se agregaron 4 µL de 20X de EDTA/Glicógeno para terminar la reacción. El ADNc doble hebra se extrajo con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se precipitó con 3.75 volúmenes de etanol anhidrido y 0.5 volúmenes de 4M de acetato de amonio pH 4.5 y se centrifugó a 14.000 rpm 20 min. Ambas poblaciones de ADNc fueron digeridas con 15 U de la enzima *Rsal* durante 1 h 30 min a 37°C. Se comprobó la eficiencia de corte mediante la visualización en geles de agarosa 1%, teñidos con BET.

### Hibridaciones y PCR

El ADNc obtenido a partir de ARN proveniente de plantas control se denominó *driver* mientras que al obtenido a partir de plantas sometidas a déficit hídrico, se denominó *tester*. El ADNc *tester* fue subdividido en dos poblaciones las cuales fueron ligadas cada una con un adaptador diferente utilizando 400 U de Ligasa T4. Una población se ligó con 1 µM del adaptador 1 (5'CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT3') y la otra con 1 µM del adaptador 2R (5'CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT3') la reacción de ligación se dejó actuar toda la noche a 16 °C. Se realizó una primera

hibridación agregando ADNc *driver* en exceso a la muestra *tester*-adaptador 1 y a la muestra *tester*-adaptador 2R por separado. Ambas mezclas se desnaturalizaron durante 90 seg a 98°C y se incubaron a 68°C durante 8 h. Luego de la primer ronda de hibridación se realizó una segunda hibridación, juntando las dos subpoblaciones de moléculas de la primera en presencia de ADNc *driver* desnaturalizado y se incubó toda la noche a 68°C. Se agregaron 200 µL de buffer de dilución y se procedió la realización del PCR primario utilizando 0.4 µM del cebador *PCR primer 1* (5'CTAATACGACTCACTATAGGGC3'), 0.2 mM dNTPs y 1 µL de la dilución con el programa: 75°C 5 min, 94°C 25 s; 27 ciclos de 94°C 10 s; 66°C 30 s; 72°C 90 s. Se realizó una segunda amplificación a partir de una dilución 1:10 del PCR primario con los cebadores *Nested PCR primer 1* (5'TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT3') y *Nested PCR primer 2R* (5'AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT3') con el programa: 94°C 30s, 12 ciclos de 94°C 10 s; 68°C 30 s; 72°C 90 s; 72°C 10 min. Todas las amplificaciones se realizaron con un termociclador Perking Elmer 2400 y con la enzima *Advantage 2 PCR System* (Clontech, Mountain View, CA).

#### Clonación y transformación de las secuencias sustraídas

Los productos de PCR se ligaron al vector *Dual Promoter pCRII* (Invitrogen, San Diego, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y se transformaron las células competentes *One Shot® TOP10F'* (Invitrogen, San Diego, CA). Las células transformadas fueron seleccionadas en medio LB suplementado con ampicilina 100 µg/mL, 40 µg/mL X-Gal y 0.1 mM IPTG. Las colonias blancas se reestriaron en el mismo medio y a partir de estas estrías se realizaron cultivos en LB líquido (Miller, 1972) con ampicilina 100 µg/mL para realizar las minipreparaciones de plásmidos y conservar las células en glicerol 30% (v/v) a -80°C.

### **Análisis de los clones por digestión con *EcoRI***

A partir de las colonias obtenidas se realizaron minipreparaciones de plásmidos utilizando el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Las células bacterianas se resuspendieron en 300  $\mu$ L de solución 1 (50 mM tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, RNasa A 100  $\mu$ g/mL). Se homogeneizó en vortex y se agregaron 300  $\mu$ L de solución 2 (200 mM NaOH, 1% SDS), se mezcló por inversión al menos 6 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se agregaron 300  $\mu$ L de solución 3 (3.0 M de KAc pH 5.5) se mezcló por inversión al menos 6 veces, se incubó en hielo 10 min y se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y el ADN plasmídico se precipitó con 0.7 volúmenes de isopropanol y se centrifugó a 14.000 rpm 20 min. El *pellet* se lavó con 1 mL de 70% EtOH y se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua MiliQ. La presencia de inserto en el vector TA se determinó mediante la digestión con *EcoRI* durante una hora a 37°C y electroforesis en geles de agarosa 1% con BET (500 ng/mL), utilizando 1X TAE (40 mM Tris-Acetato pH 8.0, 1 mM de EDTA) como buffer de electroforesis (Sambrook *et al.*, 1989).

### **Análisis de los clones por secuenciación**

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 minipreparaciones ajustadas a una concentración de 100 ng/ $\mu$ L, utilizando el cebador *SP6*. Las secuencias obtenidas fueron analizadas en la base de datos *Phytozome* (<http://www.phytozome.net>) y 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.



## Análisis de expresión

### Análisis global de la expresión por macroarreglos

Los fragmentos correspondientes a los clones seleccionados se amplificaron por PCR utilizando los cebadores *Nested PCR primer 1* y *Nested PCR primer 2R* y el programa: 94°C 60 s, 20 ciclos de 94°C 30 s; 68°C 30 s; 72°C 90 s; 72°C 10 min. Los productos de PCR fueron cuantificados en placa con BET (0.8% agarosa, 1 µg/mL bromuro de etidio). Se ajustó la concentración a 100 ng/µL y se procedió a la confección de arreglos. Para cada clon se mezcló el producto de PCR con un volumen igual de 0.6 N NaOH preparado en el momento y se procedió a la realización de *dot blots* en membranas de Nylon *Amaersham Hybond-N<sup>+</sup>* (GE Health Care, Buckinghamshire NA) utilizando 5 µL de la mezcla. El ADN presente en las membranas se neutralizó en una solución de 0.5 M Tris-HCl pH 7.5 incubando durante 4 min y posteriormente se lavó con agua MiliQ dos veces. El ADN se fijó a las membranas por *crosslinking* mediante irradiación con luz ultravioleta utilizando un *crosslinker* (Hoefer UVC 500 Ultraviolet Crosslinker; 70.000 µJ/cm<sup>2</sup>, 5 s). Para la obtención de sondas sustraídas se utilizó el *PCR-Select Differential Screening Kit* (Clontech, Mountain View, CA). La síntesis del ADNc se realizó como se detalla en el apartado “*Síntesis de ADNc doble hebra y digestión con RsaI*”. A partir de estos se generaron 8 tipos de sondas sustraídas diferentes, para hibridar con cada una de las membranas. Para cada genotipo, tiempo de toma de muestra (inicial o tardío) y condición de crecimiento (control o estrés), se generó una sonda sustraída en sentido directo (enriquecida en secuencias expresadas en condiciones de estrés) y una sonda sustraída en sentido inverso (enriquecida en secuencias expresadas en condiciones control). Para ello dependiendo del tipo de sonda, se tomaron como *driver* o *tester* diferentes muestras de ADNc. Las hibridaciones y amplificaciones posteriores se realizaron como se detalla en el apartado “*Hibridaciones y PCR*”. Se marcaron 90 ng de producto de PCR correspondiente a cada sonda sustraída según las especificaciones del *PCR-Select Differential Screening Kit* (Clontech, Mountain View, CA). La sonda se desnaturalizó a 95°C durante 8 min, se incubó en hielo y se utilizó en la

reacción de marcado (buffer de reacción-dCTP, Random primer Mix, Enzima Klenow (exo<sup>-</sup>) y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP 50 $\mu$ Ci, 3000Ci/mmol). Se incubó 30 min a 37°C y se purificó usando columnas de exclusión cromatográfica *Illustra MicroSpin G-25 Columns* (GE Health Care, Buckinghamshire NA). Las membranas se prehibridaron durante 4 h a 65°C en solución *Express Hyb* (Clontech Laboratories, Inc. Mountain View, CA 94043). Las sondas se desnaturalizaron 5 min a 95°C, se agregaron al buffer de hibridación y se dejó toda la noche a 65°C. Las membranas se lavaron 2 veces durante 40 min con la solución 2X SSC, 0.05% SDS y 2 veces en la solución 0.1X SSC, 0.1 % SDS. El revelado se realizó con películas de autoradiografía KODAK a -80°C, así como por medio del equipo Fuji Imager FLA-3000.

#### Ensayos de Northern Blot

El ARN total (15  $\mu$ g) fue separado en geles de agarosa desnaturalizantes con formaldehído 2.2 M, utilizando el buffer 1X MOPS para la corrida electroforética, como se describe en el apartado “*Extracción de ácidos nucleicos*”. La transferencia del ARN a membranas de Nylon (*Amaersham Hybond-N<sup>+</sup>*, GE Health Care, Buckinghamshire NA) se realizó en solución 20X SSC (3 M NaCl, 0.3 M Citrato de sodio). Las muestras de ARN fueron fijadas a las membranas por exposición a luz ultravioleta (70.000  $\mu$ J/cm<sup>2</sup>, 5 seg) utilizando un *crosslinker* (Hoefer UVC 500 *Ultraviolet Crosslinker*). Las membranas fueron prehibridadas 4 h e hibridadas (toda la noche) a 65°C en solución Denhardt (5X SSC, 0.2 % SDS, 5X Denhardt’s y 500  $\mu$ g/mL de ADN de esperma de salmón desnaturalizado). Se agregaron 50 ng de sondas de ADN desnaturalizadas, marcadas con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP y se dejó proceder la hibridación toda la noche. Las membranas fueron lavadas a 65°C 2 veces durante 40 min con 5X SSC, 0.5 % SDS y 2 veces con 1X SSC, 0.5 % SDS a 65°C. El revelado se realizó por medio de películas de autoradiografía KODAK a -80°C, así como con el equipo Fuji Imager FLA-3000. Los fragmentos de ADN utilizados como sonda se obtuvieron a partir de la digestión con *EcoRI* de los plásmidos seleccionados de la biblioteca. Los insertos se purificaron a partir de

los geles utilizando el *Quiagen Gel extraction Kit* (Quiagen, Hilden, Germany). Se marcaron 50 ng de ADN con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP 50  $\mu$ Ci, 3000 Ci/mmol (MP Biomedicals, USA) usando el kit *Amersham Rediprime II DNA Labeling System* (GE Health Care, Buckinghamshire NA). Las sondas se purificaron con columnas de exclusión cromatográfica *Illustra MicroSpin G-25 Columns* (GE Health Care, Buckinghamshire NA).

## Construcciones para sobre-expresión y determinación de la localización subcelular

### Construcciones para sobre expresión

Se amplificaron las regiones codificantes de los genes seleccionados a partir del ADNc de la planta N7001 en condiciones de déficit hídrico. La síntesis del mismo se llevó a cabo a partir de 5  $\mu$ g de ARN total utilizando el kit *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, San Diego, CA) y 0.5  $\mu$ L del cebador (dT)<sub>20</sub>N<sub>1</sub>N (100  $\mu$ M) en un volumen final de 20  $\mu$ L. Los cebadores utilizados así como el programa de amplificación se detallan en la Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Lista de cebadores y condiciones de amplificación para el aislamiento de los CDS correspondientes a los genes seleccionados, para su utilización en construcciones de expresión condicional.

Gen	Cebadores y programa de amplificación
<b>GmIFiso4G</b>	5'-ACGTCGACGATTGCATCGCGAGGTATTA-3' / 5'-CGGAATTCTCATGCAAACCTCTCATCTGATTC-3' 94°C 2 min; 10 ciclos de 94°C 30 s/ 50°C 30 s/ 68°C 2 min. y 30 ciclos de 94°C 30 s/ 55°C 30 s/ 68°C 2 min.; 68°C 10 min.
<b>GmSEOa</b>	5'-ATGAATTCCTTTCCCTTCCAAACCTTCG-3' / 5'-ATCTCGAGCAAACCAGAACCCACATTCC-3' 94°C 2 min; 10 ciclos de 94°C 30 s/ 50°C 30 s/ 68°C 90 s y 30 ciclos de 94°C 30 s/ 55°C 30 s/ 68°C 90 s; 68°C 10 min.
<b>GmA20/AN1</b>	5'-AAGAATTCCTGGCTATCAGGAAAGTTG-3' / 5'-CTCTCGAGGACAACAATGAGCATAACAG-3' 94°C 2 min; 10 ciclos de 94°C 30 s/ 50°C 30 s/ 68°C 30 s y 30 ciclos de 94°C 30 s/ 55°C 30 s/ 68°C 30 s; 68°C 10 min.
<b>GmNrx-C1</b>	5'-AAGTCGACAGAGAAAGCGGAGATGAAGG-3' / 5'-AAGAATTCCTAGACATTATTGTCATGACGTTC-3' 94°C 2 min; 10 ciclos de 94°C 30 s/ 50°C 30 s/ 68°C 1 min. y 30 ciclos de 94°C 30 s/ 55°C 30 s/ 68°C 1 min.; 68°C 10 min.

Todas las amplificaciones se realizaron con un termociclador Perking Elmer 2400 utilizando la polimerasa *Advantage 2 PCR System* (Clontech, Mountain View, CA). Los amplicones obtenidos fueron clonados en el vector *pENTR2B* (Invitrogen, San Diego, CA) en los sitios *Sall/EcoRI* para elFiso4G y NrxC1 y los sitios *EcoRI/XhoI* para GmSEOa y A20/AN1. La ligación se llevó a cabo con 1 U de ligasa T4 a 16°C toda la noche. Se transformaron 4 µL de ligación en células TOP10 electrocompetentes y los transformantes fueron seleccionados en medio LB suplementado con Kanamicina 50 µg/mL. Se realizaron minipreparaciones de plásmidos utilizando el método de lisis alcalina y se seleccionaron colonias que fueron analizadas mediante ensayos de restricción y secuenciación. Para la sobreexpresión en plantas de los genes seleccionados se utilizó el vector binario *pMDC7* (Curtis y Grossniklaus, 2003). Este vector permite clonar secuencias utilizando la tecnología Gateway bajo el control de un promotor inducible por β estradiol. Se recombinaron 150 ng del vector *pMDC7* con 100 ng del vector *pENTR 2B* (conteniendo el CDS de los genes seleccionados) utilizando 2 µL de buffer de reacción *Gateway LR Clonase II Enzyme mix* (Invitrogen, San Diego, CA). Se incubó a 24°C toda la noche, se agregó 1 µL de proteinasa K y se incubó 10 min a 37°C. Se transformaron células Top10 electrocompetentes con 3 µL de reacción y los transformantes se seleccionaron en medio LB con Espectinomicina 50 µg/mL. Se seleccionaron algunas colonias que fueron a analizadas mediante ensayos de restricción y de las que dieron positivas se seleccionó una de ellas para ser secuenciada y transformar *Agrobacterium tumefaciens*.

#### Construcciones para la determinación de la localización subcelular

Se amplificaron las regiones codificantes de los genes seleccionados como se describe en “*Construcciones para sobre-expresión*”. Los programas y cebadores específicos se detallan en la Cuadro 6.

**Cuadro 6.** Lista de cebadores y condiciones de amplificación para el aislamiento de los CDS correspondientes a los genes seleccionados, para su utilización en construcciones conteniendo el gen reportero GFP fusionado al extremo carboxilo terminal del producto proteico codificado por los genes seleccionados.

Gen	Cebadores y programa de amplificación
<b>GmIFiso4G</b>	5'-ACGTCGACGATTGCATCGCGAGGTATTA-'3 / 5'- TGGAATTCTTGAACAGACTCTGGCAGG -'3 94°C 2 min; 10 ciclos de 94°C 30 s/ 50°C 30 s/ 68°C 2 min. y 30 ciclos de 94°C 30 s/ 55°C 30 s/ 68°C 2 min.; 68°C 10 min.
<b>GmSEOa</b>	5'-ATGAATTCCTTTCCCTTCCAAACCTTCG-'3 / 5'- CACTCGAGTGAATGGCATTGGCAG -'3 94°C 2 min; 10 ciclos de 94°C 30 s/ 50°C 30 s/ 68°C 90 s y 30 ciclos de 94°C 30 s/ 55°C 30 s/ 68°C 90 s; 68°C 10 min.
<b>GmA20/AN1</b>	5'-AAGAATTCCTGGCTATCAGGAAAGTTG-'3 / 5'- AACTCGAGATCTTAACAAGTTTCTCAGC -'3 94°C 2 min; 10 ciclos de 94°C 30 s/ 50°C 30 s/ 68°C 30 s y 30 ciclos de 94°C 30 s/ 55°C 30 s/ 68°C 30 s; 68°C 10 min.
<b>GmNrx-C1</b>	5'-AAGTCGACAGAGAAAGCGGAGATGAAGG-'3 / 5'- AAAAGAATTCACATTATTGTCATGACGTTCC -'3 94°C 2 min; 10 ciclos de 94°C 30 s/ 50°C 30 s/ 68°C 1 min. y 30 ciclos de 94°C 30 s/ 55°C 30 s/ 68°C 1 min.; 68°C 10 min.

Para determinar la localización subcelular de los productos proteicos codificados por los genes estudiados se utilizó el vector binario *pK7FWG2* (Karimi *et al.*, 2002) que permite fusionar la proteína fluorescente GFP (*green fluorescent protein*) al extremo carboxilo terminal de la secuencia clonada en el vector por medio de la tecnología Gateway. Los amplicones obtenidos fueron clonados en el vector *pENTR2B* (Invitrogen, San Diego, CA) en los sitios *SalI/EcoRI* para *IFiso4G* y *Nrx-C1*, y los sitios *EcoRI/XhoI* para *GmSEOa* y *A20/AN1*. La ligación se llevó a cabo con 1 U de ligasa T4 a 16°C toda la noche. Se transformaron 4 µL de ligación en células TOP10 electrocompetentes y los transformantes fueron seleccionados en medio LB con Kanamicina 50 µg/mL. Se realizaron minipreparaciones de plásmidos utilizando el método de lisis alcalina y se seleccionaron colonias que fueron analizadas mediante ensayos de restricción y secuenciación. Se recombinaron 150 ng del vector *pK7FWG2* con 100 ng del vector *pENTR 2B* (conteniendo la región codificante de los genes seleccionados) utilizando y 2 µL de buffer de reacción *Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix* (Invitrogen, San Diego, CA). Se incubó a 24°C toda la noche y se agregó 1 µL de proteinasa K e incubó 10 min a 37°C. Se transformaron células Top10 electrocompetentes con 3 µL de reacción y los transformantes se seleccionaron en medio LB con espectinomicina 50 µg/mL. Se seleccionaron colonias que fueron analizadas

mediante ensayos de restricción y entre las que dieron positivas se seleccionó una de ellas para ser secuenciada y transformar *A. tumefaciens*.

#### Transformación de *Agrobacterium*

Para todos los experimentos se utilizó la cepa C58C1 de *A. tumefaciens* (Deblaere *et al.*, 1985). Para la preparación de células electrocompetentes de *Agrobacterium*, se inoculó una colonia aislada en 100 mL de medio de cultivo YEP con los antibióticos apropiados y se incubó a 28° C a 200 rpm una noche. Con este cultivo se inocularon 1.5 L de medio YEP y se incubó a 28°C a 200 rpm hasta alcanzar una DO<sub>550</sub> de 1. Se transfirió el cultivo a hielo durante 10 min y se centrifugó a 3000 x g 10 min, a 4°C. El *pellet* se lavó tres veces con 50 mL de 10 % glicerol frío y finalmente se resuspendió en 1 mL 10 % glicerol. Para todas las transformaciones realizadas se utilizó el electroporador *Gene Pulser Xcell Electroporation System* (BioRad, USA, CA). La selección en placa y medio líquido se llevó a cabo usando medio YEP con 100 µg/mL de rifamicina, carbenicilina y espectinomicina.

#### **Transformación de *Arabidopsis thaliana***

Para cada construcción se sembraron al menos 4 macetas con 6 plantas de *Arabidopsis* en cada una. Se cortaron las inflorescencias primarias y cuando se llegó al estado en que las plantas presentaron una mayoría de botones florales, se procedió a la transformación por inmersión floral (Clough y Bent, 1998). Para ello se inocularon 500 mL de medio YEP con 100 µg/mL de rifamicina, carbenicilina y espectinomicina, con cultivos frescos de *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo las diferentes construcciones. Se incubó una noche a 28°C con agitación a 200 rpm, o hasta llegar a una densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) ~2.0. Se centrifugó el cultivo durante 20 min a 5.500 x g y se resuspendió en buffer de infiltración (0.5 x MS, 5 % sacarosa, 0.05 % Silwett L-77) obteniendo una DO<sub>600</sub> mayor a 2.0. Las plantas se sumergieron en esta

mezcla durante ~20 segundos y se envolvieron en bolsas de nylon para que no se evapore el inóculo. Se dejó una noche dentro de las bolsas y posteriormente se transfirieron a condiciones normales de crecimiento. Se realizó un seguimiento de las plantas, realizándose inoculaciones en los botones florales que fueron surgiendo (cada 5 días a partir de la primera inoculación por inmersión). Para estas inoculaciones se pipeteó la suspensión bacteriana detallada anteriormente en cada botón floral en lugar de sumergir la planta (Martinez *et al.*, 2004). Se cosecharon las semillas y se sembraron en medio ½ MS pH 5.7, 0.7 % agar con  $\mu\text{g/mL}$  25 higromicina. Las plantas que sobrevivieron a los 12 días fueron transferidas a maceta y se cosecharon semillas para la siguiente ronda de selección. El proceso anterior se repitió hasta obtener plantas T2 y T3 (se considera T0 a las plantas originadas por las semillas obtenidas luego de la inoculación).

### **Agroinfiltración de tabaco y microscopía**

Para cada construcción se inocularon 5 mL de medio YEP con 100  $\mu\text{g/mL}$  de rifamicina, carbenicilina y espectinomicina, con cultivos frescos (1 o 2 días) de *A. tumefaciens*. El crecimiento se realizó en agitación a 200 rpm durante una noche a 28°C. Antes de infiltrar se pulverizaron las plantas con agua destilada y se las colocó bajo luces para que los estomas se abran. Se centrifugó 1 mL del cultivo a 2200  $\times g$  5 min a temperatura ambiente. Se resuspendió el *pellet* en 1 mL de buffer de infiltración (50 mM MES pH 5.6, 2 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 0.5 % glucosa y 100  $\mu\text{M}$  acetosiringona), se centrifugó y resuspendió nuevamente en 1 mL de buffer de infiltración. Se diluyó la suspensión bacteriana con buffer de infiltración hasta llegar a una  $\text{DO}_{600}$  de 0.1. Las infiltraciones se realizaron con jeringas de 5 mL sin aguja, presionando sobre el envés de las hojas. Se realizaron 3 o 4 infiltraciones por construcción. Transcurridos 2 días, se cortaron los trozos de hoja infiltrados y se montaron para ser visualizados en microscopio confocal espectral (Leica TCS SP5 montado sobre un microscopio invertido Leica DM6000, *software* de imagen, LASAF v2.6.0).

Para la comparación de patrones de acumulación de fluorescencia se utilizaron vectores que contienen la secuencia de retención del retículo endoplasmático

(HDEL) y la secuencia de retención específica para el aparato de Golgi (ST), fusionadas a los genes reporteros GFP y RFP, respectivamente.

### **Evaluación molecular de líneas de *Arabidopsis* transgénicas**

Se realizó la extracción de ADN genómico de las plantas T2 obtenidas para cada construcción, como se describe en “*Extracción de ácidos nucleicos*”. Posteriormente se realizaron análisis mediante PCR para confirmar la presencia del gen en el genoma de las mismas, utilizando los cebadores y condiciones detalladas en “*Construcciones para sobre expresión*”.

Para analizar los niveles de expresión de los genes transformados, se pulverizaron las plantas T2 con agua destilada estéril conteniendo 10  $\mu$ M  $\beta$  estradiol 24 h antes de la extracción de ARN total. Diez  $\mu$ g de ARN total fueron separados en geles de agarosa desnaturalizantes con formaldehído 2.2 M, utilizando el buffer 1X MOPS para la corrida electroforética, como se describe en el apartado “*Extracción de ácidos nucleicos*” y se realizaron ensayos de *Northern blot* como se detalla en “*Ensayos de Northern Blot*”.

### **Evaluación fenotípica de *Arabidopsis***

Las semillas se sembraron en placas de Petri con medio  $\frac{1}{2}$  MS pH 5.7, 0.7 % agar y se estratificaron durante 2 días en heladera a 4°C. A los 5 - 7 días, dependiendo del vigor, las plántulas que presentaban los dos cotiledones expandidos, se transfirieron a los correspondientes medios de estrés y control. Las plántulas se colocaron de manera vertical, recostadas en el medio de cultivo para evaluar el crecimiento de la raíz. Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de los genes seleccionados sobre el crecimiento en condiciones control y de estrés, se pulverizaron las plantas con agua destilada estéril conteniendo  $\beta$  estradiol 10  $\mu$ M, o con agua sola, 24 h antes del cambio de medio. Para mantener la inducción de los genes, los medios de cultivo fueron suplementados con 10  $\mu$ M de  $\beta$  estradiol. Se utilizaron tratamientos de manitol 300 mM, NaCl 150 mM y placas sumergidas en 40 % PEG 8000 (~ -0.7



MPa), de acuerdo a van der Weele *et al.* (2000). Se tomaron fotografías en tiempo inicial y final de los tratamientos. Transcurridos 6-9 días de establecidos los tratamientos de estrés y controles, se realizaron las mediciones de tamaño utilizando el software ImageJ (Abramoff, *et al.*, 2004), medidas de peso fresco, peso seco y contenido de clorofila (Porra *et al.*, 1989).

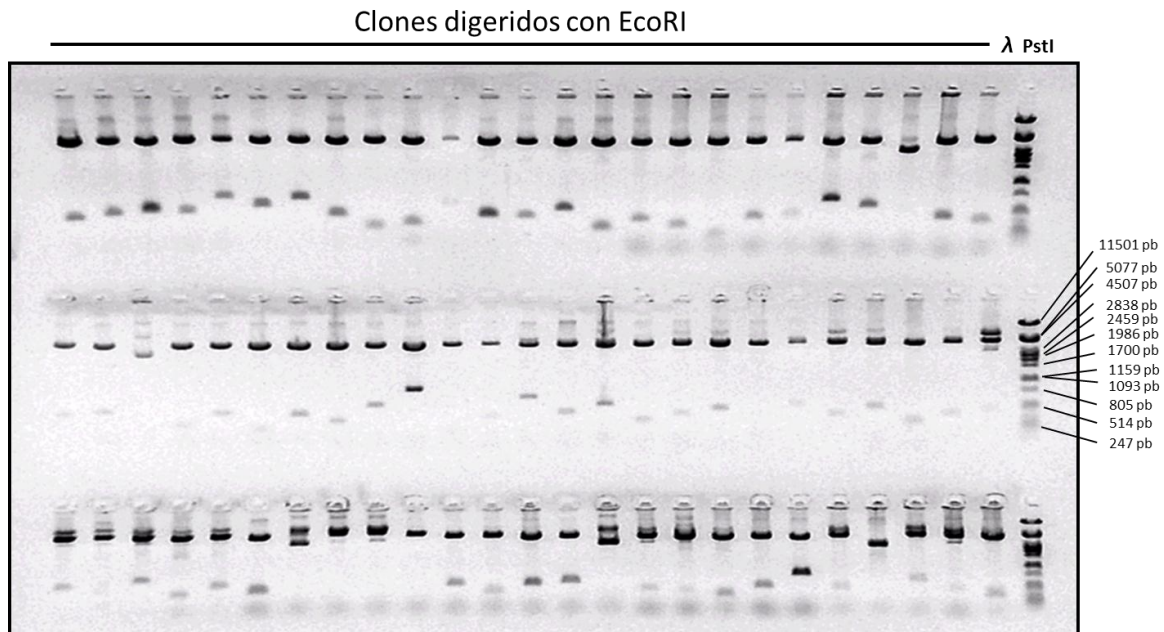
Plantas de *Arabidopsis* de 2 semanas de crecimiento *in vitro*, fueron transferidas a recipientes de 50 ml conteniendo turba y adaptadas durante una semana en sustrato a 100 % de capacidad de campo. Luego de ese período, se suspendió el riego, agregando diariamente 200  $\mu$ l de una solución 5  $\mu$ M de  $\beta$ -estradiol, o el mismo volumen de agua a los controles sin  $\beta$ -estradiol. Se tomaron fotos de las rosetas a los 4 días de haber comenzado el tratamiento de sequía. Se analizaron un total de 12 plantas por tratamiento y por genotipo.

## RESULTADOS

### Identificación de genes de respuesta a déficit hídrico

Con el objetivo de identificar genes involucrados en la tolerancia a sequía en soja, se construyó una biblioteca de ADNc enriquecida en secuencias inducidas bajo condiciones de déficit hídrico en el genotipo N7001. Este cultivar se ha reportado como tolerante a la sequía por presentar el fenotipo “*slow wilting*” o de marchitamiento lento, en condiciones de sequía (Carter *et al.*, 2003; Hufstetler *et al.*, 2007). Para ello, varias plantas de este genotipo fueron crecidas hasta estadio V4, momento en el cual se dejaron de regar. Cuando las plantas alcanzaron un potencial hídrico ( $\psi$ ) en hoja de -0.70 MPa (tres días después de suspendido el riego), se tomaron muestras de hojas y de raíces correspondientes al “estrés inicial”. Cuando se alcanzó un  $\psi$  de -2.25 MPa (a los siete días de suspendido el riego), se tomaron las muestras correspondientes al “estrés tardío”. A partir del ARN total se purificó el ARNm y se compararon las poblaciones utilizando la técnica de sustracción por supresión e hibridación (SSH). Esta técnica está basada en la amplificación selectiva de secuencias diferencialmente expresadas, suprimiendo simultáneamente la amplificación de secuencias comunes a ambas poblaciones, lo cual la hace adecuada para la identificación de transcritos poco abundantes (Diatchenko *et al.*, 1996; Gurskaya *et al.*, 1996). La población de moléculas resultantes del PCR secundario fue clonada en un vector T/A y se transformaron células competentes de *E.coli*. Aproximadamente 850 colonias blancas fueron aisladas, propagadas y almacenadas. La presencia y el tamaño de los insertos se confirmaron mediante ensayos de restricción de los plásmidos con la enzima *EcoRI*.

Los productos de las digestiones se separaron en geles de agarosa, pudiéndose determinar que 796 clones contenían insertos de tamaños que variaron entre 300 y 2000 pb (Figura 2).



**Figura 2.** Perfiles de restricción de una muestra representativa de plásmidos de la biblioteca de cDNA generada por la técnica SSH. Los plásmidos se digirieron con *EcoRI* y los perfiles de restricción se resolvieron en geles de agarosa 1%. A la derecha se indica el peso molecular en pares de bases (pb).

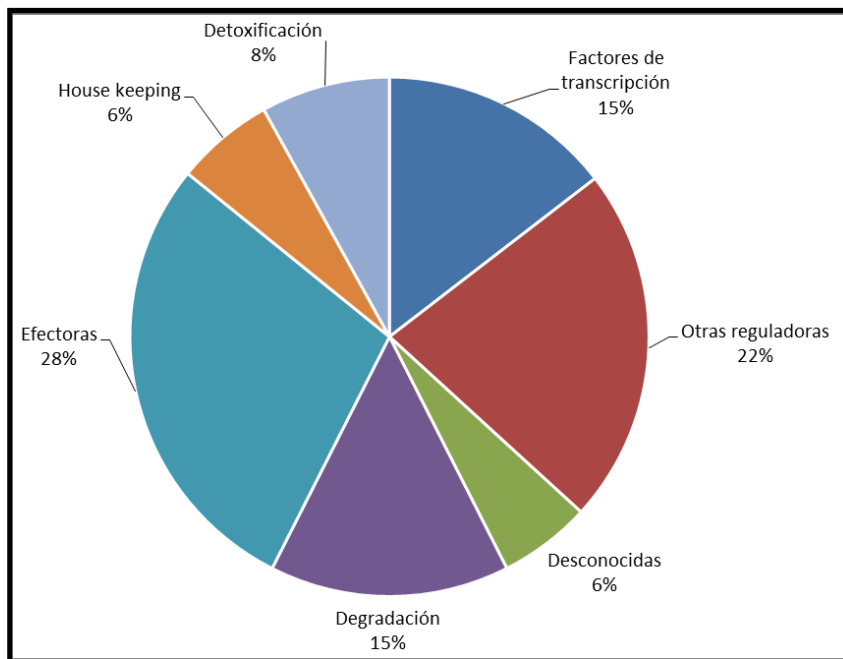
### Caracterización de la biblioteca de ADNc

Los clones fueron secuenciados con el objetivo de identificar y clasificar los genes representados en la biblioteca. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las bases de datos genómicos de soja y otras especies (*Phytozome* y NCBI) utilizando el algoritmo *BlastX*. Con la información recopilada se realizó una base de datos que incluyó: número de clon, gen identificado en soja, similitud con genes de otros organismos, locus correspondiente y clasificación en probable grupo funcional.

Del análisis de los datos obtenidos, se determinó que el conjunto de los clones secuenciados correspondían a 389 loci diferentes. Se obtuvieron secuencias representadas una sola vez y hasta 84 veces en la biblioteca. Luego de eliminar la redundancia de las secuencias, los 389 genes fueron clasificados en 5 grupos según su probable categoría funcional: efectoras, degradación, detoxificación, reguladoras y de función desconocida. La categoría de “efectoras” abarcó secuencias de proteínas que podrían tener una función

directa en la tolerancia al estrés hídrico. Ejemplo de este tipo de proteínas son las que pertenecen a la familia LEA, como las dehidrinas, así como chaperonas, acuaporinas, etc. Dentro de la categoría de “degradación” se incluyeron clones cuyas secuencias codificarían para proteínas involucradas en la degradación de otras proteínas, como proteasas, proteínas relacionadas con la ubiquitinación, inhibidores de proteasas, factores asociados a proteasas, etc. En la categoría de “detoxificación” se incluyeron las proteínas que estarían involucradas en la respuesta oxidativa y en la detoxificación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Ejemplos de este grupo son las enzimas catalasas, peroxidasas, proteínas con dominios thioredoxina, etc. Dentro de la categoría de proteínas “reguladoras” se incluyeron aquellas cuya función podría estar vinculada con la señalización celular, la regulación de la transcripción y traducción, etc. Por último, la categoría “desconocidas” estuvo conformada por secuencias que codifican para proteínas cuya función no se conoce.

Los resultados de estos análisis se muestran en la Figura 3. Basado en esta categorización de las secuencias de acuerdo a su posible función, se observó que un 37 % de los genes representados codificarían para proteínas con una posible función en la señalización o regulación de la expresión génica. Dentro de esta categoría, casi la mitad codificaría para posibles factores de transcripción. Este tipo de genes generalmente exhibe un perfil de baja expresión si se los compara con otros, por ejemplo los que codifican proteínas que tendrían una acción directa en la protección celular frente al estrés, como es el caso de las proteínas clasificadas como “efectoras“. Por lo tanto, los resultados indican que la técnica SSH fue efectiva al permitir el enriquecimiento de secuencias correspondientes a transcritos poco abundantes.



**Figura 3.** Distribución relativa de los genes de acuerdo a su posible función.

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron 287 clones para el análisis global de la expresión mediante macroarreglos de ADN. El criterio de selección se basó principalmente en las características de secuencia de los genes, eliminándose del análisis aquellas secuencias que codificarían para proteínas *house keeping* y otras cuya función específica en la respuesta a la sequía no es clara.

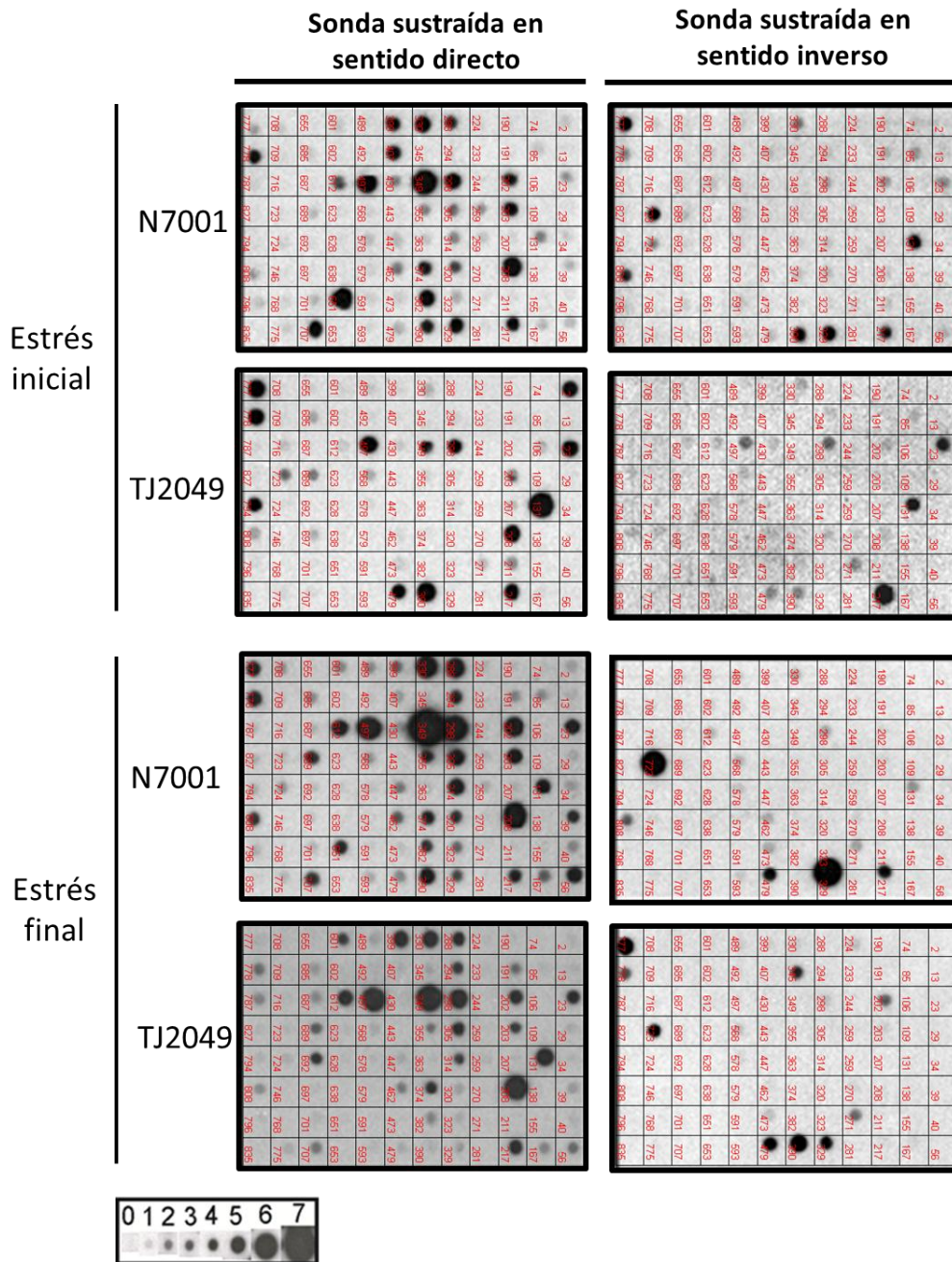
### **Análisis de la expresión global de genes por macroarreglos**

Con el objetivo de comparar la expresión global de los genes del genotipo tolerante (N7001) respecto al susceptible a la sequía (TJ2049) y eliminar las secuencias falsas positivas se construyeron macroarreglos de ADN con los productos de amplificación de los insertos de los 287 clones seleccionados.

Se confeccionaron 3 grupos de arreglos, uno conteniendo secuencias correspondientes a genes “reguladores”, otro con genes “efectores” y de “degradación” y uno con los genes de “detoxificación” sumado a genes de función desconocida. Para los análisis de expresión global, se optó por la utilización de sondas sustraídas en lugar de sondas obtenidas a partir de

ADNc, ya que estas últimas suelen presentar baja sensibilidad y no permiten la detección de secuencias correspondientes a ARNm poco abundantes (James y Higgins, 1985; Wang y Brown, 1991). Se generaron sondas sustraídas en ambas direcciones, es decir, enriquecidas en secuencias de genes inducidos en condición de déficit hídrico (sustracción directa) y enriquecidas en secuencias de genes expresados mayormente en condición control (sustracción inversa). De esta forma, los clones que mostraron mayor señal de hibridación con la sonda sustraída en sentido directo, corresponderían a transcritos con mayor representación en condición de déficit hídrico respecto a las condiciones control. Por el contrario, los clones que mostraron una mayor señal de hibridación con la sonda sustraída en sentido inverso corresponderían a transcritos más abundantes en el control.

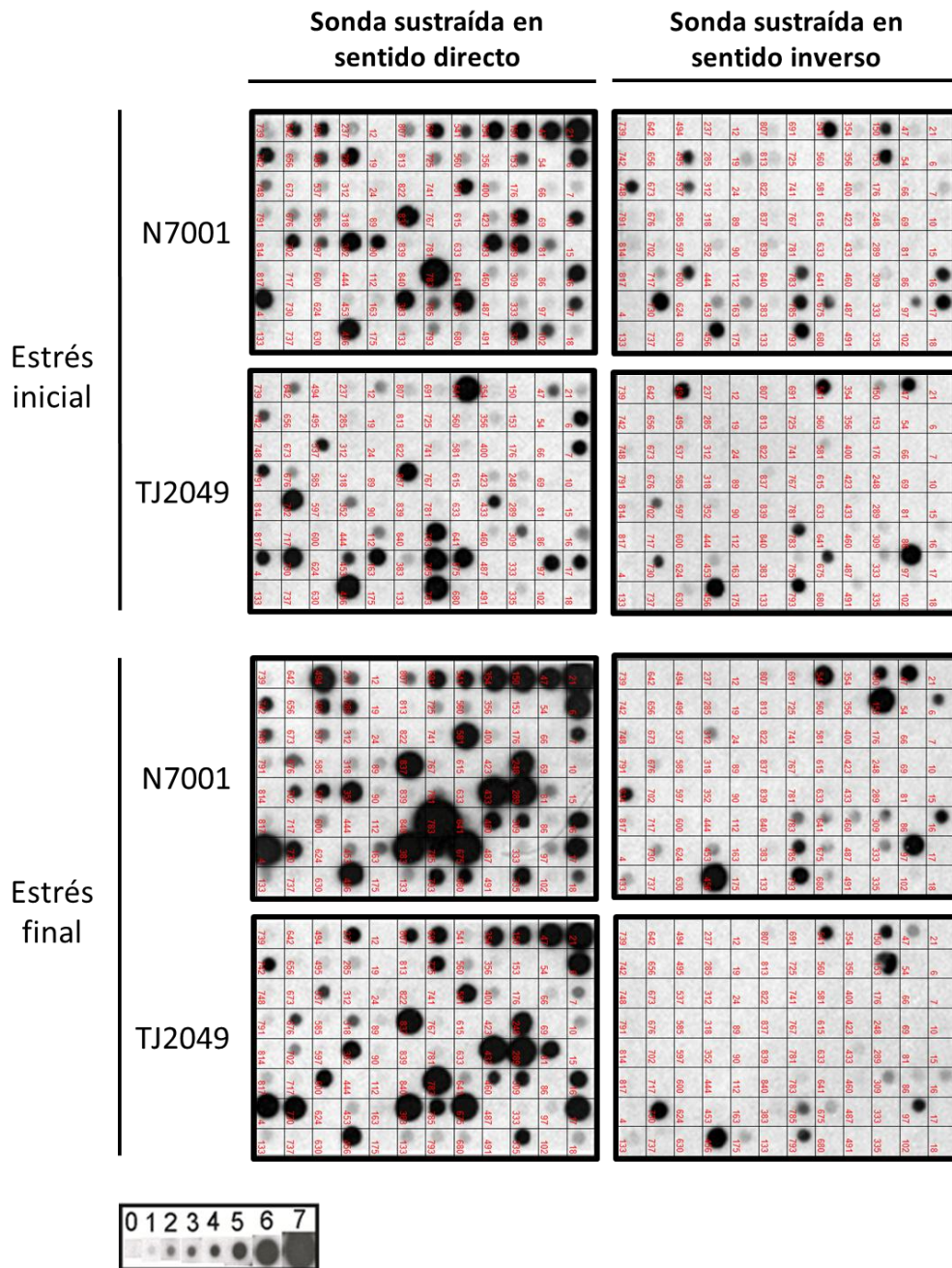
En éste trabajo se generaron 8 tipos de sondas obtenidas por sustracción directa e inversa, a partir de ADNc del cultivar N7001 y del cultivar TJ2049, tanto en estrés temprano como en estrés tardío. Las sondas se marcaron con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP y se hibridaron a las membranas con los macroarreglos. Luego de la exposición de las membranas a películas autoradiográficas, se realizó una comparación visual de la intensidad de las señales obtenidas para cada clon. Para ello se realizó una escala visual con valores que van del 0 al 7 y se le asignó un valor numérico a cada señal (Figuras 4,5 y 6). Los valores obtenidos se ingresaron en una base de datos para simplificar el análisis de los mismos. Los resultados que surgen de la comparación del patrón de hibridación de las distintas membranas, con sondas provenientes de los genotipos N7001 y de TJ2049, sugieren que estos difieren fundamentalmente en la respuesta temprana al déficit hídrico. Al analizar las secuencias correspondientes a genes con posible función reguladora, se observó que en la respuesta temprana al déficit hídrico, 8% de las secuencias corresponderían a genes inducidos en ambos genotipos, 30% a genes inducidos únicamente en el genotipo tolerante N7001, y 15% a genes inducidos únicamente en el genotipo susceptible TJ2049. Sin embargo, en la respuesta tardía, ambos genotipos comparten un 37% de los genes inducidos en común, mientras que solamente 20% y 2% serían específicos de la respuesta en N7001 y TJ2049, respectivamente (Figuras 4 y 7).



**Figura 4.** *Dot blots* de sondas sustraídas de clones correspondientes a proteínas con posible función reguladora de plantas N7001 y TJ2049. Estrés inicial (3 días) con supresión de riego y estrés final (7 días) con supresión de riego. El número de cada clon se indica en cada posición de las membranas. Abajo y a la izquierda se muestra la escala visual utilizada.

En cuanto a los genes con posible función efectora, los datos fueron similares. En la respuesta temprana, el 25% de los clones corresponderían a genes inducidos específicamente en el genotipo N7001, 17% a genes inducidos únicamente en TJ2049, y 18% a genes inducidos en ambos genotipos. En la

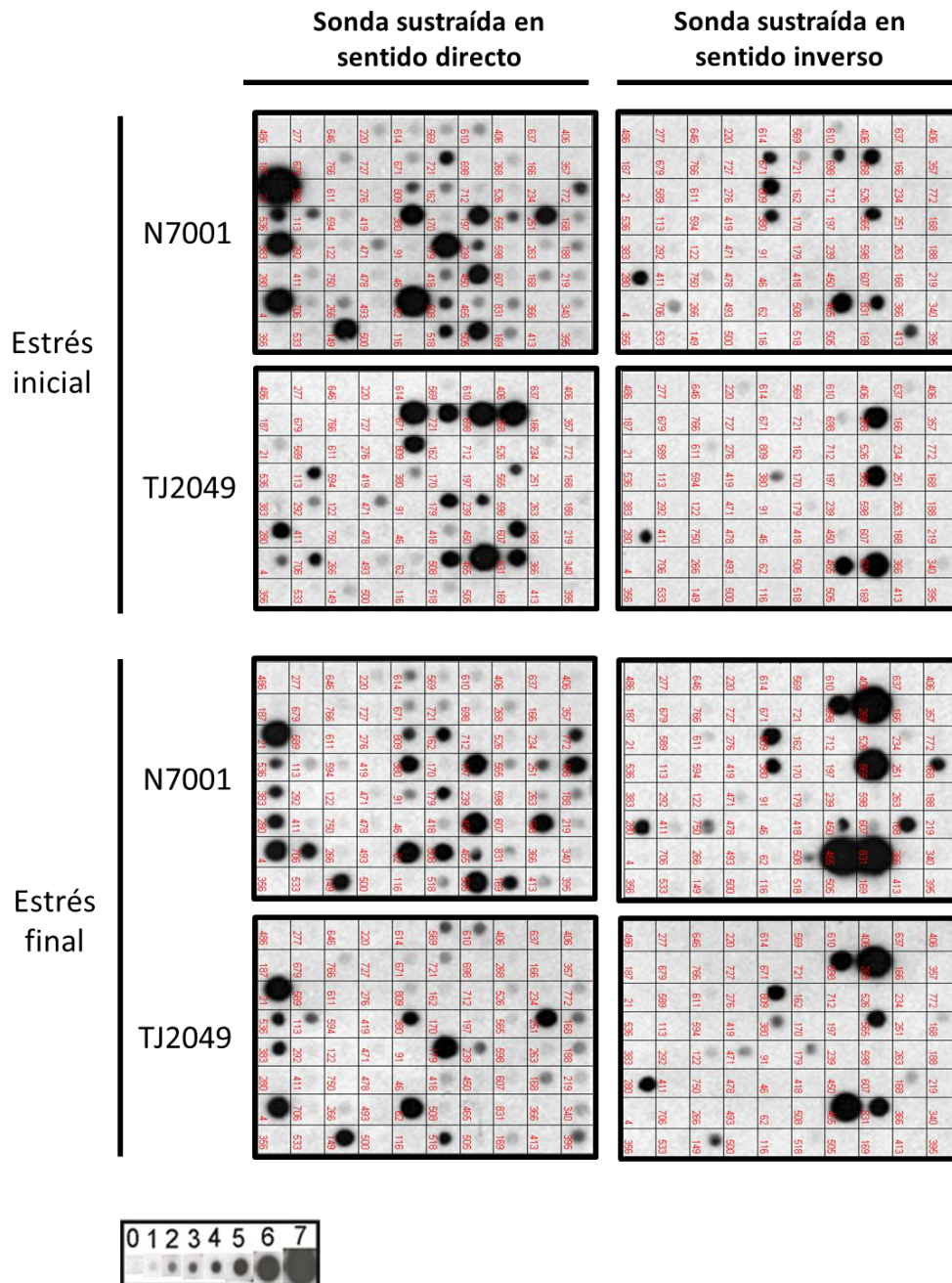
respuesta tardía, el 44% de los genes se inducirían en ambos genotipos y solamente un 7% de los genes se inducirían específicamente en cada uno (Figura 5 y 7).



**Figura 5.** Dot blots de sondas sustraídas de clones correspondientes a proteínas con posible función efectora de plantas N7001 y TJ2049. Estrés inicial (3 días) con supresión de riego y estrés final (7 días) con supresión de riego. El número de cada clon se indica en cada posición de las membranas. Abajo y a la izquierda se muestra la escala visual.



Al analizar específicamente las secuencias correspondientes a genes cuyos productos podrían tener una función en la respuesta oxidativa y en la detoxificación de especies reactivas, los resultados obtenidos muestran que las mayores diferencias entre los genotipos se dan en esta categoría de genes (Figura 6).



**Figura 6.** *Dot blots* de sondas sustraídas de clones correspondientes a proteínas con posible función de detoxificación y desconocida de plantas N7001 y TJ2049. Estrés inicial (3 días) con supresión de riego y estrés final (7 días) con supresión de riego. El número de cada clon se indica en cada posición de las membranas. Abajo y a la izquierda se muestra la escala visual utilizada.

En la respuesta temprana un 22% de los genes se inducirían de manera común en los dos genotipos, mientras que un 39% y un 28% responderían específicamente en el genotipo N7001 y TJ2049 respectivamente (Figura 7). En la respuesta tardía la proporción de genes inducidos en común en ambos genotipos fue de 39%, lo que significó un aumento significativo con respecto a la respuesta temprana (22%) (Figura 7). A su vez se observó que un 28% de los genes se indujeron específicamente en el genotipo tolerante N7001 y un 6% en el susceptible TJ2049. Estos resultados sugieren que a nivel de expresión de genes implicados en el estrés oxidativo y su detoxificación, el genotipo tolerante tiene mayor respuesta y más sostenida en el tiempo que el genotipo susceptible (Figura 7).

En suma, los resultados obtenidos a partir del análisis de los macroarreglos confeccionados sugieren que los genotipos N7001 y TJ2049 responden al estrés hídrico mediante la activación de la expresión de un conjunto de genes en común, así como de genes activados específicamente en uno de los dos genotipos estudiados. La proporción de genes expresados en común en ambos genotipos es mayor en la respuesta tardía que en las etapas iniciales de exposición al estrés, siendo mayor la proporción de genes activados específicamente en el cultivar N7001, en el estrés inicial. Estos resultados podrían estar indicando que el genotipo tolerante es capaz de percibir la falta de agua y activar una respuesta, más rápidamente que el cultivar susceptible.

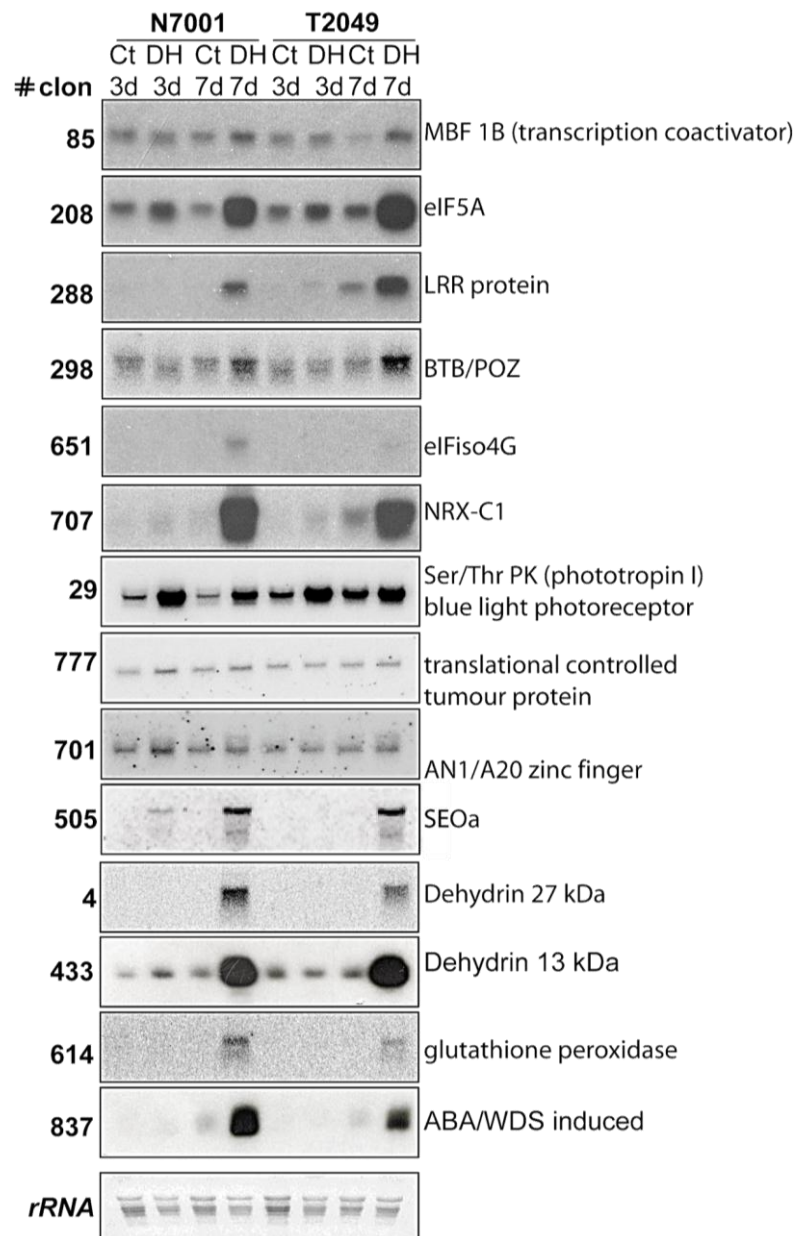


**Figura 7.** Representación de la distribución relativa de los genes inducidos y no inducidos según su agrupación, estado de estrés y genotipo analizado.

### Análisis de la expresión de genes seleccionados

En base a los resultados obtenidos se seleccionó un conjunto de genes que presentó una clara expresión diferencial entre los dos genotipos de soja, cuya función putativa resultó interesante en base a datos bibliográficos. Otro criterio que se usó para la selección de candidatos fue que la señal obtenida en estrés temprano fuera significativamente más alta en el genotipo N7001 que en TJ2049, o incluso, que se activara específicamente en el cultivar tolerante.

Con el objetivo de estudiar el patrón de expresión de estos genes, se realizaron ensayos de *Northern blot* utilizando muestras de ARN extraído a distintos tiempos, como se describe en materiales y métodos. En una primera instancia se analizó la expresión de los genes representados por los clones que se muestran en la Figura 8.



**Figura 8.** Perfil de expresión génica de genes candidatos. Análisis por *Northern blot* utilizando muestras de ARN de hojas de los genotipos N7001 y TJ2049 en condiciones control (Ct) o estrés (DH; deshidratación) inicial (3d) o final (7d).

Para la mayoría de los genes analizados se confirmó un patrón de inducción por sequía en uno o en ambos genotipos. En algunos casos se aprecian diferencias significativas en los niveles de expresión entre los genotipos. De este subgrupo de genes los que mostraron mayor expresión en el genotipo tolerante respecto al susceptible en condición de estrés fueron los correspondientes a los clones: 651, 707, 4, 614, 837, 777, 701 y 505, cuyas características de secuencia se detallan a continuación.

La secuencia del clon 651 corresponde a un gen que codifica para una proteína de 87 kDa que contiene un dominio MIF4G y un dominio MA3. Estos dominios están presentes en los factores de iniciación de la traducción 4G (eIF4G) que forman parte del complejo eIF4F junto con las subunidades eIF4E y eIF4A. Las plantas contienen un segundo complejo eIF4F, denominado eIFiso4F (Browning *et al.*, 1992; Browning, 1996; Lellis *et al.*, 2010). El gen identificado en nuestra biblioteca de cDNA presentó una alta homología con una de las dos isoformas de la subunidad eIFiso4G de *Arabidopsis* (*atEIFiso4G1*; *AT5G57870*). Los resultados obtenidos por *Northern blot* indicaron que el gen *GmEIFiso4G* muestra un patrón de expresión claramente diferencial entre los dos genotipos de soja, siendo prácticamente nula la expresión en el genotipo susceptible.

El clon 707 corresponde a un gen que codificaría para una nucleoredoxina de 49 kDa que contiene dos dominios thioredoxina y un dominio C1. Éste último es un dominio de unión al glicérido diacilglicerol (DAG), el cual está identificado como un segundo mensajero en animales (Mellor y Parker, 1998), pero no ha sido descrito como tal en plantas. Este gen mostró una clara inducción por sequía en ambos genotipos, siendo mayor el nivel de expresión en el genotipo tolerante que en el susceptible.

El clon 4 corresponde a un gen que codificaría una proteína de 27 kDa que pertenece a la familia de las dehidrinas. Este tipo de proteínas se acumulan en todas las plantas en respuesta a factores de estrés abiótico, principalmente sequía, y se caracterizan por presentar en la región C terminal, un motivo rico en glicinas denominado segmento K (Close, 1996; Close, 1997; Dure *et al.*, 1998).

El clon 614 corresponde a un gen que codifica para una enzima de la familia de las glutatión peroxidases. Estas protegen a los organismos del daño oxidativo, reduciendo hidroperóxidos de lípidos a sus correspondientes alcoholes y el peróxido de hidrogeno a agua (Navrot *et al.*, 2006).

El clon 837 corresponde a un gen que codificaría para una proteína de 25 kDa, clasificada como inducida por ABA, estrés hídrico y/o en la maduración, pero de función desconocida.

El análisis de la secuencia del inserto del clon 777 determinó que codificaría para una proteína hidrofílica de 19 kDa agrupada en la familia de las *translationally controlled tumour protein*. Estas exhiben una similitud estructural significativa con la proteína MSS4 de humanos, la cual funciona como chaperona de la proteína Rab (Thaw *et al.*, 2001). En plantas se ha demostrado que las líneas *knock out* de *Arabidopsis* para estos genes exhiben un crecimiento vegetativo más lento y una expansión foliar menor. La inhibición de estas proteínas también afecta el desarrollo radicular, específicamente la formación de pelos radiculares y raíces laterales (Berkowitz *et al.*, 2008). Los ensayos de *Northern blot* indicaron que este gen se induce levemente por sequía y específicamente en el cultivar N7001.

La secuencia aminoacídica deducida para el gen correspondiente al inserto del clon 701 correspondió a una proteína de 18 kDa del grupo SAP (*Stress Associated proteins*) con un dominio dedo de zinc *A20/AN1*. Se han caracterizado este tipo de proteínas extensivamente en animales y su rol en la regulación del sistema inmune. Recientemente se ha reportado que estas proteínas están involucradas en respuestas de estrés en plantas, pero su mecanismo de acción continua siendo desconocido (Jin *et al.*, 2007; Vij y Tyagi 2007; Vij y Tyagi 2008). Nuestros resultados indican que este gen se activa tempranamente en respuesta a sequía en soja, específicamente en el cultivar tolerante.

El clon 505 corresponde a un gen que codificaría una proteína de 76 kDa que fue denominada GmSEOa, por pertenecer a la familia de las *Sieve Element Occlusion* (SEO). Las proteínas SEO están mayoritariamente presentes en el floema de plantas leguminosas y algunos miembros de esta familia forman parte de los forisomas (Noll *et al.*, 2011). Estas estructuras se forman en los elementos cribosos del floema, generalmente en respuesta a heridas, y tienen la capacidad de sufrir cambios conformacionales reversibles, dependientes de

calcio, bloqueando la translocación y por lo tanto previniendo la pérdida de los carbohidratos fotoasimilados (Ernst *et al.*, 2011, Rüping *et al.*, 2010). En soja existen 26 genes *SEO*, cuatro de ellos codifican proteínas que forman parte del forisoma en esta especie. El resto de los genes no tienen una función conocida hasta la fecha. Los análisis de expresión de toda la familia de genes *SEO* de soja, en muestras enriquecidas en tejidos de floema, y en muestras que excluyen el floema, mostraron que todos los genes *SEO* de soja, con excepción de *GmSEOa*, se expresan exclusivamente en el floema (Rüping *et al.*, 2010). Este gen en particular mostró una clara inducción frente a sequía, siendo claramente mayor en el genotipo tolerante que en el susceptible.

Otro grupo de los genes analizados mostró un claro perfil de inducción por sequía, pero con un patrón de expresión similar entre los genotipos TJ2049 y N7001. Estos genes están representados por los clones 85, 208, 288, 298, 433 y 29, y sus características se detallan a continuación.

El clon 85 corresponde a un gen que codifica para una proteína deducida de 15 kDa que contiene un dominio de unión al ADN hélice-vuelta-hélice (*helix-turn-helix*; HTH) en el extremo carboxilo terminal (Brennan y Matthews, 1989) y un dominio MBP (*Multiprotein bridging factor 1*) en el extremo amino terminal que actuaría como puente, permitiendo la interacción de esta proteína con otros factores integrantes de la maquinaria de transcripción (Brendel *et al.*, 2002).

La secuencia aminoacídica deducida del gen correspondiente al inserto del clon 208 correspondió a una proteína de 17 kDa con alta homología con el factor de iniciación de la traducción *eIF5A1* de *Arabidopsis*. Estudios realizados en esta planta determinaron que esta proteína cumple un rol importante en la formación del xilema (Liu *et al.*, 2008). Por otra parte estudios realizados con un gen ortólogo de *Rosa chinensis* involucran a este factor de iniciación de la traducción en la tolerancia a altas temperaturas, estrés oxidativo y estrés osmótico (Xu *et al.*, 2011).

El clon 288 corresponde a un gen que codifica para una proteína deducida de 87 kDa con 2 dominios de repetidos ricos en leucina (*leucine rich repeat*; LRR) y un dominio C terminal de quinasa. Es probable que ésta proteína cumpla funciones como receptor perteneciente al grupo de las RLKs (*receptor-like protein kinase*) y esté involucrada en la transducción de señales (Stone y Walker, 1995; Lease *et. al.*, 1998). En *Arabidopsis* existen al menos 610 genes que codifican éste tipo de proteínas, lo que estaría reflejando la multiplicidad de estímulos externos percibidos por las plantas, incluidos factores de estrés abiótico (Torii, 2004; ten Hove *et al.*, 2011).

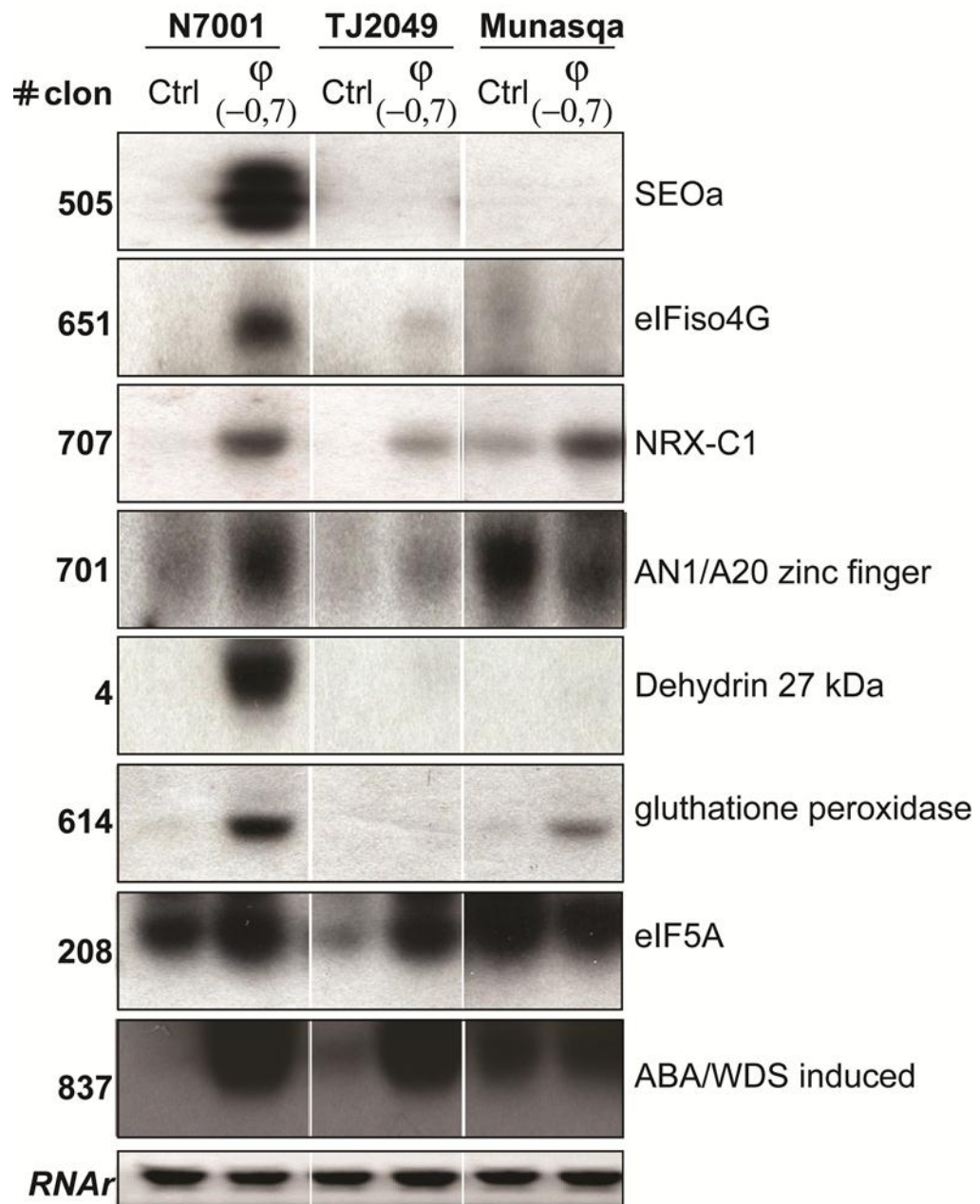
La secuencia aminoacídica deducida del gen correspondiente al clon 298 corresponde a una proteína de 57 kDa miembro de la familia BTB/POZ-MATH (BPM). Estas contienen un dominio bric-a-brac/POX *virus and zinc finger* (BTB/POZ), que se ha demostrado que permite la interacción directa con factores de transcripción y participa en el marcado de proteínas para su degradación vía proteosoma por medio de su interacción con la ligasa de ubiquitina CUL3 (Grayer *et al.*, 2003). Estudios recientes en *Arabidopsis* demostraron que el dominio *meprin and TRAF homology* (MATH) es necesario para la interacción de las proteínas BPM con miembros de la familia de factores de transcripción *ethylene response factor/Apetala2* (ERF/AP2). Por otra parte se determinó que 2 de los 6 genes representantes de familia BPM en *Arabidopsis* son inducidos en condiciones de estrés (Weber y Hellman, 2009).

Por su parte, el clon 433 contiene una secuencia que codificaría para una dehidrina de 13 kDa, que por los resultados obtenidos, mostró una expresión basal, a diferencia de lo observado para la dehidrina representada en el clon 4, la cual no fue detectada en condiciones control.

Por último, el clon 29 corresponde a un gen que codifica para una proteína de 50 kDa similar a la proteína fotoreceptora PHOT2 de *Arabidopsis*. Investigaciones recientes han demostrado que los receptores PHOT1 y PHOT2 median respuestas en la planta como fototropismo, relocalización cloroplástica y regulación de la apertura estomática (Inoue *et al.*, 2010).



El perfil de expresión de varios de estos genes fue nuevamente analizado en experimentos que incluyeron otros genes seleccionados de la biblioteca, así como un nuevo genotipo de soja, el cultivar Munasqa, también definido como tolerante a la sequía de acuerdo a datos aportados por equipo de investigación de la EEAO, y corroborados por el grupo del Dr. Omar Borsani (Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Agronomía). El objetivo de estos ensayos fue determinar si ambos genotipos tolerantes (N7001 y Munasqa) presentaban patrones de expresión génica similares entre sí, y diferentes a los observados en el genotipo susceptible TJ2049. En este segundo experimento se analizaron nuevamente los genes correspondientes a los clones 707, 505, 614, 837, 4, 208, 651 y 701. Al mismo tiempo se incluyeron los genes correspondientes a los clones 497, 349, 382, 689, 399, 796, 320 y 778 (no analizados hasta el momento). Se utilizó ARN total extraído a partir de plantas N7001, Munasqa y TJ2049, en condiciones control y de estrés inicial, ya que fue en este momento donde se observaron mayores diferencias entre la variedad susceptible y tolerante. Para los genes analizados anteriormente se confirmó el comportamiento observado en la primera instancia. Varios de los genes analizados presentaron un patrón de expresión similar en las variedades tolerantes. El patrón de expresión de estos genes se detalla en la Figura 9.



**Figura 9.** Perfil de expresión génica de genes candidatos. Análisis por *Northern blot* con muestras de ARN de hojas de los genotipos N7001, TJ2049 y Munasqa en condiciones control (Ctrl) y estrés inicial ( $\psi = -0.7$  MPa).

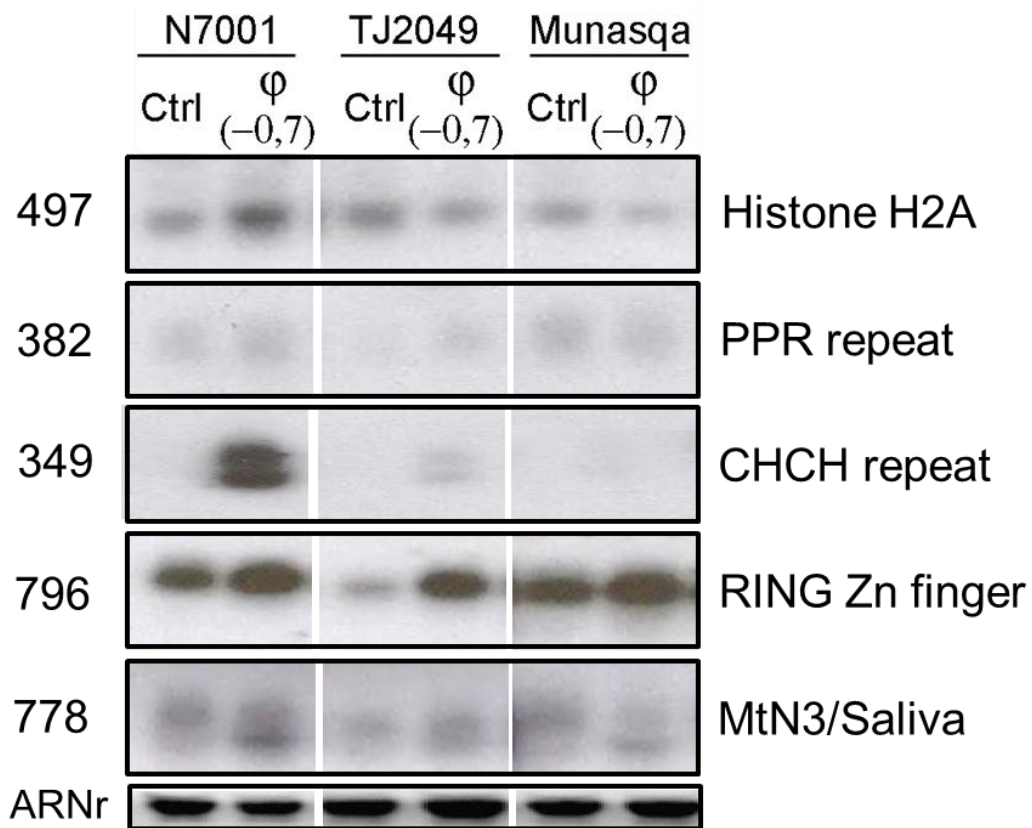
El patrón de expresión obtenido para el gen *GmSEOa* concordó el obtenido anteriormente, observándose una inducción temprana específicamente en el N7001. Para el gen *GmelFiso4G* el patrón de expresión también se correlacionó con los datos obtenidos anteriormente, aunque en esta instancia se pudo detectar una señal tenue en TJ2049 en estrés inicial, mientras que para la variedad Munasqa se determinó una acumulación del transcrito en

condición control y de estrés inicial, con una intensidad tenue en comparación con la inducción observada en N7001. Resultados similares se obtuvieron para el gen *GmNRX-C1*, que se indujo en ambos tolerantes en estrés inicial con una mayor intensidad que en el genotipo susceptible. Para la variedad Munasqa se observó una acumulación basal del transcripto correspondiente a este gen mayor que para las restantes variedades.

El gen correspondiente al clon 701 (AN1/A20 *zinc finger*) mostró inducción en los genotipos N7001 y TJ2049, pero con niveles significativamente más altos en los genotipo tolerantes. La variedad Munasqa presentó una expresión basal en condición control.

En el caso del transcripto correspondiente a la dehidrina de 27 kDa, representado por el clon 4, se observó una inducción exclusiva en N7001 en estrés inicial, mientras que para el gen de la glutatión peroxidasa, representado por el clon 614, se observó inducción sólo en las plantas tolerantes en situación de estrés hídrico inicial. Para el gen que codifica para el eIF5A, se verificaron los resultados obtenidos en una primera instancia, observándose una acumulación basal en condición control y un incremento de la expresión en situación de déficit hídrico. Finalmente, para el gen correspondiente al clon 837, que codifica una proteína de respuesta al ABA, se observó inducción en los tres genotipos en respuesta al déficit hídrico, y una expresión constitutiva en el cultivar Munasqa.

De los ocho genes analizados que no habían sido incluidos en el primer ensayo, cinco de ellos mostraron un patrón de inducción por sequía en al menos uno de los genotipos analizados (Figura 10) y en algunos casos se apreciaron diferencias claras en los niveles de expresión entre los genotipos comparados. De este subgrupo de genes analizados, aquellos que mostraron mayor expresión en estrés temprano en N7001 respecto a los otros dos genotipos estudiados, fueron los genes correspondientes a los clones 497, 382, 349, 778 y 796 (Figura 10).



**Figura 10.** Perfil de expresión génica de genes candidatos. Análisis por *Northern blot* utilizando muestras de ARN de hojas de los genotipos N7001, TJ2049 y Munasqa en condiciones control (Ctrl) y estrés inicial ( $\psi = -0.7$  MPa).

El clon 497 corresponde a un gen que codificaría para una proteína de 16 kDa que pertenece a la familia de las histonas H2A. Específicamente esta proteína presentó una alta homología con la histona H2A.X de humanos, que en su estado fosforilado participa en el marcado y reparación del ADN dañado (Rogak *et al.*, 1998; Paull *et al.*, 1998; Celeste *et al.*, 2002).

El gen representado en el clon 349 codifica para una proteína de 14 kDa que contiene un dominio *coiled coil-helix-coiled coil-helix* (CHCH) y que presenta una alta homología con la proteína Cox19 *like* de *Arabidopsis*, la cual a su vez es similar a la Cox19 de levadura. Esta es una metalochaperona implicada en la biogénesis de la citocromo oxidasa c (Nobrega *et al.*, 2002). Estudios en *Arabidopsis* del gen *AtCOX19* demostraron que este es inducido tanto por heridas como por estrés biótico y abiótico (Attallah *et al.*, 2007).

El clon 778 corresponde a un gen que codifica para una proteína hipotética con 2 dominios MtN3/Saliva de 32 kDa. En plantas las proteínas MtN3/Saliva están involucradas en la nodulación, el desarrollo de tejidos reproductivos y en la adaptación ambiental (Gamas *et al.*, 1996; Guan *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2011).

El clon 796 codifica para una proteína de 35 kDa que contiene un dominio dedo de zinc RING (*Really Interesting New Gene*). Se han identificado varias proteínas RING involucradas en la ubiquitinación de proteínas en diferentes organismos (Lorick *et al.*, 1999; Freemot, 2000; Joazeiro y Weissman 2000). En *Arabidopsis* se identificaron 3 ligasas de ubiquitina que contienen este dominio y que están involucradas en la respuesta frente a factores de estrés abiótico (Ryu *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2011; Kim y Kim, 2013).

Por último, el clon 382 corresponde a un gen que codifica una proteína hipotética de 104 kDa perteneciente a la familia de proteínas que contienen motivo *pentatricopetide repeat* (PPR), los cuales se caracterizan por la presencia de motivos de 35 aminoácidos degenerados en tándem (Small y Peeters, 2000). Se han identificado 450 de estas proteínas codificadas en el genoma de *Arabidopsis*, la mayoría de las cuales interactúan con los cloroplastos y otros organelos (Lurin *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2004). Existen evidencias que sugieren que varias de estas proteínas cumplen un rol en el procesamiento postranscripcional de los ARNs dentro de los organelos (Meierhoff *et al.*, 2003; Mili y Piñol-Roma, 2003; Delannoy *et al.*, 2007; Kotera *et al.*, 2005; Takenaka *et al.*, 2010).

En suma, los resultados obtenidos permitieron identificar un grupo de genes que se inducen en respuesta a la sequía en el genotipo N7001. Varios de estos genes exhibieron un patrón de expresión diferencial entre cultivares tolerantes y un cultivar susceptible a la sequía. Asimismo los análisis de expresión global por macroarreglos de los genes representados en la biblioteca mostraron diferencias significativas en los perfiles de expresión génica entre el genotipo tolerante y el susceptible. Estos datos sugieren que el genotipo N7001 responde al estrés en una forma más rápida que el genotipo TJ2049. Sin

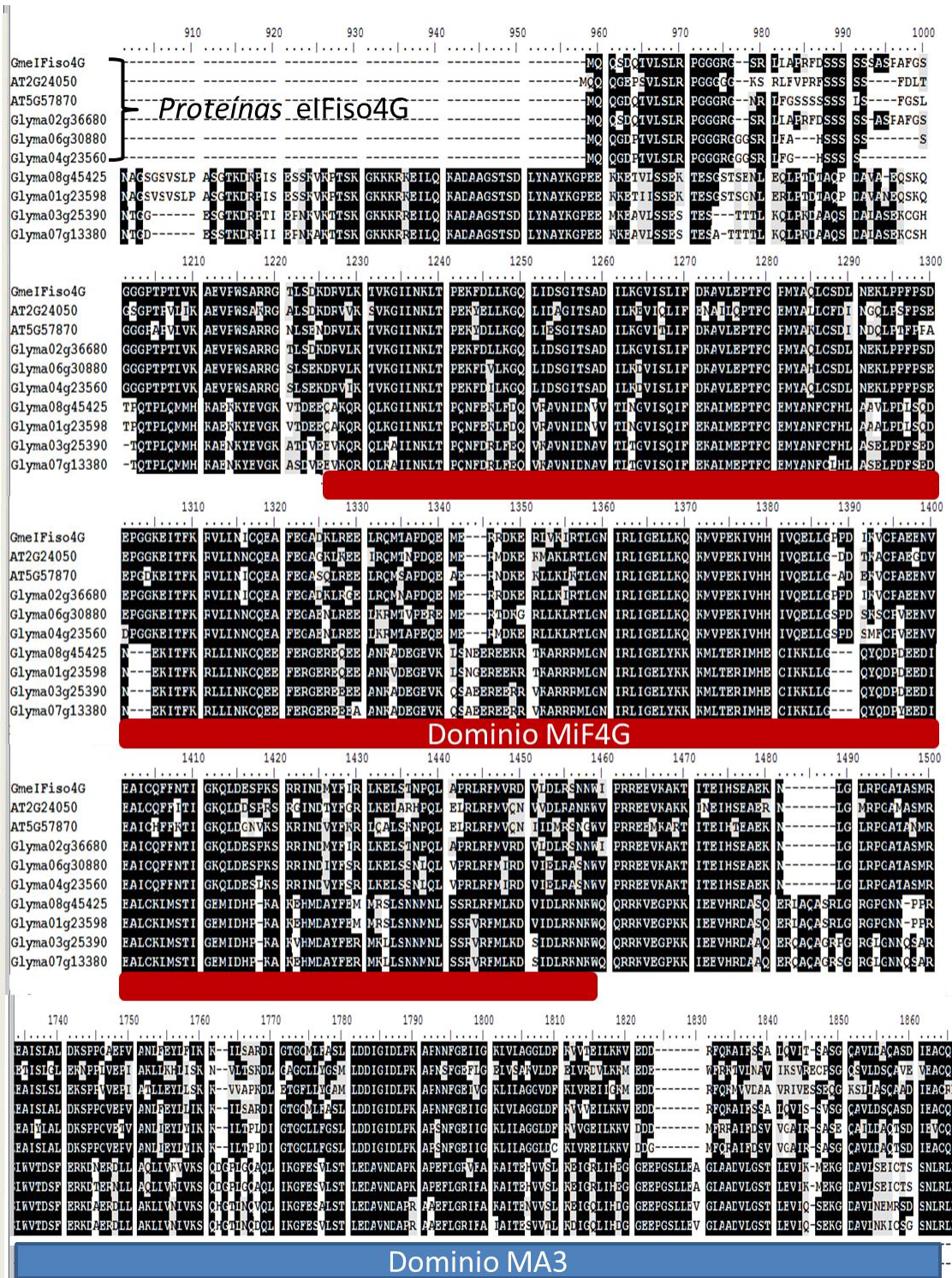
embargo, ambos genotipos se comportan a nivel de expresión de los genes analizados de manera similar en condiciones de estrés severo.

### **Caracterización funcional de los genes candidatos**

En base a los resultados obtenidos y a datos de la literatura, se decidió profundizar en el análisis funcional de varios genes de la biblioteca, entre los cuales se incluyeron *GmEIFiso4G* (clon 651), *GmSEOa* (clon 505), *GmA20/AN1* (clon 701) y *GmNrx-C1* (clon 707). En este trabajo se describen los resultados obtenidos a partir de la caracterización funcional de *GmEIFiso4G* y *GmSEOa*.

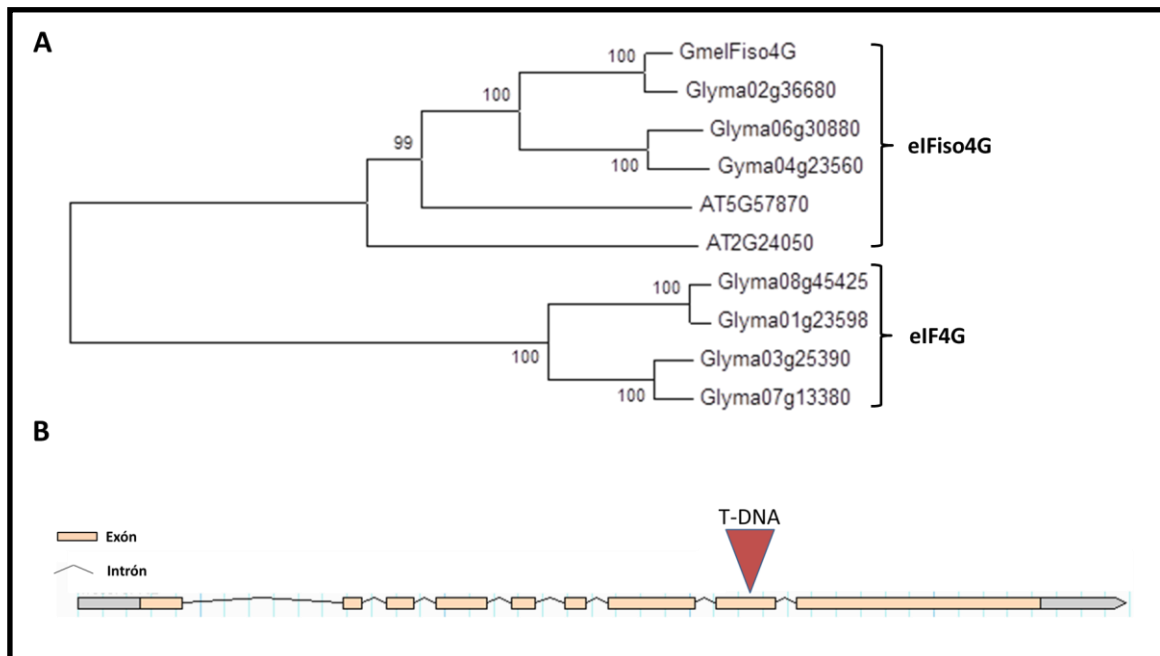
### **Evaluación del rol de *GmEIFiso4G* en la respuesta a sequía**

El gen *GmEIFiso4G* codifica un factor de iniciación de la traducción eIFiso4G. Utilizando la secuencia aminoacídica deducida a partir del gen *GmEIFiso4G*, se realizaron búsquedas de genes homólogos de *GmEIFiso4G* en el genoma de *Arabidopsis* y soja mediante *BlastP* en la base de datos *Phytozome*. En *Arabidopsis* se identificaron dos genes que presentaron una alta homología con *GmEIFiso4G*: *AT5G57870* (*eIFiso4G1*) y *AT2G24050* (*eIFiso4G2*), con 73 % y 68 % de similitud respectivamente. En soja, se identificaron 7 genes con alta homología a *GmEIFiso4G*. Se realizó el alineamiento utilizando el método *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994) con la secuencia proteica deducida de los mismos y se determinó que el gen *GmEIFiso4G*, junto con otros tres de soja pertenecen al grupo de los factores de iniciación eIFiso4G, dado que carecen de la región conservada N-terminal característica de los eIF4G y presentan los dominios conservados MIF4G y MA3 (Figura 11).



**Figura 11.** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas completas de genes identificados con alta homología a GmeIFiso4G en soja y en *Arabidopsis*. Se utilizó el software BioEdit con un *bootstrap* x1000. Se señalan los residuos correspondientes al dominio conservado MIF4G (rojo) y el dominio MA3 (azul).

Se calculó la relación filogenética entre los genes identificados utilizando la secuencia aminoacídica deducida de los mismos. Se observó que estos se encuentran agrupados en 2 grupos, uno conteniendo los factores de iniciación eIF4G y el otro las isoformas eIFiso4G. También se observó que los genes eIFiso4G identificados en soja presentan una mayor similitud con la isoforma eIFiso4G1 de *Arabidopsis* (AT2G24050) que con eIFiso4G2 (AT5G57870) (Figura 12). Una búsqueda en el sitio *tair* (<http://arabidopsis.org>), para identificar líneas de *Arabidopsis* con inserciones de T-DNA en el gen *eIFiso4G1*, permitió la obtención de un mutante knockout (KO) en este gen.



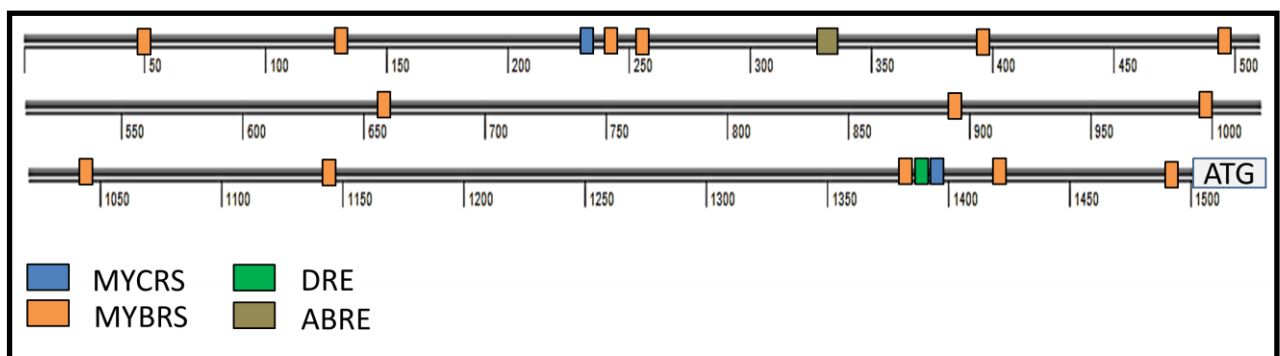
**Figura 12.** Relación filogenética de las proteínas eIFiso4G y eIF4G de *Arabidopsis* y Soja. **A)** Árbol filogenético utilizando el método de *Neighbor joining* para las proteínas identificadas que mostraron una alta homología con la proteína GmelFiso4G en soja y *Arabidopsis*. El mismo fue generado utilizando el programa Mega 5.2 (Tamura *et al.*, 2011) y con un soporte de *bootstrap* de 1000 réplicas. Los porcentajes de *bootstrap* se muestran en los nodos. La longitud de las ramas es proporcional al número de sustituciones de aminoácidos. **B)** Representación gráfica del sitio de inserción del T-DNA en el mutante SALK\_072365. Se muestran como líneas negras la secuencia correspondiente a intrones, en rosa los exones y en gris los UTR 5' y 3'.

Este mutante (SALK\_072365) presenta una inserción de T-DNA en la región codificante a nivel del exón ocho (Figura 12 B). Este mutante fue incluido posteriormente en los ensayos fenotípicos realizados en el marco de este



trabajo, con el objetivo de evaluar funcionalmente el gen de *Arabidopsis*, ortólogo de *GmeIFiso4G*.

Para profundizar en el conocimiento de la regulación y función del gen *GmeIFiso4G* se analizó la secuencia de 1500 pares de bases ubicadas corriente arriba del codón de iniciación de la traducción, utilizando la base de datos de predicción de elementos *cis* PLACE (*Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements*; Higo *et al.*, 1999). Se determinó que el promotor de este gen de soja, correspondiente al genotipo Williams-82 de referencia en la base de datos *Phytozome*, presenta varios elementos en *cis* específicos de regulación por estrés hídrico, que a su vez estarían involucrados en las vías de señalización dependientes e independientes de ABA (Figura 13). Se observó la presencia de 14 elementos en *cis* de unión a factores de transcripción del tipo MYB, dos elementos *cis* reconocidos por factores de transcripción tipo MYC, un elemento ABRE específico para el reconocimiento por parte de factores del tipo bZIP y un elemento *cis* DRE específico para los factores tipo DREB.



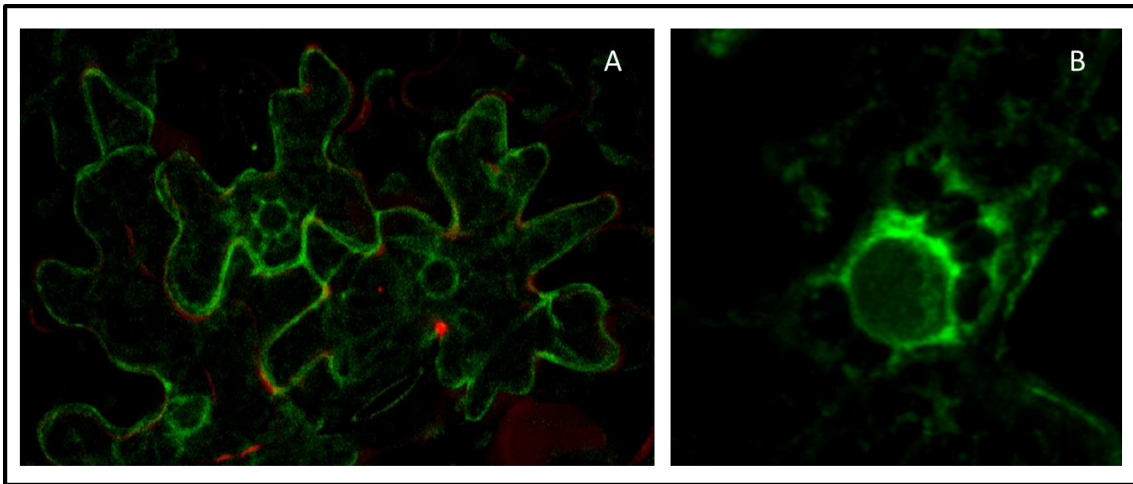
**Figura 13.** Representación esquemática de los sitios *cis* involucrados en la respuesta a sequía, predichos para la región promotora del gen GmSEOa. Se muestran 1500 bases *upstream* del codón de iniciación, con los correspondientes elementos *cis*: MYCRS (*MYC recognition sequence*), MYBRS (*MYB recognition sequence*), DRE (*drought response element*) y ABRE (*ABA response element*).

La presencia de estas secuencias en la región promotora del gen sugiere una regulación tanto dependiente como independiente de ABA.

### Análisis de la localización subcelular de GmelFiso4G

Con el fin de conocer la ubicación subcelular de la proteína GmelFiso4G se llevaron a cabo experimentos de expresión transitoria de la fusión GmelFiso4G:GFP en hojas de tabaco. Utilizando como molde ADNc obtenido a partir de la planta N7001, se amplificó la región codificante del gen utilizando cebadores diseñados de manera tal que se eliminó el codón de terminación y se conservó el marco de lectura con la proteína verde fluorescente (GFP). La secuencia amplificada fue clonada en el vector de pENTR2B obteniéndose el vector de entrada pENTR2B:GmelFiso4Gfs. Se confirmó la presencia del inserto y su identidad mediante análisis de restricción y secuenciación. Posteriormente se realizó la recombinación entre el vector de entrada y el vector binario destino pK7FWG2, obteniéndose el vector de expresión 35S:GmelFiso4G-GFP.

Se utilizaron hojas de plantas de tabaco para realizar infiltraciones con cultivos de *Agrobacterium* conteniendo el vector de expresión y vectores que codifican para proteínas de localización conocida en diferentes compartimentos celulares. Se utilizaron vectores binarios que contenían GFP-HDEL (proteína GFP conteniendo un péptido que corresponde a la señal de retención en el retículo endoplasmático, HDEL) y ST-RFP que contiene una señal de localización específica para el aparato de Golgi fusionada con la proteína roja fluorescente (RFP). Las señales fluorescentes se analizaron por microscopía confocal. Se realizaron infiltraciones utilizando la construcción 35S:HDEL-GFP y 35S:GmelFiso4G-GFP por separado ya que no fue posible utilizar ambas construcciones en estudios de co-localización por estar fusionadas al mismo gen reportero (GFP). Se observaron patrones de fluorescencia similares entre la proteína de fusión GmelFiso4G-GFP y el marcador de retículo endoplasmático HDEL-GFP. Se espera que GmelFiso4G sea de localización citoplasmática por no presentar péptido señal y cumplir la función de regulación de la traducción en el citoplasma de la célula. Por lo tanto, el perfil de fluorescencia observado podría estar evidenciando una localización citoplasmática, pero asociada al sistema de endomembranas (Figura 14).



**Figura 14.** Expresión transitoria por agroinfiltración de hojas de tabaco para determinar la localización subcelular de la proteína GmelFiso4G fusionada con GFP. **A)** Patrón de acumulación de fluorescencia obtenido con la co-infiltración de *Agrobacterium* conteniendo la construcción 35S:GmelFiso4G-GFP y la construcción 35S:ST-RFP. **B)** Patrón de fluorescencia obtenido para la agroinfiltración utilizando la construcción 35S:HDEL-GFP.

### **Generación y caracterización molecular de líneas de *Arabidopsis* con expresión condicional del gen *GmelFiso4G***

En plantas superiores, las respuestas moleculares a la sequía se han estudiado extensamente en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. La adopción de esta especie como angiosperma modelo ha facilitado significativamente la unificación de criterios para la evaluación fenotípica de las respuestas al estrés hídrico y la interpretación de los resultados. La facilidad para obtener plantas transgénicas, sumado a la disponibilidad de mutantes en prácticamente todos sus genes, hacen de esta especie un modelo excelente para llevar a cabo estudios funcionales de genes.

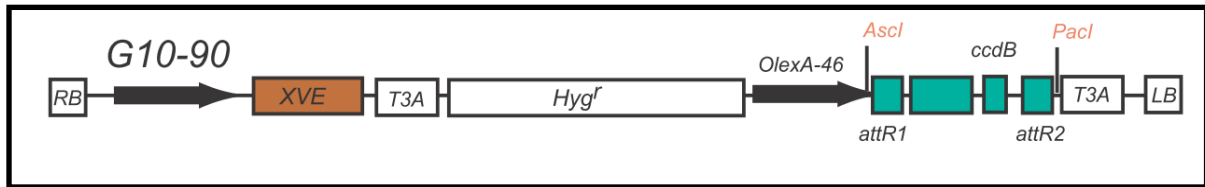
Con el objetivo de determinar la contribución del gen *GmelFiso4G* a la tolerancia en el estrés hídrico en soja y *Arabidopsis*, se realizó una construcción de expresión inducible por  $\beta$ -estradiol para el gen *GmelFiso4G*. Para ello se diseñaron cebadores específicos a partir de la secuencia codificante obtenida de la base de datos *Phytozome* y se amplificó por PCR un fragmento de 2370 pb, correspondiente a la región codificante del gen, utilizando como molde ADNc obtenido de la planta N7001 en el estadio de estrés inicial.

El producto de amplificación fue clonado en el vector pENTR2B dando a lugar al vector de entrada pENTR2B-GmeIFiso4G. Se confirmó la presencia del fragmento mediante análisis de restricción y la identidad de la secuencia mediante secuenciación. Por último se llevó a cabo la reacción de recombinación entre el vector de entrada pENTR2B-GmeIFiso4G y el vector binario destino pMDC7 (Curtis y Grossniklaus, 2003) utilizando la tecnología *Gateway*. Este vector contiene los sitios *attR1* y *attR2* que permiten el clonado de un fragmento de ADN por recombinación homóloga, utilizando la clonasa LR. La inserción de una secuencia entre estos dos sitios permite la expresión de la misma bajo el control de un promotor inducible por  $\beta$ -estradiol. El vector obtenido se denominó XVE:GmeIFiso4G.

El cassette de expresión completo consistió por un lado en un promotor fuerte y constitutivo (G10-90) (Ishige *et al.*, 1999) que regula la expresión del gen *XVE* y por otro lado, el promotor sintético OlexA-46, que regula la expresión de la secuencia clonada en los sitios *attR* (Figura 15). El gen *XVE* codifica para una proteína quimérica que actúa como activador de la transcripción del promotor OlexA-46. Esta proteína, contiene el dominio de unión al ADN del represor bacteriano LexA, el dominio ácido de transactivación de la proteína VP16, y la región C-terminal reguladora del receptor de estrógenos humano (Zuo *et al.*, 2000). La expresión del gen de *XVE* es constitutiva, pero la proteína quimérica se activa únicamente en presencia del  $\beta$  estradiol. De esta forma, si la secuencia codificante se clona en los sitios *attR*, el agregado de  $\beta$  estradiol activa *XVE*, induciéndose la expresión del transgén.

El poder controlar la expresión de un determinado gen, utilizando promotores inducibles, presenta varias ventajas. Por un lado, un transgén puede ser expresado en un momento del desarrollo determinado y con una duración específica. Esta flexibilidad es particularmente importante cuando se estudian genes cuya regulación es desarrollo y/o tejido específica. Por otra parte, el uso de promotores inducibles permite generar plantas transgénicas conteniendo genes cuya expresión constitutiva puede ser perjudicial para el crecimiento o incluso letal. Puntualmente el sistema que utiliza  $\beta$  estradiol como inductor ha

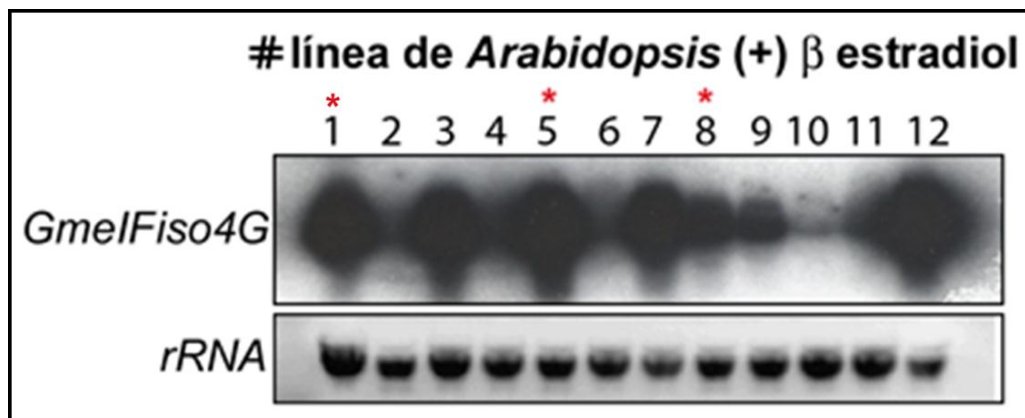
demostrado estar estrictamente regulado, ser altamente inducible y carente de toxicidad en *Arabidopsis* y tabaco (Zuo *et al.*, 2000).



**Figura 15.** Esquema del cassette de expresión inducible por  $\beta$  estradiol contenido en el vector binario pMDC7, derivado del vector pER8. G10-90; promotor sintético constitutivo; gen quimérico XVE; OlexA-46, promotor inducible conformado por 8 copias del operón Lex A y la porción mínima -46 del promotor 35S; ccdB, gen letal; attR1 y attR2, sitios específicos para la recombinación LR; RB y LB, borde derecho y borde izquierdo respectivamente (Zuo *et al.*, 2000).

Con el objetivo de analizar el efecto de la expresión heteróloga del gen *GmeFiso4G* de soja, se transformaron plantas de *Arabidopsis* con la construcción XVE:*GmeIFiso4G*. Utilizando el método de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* mediante el procedimiento de inmersión floral. Se obtuvieron 16 líneas que fueron seleccionadas en base a su resistencia a la higromicina durante dos generaciones (plantas T2) y se realizaron extracciones de ADN para la caracterización molecular de las mismas. La presencia del gen *GmeIFiso4G* en el genoma de las líneas obtenidas fue analizada por PCR utilizando los cebadores específicos para amplificar completamente la región codificante del gen. Se determinó que 14 líneas contenían el gen *GmeIFiso4G*. Posteriormente se analizó la expresión del transgén en las líneas confirmadas por medio de PCR y *Northern blot*. Para ello se realizaron extracciones de ARN a partir de las plantas inducidas con  $\beta$  estradiol durante 24 horas, el ARN fue separado en geles de agarosa desnaturalizante y transferido a membranas de Nylon como se describe en Materiales y Métodos. Como sondas se utilizaron los fragmentos de ADN correspondiente al inserto del clon 651 marcado con [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP.

Se observó una acumulación significativa del transcripto correspondiente al gen *GmeIFiso4G* en las líneas 1, 3, 5, 7, 8, 9, 11 y 12 (Figura 16). En base a los resultados obtenidos se seleccionaron las líneas 1, 5 y 8 para la caracterización fenotípica en condiciones de estrés y en condiciones normales de crecimiento.



**Figura 16.** Análisis de expresión por *Northern blots* de *GmeIFiso4G* en diferentes líneas transgénicas. Se analizó ARN extraído a partir de plantas inducidas con  $\beta$  estradiol 10 $\mu$ M durante 24 horas. Con asterisco se marcan las líneas seleccionadas para posteriores análisis fenotípicos.

#### Caracterización fenotípica de plantas transgénicas

Para determinar el efecto de la expresión del gen *GmeIFiso4G* en la tolerancia al estrés abiótico en *Arabidopsis*, se realizaron varios ensayos *in vitro* en diferentes condiciones de estrés osmótico y salino. Se utilizaron plantas de *Arabidopsis* de 5-7 días tanto de las líneas transgénicas seleccionadas, como de plantas silvestres Col-0 y el mutante SALK\_072365. El efecto de la expresión de *GmeIFiso4G* sobre el crecimiento en condiciones control y de estrés se evaluó mediante la inducción del transgén 24 horas antes del cambio de medio de crecimiento normal al de estrés, manteniéndose la inducción en los diferentes medios, suplementados con 10  $\mu$ M de  $\beta$  estradiol. Se utilizaron varios medios de cultivo que determinaron diferentes niveles y condiciones de estrés osmótico y salino: manitol 250-300 mM, NaCl 100-150 mM y placas perfundidas con PEG 8000 (25%-40%). Se tomaron fotografías en tiempo inicial y final de los tratamientos, transcurridos 6 a 9 días, y se realizaron mediciones de tamaño, peso fresco, peso seco y contenido de clorofila. Se determinó que las mejores condiciones para evaluar la respuesta frente al estrés fueron con los medios conteniendo manitol (300 mM), NaCl (150 mM) y placas perfundidas con 40% polietilenglicol (PEG) 8000. Estas últimas

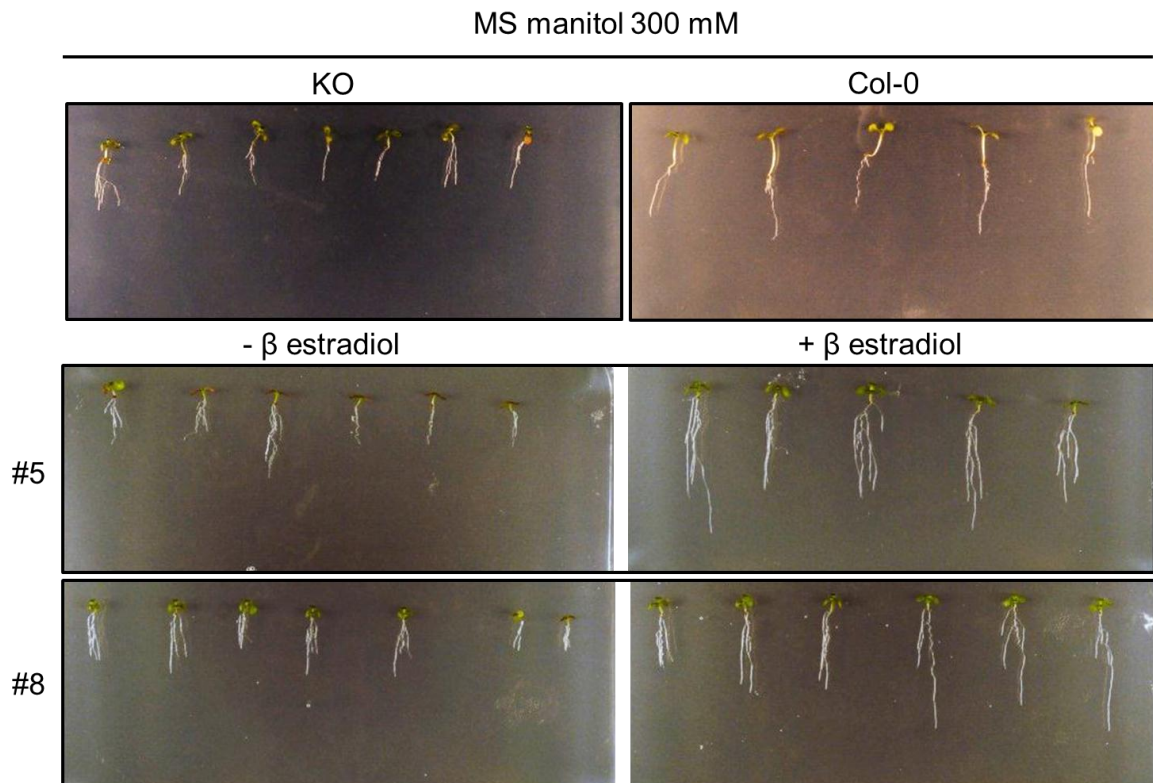
condiciones equivalen a un estrés impuesto por un potencial hídrico ( $\psi$ ) de aproximadamente -0.7 MPa.

### (I) Respuesta frente a estrés osmótico y sequía

Existen diferentes compuestos que permiten generar un estrés osmótico en plantas crecidas *in vitro*, destacándose entre ellos el manitol, el sorbitol y el PEG. El uso de estos compuestos tiene varias ventajas, como el control preciso del potencial hídrico, la reproducibilidad, rapidez y el gran número de plantas que pueden ser analizadas simultáneamente. Sin embargo, pueden presentarse limitaciones, dependiendo del soluto utilizado. Por ejemplo, el manitol es un soluto de bajo peso molecular que es capaz ingresar en las células de la planta pudiendo tener efectos tóxicos, lo que puede enmascarar los resultados observados. Para evitar los efectos secundarios no deseados es posible utilizar solutos de alto peso molecular como el PEG 6000 o de mayor peso molecular, que no ingresan a las células.

En este trabajo se realizaron ensayos preliminares utilizando plantas T2 de las líneas 1, 5 y 8, que expresan condicionalmente el gen *GmeIFiso4G* en medio MS conteniendo manitol (300 mM) o NaCl (150 mM), tanto en presencia o en ausencia del agregado de  $\beta$  estradiol. Se determinó que las líneas 5 y 8 mostraban una diferencia fenotípica en estrés en condiciones de expresión del transgen, por lo que se descartó la línea 1 para futuros análisis fenotípicos y se procedió a la obtención de plantas de la generación T3 para las líneas 5 y 8. Con estas líneas, se llevaron a cabo análisis fenotípicos, comparando su comportamiento con el genotipo silvestre Col-0 y con el KO, SALK\_072365.

En la Figura 17 se resumen los resultados obtenidos a partir de la evaluación visual de los cultivos a los 6 días de establecidos los tratamientos de estrés osmótico generado por el agregado al medio de manitol (300 mM). Se realizaron análisis cuantitativos de peso fresco, peso seco, longitud radicular y contenido de clorofila.



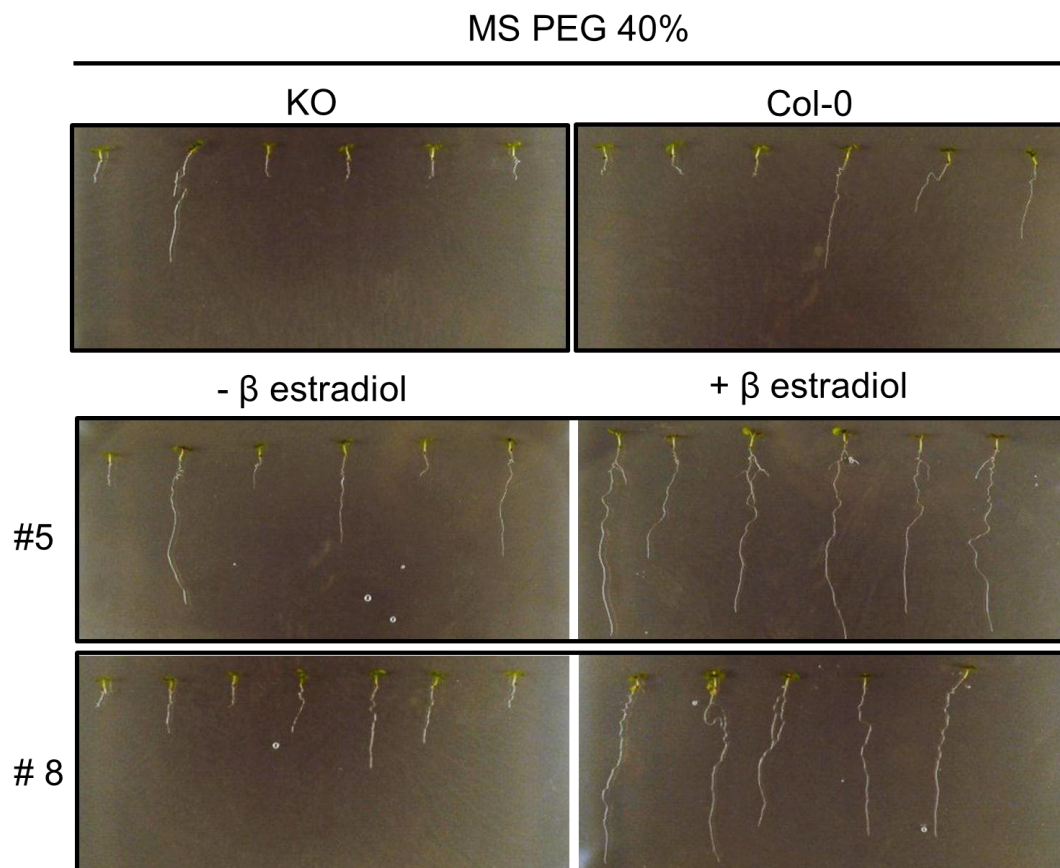
**Figura 17.** Crecimiento en medio MS suplementado con manitol 300 mM luego de 6 días, de plantas salvajes (Col-0), mutantes KO (KO) y líneas transgénicas #5 y #8. Para estas últimas se detalla en crecimiento en presencia de  $\beta$  estradiol (+ $\beta$ ) y en ausencia del mismo (- $\beta$ ).

Los resultados mostraron que en condiciones control no hubo diferencias significativas de crecimiento entre ninguno de los cuatro genotipos analizados, tanto en presencia como en ausencia de  $\beta$  estradiol. Tampoco se observaron diferencias entre los genotipos en condiciones de estrés osmótico en ausencia de  $\beta$  estradiol. Sin embargo se observaron diferencias importantes en condiciones de estrés frente al agregado de  $\beta$  estradiol en los genotipos transgénicos. Las medidas de peso fresco de la parte aérea mostraron que, el genotipo Col-0, el mutante KO y las líneas transgénicas en ausencia de  $\beta$  estradiol presentaron una reducción de aproximadamente 75% de su peso con respecto a los controles, y las líneas 5 y 8 mostraron una reducción del 55% y de 70% respectivamente (Figura 19A). Estas diferencias fueron significativamente mayores a nivel radicular, en donde las plantas Col-0, el mutante KO y líneas analizadas en estrés sin inducción del transgen, mostraron una reducción del crecimiento radicular de aproximadamente 70% con respecto a las plantas crecidas en condición control. Sin embargo se observó una



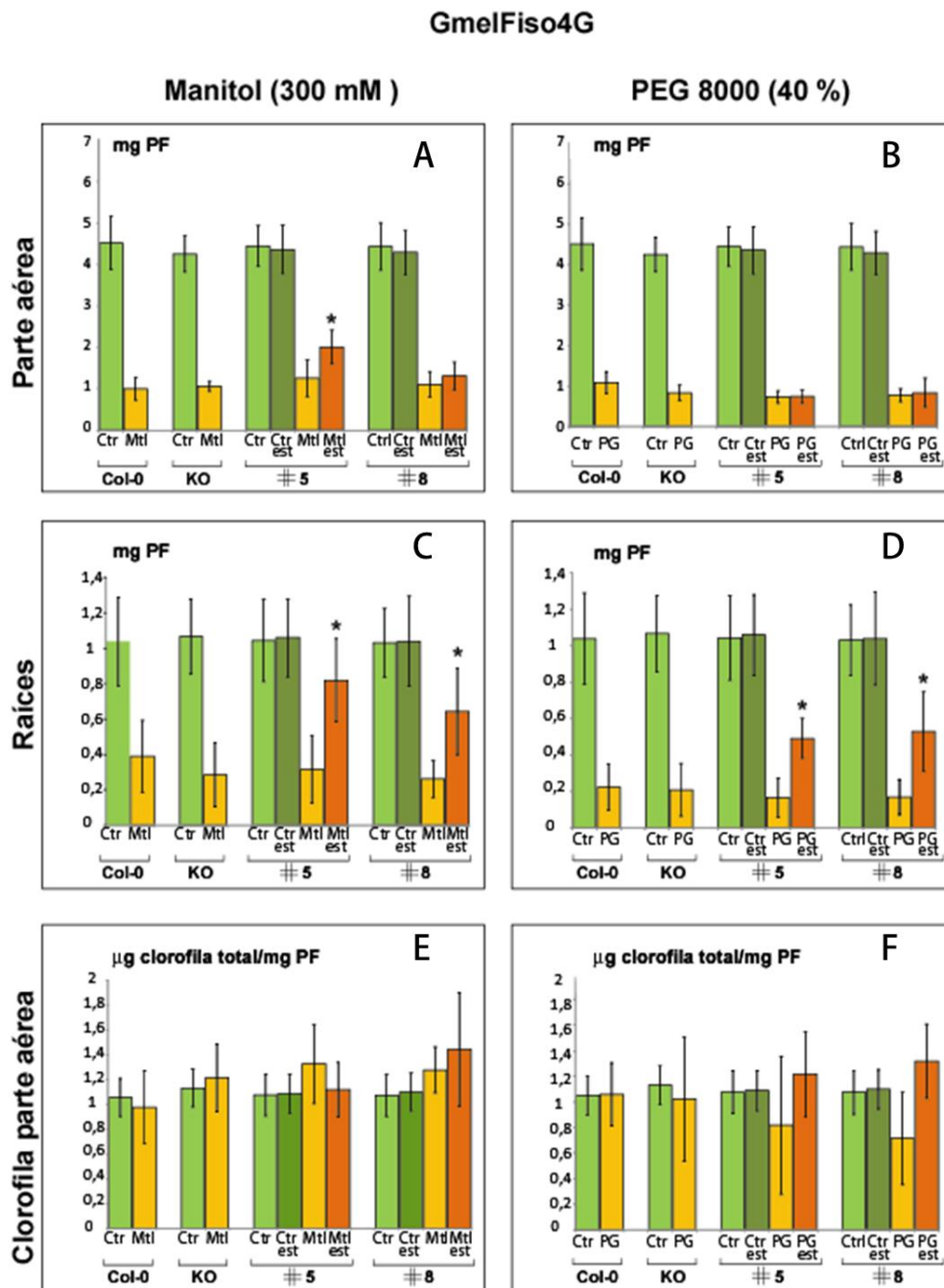
reducción del crecimiento de 21% y 39% en las líneas 5 y 8 respectivamente, en plantas sometidas a estrés e inducidas con  $\beta$  estradiol. Esta diferencia fue significativa tanto cuando se las comparó entre las líneas sin inducción, así como con plantas Col-0 y mutante KO (Figura 19C). Sin embargo, estas diferencias no se vieron reflejadas en el contenido de clorofila en las distintas plantas, ya que bajo estrés y en condición control, con y sin inducción del transgén, no se observaron diferencias significativas (Figura 19E).

Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizó PEG para la generación de estrés osmótico. La comparación del crecimiento de la parte aérea no arrojó diferencias significativas entre el genotipo Col-0, mutante KO y las líneas transgénicas analizadas, tanto en presencia como en ausencia de  $\beta$  estradiol (Figura 18).



**Figura 18.** Crecimiento en medio MS perfundido con PEG 8000 40% luego de 6 días. Plantas salvajes (Col-0), mutantes KO (KO) y líneas transgénicas #5 y #8. Para estas últimas se el crecimiento en presencia de  $\beta$  estradiol (+ $\beta$ ) y sin el mismo (- $\beta$ ).

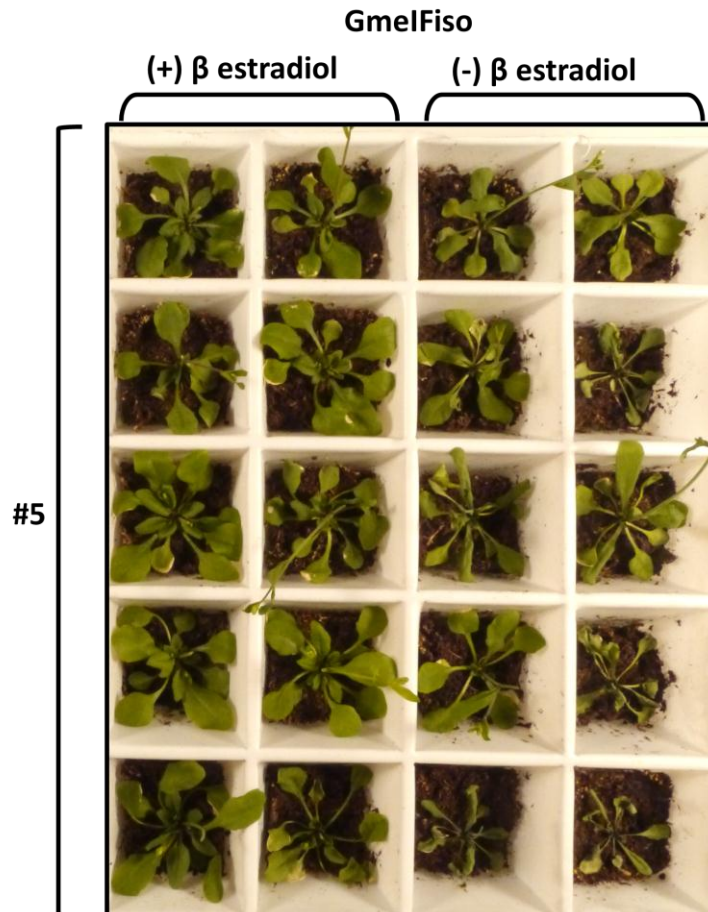
Sin embargo, el análisis de los datos recopilados de la medición del peso fresco de las raíces de las plantas sometidas a estrés osmótico generado por PEG, mostró diferencias en el crecimiento radicular para las líneas 5 y 8 en condiciones de estrés y en presencia de  $\beta$  estradiol, respecto a las plantas Col-0, mutante KO y las respectivas líneas sin  $\beta$  estradiol. Para la línea 5 se determinó una reducción de 53% del crecimiento radicular y para la línea 8 un 49%, mientras que para los genotipos Col-0, mutante KO y transgénicas sin inducción, se determinó una reducción que osciló entre el 78% al 83% de reducción del crecimiento en comparación con el crecimiento radicular en condiciones óptimas (Figura 19D).



**Figura 19.** Expresión heteróloga de *Gmelfiso4G* en *Arabidopsis* afecta la tolerancia al estrés osmótico. La expresión de *Gmelfiso4G* afecta la tolerancia al estrés osmótico. Resultados cuantitativos de medidas de peso fresco (mg) de la parte aérea **A**), del peso fresco de raíces (mg) **C**) y del contenido de clorofila **E**) en plantas sometidas a 6 días de estrés osmótico causado por el agregado de manitol 300 mM al medio. Resultados cuantitativos de medidas de peso fresco (mg) de la parte **B**), del peso fresco de raíces (mg) **D**) y del contenido de clorofila **F**) en plantas sometidas a 6 días de estrés osmótico causado agregado de PEG 8000 40%. Condiciones normales en medio MS (Ctrl), correspondientes a los genotipos Col-0, mutante KO (KO), líneas transgénicas #5 y #8, sin y con el agregado de  $\beta$  estradiol al medio de cultivo (est). Los valores representados corresponden a medias de 12 réplicas. Los datos fueron analizados por test de *Student*, las diferencias significativas se marcan con asterisco \* ( $P < 0.05$ ).

Por otra parte, los datos obtenidos para el contenido de clorofila en las plantas sometidas a estrés osmótico mediado por PEG, tanto en condiciones de inducción como de no inducción del transgén, no mostraron diferencias significativas entre las líneas analizadas, las plantas mutantes KO y Col-0. Sólo se apreció una diferencia significativa en el contenido de clorofila, cuando se compara las líneas 5 y 8 en condiciones de estrés, en presencia y ausencia de  $\beta$  estradiol (Figura 19F). Se concluye de estos resultados, que la expresión controlada del gen *GmeIFiso4G* de soja en *Arabidopsis* resulta en un aumento significativo de la tolerancia al estrés osmótico, que se manifiesta a través del crecimiento radicular.

Con el objetivo de comparar el fenotipo resultante de la imposición de un estrés osmótico a plantas crecidas en condiciones *in vitro*, con el fenotipo de las plantas crecidas en tierra y sometidas a condiciones de estrés hídrico, se llevaron a cabo ensayos de sequía de las líneas transgénicas 5 y 8 en presencia o ausencia de  $\beta$  estradiol. Luego de suspendido el riego, las mitad de las plantas fueron suplementadas con 200  $\mu$ l de 5  $\mu$ M de  $\beta$  estradiol, mientras que los controles sin expresión del transgén, sometidos a estrés hídrico, fueron regados 200  $\mu$ l de agua. Al cabo de 5 días de impuesto el estrés, se tomaron fotografías. Los resultados de estos experimentos claramente mostraron que la expresión de *GmeIFiso4G* en *Arabidopsis* aumentó significativamente la tolerancia a la sequía en estas plantas (Figura 20). Las plantas tratadas con  $\beta$  estradiol tuvieron un fenotipo similar a las plantas crecidas con condiciones de riego óptimo, mientras que las plantas que no fueron tratadas con este compuesto alcanzaron a un estado claro de marchitez en condiciones de sequía.

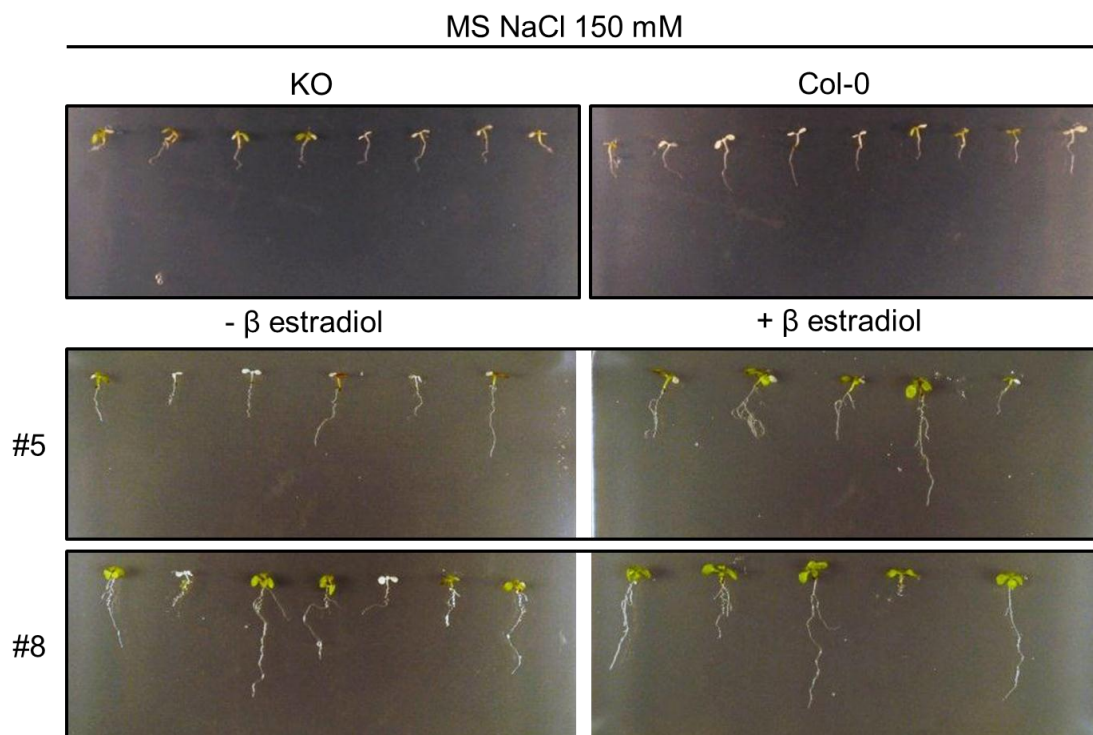


**Figura 20.** Crecimiento en turba de plantas de *Arabidopsis* expresando condicionalmente el gen *GmeIFiso4G*, luego de 5 días de instaurado el régimen de sequía. Línea transgénicas #5, en presencia de  $\beta$  estradiol ( $+\beta$ ) y sin el mismo ( $-\beta$ ).

### (II) Respuesta frente a estrés salino

El estrés salino representa un problema dual, por un lado genera estrés osmótico, limitando la disponibilidad de agua y nutrientes, y por otro, genera un efecto tóxico debido a los altos niveles de iones  $\text{Na}^+$  y el desbalance iónico que estos causan (Huh *et al.*, 2002; Munns, 2002). El estrés osmótico y salino comparten una serie de elementos en común, fundamentalmente la generación de potenciales hídricos bajos en el medio de crecimiento de la planta. Se ha observado que varios factores de las vías de respuestas están implicados en la tolerancia a varios tipos de estrés ambiental. En este contexto se evaluó el

despeño de las líneas transgénicas en condiciones de estrés salino y se comparó con el genotipo Col-0 y el mutante KO. En la Figura 21 se resumen los resultados obtenidos a partir de la evaluación visual del crecimiento a los 6 días de establecidos los tratamientos de estrés y en condición control. Se observó para ambas líneas un crecimiento diferencial, en presencia de 150 mM de NaCl, en las plantas tratadas con  $\beta$  estradiol, respecto a los mismos genotipos en ausencia de  $\beta$  estradiol. Esta misma diferencia también se observó al comparar las plantas transgénicas inducidas con las plantas Col-0 y el mutante KO en condiciones de estrés. No se observaron diferencias significativas entre las plantas Col-0 y las mutantes KO ni en condiciones control, ni en estrés salino.

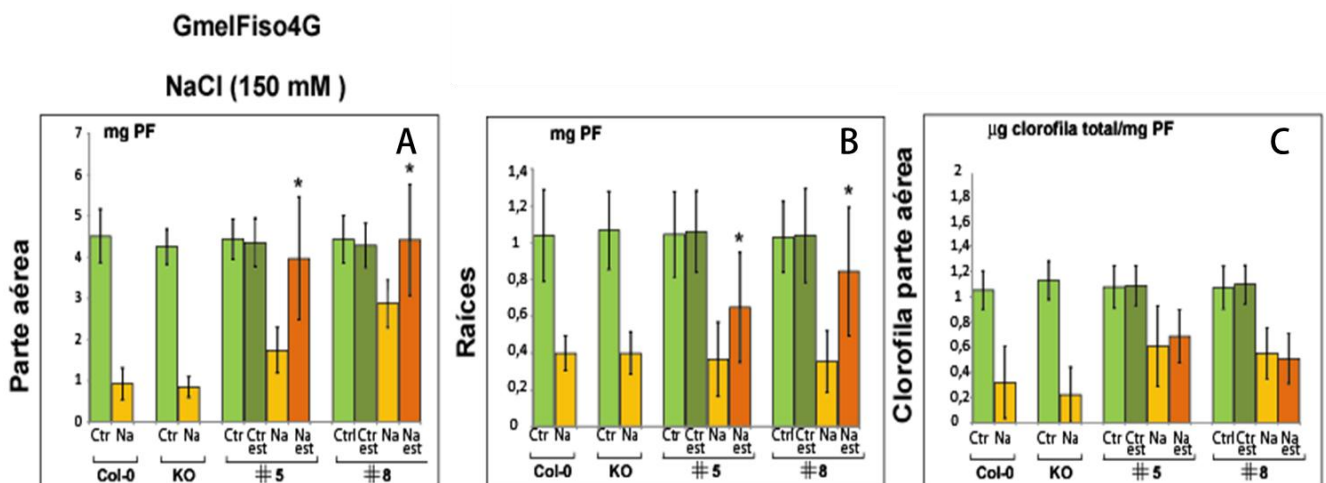


**Figura 21.** Crecimiento en medio MS suplementado con NaCl 150 mM luego de 6 días. Plantas salvajes (Col-0), mutantes KO (KO) y líneas transgénicas #5 y #8. Para estas últimas se detalla el crecimiento en presencia de  $\beta$  estradiol (+ $\beta$ ) y sin el mismo (- $\beta$ ).

A diferencia de la respuesta al estrés osmótico, se observaron crecimientos diferenciales tanto en la parte aérea como en las raíces. En éste último caso, se observó un crecimiento radicular significativamente mayor en las líneas 5 y

8 en presencia de  $\beta$  estradiol en condiciones de estrés, en comparación con las otras plantas analizadas. La reducción de crecimiento en presencia de NaCl fue de 32% y 25% para las líneas 5 y 8 respectivamente, mientras que para las plantas sin inducción, mutantes KO y Col-0, la reducción del crecimiento radicular fue de alrededor de 60% (Figura 22A y 22B).

Los datos obtenidos para el contenido de clorofila en las plantas sometidas a estrés salino generado por el agregado de NaCl no mostraron diferencias significativas entre las líneas analizadas con y sin inducción. Por otra parte, sí se observó un comportamiento diferencial cuando se compararon las líneas 5 y 8 en condición de estrés, con y sin  $\beta$  estradiol, con las plantas mutantes KO y Col-0. Las mediciones de clorofila tomadas en plantas sometidas a estrés salino con 150 mM de NaCl presentaron desviaciones muy marcadas, ya que la toma de muestra se realizó por planta individual y existieron varios casos en los cuales las plantas no presentaron una cantidad determinable de clorofila, esto hizo que los valores obtenidos oscilaran entre 0  $\mu\text{g}/\text{mg}$  y 1.25  $\mu\text{g}/\text{mg}$  ( $\mu\text{g}$  Clorofila/mg peso fresco), (Figura 22C).



**Figura 22.** Expresión heteróloga de *Gmelfiso4G* en *Arabidopsis*. **A)** Peso fresco (mg) de la parte aérea. **B)** Peso fresco de raíces (mg). **C)** contenido de clorofila de plantas sometidas a 6 días de estrés salino causado por NaCl 150 mM y condiciones normales de crecimiento en medio MS (Ctrl), correspondientes a los genotipos Col-0, mutante KO (KO), líneas transgénicas #5 y #8, sin y con el agregado de  $\beta$  estradiol al medio de cultivo (est). Los valores representados corresponden a medias de 12 réplicas. Los datos fueron analizados por test de *Student*, las diferencias significativas se marcan con asterisco \* ( $P < 0.05$ ).

En suma, los análisis fenotípicos cuantitativos de peso fresco de la parte aérea y raíz apoyaron los resultados cualitativos observados inicialmente. Estos resultados en su conjunto representan una evidencia sobre el rol del gen *GmeIFiso4G* en la tolerancia al estrés hídrico, osmótico y salino.

### **Caracterización funcional de *GmSEOa***

Un segundo gen candidato seleccionado en este estudio fue *GmSEOa*, que codifica una proteína de la familia SEO. Este tipo de proteínas se encuentran mayoritariamente presentes en el floema de plantas leguminosas, algunas de ellas formando parte de los forisomas (Noll *et al.*, 2011). En soja se han identificado 26 genes *SEO*, de los cuales cinco aparentemente son pseudogenes (Rüping *et al.*, 2010). Cuatro de ellos (*GmSEOF1-F4*) codifican proteínas que forman parte del forisoma en esta especie. El resto de los genes no tienen una función conocida hasta la fecha.

Las proteínas de la familia SEO contienen 3 dominios conservados: el dominio SEO N-terminal (SEO-NTD; SEO *N-terminal domain*, dominio Pfam PB013523), un dominio “potencial tioredoxina” y un dominio carboxilo terminal SEO (SEO-CTD; SEO *C-terminal domain*, Pfam PB006891) (Ruping *et al.*, 2010). La presencia de los tres dominios determina que una proteína pertenezca a esta familia. A pesar de que los forisomas están presentes únicamente en especies leguminosas, se han identificado varios genes miembros de la familia SEO en varias especies de dicotiledóneas leguminosas, así como de especies leguminosas, pero cuyos productos proteicos no forman parte de los forisomas (Ruping *et al.*, 2010; Ernst *et al.*, 2011).

En el caso particular del gen *GmSEOa*, su secuencia aminoacídica deducida corresponde a una proteína de 76 kDa, que contiene en su región N terminal, el dominio SEO-NTD, en su región central, un dominio tioredoxina, y un dominio SEO-CTD en la región C terminal de la proteína (Figura 23).

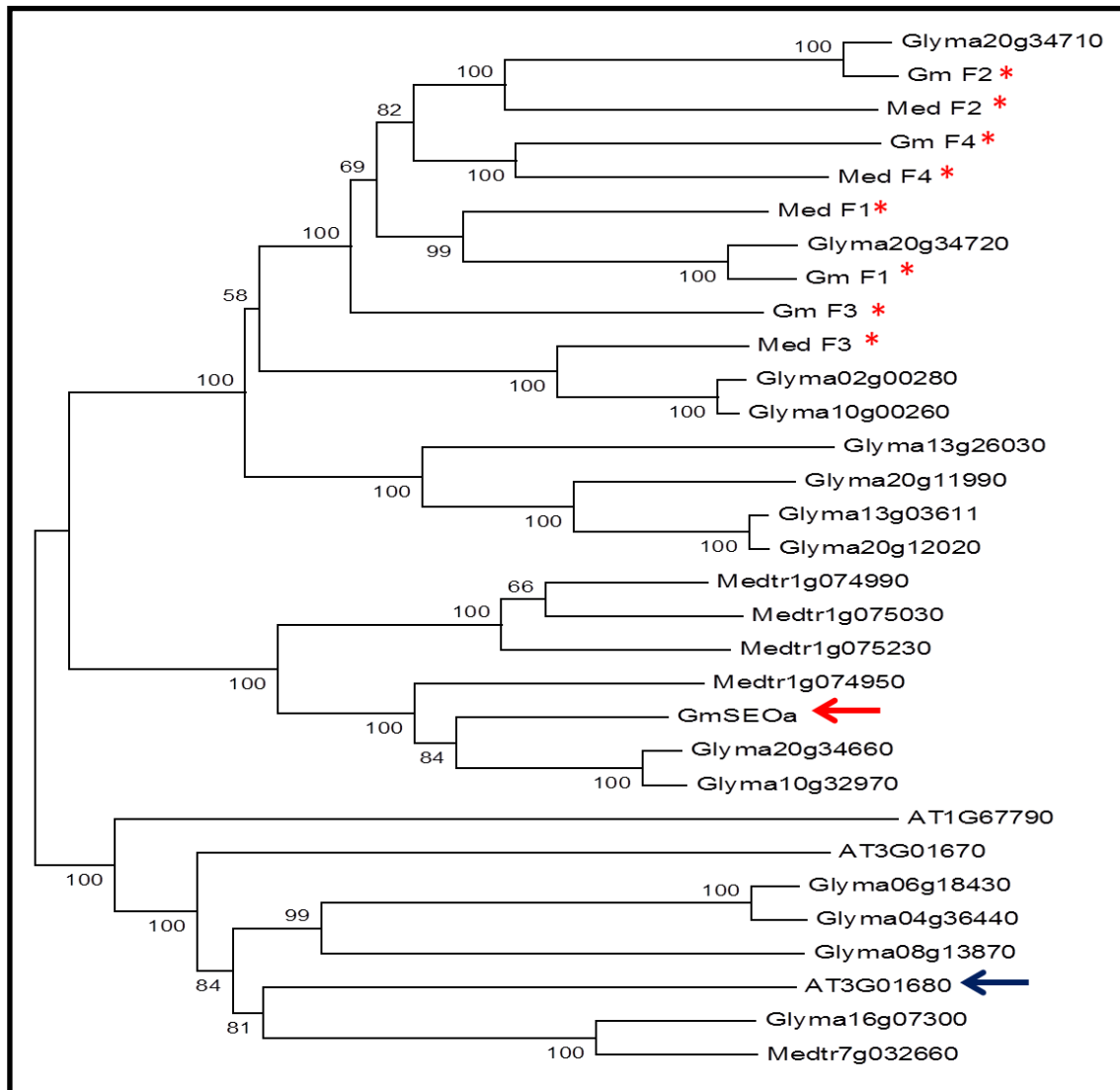




**Figura 23.** Análisis de la proteína SEO **A)** Secuencia aminoacídica deducida para el gen *GmSEOa*. Los dominios específicos de las *sieve element occlusion* (SEO) se indican en verde (SEO-NTD), celeste (dominio potencial thioredoxina) y gris (SEO-CTD). **B)** Representación gráfica del sitio de inserción del T-DNA en el mutante SALK\_042288. Se muestran como líneas negras la secuencia correspondiente a intrones, en rosa los exones y en gris los UTR 5' y 3'.

Los genes *SEO* están presentes en todas las plantas vasculares aunque no se han identificado forisomas en especies no leguminosas. En *Arabidopsis* existen dos que codifican proteínas pertenecientes a esta familia. La búsqueda de genes de *Arabidopsis* ortólogos al gen *GmSEOa* permitió identificar al gen *AT3G01680* como el de mayor homología a nivel de la secuencia aminoacídica (52 % de similitud).

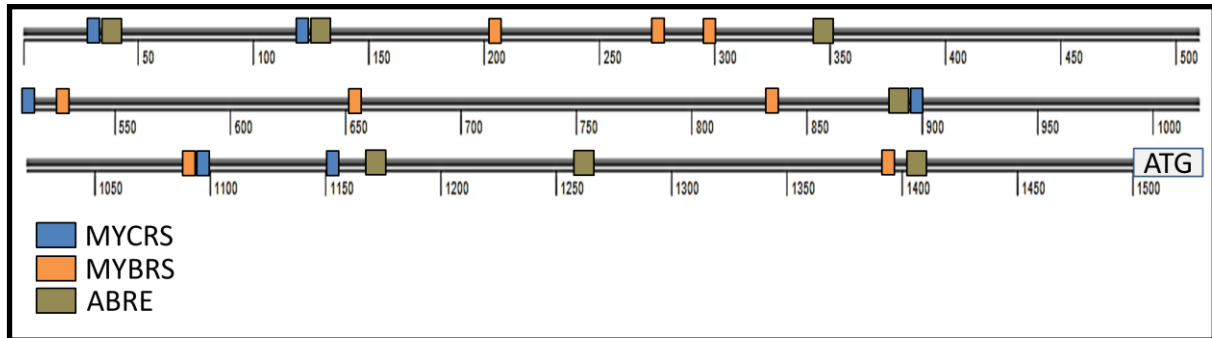
Se identificó un mutante KO (SALK\_042288) por inserción de T-DNA en este gen, que presenta una inserción en la región codificante a nivel de la región UTR 3' (Figura 23B). Estas plantas fueron analizadas fenotípicamente junto con líneas de *Arabidopsis* generadas en este trabajo. Sin embargo, cuando se calculó la relación filogenética entre los genes identificados con alta homología al *GmSEOa*, de soja, *Medicago truncatula* y *Arabidopsis thaliana*, se observó que la proteína *GmSEOa* diverge considerablemente de la codificada por el gen *AT3G01680* de *Arabidopsis*, y no se agrupa con los genes que codifican proteínas SEO que forman parte del forisoma en soja y *Medicago* (Figura 24).



**Figura 24.** Árbol filogenético para proteínas SEO de diferentes especies. Se incluye soja, *Medicago truncatula* y *Arabidopsis thaliana*. El mismo fue generado utilizando el programa Mega 5.2 (Tamura *et al.*, 2011) utilizando el algoritmo *Neighbor joining* y con un soporte de *bootstrap* de 1000 réplicas. Los porcentajes de *bootstrap* se muestran en los nodos. La longitud de las ramas es proporcional al número de sustituciones de aminoácidos. AT: *Arabidopsis thaliana*, Glyma y Gm: *Glycine max*, Medtr y Med: *Medicago truncatula*. Las proteínas SEO identificadas en los forisomas en trabajos anteriores, se marcan con un asterisco. La proteína GmSEOa con una flecha roja y la de mayor similitud en *Arabidopsis* con una flecha azul.

Para profundizar en el conocimiento de la regulación y función del gen *GmSEOa* se realizó el análisis bioinformático de pb 1500 corriente arriba del codón de iniciación de la traducción, utilizando el sitio de predicción de elementos en *cis*, PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>). Se determinó que la región promotora de este gen en el genotipo de referencia Williams-82, presenta varios elementos en *cis* específicos de la inducción por estrés hídrico

involucrados en las vías de señalización dependientes de ABA (Figura 25). Se determinó la presencia de ocho elementos en *cis* de unión a factores de transcripción del tipo MYB, seis elementos en *cis* reconocidos por factores de transcripción tipo MYC y siete elementos ABRE reconocidos por factores de transcripción del tipo bZIP.



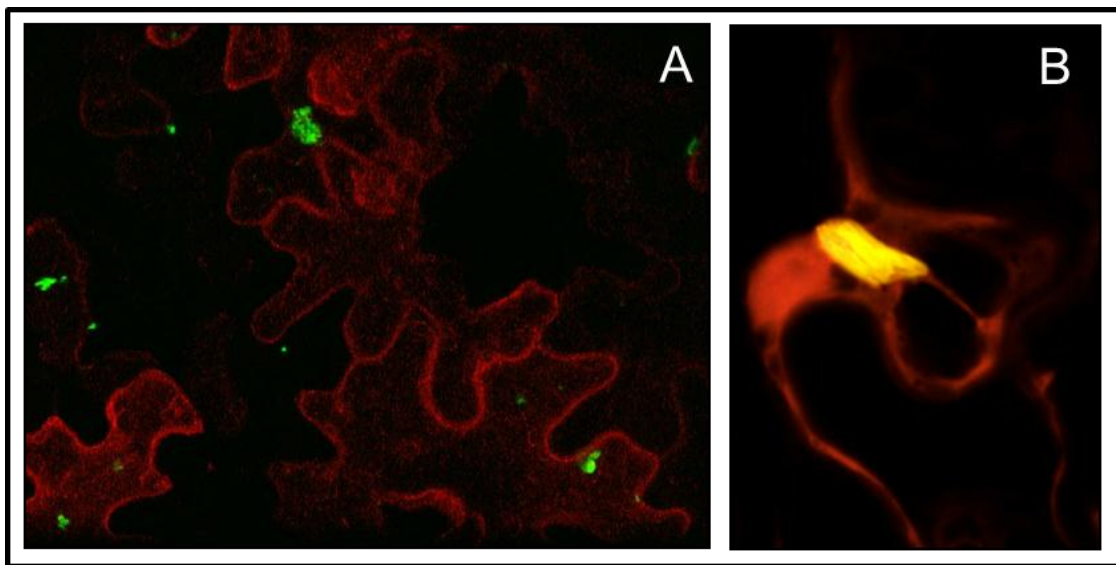
**Figura 25.** Esquema de los elementos *cis* asociados al estrés hídrico, predichos para la región promotora del gen *GmSEOa*. Se muestran 1500 bases *upstream* del codón de iniciación, con los correspondientes elementos *cis*: MYCRS (*MYC recognition sequence*), MYBRS (*MYB recognition sequence*) y ABRE (*ABA response element*).

### Determinación de la localización subcelular de *GmSEOa*

Con el fin de conocer la ubicación subcelular de la proteína *GmSEOa* se llevaron a cabo experimentos de expresión transitoria en hojas de tabaco, de una construcción que dirige la expresión constitutiva, la proteína de fusión *GmSEOa-GFP* en hojas de tabaco. Para ello, se amplificó, a partir de cDNA, la región codificante del gen *GmSEOa*, utilizando cebadores diseñados de manera tal que se eliminó el codón de terminación y se conservó el marco de lectura con la proteína GFP. La secuencia amplificada fue clonada en el vector de pENTR2B y luego clonada por recombinación LR en el vector binario destino pK7FWG2, obteniéndose el vector de expresión 35S:*GmSEOa-GFP*.

Con este tipo de enfoque no es posible determinar el patrón de expresión espacial de este gen debido a que la expresión del gen quimérico está regulada por un promotor constitutivo (CaMV35S). Sin embargo, esta aproximación permite contribuir a determinar el patrón de localización intracelular de la proteína.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos de expresión transitoria en hojas de tabaco, determinaron un patrón de fluorescencia en forma de acúmulos probablemente citoplasmáticos, ya que no se observaron asociaciones con organelos o compartimentos subcelulares (Figura 26A). Estudios realizados por Ernst y colaboradores (2012) determinaron un patrón de acumulación similar para la proteína NtSEO1 de tabaco (Figura 26 B). Estos resultados sugieren que la proteína GmSEOa podría estar formando complejos oligoméricos.



**Figura 26.** Expresión transitoria por agroinfiltración de hojas de tabaco para determinar la localización subcelular de la proteína GmSEOa fusionada con GFP. **A)** Patrón de acumulación de fluorescencia observado en hojas de tabaco agroinfiltradas con la construcción 35S:GmSEOa-GFP. **B)** Patrón de acumulación de fluorescencia observado en hojas de tabaco agroinfiltradas con la construcción 35S:NtSEO1-Venus coexpresada con ARNm de RFP citoplasmática por Ernst y colaboradores (2012).

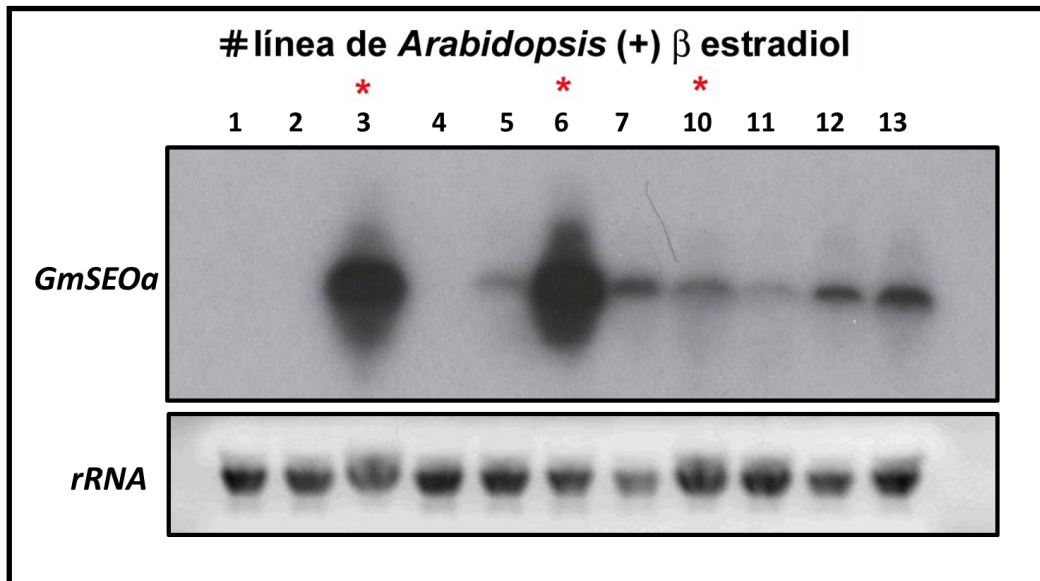
### **Generación y caracterización molecular de líneas de *Arabidopsis* con expresión condicional del gen *GmSEOa***

Con el objetivo de determinar la contribución del gen *GmSEOa* a la tolerancia al estrés hídrico en *Arabidopsis*, se realizó una construcción génica en un vector binario, que permite la expresión del gen bajo la regulación de un promotor inducible por  $\beta$  estradiol. Para ello se diseñaron cebadores específicos a partir de la secuencia codificante obtenida de la base de datos

*Phytozome*. Se obtuvo un fragmento de 2010 pb utilizando como molde ADNc obtenido del genotipo N7001 en el estadio de estrés inicial. Al igual que con el gen *GmeIFiso4G*, el gen *GmSEOa* se clonó en el vector de expresión inducible por  $\beta$  estradiol, *pMDC7*. La presencia del inserto fue confirmada mediante análisis de restricción y secuenciación y se denominó XVE:GmSEOa.

Utilizando la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* mediante el procedimiento de inmersión floral, se obtuvieron 14 líneas que fueron seleccionadas en base a su resistencia a la higromicina durante dos generaciones (plantas T2) y se realizaron extracciones de ADN para la caracterización molecular de las mismas. La presencia del gen *GmSEOa* en el genoma de las líneas obtenidas fue analizada por PCR utilizando los cebadores específicos para amplificar la región codificante completa del gen. Se determinó que 12 de las líneas analizadas contenían el gen *GmSEOa*. Posteriormente se analizó la expresión del transgen en las líneas confirmadas por medio de RT-PCR y *Northern Blot*. Para ello se realizaron extracciones de ARN a partir de las plantas inducidas con  $\beta$  estradiol durante 24 horas y el ARN fue separado en geles de agarosa desnaturalizante y transferido a membranas de Nylon como se describe en Materiales y Métodos. Como sonda se utilizó el fragmento de ADN correspondiente al inserto del clon 505 marcado con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP.

Se observó una acumulación significativa del transcrito correspondiente al gen *GmSEOa* en las líneas 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12 y 13 (Figura 27), en presencia de  $\beta$  estradiol. En base a los resultados obtenidos se seleccionaron las líneas 3, 6 y 10 para la caracterización fenotípica en condiciones de estrés y en condición control.



**Figura 27.** Análisis por *Northern blots*, de la expresión de *GmSEOa* en diferentes líneas transgénicas. Se analizaron muestras de ARN extraídas a partir de plantas inducidas con  $\beta$  estradiol durante 24 horas. Con asterisco se marcan las líneas seleccionadas para posteriores análisis fenotípicos.

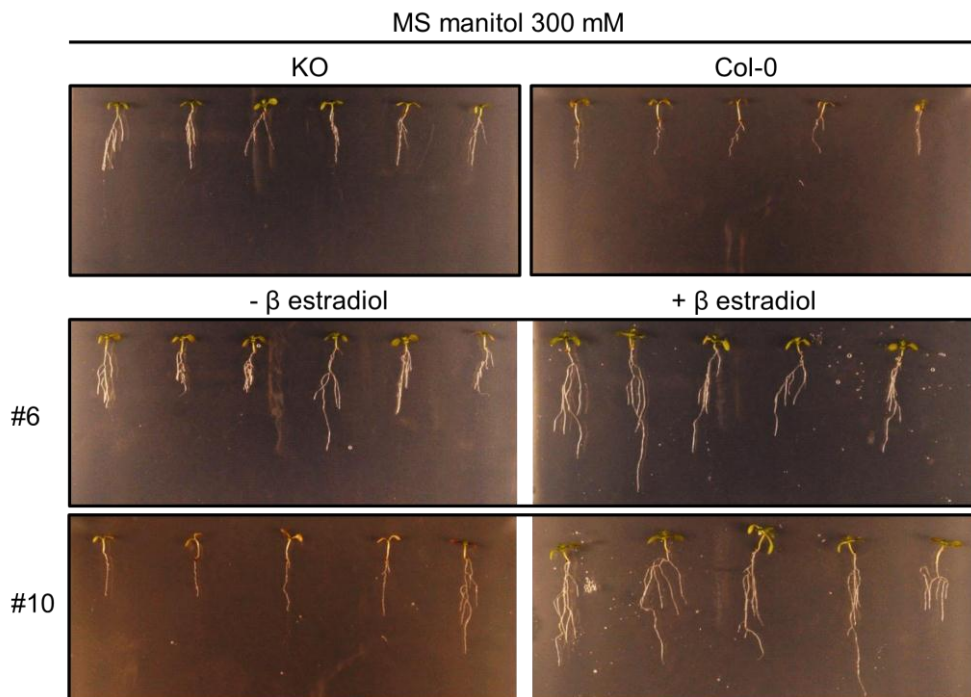
### Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas

Se realizaron ensayos preliminares utilizando plantas T2 de las líneas 3, 6 y 10 que expresan condicionalmente el gen *GmSEOa* en medio MS conteniendo manitol 300 mM, NaCl 150 mM, con y sin el agregado de  $\beta$  estradiol. Se determinó que las líneas 6 y 10 mostraban diferencias fenotípicas claras entre las condiciones de inducción y no inducción del transgén, por lo que se procedió a la obtención de plantas de la generación T3 para éstas. Con estas semillas se llevaron a cabo los siguientes análisis fenotípicos, comparando su comportamiento con plantas silvestres Col-0 y el mutante SALK\_042288, afectado en el gen *AT3G01680* de *Arabidopsis*.

#### (I) Respuesta frente a estrés osmótico y sequía

Al igual que con las plantas de *Arabidopsis* con expresión heteróloga *GmeIFiso4G*, las líneas transgénicas de que expresaron *GmSEOa* fueron

analizadas in vitro, en condiciones de estrés osmótico, mediante el agregado de manitol o PEG al medio de cultivo. En la Figura 28 se resumen los resultados obtenidos a partir de la evaluación visual del crecimiento a los 7 días de establecidos los tratamientos de estrés osmótico generado por el agregado de manitol 300 mM y en condiciones control. Ninguno de los genotipos mostró alteraciones en el crecimiento en condiciones óptimas de crecimiento, tanto en presencia como en ausencia de  $\beta$  estradiol. Sin embargo, en estrés osmótico, las dos líneas transgénicas se mostraron menos afectadas por el estrés impuesto cuando se agregó  $\beta$  estradiol.



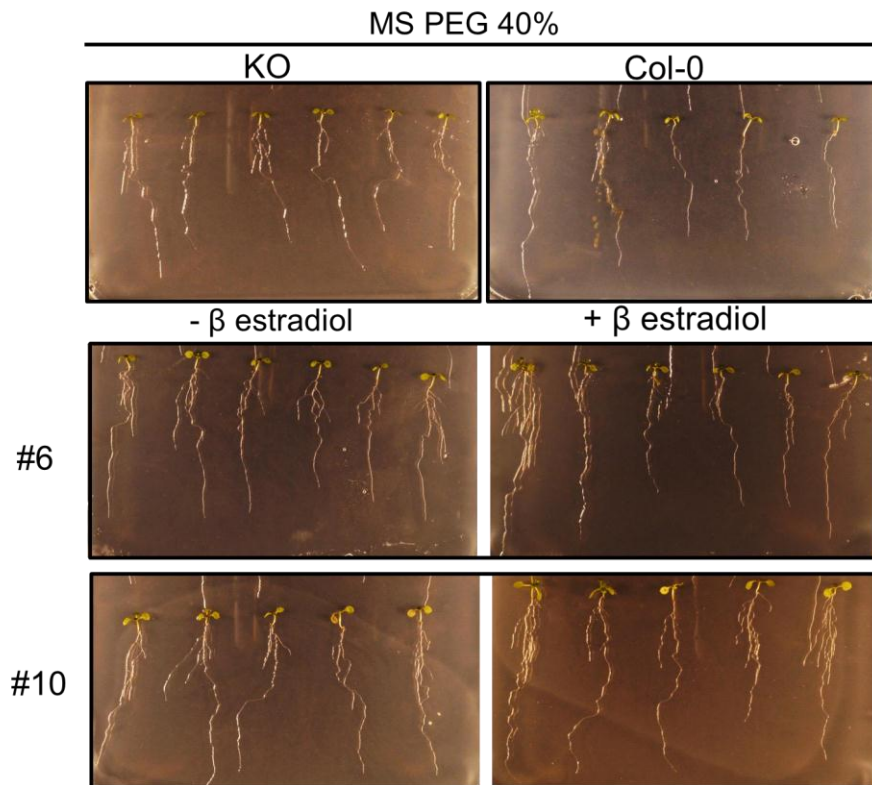
**Figura 28.** Crecimiento en medio MS suplementado con manitol 300 mM luego de 7 días, de plantas salvajes (Col-0), mutantes KO (KO) y líneas transgénicas #6 y #10. Para estas últimas se detalla en crecimiento en presencia de  $\beta$  estradiol ( $+\beta$ ) y en ausencia del mismo ( $-\beta$ ).

El análisis cuantitativo de los datos obtenidos para peso fresco de la parte aérea evidenció una reducción del 58% y 53% para las líneas 6 y 10 respectivamente en comparación con 70% para las plantas sin inducción, el mutante KO y Col-0 (Figura 30A). Resultados similares se obtuvieron para las

mediciones del peso fresco de raíz, observándose diferencias significativas entre las líneas transgénicas con  $\beta$  estradiol y las mismas líneas sin el agregado del mismo, así como con los otros genotipos. Concretamente, en presencia de  $\beta$  estradiol, se observó una reducción del crecimiento radicular de 5%, 19%, 62% y 48% para la línea 6, la línea 10, el genotipo Col-0 y el mutante KO, con respecto a los mismos genotipos en condición control (Figura 30C). Las mediciones de contenido de clorofila en estas condiciones de estrés no arrojaron diferencias significativas entre las plantas analizadas, aunque sí se observó una mayor variación en el contenido de la misma en las plantas bajo estrés, pero estas variaciones fueron similares entre las líneas transgénicas y las otras plantas analizadas (Figura 30E).

La utilización de PEG como generador de estrés osmótico arrojó resultados similares. En la Figura 29 se muestran los resultados obtenidos a partir de la evaluación visual del crecimiento a los 7 días de establecido el estrés causado por PEG y en condición control. Las líneas 6 y 10 en presencia de  $\beta$  estradiol y sometidas a estrés, mostraron un claro crecimiento diferencial, en comparación con las plantas Col-0, el mutante KO y los mismos genotipos sin el agregado de  $\beta$  estradiol. Estas diferencias se observaron tanto en la parte aérea (Figura 30B) como en las raíces, donde fueron más notorias (Figura 30D).

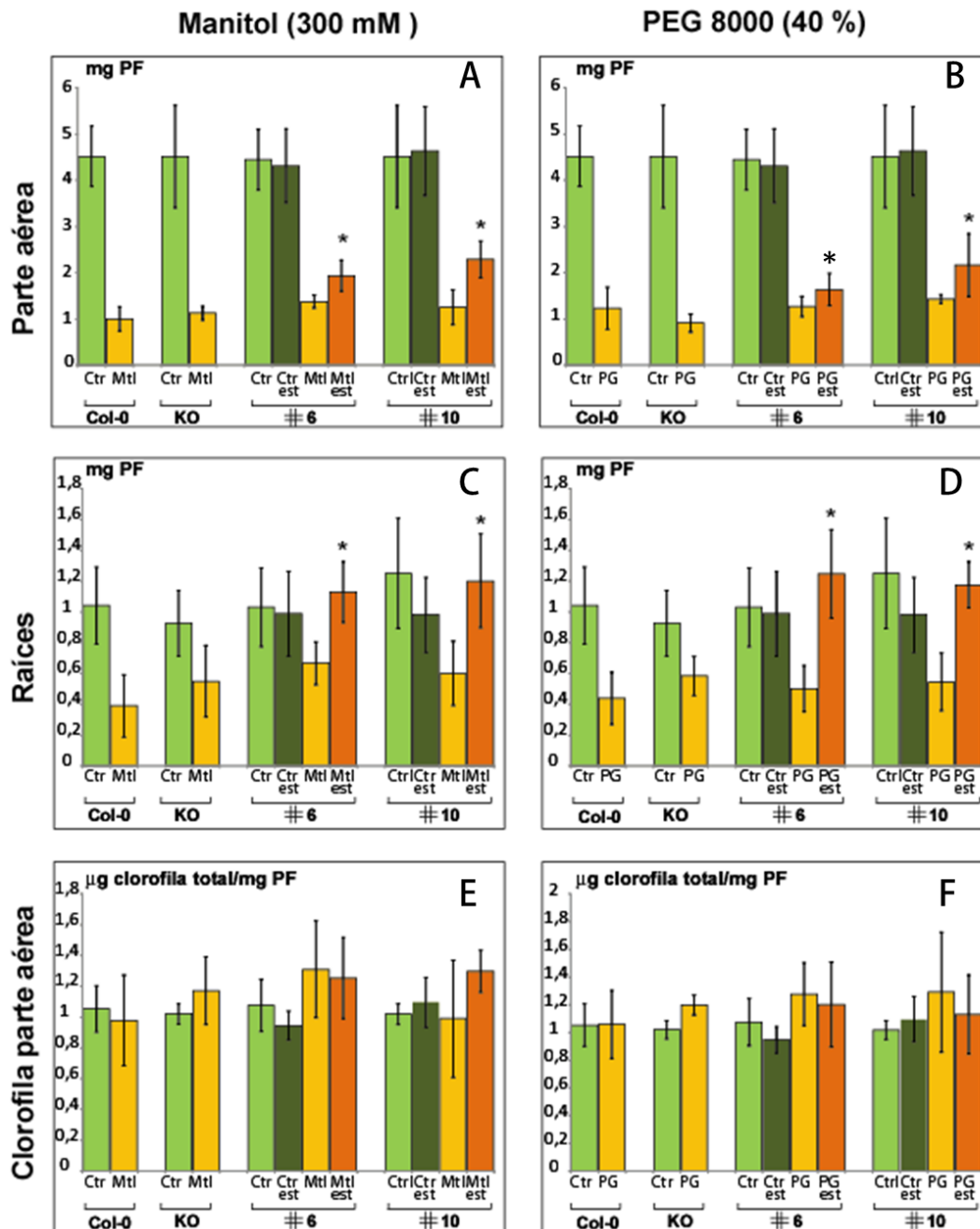




**Figura 29.** Crecimiento en medio MS perfundido con PEG 8000 luego de 7 días. Plantas salvajes (Col-0), mutantes KO (KO) y líneas transgénicas #6 y #10. Para estas últimas se detalla en crecimiento en presencia de  $\beta$  estradiol (+ $\beta$ ) y en ausencia del mismo (- $\beta$ ).

El análisis de los datos obtenidos para peso fresco de raíz confirmó lo observado visualmente. Ambas líneas mostraron un crecimiento diferencial significativo en condiciones de estrés con inducción del transgén, en comparación con las mismas líneas sin inducir y con las plantas Col-0 y el mutante KO. Concretamente, no se observó una reducción del crecimiento radicular para la línea 6 en comparación con los controles mientras que para la línea 10 se determinó una reducción del 18% en condiciones de estrés, comparado con una reducción que va de 37% a 44% para los otros genotipos analizados (Figura 30D).

## GmSE0a

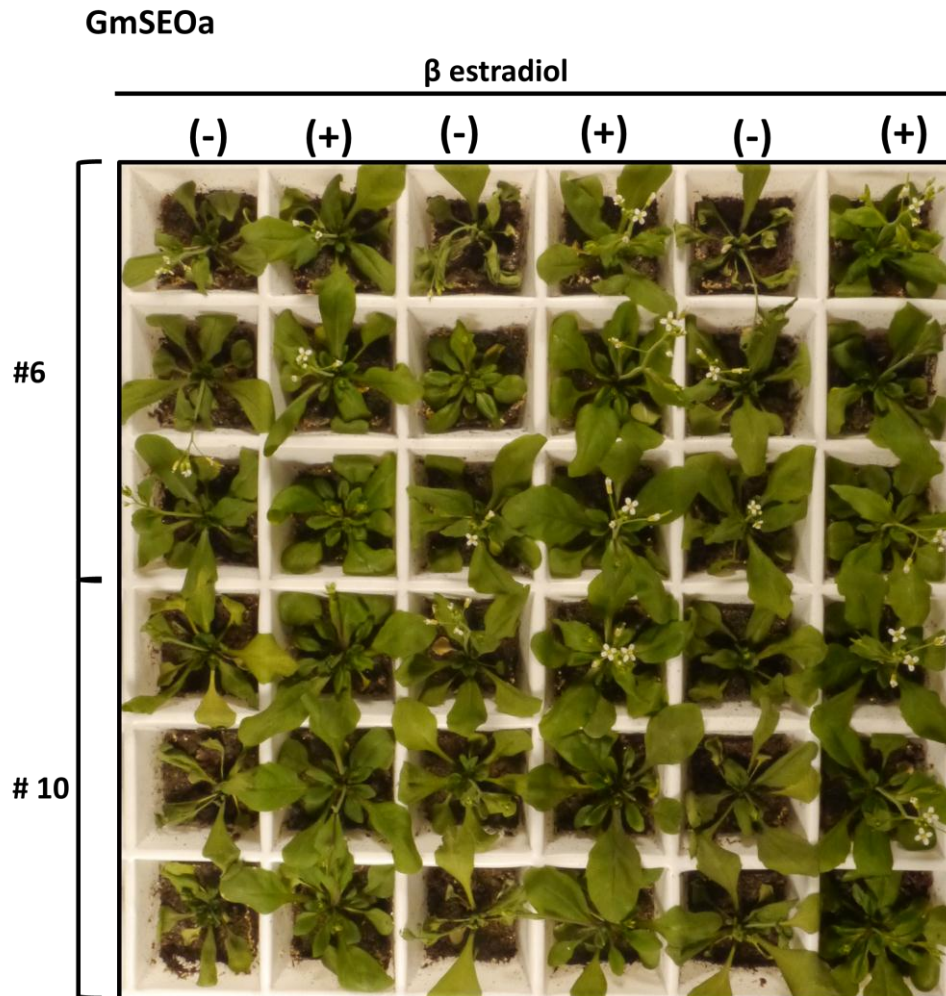


**Figura 30.** Expresión heteróloga de *GmSE0a* en *Arabidopsis*. Peso fresco (mg) de la parte aérea **A**), del peso fresco de raíces (mg) **C**) y del contenido de clorofila **E**), en plantas sometidas a 7 días de estrés osmótico causado por el agregado de manitol 300 mM al medio. Resultados cuantitativos de medidas de peso fresco (mg) de la parte aérea **B**), del peso fresco de raíces (mg) **D**) y del contenido de clorofila **F**), en plantas sometidas a 7 días de estrés osmótico causado agregado de PEG 8000 40%. Condición control en medio MS (Ctrl), correspondientes a los genotipos Col-0, mutante KO (KO), líneas transgénicas #6 y #10 sin y con el agregado de  $\beta$  estradiol al medio de cultivo (est). Los valores representados corresponden a medias de 12 réplicas. Los datos fueron analizados por test de *Student*, las diferencias significativas se marcan con asterisco \* ( $P < 0.05$ ).

No se observaron diferencias en los niveles de clorofila total entre los diferentes genotipos en condiciones de estrés osmótico (Figura 30F).

Los análisis fenotípicos cuantitativos de peso fresco de la parte aérea y raíz apoyaron los resultados cualitativos observados inicialmente. Estos resultados en su conjunto representan una evidencia para el rol del gen *GmSEOa* en la tolerancia al estrés osmótico.

Con el objetivo de comparar el fenotipo resultante de la imposición de un estrés osmótico a plantas crecidas en condiciones *in vitro*, con el fenotipo de las plantas crecidas en tierra y sometidas a condiciones de estrés hídrico, se llevaron a cabo ensayos de sequía de las líneas transgénicas 6 y 10, como se describe para el gen *GmeiFiso4G*. Los resultados de estos experimentos claramente mostraron que la expresión de *GmSEOa* en *Arabidopsis* aumentó significativamente la tolerancia a la sequía en estas plantas (Figura 31).



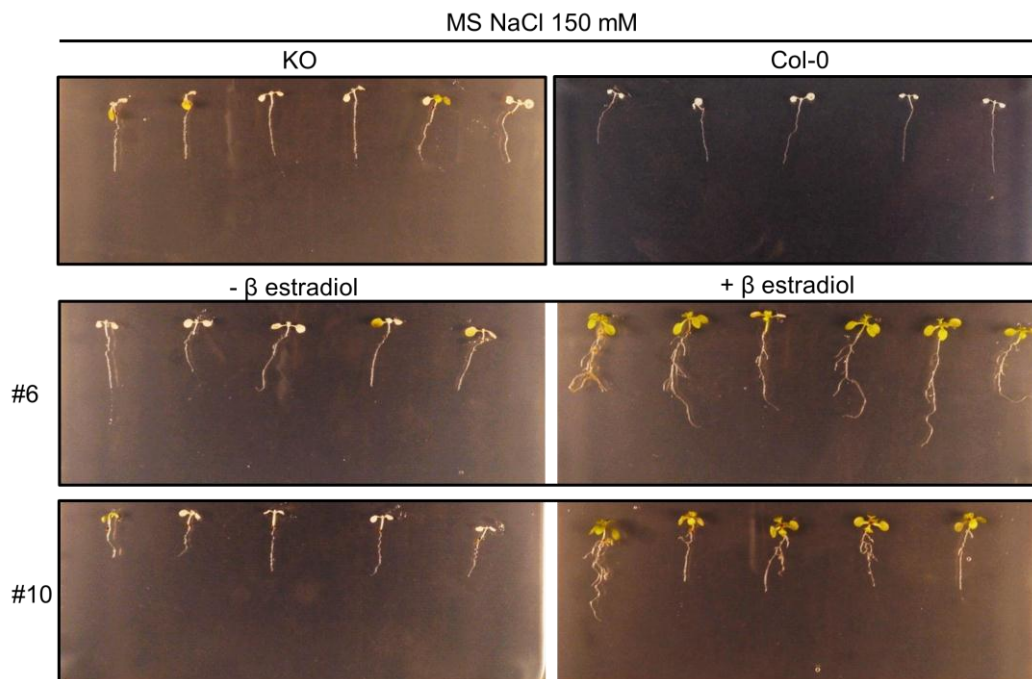
**Figura 31.** Crecimiento en turba de plantas de *Arabidopsis* expresando condicionalmente el gen *GmSEOa*, luego de 5 días de instaurado el régimen de sequía. Línea transgénicas #6 y #10, en presencia de  $\beta$  estradiol (+) y sin el mismo (-).

Esta es la primera evidencia experimental que relaciona un miembro de la familia de proteínas SEO con la respuesta al estrés hídrico en plantas.

### (II) Respuesta frente a estrés salino

Para evaluar el efecto de la expresión de *GmSEOa* en la respuesta al estrés salino, se analizó el crecimiento y el contenido de clorofila de plantas transgénicas y los genotipos Col-0 y mutante KO, en condiciones control y en presencia de 150mM de NaCl en el medio de cultivo.

Se realizó una evaluación visual del crecimiento a los 7 días de establecidos los tratamientos de estrés y en condición control. Para ambas líneas transgénicas, se observó un claro crecimiento diferencial en estrés, en presencia de  $\beta$  estradiol, tanto a nivel de la parte aérea como a nivel radicular (Figura 32). Esta misma diferencia también se observó al comparar las plantas inducidas con las plantas Col-0 y el mutante KO en condiciones de estrés. No se observaron diferencias significativas entre los genotipos Col-0 y el mutante KO en condiciones control ni en condiciones de estrés salino (Figura 32).

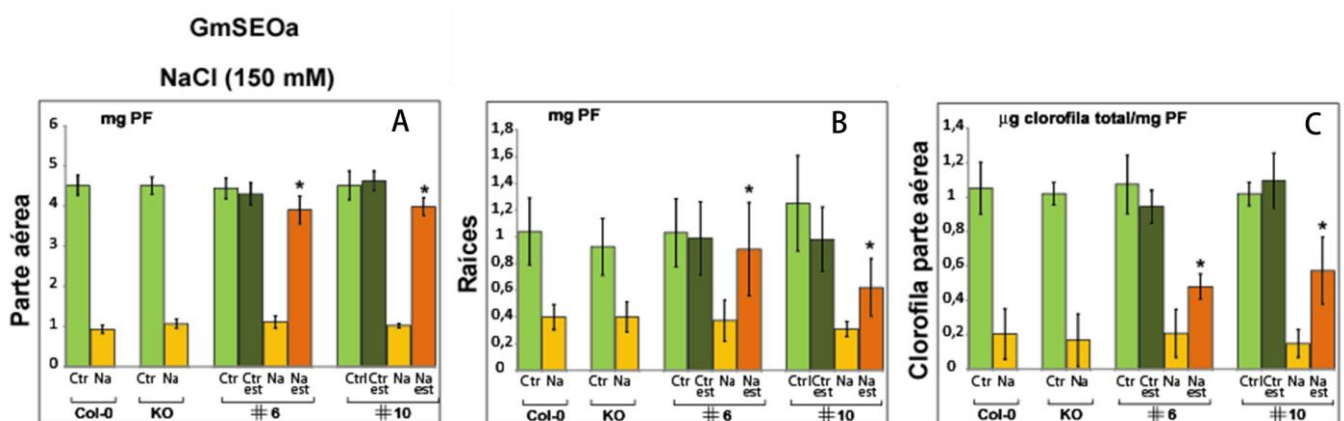


**Figura 32.** Crecimiento en medio MS suplementado con NaCl 150 mM. La determinación se realizó a los 7 días. Plantas salvajes (Col-0), mutantes KO (KO) y líneas transgénicas #6 y #10. Para estas últimas se detalla en crecimiento en presencia de  $\beta$  estradiol (+ $\beta$ ) y en ausencia del mismo (- $\beta$ ).

Los datos cuantitativos provenientes de las mediciones de peso fresco de la parte aérea y de las raíces confirmaron lo observado visualmente. Las líneas 6 y 10 en estrés salino y en presencia de  $\beta$  estradiol mostraron una reducción en el crecimiento de la parte aérea de 22% y 14% respectivamente, mientras que las mismas líneas en ausencia de  $\beta$  estradiol y los genotipos Col-0 y mutante KO, exhibieron una reducción del 75% de su crecimiento con respecto a los controles (Figura 33A). A su vez en las raíces se observó una reducción del

crecimiento de 13% para la línea 6 y de 50 % para la línea 10, mientras que para los genotipos Col-0, el mutante KO y las líneas transgénicas en ausencia de  $\beta$  estradiol, la reducción del crecimiento se situó entre 60% y 74% (Figura 33B).

Los datos obtenidos para el contenido de clorofila en las plantas sometidas a estrés salino mediado por NaCl, mostraron diferencias significativas entre las líneas analizadas con y sin inducción y con respecto a las plantas Col-0 y el mutante KO (Figura 33C).



**Figura 33.** Expresión heteróloga de *GmSEOa* en *Arabidopsis* **A)** Peso fresco (mg) de la parte aérea. **B)** Peso fresco de raíces (mg) y **C)** contenido de clorofila, de plantas sometidas a 7 días de estrés salino causado por NaCl 150 mM y condiciones normales de crecimiento en medio MS (Ctrl), correspondientes a los genotipos Col-0, mutante KO (KO), líneas transgénicas #6 y #10, sin y con el agregado de  $\beta$  estradiol al medio de cultivo (est). Los valores representados corresponden a medias de 12 réplicas. Los datos fueron analizados por test de *Student*, las diferencias significativas se marcan con asterisco \* ( $P < 0.05$ ).

Al igual que para los resultados obtenidos para el estrés osmótico e hídrico, los análisis fenotípicos cuantitativos y cualitativos representan en su conjunto una evidencia para el rol del gen *GmSEOa* en la tolerancia al estrés salino.

## DISCUSIÓN

La soja representa una fuente potencial de genes nuevos con posibles aplicaciones en los programas de mejoramiento genético de plantas, ya que presenta un genoma que contiene varios bloques de genes duplicados, pudiendo estos diversificarse en nuevas funciones. La identificación de genes que se inducen por estrés hídrico en genotipos de soja que responden de forma diferencial al estrés, podrá contribuir a desarrollar estrategias para incrementar la tolerancia en genotipos sensibles al mismo.

Para facilitar la identificación de genes expresados diferencialmente se han desarrollado varios métodos que incluyen el *mRNA differential display* por medio de PCR (Liang y Paradee, 1992), *serial analysis of gene expression* (SAGE; Velculescu *et al.*, 1992), PCR cuantitativo, (Bassler *et al.*, 1995; Heid *et al.*, 1996; Gibson *et al.*, 1996), *Suppression Subtractive Hybridization* (SSH; Diatchenko *et al.*, 1996), hibridación de microarreglos (Chee *et al.*, 1996; Chu *et al.*, 1998) y recientemente la secuenciación directa de transcriptomas (Li *et al.*, 2008; Marioni *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). La SSH es un método que ha sido ampliamente utilizado para el enriquecimiento de genes expresados diferencialmente. Las metodologías puramente substractivas son de uso limitado debido a que se necesitan grandes cantidades de ARNm y a que resulta difícil el clonado de pequeñas cantidades de ADNc. Este método fue mejorado con la utilización de adaptadores genéricos que se unen al ADNc y permiten la amplificación selectiva de las secuencias más abundantes en una población determinada.

En este trabajo se logró con éxito la construcción de una biblioteca de ADNc enriquecida en secuencias inducidas por estrés hídrico mediante la técnica de SSH. Se realizó un *screening* primario utilizando patrones de restricción para determinar los clones que presentaban inserto. Los clones fueron secuenciados en su totalidad, de forma tal de eliminar la redundancia de los mismos en la biblioteca.

El análisis de expresión global de los genes representados en la biblioteca utilizando macroarreglos y sondas sustraídas permitió identificar alrededor de

140 genes inducidos frente a estrés hídrico. Por otra parte la utilización de sondas sustraídas permitió identificar genes de baja expresión, que no podrían haber sido detectados utilizando sondas obtenidas a partir de ADNc.

En base a los resultados de la expresión de los genes analizados, se determinó que más de un 90 % de los genes seleccionados se inducen por estrés hídrico, por lo que la técnica de SSH resultó adecuada para la identificación de secuencias de expresión diferencial. Por otro lado, la utilización de éste método y la construcción de la biblioteca de ADNc tiene la ventaja de poder contar con las secuencias clonadas, a diferencia de los métodos basados en la secuenciación masiva, en donde lo que se obtiene como resultado son los datos de secuencia de los genes expresados.

Como material vegetal de partida se utilizaron 3 genotipos contrastantes (N7001 y Munasqa; tolerantes a sequía, y TJ2049; susceptible) los cuales fueron sometidos a un estrés hídrico gradual, simulando las condiciones naturales de sequía y para los cuales se contaba con varios resultados de estudios fisiológicos y bioquímicos.

El diseño experimental consistió en la simulación de una sequía, de una manera lenta y prolongada, pero en condiciones controladas. Este enfoque contrasta con estudios en los cuales se utilizan tratamientos simulando condiciones de estrés hídrico, pero que someten a las plantas a periodos de estrés, cortos y severos. En esas condiciones es probable que se activen principalmente genes involucrados en la respuesta a daños causados por el estrés y no los genes requeridos para llevar a cabo los ajustes necesarios para la supervivencia a largo plazo bajo condiciones de estrés ambiental (Bray, 2002).

La información obtenida a partir de la comparación de los patrones de expresión de genes candidatos, entre genotipos que responden al estrés a nivel fisiológico de forma diferente, podrá contribuir a la asociación de determinados tipos de genes a una respuesta fisiológica en particular. De esta forma, las diferencias en la expresión génica de genotipos susceptibles y tolerantes permitirían discriminar genes involucrados en respuestas específicas



de la tolerancia al estrés. Algunos de los genes identificados en este trabajo han sido reportados previamente y otro surgen como novedosos a partir de este estudio.

Si bien la biblioteca de ADNc fue realizada utilizando un único genotipo, el N7001, cuando se compararon los patrones de expresión de los genes identificados entre distintos genotipos de soja, se lograron identificar genes con expresión diferencial entre los genotipos tolerantes y susceptibles a la sequía. Mientras que la planta N7001 se caracterizó por inducir la expresión temprana de la mayoría de los genes analizados, la planta Munasqa se caracterizó por presentar una inducción basal de los mismos, y/o alcanzar mayores niveles de expresión de los genes analizados. Por otra parte la variedad TJ2049, considerada como susceptible, mostró un retraso en la expresión de los genes inducibles por sequía, e incluso la ausencia de expresión de los mismos en algunos casos. Resultados similares fueron obtenidos en estudios recientes en garbanzo (*Cicer arietinum*), cebada (*Hordeum vulgare* L.) y mandioca (*Manihot esculenta*) (Dokar *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2009; Turyagyenda *et al.*, 2013), en donde se compararon genotipos tolerantes y susceptibles, observándose estrategias similares a las de las plantas N7001 y Munasqa.

Los genes inducidos en forma similar en todos los genotipos probablemente no tengan un rol específico en la tolerancia del genotipo, pero sí un rol funcional importante en la adaptación de las plantas en general al estrés. A estos últimos se los puede denominar como genes de “respuesta” a la sequía (Seki *et al.*, 2002; Bray, 2004; Boudet *et al.*, 2006; Talame` *et al.*, 2007). En el presente estudio, seis transcritos mostraron un patrón de acumulación similar en los tres genotipos y por lo tanto representan probablemente genes involucrados en la respuesta general a la sequía. Por otra parte los genes cuya expresión diferencial difiere en los genotipos tolerantes con respecto a los genotipos susceptibles, representan posibles candidatos como genes de “tolerancia”. Su identificación es el primer paso para dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen la tolerancia observada en determinados genotipos.

Los genes involucrados en la tolerancia pueden dividirse en dos categorías, aquellos cuyos niveles de expresión basal y/o su nivel de inducción es mayor

en genotipos tolerantes, con respecto a genotipos susceptibles y aquellos cuya respuesta es más temprana en las variedades tolerantes sometidas a estrés (Turyagyenda *et al.*, 2013).

Como se mencionó anteriormente, el genotipo N7001 mostró una inducción temprana de 13 genes en comparación con el genotipo susceptible TJ2049 y en algunos casos, incluso con el genotipo Munasqa. Entre los genes que se comportan de esta forma hay representantes de la categoría “Efectora” y “Detoxificantes”, como es el caso de un gen que codifica para una dehidrina, un gen que codifica para una glutatión peroxidasa, un gen que codifica para una proteína inducible por ABA de función desconocida, un gen que codifica para una metalochaperona y el gen *GmSEOa*. La acumulación de transcriptos a *GmSEOa* fue detectada únicamente en el genotipo N7001, por lo que podría tratarse de una estrategia única de esta planta en la tolerancia al estrés hídrico. Los otros transcriptos analizados correspondieron a genes agrupados dentro de la categoría “Reguladora” y codifican para: una nucleoredoxina con dominio C1, una proteína SAP dedo de zinc A20/AN1, una proteína tipo dedo de zinc RING, una proteína tipo *translationally controlled tumour protein*, una proteína con dos dominios MtN3/Saliva, una histona perteneciente a la familia H2A, un factor de la iniciación de la traducción tipo eIF5A, una proteína PPR y el factor de iniciación de la traducción eiFiso4G (*GmeIFiso4G*). Por otra parte se observó una acumulación basal de los transcriptos correspondientes a los genes que codifican para el factor eIF5A, la proteína PPR y el factor de transcripción tipo dedo de zinc RING.

El genotipo Munasqa por su parte, presentó una expresión basal de siete genes inducibles por estrés hídrico que codifican para: el factor de transcripción tipo dedo de zinc RING, la proteína PPR, el factor de la iniciación de la traducción tipo eIF5A, una proteína inducible por ABA de función desconocida, la nucleoredoxina con dominio C1, la proteína SAP dedo de zinc A20/AN1 y el factor de iniciación de la traducción eiFiso4G (*GmeIFiso4G*). Para los últimos cuatro, la expresión basal es exclusiva del genotipo Munasqa. El genotipo Munasqa mostró una inducción temprana de tres genes en comparación con el genotipo susceptible TJ2049, que codifican para: la nucleoredoxina conteniendo un dominio C1, la proteína SAP dedo de zinc A20/AN1 y la

glutación peroxidasa. Estos genes también son expresados tempranamente en el genotipo N7001, por lo que podrían representar una estrategia en común entre ambos genotipos tolerantes.

Los resultados obtenidos sugieren que el genotipo N7001 utiliza como estrategia la expresión temprana de genes involucrados en la respuesta y tolerancia al estrés hídrico, en comparación con la planta susceptible TJ2049. Por otra parte la planta Munasqa utilizaría una expresión basal de estos genes, como estrategia frente al estrés hídrico. Estudios realizados comparando los perfiles de expresión de genes de *Thellungiella halophila* (especie halófila emparentada cercanamente con *Arabidopsis thaliana*) y *Arabidopsis thaliana*, en condiciones de estrés salino y condiciones normales de crecimiento demostraron que sólo una pequeña proporción de genes fueron inducidos en *Thellungiella* en condiciones de estrés en comparación con *Arabidopsis*, atribuyendo la tolerancia de *Thellungiella* a la expresión basal de genes de respuesta (Taji *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2005). Este mismo mecanismo podría estar siendo utilizado en la planta Munasqa y en menor grado en la N7001, y podría justificar las diferencias fenotípicas observadas entre estos genotipos tolerantes y el fenotipo susceptible cuando son sometidas a estrés hídrico.

### **Rol de *GmeIFiso4G* en la tolerancia al estrés abiótico**

El gen *GmeIFiso4G*, se induce en condiciones de estrés hídrico de manera diferencial en los genotipos estudiados, observándose una inducción temprana en la planta N7001 y una expresión basal en el genotipo Munasqa, mientras que para la variedad susceptible, no fue detectada acumulación a nivel de estrés temprano. Nuestros resultados indicaron que la expresión heteróloga del gen *GmeIFiso4G* en *Arabidopsis* resultó en un incremento significativo de la tolerancia de las plantas a condiciones de estrés hídrico, osmótico y salino. La amplia mayoría de los estudios sobre los mecanismos de regulación de la expresión de los genes en respuesta al estrés abiótico se han centrado en análisis de cambios a nivel de la transcripción. Sin embargo, son escasos los estudios sobre los mecanismos de regulación de la traducción génica, a pesar

de que existen numerosos trabajos que demuestran que la síntesis proteica es uno de los principales blancos de regulación celular en condiciones de estrés (Baena-González 2010; Muñoz y Castellano, 2012).

Prácticamente todas las condiciones de estrés desencadenan la inhibición de procesos celulares que requieren un alto consumo de energía, siendo uno de ellos la síntesis de proteínas. Si bien el estrés compromete severamente la síntesis proteica global, algunas proteínas son activamente sintetizadas en estas condiciones, como parte de los mecanismos de adaptación y protección de las células (Holcik y Sonenberg, 2005). Por lo tanto, el manejo de los recursos energéticos bajo condiciones de estrés es crucial para la supervivencia de las plantas, y la regulación general y selectiva de la síntesis proteica cumple una función muy importante en este proceso (Baena-González, 2010; Van Der Kelen *et al.*, 2009). En este sentido, estudios recientes han demostrado que la regulación postranscripcional de genes, específicamente a nivel de la traducción de sus ARNm, es crucial en la respuesta adaptativa a varios factores de estrés abiótico, como la hipoxia, las altas temperaturas, la salinidad y el déficit hídrico (Floris *et al.*, 2009).

Existen importantes evidencias experimentales que indican que el paso de iniciación de la traducción sería el principal blanco de regulación de la síntesis proteica (Muñoz y Castellano, 2012). En eucariotas, la mayoría de los transcritos son traducidos mediante un mecanismo dependiente de la estructura cap (7-metil guanosina), ubicada en el extremo 5' de los ARNm. Este proceso requiere de la interacción de múltiples factores de iniciación de la traducción (eIF: *eukaryotic initiation factors*) (Pestova *et al.*, 2007). El eIF4E interactúa con eIF4G y con eIF4A formando el complejo de unión a la cap, denominado eIF4F.

Las proteínas eIF4G presentan varios dominios conservados. En el extremo N-terminal, contienen dominios de interacción con PABP (*polyA binding protein*) y con eIF4E. En la región central de la proteína, contienen el dominio MIF4G (*Middle domain of eukaryotic initiation factor 4G*), que interactúa con eIF4A, y en la región C-terminal, contienen el dominio MA3, responsable de la

interacción con otros factores de iniciación, (Shutz *et al.*, 2008). El complejo eIF4F, y en particular la subunidad eIF4G, cumplen una función esencial en la regulación de la iniciación de la síntesis proteica.

Este complejo permite la unión posterior del complejo de preiniciación 43S, que consiste en la subunidad 40S del ribosoma, el complejo eIF2/GTP/tRNA<sup>i</sup> met y los factores eIF3, eIF1 y eIF1A. Una vez ensamblado, el complejo de preiniciación recorre el ARNm hasta encontrar un codón de iniciación, donde se asocia con la subunidad 60S del ribosoma y comienza la fase de elongación de la traducción (Jackson *et al.*, 2010). En condiciones de estrés, esta modalidad de traducción dependiente de la estructura cap puede verse afectada por diferentes mecanismos que condicionan la actividad de algunos factores de iniciación (Muñoz y Castellano 2012). En ese sentido, se conocen otros mecanismos de iniciación de la traducción que son independientes de la estructura cap, como los mediados por IRES (*Internal Ribosome Entry Sites*) o CITEs (*Cap-Independent Translational Enhancers*). La presencia de IRES en determinados ARNm permite la traducción eficiente de ellos en condiciones en las cuales la iniciación dependiente de cap está afectada, como es el caso del estrés abiótico (Komar y Hatzoglou, 2011). Por su parte, los CITEs son estructuras capaces de reclutar los factores del tipo eIF4E y eIF4G, o directamente la subunidad 40S del ribosoma en la proximidad del codón AUG de iniciación, y así iniciar la traducción independiente de cap (Kneller *et al.*, 2006). En plantas se ha observado traducción de ARNm independiente del cap en condiciones de estrés biótico y abiótico (Muñoz y Castellano, 2012).

Entre los mecanismos de regulación de la iniciación de la síntesis proteica, son de especial relevancia los que involucran eventos de fosforilación de algunos eIFs impactando sobre su actividad (Manjunath *et al.*, 1999; Kawagushi y Bayley-Serres, 2002; Lageix *et al.*, 2008). A su vez, varios estudios demuestran que algunas condiciones de estrés están correlacionadas con la presencia o ausencia de las distintas isoformas de eIFs (Gallie *et al.*, 1998; Mayberry *et al.*, 2009).

Como se mencionó anteriormente, el complejo eIF4F, y en particular la subunidad eIF4G, cumplen una función esencial en la regulación de la iniciación de la síntesis proteica. Este complejo a su vez, está sujeto a factores de regulación, que determinan su actividad y selectividad y puede modular la expresión de poblaciones específicas de ARNm (Bush *et al.*, 2009; Muñoz y Castellano, 2012). Las plantas contienen un segundo complejo eIF4F, denominado eIFiso4F, que consiste en distintas isoformas de la subunidad 4E (eIFiso4E) y de la subunidad 4G (eIFiso4G) (Browning, 1996). Existen algunos trabajos que demuestran que distintos ARNm interactúan preferencialmente con los complejos eIF4F o eIFiso4F, lo que sugiere que algunos ARNm tienen características específicas que permiten la interacción con uno u otro de estos complejos (Mayberry *et al.*, 2009; Gallie y Browning, 2001). En este sentido, un trabajo reciente de Dinkova y colaboradores (Dinkova *et al.*, 2011) demostró que en maíz, el complejo eIFiso4E es requerido particularmente para la traducción de los ARNm que están almacenados en las semillas deshidratadas. Por otra parte, se demostró que plantas *KO* dobles para las subunidades *eIFiso4G1* y *eIFiso4G2* en *Arabidopsis*, mostraron alteraciones importantes en la capacidad de supervivencia al estrés hídrico, salino y temperaturas altas, sugiriendo un rol para estas proteínas en la tolerancia al estrés. (Lellis *et al.*, 2010).

En conjunto, estos trabajos demuestran la existencia de un nivel adicional de regulación de la expresión génica específico de plantas, el cual resulta de particular interés para evaluar su relevancia funcional en la capacidad de adaptación de las plantas al estrés en general, y en especial al estrés hídrico.

En este trabajo se realizaron estudios fenotípicos cualitativos y cuantitativos con plantas de *Arabidopsis* expresando condicionalmente el gen *GmeIFiso4* de soja. Los resultados obtenidos sugieren una clara importancia del mismo en la tolerancia al estrés salino y osmótico. Por otra parte no se observaron diferencias entre las plantas silvestres y el mutante *KO* de éste gen, lo que concuerda con los datos obtenidos por Lellis y colaboradores (Lellis *et al.*, 2010), en donde atribuyen la ausencia de diferencias fenotípicas a el solapamiento en las funciones de ambas isoformas (*eIFiso4G1* y *eIFiso4G2*).

Los análisis llevados a cabo en éste estudio apoyan trabajos anteriores y representa el primer estudio en el cual la sobre expresión de éste tipo de genes resulta en un aumento en la tolerancia al estrés abiótico y abre la puerta a futuras investigaciones para determinar los mecanismos involucrados de la regulación traduccional bajo condiciones de estrés ambiental, así como su uso para el mejoramiento de los cultivares en cuanto a su tolerancia al estrés abiótico.

En trabajos recientes se obtuvieron plantas tolerantes al estrés térmico, osmótico y oxidativo, mediante la expresión heteróloga en *Arabidopsis* de un factor de la iniciación de la traducción denominado RceIF5A proveniente de *Rosa chinensis*. En estas plantas se determinó una actividad aumentada de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y también de la enzima P5CS (Pirrolin-5-carboxilato sintetasa, involucrada en la síntesis de prolina), en comparación con las plantas salvajes y plantas silenciadas por expresión antisentido del gen ortólogo de *Arabidopsis* (Xu *et al.*, 2011). En otro estudio llevado a cabo por Wang y colaboradores, se expresó el factor eIF5A proveniente de *Tamarix androssowii* heterológamente en álamo, obteniéndose resultados similares a los observados con el gen *ReclF5A* de rosa. Los autores concluyeron que este tipo de factor de la iniciación de traducción facilitaría de alguna manera la traducción de proteínas involucradas en el estrés y por tanto incrementarían la tolerancia al mismo (Wang *et al.*, 2012). Por otra parte los estudios realizados por Xu y colaboradores (2011), determinaron que existe un aumento en la acumulación de transcritos que codifican para las enzimas catalasa, glutatión peroxidasa y P5CS, en plantas estresadas sobre-expresando el gen *RceIF5A*, en comparación con las plantas silvestres y líneas silenciadas, por lo que la diferencia observada en la actividad de estas enzimas podría deberse a alguna función estabilizadora de los ARNm por parte del eIF5A.

Si bien el gen identificado en este trabajo no está relacionado con el descrito anteriormente, éste podría funcionar de manera similar, facilitando la traducción de ciertos ARNm, determinando que la planta presente una mayor actividad

enzimática detoxificante y/o un mayor contenido de compuestos osmoprotectores.

### **Rol de *GmSEOa* en la tolerancia al estrés abiótico**

El gen denominado en este trabajo *GmSEOa*, se induce en condiciones de estrés hídrico de manera diferencial en los genotipos estudiados, observándose una inducción en estrés temprano sólo en el genotipo N7001, mientras que para los genotipos TJ2049 y Munasqa, no fue detectada la acumulación de transcrito. Nuestros resultados mostraron que la expresión heteróloga del gen *GmSEOa* en *Arabidopsis*, incrementó significativamente la tolerancia al estrés hídrico, osmótico y salino de las plantas. El gen *GmSEOa* pertenece a la familia de las *Sieve Element Occlusion* (SEO), cuyos miembros están mayoritariamente presentes en el floema de plantas leguminosas, algunos de ellos formando parte de los forisomas (Noll *et al.*, 2011).

Los forisomas son cuerpos cristalinos de proteínas, que se encuentran específicamente en tubos cribosos de ciertas fabáceas y cuya función es el bloqueo de los mismos de una manera reversible, en respuesta a heridas para evitar la pérdida de fotoasimilados (Knoblauch *et al.*, 2001; Knoblauch *et al.*, 2003). Los forisomas responden a cambios en las concentraciones de calcio independientemente del ATP, adoptando una conformación contraída en presencia de bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  y una conformación expandida en presencia de altas concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$ . Es ésta forma expandida la que bloquea el transporte en los tubos cribosos (Knoblauch *et al.*, 2005; Peters *et al.*, 2007; Peters *et al.*, 2008).

Recientemente se han identificado miembros de esta familia en otras dicotiledóneas además de las leguminosas. Se sugiere que estas proteínas SEO actuarían como proteínas P convencionales (proteínas filamentosas específicas del floema), y no formarían forisomas. La evidencia apunta a que el rol de estas proteínas es el sellamiento rápido de los tubos cribosos del floema en respuesta a heridas (Will y van Bel, 2006; Furch *et al.*, 2010; Jekat *et al.*,



2013). Luego de la formación de heridas, las proteínas P se despegan de su posición parietal y forman tapones a nivel de la placa cribosa, bloqueando la translocación (Knoblauch y van Bel, 1998; Anderson y Cronshaw, 1970).

Los análisis de expresión de toda la familia de genes *SEO* de soja, en muestras enriquecidas en tejidos de floema, y en muestras que excluyen el floema, mostraron que todos los genes *SEO* de soja, con excepción de *GmSEOa*, se expresan únicamente en el floema. En *Medicago truncatula*, existen nueve genes *SEO*. Cuatro de ellos codifican proteínas que forman parte del forisoma. Los datos presentados por Rüping y colaboradores muestran también que las dos proteínas de esta especie más cercanas filogenéticamente al gen *GmSEOa*, denominadas *MtSEOb* y *MtSEOc*, son las únicas que muestran expresión también en células fuera del floema, al igual que *GmSEOa* (Rüping *et al.*, 2010).

Resulta interesante que en nuestra búsqueda de genes relacionados con la respuesta a sequía en soja, hayamos identificado precisamente este gen. Es probable que haya una especialización funcional entre los distintos miembros de las proteínas *SEO*, pudiendo cumplir algunos de ellos, funciones relacionadas con la respuesta al estrés hídrico. Los resultados fenotípicos obtenidos para plantas de *Arabidopsis* expresando condicionalmente el gen *GmSEOa* sugieren un rol de esta proteína en la tolerancia al estrés osmótico y salino. Esta es la primer evidencia de que un miembro de la familia *SEO* podría estar involucrado en este tipo de funciones. El mecanismo involucrado en la tolerancia conferida por la expresión de éste gen podría explicarse de diferentes maneras. Una de ellas podría deberse a una reducción en la transpiración por parte de las plantas, ya sea por vía estomática y/o cuticular, debido a la presencia de estas proteínas, que podrían estar bloqueando parcialmente la apertura de los estomas. Otra explicación podría ser que el dominio thioredoxina presente en estas proteínas, podría estar jugando un rol detoxificante inespecífico. Para responder estas preguntas es necesario realizar más experimentos, sobre todo los que implican la medición de tasas de transpiración en condiciones de estrés con y sin la inducción de la expresión del transgén.

**CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

Este trabajo se centró en la identificación de genes de respuesta al estrés hídrico, en un genotipo tolerante a la sequía, la comparación de los perfiles de expresión génica de los genes identificados, entre dos genotipos contrastantes en cuanto a su respuesta al estrés, y finalmente en la caracterización funcional de dos genes de soja expresados heterológamente en *Arabidopsis* y tabaco (*GmeiFiso4G* y *GmSEOa*).

Para ello se obtuvieron varias líneas transgénicas estables de *Arabidopsis*, con expresión inducible por  $\beta$  estradiol para ambos genes. Los datos obtenidos de los patrones de expresión de los mismos en diferentes genotipos de soja susceptibles y tolerantes, junto con el estudio fenotípico de las líneas transgénicas sugirió una función de estas proteínas relacionada al estrés osmótico y salino. Si bien se utilizaron mutantes KO en genes de *Arabidopsis* con alta homología de secuencia a *GmeiFso4G* y *GmSEOa*, no se observaron diferencias fenotípicas significativas en las condiciones de estrés analizadas. La ausencia de diferencias en el gen *GmeiFiso4G* podrían deberse a la existencia de un segundo alelo en el genoma de *Arabidopsis*, por lo que éste podría compensar la falta de expresión de su homólogo, por lo que sería recomendable realizar ensayos con el doble mutante KO para analizar la implicación de este gen en los mecanismos de tolerancia al estrés. Por otra parte, el gen de *Arabidopsis* con mayor similitud de secuencia con el gen *GmSEOa* de soja, presentó una divergencia significativa con la proteína codificada por el gen de soja y podría no estar relacionada funcionalmente con el mismo.

Para la continuación de estos estudios se plantea el análisis de las secuencias reguladoras de la transcripción encontradas corriente arriba en ambos genes, para determinar si existen diferencias en la conformación de los elementos *cis* presentes en los mismos, y si estos explicarían las diferencias en los patrones de expresión observados entre los genotipos analizados. Por otra parte se plantea la realización de construcciones para analizar la expresión espacial del

gen *GmSEOa*, para determinar en qué tejidos es expresado y en qué condiciones de crecimiento. La obtención de estas secuencias promotoras, no sólo contribuiría al entendimiento de los mecanismos reguladores, sino que también podrían ser de utilidad para la generación de construcciones génicas con promotores inducibles por estrés hídrico.

Asimismo se propone estudiar el fenotipo de las líneas transgénicas obtenidas en condiciones controladas, *ex vitro*, para evaluar la tasa de transpiración estomática y cuticular, ya que ésta no fue determinada en los ensayos *in vitro* realizados. Por otra parte sería interesante determinar los niveles de proteínas involucradas en la detoxificación y la protección frente al estrés, y sus correspondientes ARNm, en las plantas que expresan el factor de iniciación *GmElFiso4G*, comparándolas con plantas silvestres y mutantes KO, para determinar si la expresión de este gen facilita la traducción de ciertos ARNm que codifican para proteínas involucradas en la respuesta al estrés.

## BIBLIOGRAFÍA

**Abdel-Haleem H, Lee G-J y Boerma RH (2011)** Identification of QTL for increased fibrous roots in soybean. *Theor. Appl. Genet.* (2011) 122-925.

**Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaki K (2003)** Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell* 15: 63–78.

**Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D y Shinozaki K (1997)** Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell* 9, 1859–1868.

**Abramoff MD, Magalhaes PJ y Ram SJ (2004)** Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, volume 11, issue 7, pp. 36-42, 2004.

**Agarwal P, Agarwal PK, Joshi AJ, Sopory SK y Reddy MK (2010)** Overexpression of PgDREB2A transcription factor enhances abiotic stress tolerance and activates downstream stress-responsive genes. *Molecular Biology Reports* 37, 1125–1135.

**Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H y Tasaka M (1997)** Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *The Plant Cell* 9: 841-857.

**Anderson R y Cronshaw J (1970)** Sieve-plate pores in Tobacco and Bean. *Planta* 91:173–180.

**André HM y Hansson M (2009)** The barley magnesium chelatase 150-kd subunit is not an abscisic acid receptor. *Plant Physiol.* 2009 May;150(1):157-66

**Araki S, Ito M, Soyano T, Nishihama R y Machida Y (2004)** Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in tobacco. *Journal of Biological Chemistry* 279: 32979–88.

**Attallah CV, Welchen E, Pujol C, Bonnard G y Gonzalez DH (2007)** Characterization of Arabidopsis thaliana genes encoding functional homologues of the yeast metal chaperone Cox19p involved in cytochrome c oxidase biogenesis. *Plant Mol. Biol.* 65(3): 343-55.

**Baena-González (2010)** Energy signaling in the regulation of gene expression during stress. *Mol Plant.* 2010 Mar;3(2):300-13.

**Bailey PC, Martin C, Toledo-Ortiz G, Quail PH, Huq E, Heim MA, Jakoby M, Werber M y Weisshaar B (2003)** Update on the basic helix–loop–helix transcription factor gene family in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 15:2497–2502.

**Bassler HA, Flood SJ, Livak KJ, Marmaro J, Knorr R y Batt CA (1995)** Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 1995 Oct;61(10):3724-8.

**Berkowitz O, Jost R, Pollmann S y Masle J (2008)** Characterization of TCTP, the Translationally Controlled Tumor Protein, from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, Vol. 20: 3430–3447.

**Biedenkapp H, Borgmeyer U, Sippel AE y Klempnauer KH (1988)** Viral myb oncogene encodes a sequence-specific DNA-binding activity. *Nature* 1988, 335(6193):835-837.

**Bohnert HJ y Jensen RG (1996)** Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology* 1996;14:89-97.

**Bongi G y Loreto F (1989)** Gas-exchange properties of salt stressed olive (*Olea europea* L.) leaves. *Plant Physiology* 90, 1408–1416.

**Boudet J, Buitink J, Hoekstra FA, Rogniaux H, Larre´ C, Satour P y Leprince O (2006)** Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant Physiology* 140, 1418–1436.

**Boyer JS (1982)** Plant productivity and environment. *Science*, 218, 443–448.

**Bravo L A, Gallardo J, Navarrete A, Olave N, Martinez J, Alberdi M, Close TJ y Corcuera LJ (2003)** Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. *Physiol. Plant.* 118, 262–269.

**Bray EA (1994)** Alterations in gene expression in response to water deficit. In *Stress-Induced Gene Expression in Plants* (Basra, A.S., ed.). Amsterdam: Harwood Academic, pp. 1–23.

**Bray EA (2002)** Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. *Ann Bot.* 2002 Jun;89 Spec No:803-11.

Bray EA (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 55, 2331–2241.

**Brendel C, Gelman L y Auwerx J (2002)** Multiprotein bridging factor-1 (MBF-1) is a cofactor for nuclear receptors that regulate lipid metabolism. *Mol Endocrinol.* 2002 Jun;16(6):1367-77.

**Brennan RG y Matthews BW (1989)** The helix-turn-helix DNA binding motif. *J Biol Chem* 264 (4): 1903–6.

**Brevedan RE y Egli DB (2003)** Short periods of water stress during seed filling, leaf senescence, and yield of soybean. *Crop Sci.* 43:2083–2088.

**Browning KS (1996)** The plant translational apparatus. *Plant Mol Bio.* 1996;32:107–144.

**Browning KS, Webster C, Roberts JKM y Ravel JM (1992)** Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *J Biol Chem.* 1992;267:10096–10100.

**Buchanan BB, Grissem W y Jones RL (2001)** *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Edited by American Society of Plant Physiology.

**Burris RH y Roberts GP (1993)** Biological nitrogen fixation. *Annu . Rev . Nutr.* 13:317–335.

**Bush MS, Hutchins AP, Jones AME, Naldrett MJ, Jarmolowski A, Lloyd CW y Doonan JH (2009)** Selective recruitment of proteins to 5' cap complexes during the growth cycle in *Arabidopsis*. *Plant J.* 59, 400-412.

**Busk PK y Page M (1998)** Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Molecular Biology* 37, 425–435.

**Campbell S y Close TJ (1997)** Dehydrins: Genes, proteins and associations with phenotypic traits. *New Phytologist* 137, 61–74.

**Carter TE, Burton JW, Bowman DT, Cui Z, Zhou X, Villagarcia MR, Fountain MO y Niewoehner AS (2003)** Registration of 'N7001' Soybean. *Crop Science*43:1126-1127.

**Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT y Sedelnikova OA (2002)** Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296 (5569): 922–7.

**Chaves MM, Maroco JP y Pereira JS (2003)** Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30, 239–264.

**Chee M, Yang R, Hubbell E, Berno A, Huang XC, Stern D, Winkler J, Lockhart DJ, Morris MS y Fodor SP (1996)** Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science.* 1996 Oct 25;274(5287):610-4.

**Chen JQ, Meng XP, Zhang Y, Xia M y Wang XP (2008)** Over-expression of OsDREB genes lead to enhanced drought tolerance in rice. *Biotechnology Letter* 30: 2191-2198.

**Cho SK, Ryu MY, Seo DH, Kang BG y Kim WT (2011)** The *Arabidopsis* RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP2 plays combinatory roles with AtAIRP1 in abscisic acid mediated drought stress responses. *Plant Physiol* 157: 2240-2257.

**Choi H, Hong J, Ha J, Kang J y Kim SY (2000)** ABFs, a family of ABA responsive element binding factors. *Journal of Biological Chemistry* 275: 1723–1730.

**Christmann A, Weiler EW, Steudle E y Grill E (2007)** A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant J.* 52, 167–174.

**Chu S, DeRisi J, Eisen M, Mulholland J, Botstein D, Brown PO y Herskowitz I (1998)** The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science.* 1998 Oct 23;282(5389):699-705.

**Close TJ (1996)** Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum* 97, 795–803.

**Close TJ (1997)** Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum* 100, 291–296.

**Clough SJ y Bent AF (1998)** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735-43.

**Collinge M y Boller T (2001)** Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and wounding. *Plant Molecular Biology* 46: 521-529.

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

**de Carbonnel M, Davis P, Roelfsema MRC, Inoue S, Schepens I, Lariguet P, Geisler M, Shimazaki K, Hangarter R y Fankhauser C (2010)** The *Arabidopsis* PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 2 protein is a phototropin signaling element that regulates leaf flattening and leaf positioning. *Plant Physiol* 152: 1391-1405.

**de Ronde JA, Cress WA, Krüger GHJ, Strasser RJ y Van Staden J (2004a)** Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene during heat and drought stress. *J. Plant Physiol.* 161:1211-1224.

**de Ronde JA, Laurie RN, Caetano T, Greyling MM y Kerepesi I (2004b)** Comparative study between transgenic and non-transgenic soybean lines proved transgenic lines to be more drought tolerant. *Euphytica* 158:123-132.

**Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J (1985)** Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucl. Acids Res.* (1985) 13 (13): 4777-4788.

**Delannoy E, Stanley WA, Bond CS y Small ID (2007)** Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins as sequence-specificity factors in post-transcriptional processes in organelles. *Biochem Soc Trans.* 2007 Dec;35(Pt 6):1643-7.

**Deokar AA, Kondawar V, Jain PK, Karuppayil SM, Raju NL, Vadez V, Varshney RK y Srinivasan R (2011)** Comparative analysis of expressed

sequence tags (ESTs) between drought-tolerant and -susceptible genotypes of chickpea under terminal drought stress. *BMC Plant Biology* 2011, 11:70.

**Diatchenko L, Chenchik A y Siebert PD (1998)** Suppression subtractive hybridization: a method for generating subtracted cDNA libraries starting from poly(A<sup>+</sup>) or total RNA. In: *RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis*. Eds. Siebert, P y Larrick, J (BioTechniques Books, MA), pp. 213-239.

**Diatchenko L, Lau YFC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED y Siebert PD (1996)** Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(12):6025-6030.

**Dinkova TD, Márquez-Velázquez NA, Aguilar R, Lázaro-Mixteco PE y Sánchez de Jiménez E (2011)** Tight translational control by initiation factors eIF(iso)4E and eIF4E is required for maize successful germination. *Seed Science Res* 21, 85–93.

**Dogan E, Kirnak H y 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 y Mullen RE (1992)** Soybean seed protein and oil contents and fatty acid composition adjustments by drought and temperature. *J. Amer. Oil Chem Soc.* 69:228–231.

**Du SY, Zhang XF, Lu Z, Xin Q, Wu Z, Jiang T, Lu Y, Wang XF y Zhang DP (2012)** Roles of the different components of magnesium chelatase in abscisic acid signal transduction. *Plant Mol Biol*, November 1, 2012; 80(4-5): 519-37.

**Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003)** OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought, high-salt and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal* 33: 751–763.

**Dure L, Crouch M, Harada J, Ho T, Mundy, J, Quatrano, RS, Thomas, T y Sung ZR (1989)** Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants *Plant Molecular Biology* 12,475–486.

**El-baky A, Hanaa H, Mohamed A y Hussein M (2003)** Influence of Salinity on Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzymes and Electrophoretic Patterns of Protein and Isoenzymes in Leaves of Some Onion Cultivars. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2: 633-638.

**Ernst AM, Jekat SB, Zielonka S, Müller B, Neumann U, Rüping B, Twyman RM, Krzyzanek V, Prüfer D y Noll GA (2012)** Sieve element occlusion (SEO) genes encode structural phloem proteins involved in wound sealing of the phloem. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jul 10;109(28):E1980-9.



**Ernst AM, Rüping B, Jekat SB, Nordzieke S, Reineke AR, Müller B, Bornberg-Bauer E, Prüfer E y Noll GA (2011)** The *sieve element occlusion* gene family in dicotyledonous plants. *Plant Signal Behav.* 2011 January; 6(1): 151–153.

**Finkelstein RR, Gampala SS y Rock CD (2000)** Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, supplement 2002; S15-S45.

**Fletcher AL, Sinclair TR y Allen LH (2007)** Transpiration responses to vapour pressure deficit in well watered 'slow-wilting' and commercial soybean. *Environmental and Experimental Botany* 2007;61:145-151.

**Flexas J y Medrano H (2002)** Drought-inhibition of photosynthesis in C<sub>3</sub> plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany* 89, 183–189.

**Floris M, Mahgoub H, Lanet E, Robaglia C, Menand B. (2009)** Post-transcriptional Regulation of Gene Expression in Plants during Abiotic Stress. *Int J. Molecular Science* 10,3168–3185.

**Fujita M, Mizukado S, Fujita Y, Ichikawa T, Nakazawa M, Seki M, Matsui M, Yamaguchi-Shinozaki K y Shinozaki K (2007)** Identification of stress-tolerance-related transcription-factor genes via mini-scale full length cDNA over-expressor (FOX) gene hunting system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 364:250-257.

**Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Masaru OT, Kazuo S y Kazuko YS (2005)** AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell* 17: 3470-3488.

**Furch ACU, Zimmermann MR, Will T, Hafke JB y van Bel AJE (2010)** Remote-controlled stop of phloem mass flow by biphasic occlusion in *Cucurbita maxima*. *J Exp Bot* 61:3697–3708.

**Gai J (1997)** Soybean Breeding. In: J. Gai (Ed.), *Plant Breeding: Crop Species*. China Agriculture Press, Beijing, pp. 207–251.

**Gai J y Guo W (2001)** History of maodou production in China. In: T.A. Lumpkin and S. Shanmugasundaram (Eds.), *Proceedings Second International Vegetable Soybean Conference*, Washington State University, Pullman, WA., pp. 41–47.

**Gallie DR y Browning KS (2001)** eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. *J Biol Chem* 276:36951–36960.

**Gallie DR, Tanguay RL y Browning KS (1998)** Translation initiation factors are differentially regulated in cereals during development and following heat shock. *Plant J.* 14, 715-722.

**Gamas P, Niebel F, Lescure N y Cullimore J (1996)** Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol Plant Microbe Interact* 1996; 9:233-242.

**Garg AK, Kim KJ, Owens, TG, Ranwala AP, Choi YD y Kochian LV (2002)** Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 :15898-15903.

**Geyer R, Wee S, Anderson S, Yates J y Wolf DA (2003)** BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases. *Mol Cell*. 2003 Sep;12(3):783-90.

**Gibson UE, Heid CA y Williams PM (1996)** A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*. 1996 Oct;6(10):995-1001.

**Gill N, Findley S, Walling JG, Hans C, Ma J, Doyle J, Stacey G y Jackson SA (2009)** Molecular and chromosomal evidence for allopolyploidy in soybean. *Plant Physiol*. 151, 1167–1174.

**Giraudat J, Parcy F, Bertauche N, Gosti F, Leung J, Morris P, Bouvier-Durand M y Vartanian N (1994)** Current advances in abscisic acid action and signaling. *Plant Molecular Biology* 26: 1557–1577.

**Gómez-Cadenas A, Verhey SD, Holappa LD, Shen Q, Ho T-HD y Walker-Simmons MK (1999)** An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96; 1767-1772.

**Gong Q, Li P, Ma S, Indu Rupassara S y Bohnert HJ (2005)** Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2005 Dec;44(5):826-39.

**Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb AA, Vartanian N y Giraudat J (1999)** ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell*. 1999 Oct;11(10):1897-910.

**Grotewold E, Sainz MB, Tagliani L, Hernandez JM, Bowen B y Chandler VL (2000)** Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13579–13584.

**Guan YF, Huang XY, Zhu J, Gao JF, Zhang HX y Yang ZN (2008)**. RUPTURED POLLEN GRAIN1, a member of the MtN3/saliva gene family, is crucial for exine pattern formation and cell integrity of microspores in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2008 Jun; 147(2):852-63.

**Guo P, Baum M, Grando S, Ceccarelli S, Bai G, Li R, von Korff M, Varshney RK, Graner A y Valkoun J (2009)** Differentially expressed genes

between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *J Exp Bot.* 2009;60(12):3531-44.

**Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert PD, Khaspekov GL, Lukyanov KA, Vagner LL, Ermolaeva OD, Lukyanov SA y 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(1):90–97.

**Haake V, Cook D, Riechmann JL, Pineda O, Thomashow MF y Zhang JZ(2002)** Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 130, 639–648.

**Hanson AD y Hitz WD (1982)** Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Annual Review of Plant Physiology* 1982;33:163-203.

Hara M, Terashima S y Kuboi T (2001) Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *J. Plant Physiol.* 158, 1333–1339.

**Harada A, Sakai T y Okada K (2003)** phot1 and phot2 mediate blue light-induced transient increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> differently in *Arabidopsis* leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8583-8588.

**Harada A, Takemiya A, Inoue S, Sakai T y Shimazaki K (2013)** Role of RPT2 in leaf positioning and flattening and a possible inhibition of phot2 signaling by phot1. *Plant Cell Physiol* 54: 36-47

**Hare PD, Cress WA y Van Staden J (1998)** Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.* 21, 535–553.

**Havaux M, Canaani O y Malkin S (1986)** Photosynthetic responses of leaves to water stress, expressed by photoacoustic and related methods. *Plant Physiology* 82, 827–839.

**He X y Zhang J (2005)** Gene complexity and gene duplicability. *Curr Biol.* 2005 Jun 7;15(11):1016-21.

**Hegedus, D, Yu M, Baldwin D, Gruber M, Sharpe A, Parkin I, Whitwill S y Lydiate, D (2003)** Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant Molecular Biology* 53: 383-397.

**Heid CA, Stevens J, Livak KJ y Williams PM (1996)** Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996. 6: 986-994.

**Heim MA, Jakoby M, Werber M, Martin C, Weisshaar B y Bailey PC (2003)** The basic helix–loop–helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol Biol Evol* 20:735–747.

**Hernandez JM, Heine GF, Irani NG, Feller A, Kim MG, Matulnik T, Chandler VL y Grotewold E (2004)** Different mechanisms participate in the R-dependent activity of the R2R3 MYB transcription factor C1. *J Biol Chem* 279:48205–48213.

**Higginson T, Li SF y Parish RW (2003)** AtMYB103 regulates tapetum and trichome development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 35: 177–192.

**Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M y Korenaga T (1999)** Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. *Nucleic Acids Research* Vol.27 No.1 pp. 297-300.

**Hincha DK y Hagemann M (2004)** Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. *Biochem. J.* 383,277–283.

**Holcik M, Sonenberg N. (2005)** Translational control in stress and apoptosis. *Nature Rev Mol Cell Biology* 6, 318–327.

**Hong SW; Jon JH; Kwak JM y Nam HG (1997)** Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*". *Plant Physiol.*, 1997, 113; 1203-1212.

**Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li Xianghua, Zhang Q y Xiong L (2006)** Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103: 12987–12992.

**Hu H, You J, Fang Y, Zhu X, Qi Z y Xiong L (2008)** Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Molecular Biology*, Vol.67, No.102, (May 2008), pp. 169-181, ISSN 0167-4412.

**Huang D, Jaradat MR, Wu W, Ambrose SJ, Ross AR, Abrams SR y Cutler AJ (2007)** Structural analogs of ABA reveal novel features of ABA perception and signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2007; 50:414–428.

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

**Hufstetler EV, Boerma RH, Carter TE y Earl HJ (2007)** Genotypic variation for three physiological traits affecting drought tolerance in soybean. *Crop Sci.* 47, 25-35.

**Huh GH, Damsz B, Matsumoto TK, Reddy MP Rus AM, Ibeas JI, Narasimhan ML, Bressan RA y Hasegawa PM (2002)** Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J.* 29, 649–659.

**Hwang I y Goodman HM (1995)** An *Arabidopsis thaliana* root-specific kinase homolog is induced by dehydration, ABA, and NaCl. *Plant J.*, 1995, 8; 37-43.

**Hyten DL, Song Q, Zhu Y, Choi IY, Nelson RL, Costa JM, Specht JE, Shoemaker RC y Cregan PB (2006)** Impacts of genetic bottlenecks on soybean genome diversity Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Nov 7;103(45):16666-71.

**Inoue S, Takemiya A y Shimazaki K (2010)** Phototropin signaling and stomatal opening as a model case. Curr Opin Plant Biol 13: 587-593.

**Ishige F, Takaishi M, Foster R, Chua NH y Oeda K (1999)** A G-box motif (GCCACGTGCC) tetramer confers high levels of constitutive expression in dicot and monocot. Plant J 18: 443–448.

**Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova TV (2010)** The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. Nature Rev Mol Cell Biology 11, 113–127.

**James BD y Higgins SJ (1985)** Nucleic Acid Hybridization (IRL Press Ltd., Oxford).

**Jekat SB, Ernst AM, von Bohl A, Zielonka S, Twyman RM, Noll GA y Prüfer D (2013)** P-proteins in Arabidopsis are heteromeric structures involved in rapid sieve tube sealing. Front Plant Sci. 2013 Jul 3;4:225

**Jin H y Martin C (1999)** Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. Plant Molecular Biology 41: 577–585.

**Jin X-F, Jiong A-S, Peng R-H, Liu J-G, Gao F, Chen J-M y Yao Q-H (2010)** OsAREB1, an ABRE-binding protein responding to ABA and glucose, has multiple functions in Arabidopsis. BMB Reports 43: 34-39.

**Jin Y, Wang M, Fu J, Xuan N, Zhu Y, Lian Y, Jia Z, Zheng J y Wang G (2007)** Phylogenetic and expression analysis of ZnF-AN1 genes in plants. Genomics 90:265–275.

**Joazeiro CA y Weissman AM (2000)** RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. Cell 102 (5): 549–52.

**Kang JY, Choi HI, Im MY y Kim SY (2002)** Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. The Plant Cell 14: 343–357.

**Karimi M, Inzé D y Depicker A (2002)** Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Trends Plant Sci. May;7(5): 193-195.

**Kawagushi R y Bailey-Serres J (2002)** Regulation of translational initiation in plants Curr. Opin. Plant Biol. 5, 460-465.

**Kim JH y Kim WT (2013)** The Arabidopsis RING E3 Ubiquitin Ligase AtAIRP3/LOG2 Participates in Positive Regulation of High Salt and Drought Stress Responses. *Plant Physiol.* 2013 May 21. [Epub ahead of print].

**Kim S, Kang JY, Cho DI, Park JH y Kim SY (2004)** ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant Journal* 40: 75-87.

**Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M y Shimazaki K (2001)** phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414:656-660.

**Kirik V, Kölle K, Miséra S y Bäumllein (1998)** Two novel MYB homologues with changed expression in late embryogenesis-defective Arabidopsis mutants. *Plant Molecular Biology* 37: 819–827.

**Kizis D y Pagès M (2002)** Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. *The Plant Journal* 30: 679-689.

**Klingler JP, Batelli G y Zhu JK (2010)** ABA Receptors: the START of a new paradigm. *J.Exp.Bot.*2010,61, 3199–3210.

**Kneller ELP, Rakotondrafara AM y Miller WA (2006)** Cap-independent translation of plant viral RNAs. *Virus Research* 119, 63–75.

**Knoblauch M y van Bel AJE (1998)** Sieve tubes in action. *Plant Cell* 10:35–50.

**Knoblauch M, Noll GA, Muller T, Prufer D, Schneider-Huther I y Scharner D (2005)** ATP-independent contractile proteins from plants. *Nat. Mater.* 4: 353–353.

**Knoblauch M, Noll GA, Van Bel AJE, Prufer D y Peters WS (2003)** Forisomes consist of a novel class of contractile proteins. *Eur. J. Cell Biol.* 82: 70–71.

**Knoblauch M, Peters WS, Ehlers K y van Bel, AJE (2001)** Reversible calcium-regulated stopcocks in legume sieve tubes. *Plant Cell* 13: 1221–1230.

**Kocsy G, Laurie R, Szalai G, Szilagyi V, Simon-Sarkadi L y Galiba G (2005)** Genetic manipulation of proline levels affects antioxidants in soybean subjected to simultaneous drought and heat stresses. *Physiol. Plant.* 124:227-235.

**Komar AA y Hatzoglou M. (2011)** Cellular IRES-mediated translation. *Cell Cycle* 10, 229–240.

**Kotera E, Tasaka M y Shikanai T (2005)** A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* 433 (7023): 326–30.

**Kramer PJ y Boyer JS (1995)** Water Relations of Plants and Soils. San Diego: Academic Press.

**Lageix S, Lanet E, Pouch-Pélissier MN, Espagnol MC, Robaglia C, Deragon JM, Pélissier T (2008)** Arabidopsis eIF2 $\alpha$  kinase GCN2 is essential for growth in stress conditions and is activated by wounding. *BMC Plant Biology* 8, 134.

**Larson RA (1988)** The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 27: 969 – 978.

**Lata C y Prasad M (2011)** Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *J Exp Bot.* 2011 Oct;62(14):4731-48.

**Lawlor D y Cornic G (2002)** Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment* 25, 275–294.

**Lease K, Ingham E y Walker JC (1998)** Challenges in understanding RLK function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 388–392.

**Lee SC, Lan W, Buchanan BB y Luan S (2009)** A protein kinase–phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106:21419–21424.

**Lee SH; Lee MH; Chung WI y Liu JR (1998)** WAPK, a Ser/Thr protein kinase gene of *Nicotiana tabacum*, is uniquely regulated by wounding, abscisic acid and methyl jasmonate. *Mol. Gen. Genet.*, 1998, 259; 516-522.

**Lellis AD, Allen ML, Aertker AW, Tran JK, Hillis DM, Harbin CR, Caldwell C, Gallie DR y Browning KS (2010)** Deletion of the eIFiso4G subunit of the Arabidopsis eIFiso4F translation initiation complex impairs health and viability. *Plant Mol Biol* 74: 249-263.

**Leung J y Giraudat J (1998)** Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1998, 49; 199-222.

**Li H, Lovci MT, Kwon YS, Rosenfeld MG, Fu XD y Yeo GW (2008)** Determination of tag density required for digital transcriptome analysis: Application to an androgen-sensitive prostate cancer model. *Proc Natl Acad Sci*

**Li J, Wang XQ, Watson MB y Assmann SM (2000)** Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science*, 2000; 287:300–303.

**Li M, Hong Y y Wang X (2009)** Phospholipase D and phosphatidic acid mediated signaling in plants, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, Vol 1791, Issue 9, September 2009, pp 927-935.

**Li X, Duan X, Jiang H, Sun Y, Tang Y, Yuan Z, Guo J, Liang W, Chen L, Yin J, Ma H, Wang J y Zhang D (2006)** Genome-wide analysis of basic/helix–loop–helix transcription factor family in rice and Arabidopsis. *Plant Physiol* 141:1167–1184.

**Liang P y Pardee AB (1992)** Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*. 1992 Aug 14;257(5072):967-71.

**Libault M, Farmer A, Joshi T, Takahashi K, Langley RJ, Franklin LD, He J, Xu D, May G y Stacey G (2010)** An integrated transcriptome atlas of the crop model Glycine max, and its use in comparative analyses in plants. *Plant J*. 2010 Jul 1;63(1):86-99.

**Liu X, Yue Y, Li B, Nie Y, Li W y Wu WH (2007)** A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* 315: 1712–1716.

**Liu Z, Duguay J, Ma F, Wang TW, Tshin R, Hopkins MT, McNamara L y Thompson JE (2008)** Modulation of eIF5A1 expression alters xylem abundance in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot*. 2008;59(4):939-50.

**Liu Y, Gai JY, Lu HN, Wang YJ y Chen SY (2005b)** 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.

**López-Lastra M, Rivas A y Barría MI (2005)** Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol. Res*. 38, 121-146.

**Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S y Weissman AM (1999)** RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (20): 11364–9.

**Lukyanov KA, Matz MV, Bogdanova EA, Gurskaya NG y Lukyanov SA (1996)** Molecule by molecule PCR amplification of complex DNA mixtures for direct sequencing: An approach to in vitro cloning. *Nucleic Acids Res.*24:2194–2195.

**Lurin C, Andrés C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyère C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Le Ret M, Martin-Magniette ML, Mireau H, Peeters N, Renou JP, Szurek B, Taconnat L y Small I (2004)** Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16 (8): 2089–103.

**Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y y Christmann A (2009)** Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324: 1064–1068.



**Mahalingam R y Fedoroff N (2003)** Stress response, cell death and signalling: the many faces of reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum*, 119:56–68.

**Manjunath S, Williams AJ y Bailey-Serres J (1999)** Oxygen deprivation stimulates Ca<sup>2+</sup>-mediated phosphorylation of mRNA cap-binding protein eIF4E in maize roots. *Plant J.* 19, 21-3.

**Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M y Gilad Y (2008)** RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res* 18:1509–1517.

**Martinez M, Limones V y Cabrera JL (2004)** Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 63-70. doi:10.1007/BF02773350.

**Mayberry LK, Allen ML, Dennis MD y Browning KS (2009)** Evidence for Variation in the Optimal Translation Initiation Complex: Plant eIF4B, eIF4F, and eIF(iso)4F Differentially Promote Translation of mRNA *Plant Physiol* 150, 1844-1854.

**Meierhoff K, Felder S, Nakamura T, Bechtold N y Schuster G (2003)** HCF152, an *Arabidopsis* RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast psbB-psbT-psbH-petB-petD RNAs. *Plant Cell*. 2003 Jun;15(6):1480-95.

**Mellor H y Parker J (1996)** The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* (1998) 332 (281–292).

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

**Mikami K, Katagiri T, Luchi S, Yamaguchi-Shinozaki K y Shinozaki K (1998)** A gene encoding phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase is induced by water stress and abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 1998, 15; 563-568.

**Mili S y Piñol-Roma S (2003)** LRP130, a pentatricopeptide motif protein with a noncanonical RNA-binding domain, is bound in vivo to mitochondrial and nuclear RNAs. *Mol Cell Biol.* 2003 Jul;23(14):4972-82.

**Miller JH (1972)** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

**Munns R (2002)** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25, 239–250.

**Muñoz A, Castellano MM (2012)** Regulation of Translation Initiation under Abiotic Stress Conditions in Plants: Is It a Conserved or Not so Conserved Process among Eukaryotes?. *Comparative and Functional Genomics* 8, 1-7.

**Murashige T y Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.

**Murphy R y Ortega JKE (1995)** A new pressure probe method to determine the average volumetric elastic-modulus of cells in plant tissue. *Plant Physiol.* 107, 995–1005.

**Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F y Giraudat J (2002)** Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *The Plant Cell* 14: 3089–3099.

**Nakamura T, Schuster G, Sugiura M y Sugita M (2004)** Chloroplast RNA-binding and pentatricopeptide repeat proteins. *Biochem Soc Trans.* 2004 Aug;32(Pt 4):571-4.

**Nakashima K, Ito Y y Yamaguchi-Shinozaki K (2009)** Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. *Plant Physiology* 149, 88–95.

**Nakashima K, Shinwar ZK, Sakuma Y, Seki M, Miura S, Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaki K (2000)** Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high salinity-responsive gene expression. *Plant Molecular Biology* 42, 657–665.

**Nakashima K, Tran L-SP, Nguyen DV, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaki K (2007)** Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal* 51: 617-630.

**Navari-Izzo F y Rascio N (1999)** Plant response to water-deficit conditions. In: Pessarakli M, ed. *Handbook of plant and crop stress*. New York: Marcel Dekker Inc, 231–270.

**Navrot N, Collin V, Gualberto J, Gelhaye E, Hirasawa M, Rey P, Knaff DB, Issakidis E, Jacquot JP y Rouhier N (2006)** Plant Glutathione Peroxidases Are Functional Peroxiredoxins Distributed in Several Subcellular Compartments and Regulated during Biotic and Abiotic Stresses. *Plant Physiol.*, December 2006, Vol. 142, pp. 1364–1379.

**Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H y Kawai-Yamada M (2008)** CO<sub>2</sub> regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 452:483–486.

**Nelson DE, Repetti PP, Adams TR, Creelman RA, Wu J, Warner DC, Anstrom DC, Bensen RJ, Castiglioni PP, Donnarummo MG, Hinchey BS, Kumimoto RW, Maszle DR, Canales RD, Krolikowski KA, Dotson SB, Gutterson N, Ratcliffe OJ y Heard JE (2007)** Plant nuclear factor Y (NF-Y) B

subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. Proc. Natl Acad. Sci. U S A. 104, 16450–16455.

**Nobrega MP, Bandeira S, Beers J y Tzagoloff A (2002)** Characterization of COX19 , a widely distributed gene required for expression of mitochondrial cytochrome oxidase . J. Biol. Chem. 277: 40206-40211.

**Noll GA, Müller B, Ernst AM, Rüping B, Twyman RM y Prüfer D (2011)** Sieve element occlusion (SEO) genes encode structural phloem proteins involved in wound sealing of the phloem Appl Microbiol Biotechnol (2011) 89:1675–1682.

**Oh S-K, Lee S, Yu SH y Choi D (2005)** Expression of a novel NAC domain containing transcription factor (CaNAC1) is preferentially associated with incompatible interactions between chili pepper and pathogens. Planta 222: 876–887.

**Pandey S, Nelson DC y Assmann SM (2009)** Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in Arabidopsis. Cell 136: 136–148.

**Papageorgiou G y Murata N (1995)** The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. Photosyn. Res, 1995; 44:243–252.

**Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H y Zhao Y (2009)** Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. Science 324: 1068–1071.

**Pastori GM y Foye CH (2002)** Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of ‘redox’ and abscisic acid-mediated controls. Plant Physiol. 129,460–468.

**Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M y Bonner WM (2000)** A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. Curr. Biol. 10 (15): 886–95.

**Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson PA y Saedler H (1987)** The regulatory cl locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. EMBO f. 6: 3553-3558.

**Pestova TV, Lorsch JR y Hellen CUT (2007)** In: Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB (eds) Translational control in biology and medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, pp 87-128.

**Peters C, Li M, Narasimhan R, Roth M, Welti R y Wang X (2010)** Nonspecific phospholipase C NPC4 promotes responses to abscisic acid and tolerance to hyperosmotic stress in *Arabidopsis*. Plant Cell. 2010 Aug;22(8):2642-59.

**Peters WS, Knoblauch M, Warmann SA, Pickard WF y Shen AQ (2008)** Anisotropic contraction in forisomes: simple models won't fit. *Cell Motil Cytoskeleton* 65: 368–378.

**Peters WS, Knoblauch M, Warmann SA, Schnetter R, Shen AQ y Pickard WF (2007)** Tailed forisomes of *Canavalia gladiata*: a new model to study  $\text{Ca}^{2+}$  driven protein contractility. *Ann. Bot.* 100: 101–109.

**Piao HL, Pih KT, Lim JH, Kang SG, Jin JB, Kim SH y Hwang I (1999)** An *Arabidopsis* GSK3/shaggy-like gene that complements yeast salt stress-sensitive mutants is induced by NaCl and abscisic acid. *Plant Physiol.*, 1999, 119; 1527-1534.

**Pimentel D y Patzek T (2008)** Ethanol production using corn, switchgrass and wood; biodiesel production using soybean. In *Biofuels, Solar and Wind as Renewable Energy Systems*. Edited by Pimentel D. pp.373–394. Springer, New York.

**Porra RJ, Thompson WA y Kriedmann PA (1989)** Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochem Biophys Acta* 975: 384–394.

**Pospíšilová J, Synková H, Haisel D y Baťková P (2009)** Effect of abscisic acid on photosynthetic parameters during ex vitro transfer of micropropagated tobacco plantlets. *Biologia Plantarum* 53, 11–20.

**Rigaud J y Puppo A (1975)**. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88: 223-228.

**Rock C (2000)** Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol.*, 2000, 148; 357-396.

**Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS y Bonner WM (1998)** DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273 (10): 5858–68.

**Rohde A, Kurup S y Holdsworth M (2000)** ABI3 emerges from the seed. *Trends Plant Sci.*, 2000, 5; 418–419.

**Rüping B, Ernst AM, Jekat SB, Nordziede S, Reineke AR y Müller B (2010)** Molecular and phylogenetic characterization of the sieve element occlusion gene family in *Fabaceae* and non-*Fabaceae* plants. *BMC Plant Biol* 2010; 10:219.

**Ryu MY, Cho SK y Kim WT (2010)** The *Arabidopsis* C3H2C3-type RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP1 is a positive regulator of an abscisic acid-dependent response to drought stress. *Plant Physiol* 154: 1983-1997.

**Saavedra L, Svensson J, Carballo V, Izmendi D, Welin B y Vidal S (2006)** A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *Plant J.* 45: 237–249.

**Sablowski RW y Meyerowitz EM (1998)** A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *The Cell* 92: 93-103.

**Saibo NJM, Lourenco T y Oliveira MM (2009)** Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany* 103, 609–623.

**Sakai T y Kogiso M (2008)** Soy isoflavones and immunity. *J .Med . Invest.* 55:167–173.

**Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, Swartz TE, Christie JM, Briggs WR, Wada M y Okada K (2001)** Arabidopsis *nph1* and *npl1*: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6969-6974.

**Sakamoto A y Murata N (2000)** Genetic engineering of glycine betaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *Journal Experimental Botany* 2000;51:81-88.

**Sakamoto K y Briggs WR (2002)** Cellular and subcellular localization of phototropin1. *Plant Cell* 14: 1723-1735.

**Saleh A, Lumreras V y Pages M (2005)** Functional role of DRE-binding transcription factors in abiotic stress. In: Tuberosa R, Phillips RL, Gale M, eds. *Proceedings of the International Congress 'In the Wake of the Double Helix From the Green Revolution to the Gene Revolution'*, 27–31 May 2003, Bologna, Italy, 193–205, <sup>a</sup> 2005 Avenue media, Bologna, Italy.

**Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989)** *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p. ISBN 0-87969-309-6.

**Santiago J, Dupeux F, Round A, Antoni R, Park SY, Jamin M, Cutler SR, Rodriguez PL y Márquez JA (2009)** The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature*. 2009 Dec 3;462(7273):665-8. doi: 10.1038/nature08591. Epub 2009 Nov 8.

**Sato A, Sato Y, Fukao Y, Fujiwara M, Umezawa T y Shinozaki K (2009)** Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochem. J.*424: 439–448.

**Schlueter JA, Dixon P, Granger C, Grant D, Clark L, Doyle JJ y Shoemaker RC (2004)** Mining EST databases to resolve evolutionary events in major crop species. *Genome*, 47, 868–876.

**Schlueter JA, Lin JY y Schlueter SD (2007)** Gene duplication and paleopolyploidy in soybean and the implications for whole genome sequencing. *BMC Genomics*, 8, 330.

**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 y Jackson SA (2010)** Genomesequences of the paleopolyploid soybean. *Nature* 463: 178–183.

**Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y y Shinozaki K (2002)** Monitoring the expression profiles of 7,000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* 31, 279–292.

**Seo PJ, Park JM, Kang SK, Kim SG y Park CM (2011)** An Arabidopsis senescence-associated protein SAG29 regulates cell viability under high salinity. *Planta*. 2011 Jan;233(1):189-200.

**Shabala S y Cuin TA (2006)** Osmoregulation versus osmoprotection: re-evaluating the role of compatible solutes. In: Teixeira da Silva J, editor. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology advances and topical issues*. Tokyo, Japan: Global Science Books; 2006. p. 405-416.

**Shannon L, Kay E y Lewj Y (1966)** Peroxidase isozymes from horseradish roots. Isolation and Physical Properties. *J.Biol Chem*. 241: 2166–2172.

**Sheen J (1998)** Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Feb 3;95(3):975-80.

**Shen B, Jensen RG y Bohnert HJ (1997)** Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiology*, 1997; 113(4):1177-1183.

**Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z y Shang Y (2006)** The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443:823–826.  
**Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K y Seki M (2003)** Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 410–417.

**Shinozaki Kazuo y Yamaguchi-Shinozaki Kazuko (2000)** Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000, 3; 217-223.

**Shinwari ZK, Nakashima K, Miura S, Kasuga M, Seki M, Yamaguchi Shinozaki K y Shinozaki K (1998)** An Arabidopsis gene family encoding DRE/CRT binding sites involved in low-temperature-responsive gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 250, 161–170.

**Shutz P, Bumann M, Obrholzer AE, Bieniossek C, Trachsel H, Altman M y Baumann U (2008)** Crystal structure of the yeast eIF4A-eIF4G complex: An RNA-helicase controlled by protein–protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci* 105, 9564-9569.

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

**Small ID y Peeters N (2000)** The PPR motif a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci.* 2000 Feb; 25(2):46-7.

**Smirnoff N y Cumbes QJ (1989)** Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28, 1057–1060.

**Souer E, Van Houwelingen A, Kloos D, Mol J y Koes R (1996)** The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordial boundaries. *The Cell* 85: 159-170.

**Specht JE, Hume DJ y Kumudini SV (1999)** Soybean yield potential a genetic and physiological perspective. *Crop Sci.* 39:1560–1570.

**Sterck L, Rombauts S, Vandepoele K, Rouzé P y Van de Peer Y (2007)** How many genes are there in plants (... and why are they there)? *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 199–203.

**Stone JM y Walker JC (1995)** Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol.* 108: 451–457.

**Suetsugu N, Kagawa T y Wada M (2005)** An auxilin-like J-domain protein JAC1, regulates phototropin-mediated chloroplast movement in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139: 151-162.

**Szabados L y Saviouré A (2010)** Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 2010 Feb;15(2):89-97.

**Taji T, Seki M, Satou M, Sakurai T, Kobayashi M, Ishiyama K, Narusaka Y, Narusaka M, Zhu JK y Shinozaki K (2004)** Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiol.* 2004 Jul;135(3):1697-709.

**Takenaka M, Verbitskiy D, Zehrmann A y Brennicke A (2010)** Reverse genetic screening identifies five E-class PPR-proteins involved in RNA editing in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 285 (35): 27122–27129.

**Talame V, Ozturk NZ, Bohnert HJ y Tuberosa R (2007)** Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *Journal of Experimental Botany* 58, 229–240.

**Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M y Kumar S (2011)** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

**ten Hove CA, Bochdanovits Z, Jansweijer VM, Koning FG, Berke L, Sanchez-Perez GF, Scheres B y Heidstra R (2011)** Probing the roles of LRR RLK genes in *Arabidopsis thaliana* Roots using a custom T-DNA insertion set. *Plant Mol Biol* (2011) 76:69–83.

**Testerink C y Munnik T (2005)** Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends in Plant Science* 10, 368–375.

**Thaw P, Baxter NJ, Hounslow AM, Price C, Waltho JP y Craven CJ (2001)** Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nat Struct Biol*. 2001 Aug;8(8):701-4.

**Thompson JD, Higgins DG y Gibson TJ (1994)** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994 Nov 11;22(22):4673-80.

**Toledo-Ortiz G, Huq E y Quail PH (2003)** The *Arabidopsis* basic/helix–loop–helix transcription factor family. *Plant Cell* 15:1749–1770.

**Torii KU (2004)**. Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: Structure, function, and signal transduction pathways. *Int. Rev. Cytol*. 234: 1–46.

**Tran LS, Nakashima K, Sakuma Y, Osakabe Y, Qin F, Simpson SD, Maruyama K, Fujita Y, Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaki K (2007)** Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 49: 46–63.

**Tran LS, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaki K (2004)** Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *The Plant Cell* 16: 2481-2498.



**Turyagyenda LF, Kizito EB, Ferguson M, Baguma Y, Agaba M, Harvey JJ y Osiru DS (2013)** Physiological and molecular characterization of drought responses and identification of candidate tolerance genes in cassava. *AoB Plants*. 2013;5:plt007. doi: 10.1093/aobpla/plt007. Epub 2013 Mar 21.

**Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaki K (2000)** Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 97: 11632–11637.

**Van Der Kelen K, Beyaert R, Inze D y De Veylder L (2009)** Translational control of eukaryotic gene expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44, 143-168.

**van der Weele CM, Spollen WG, Sharp RE y Baskin TI (2000)** Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany* 51: 1555-1562.

**Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B y Kinzler KW (1995)** Serial analysis of gene expression. *Science*. 1995 Oct 20;270(5235):484-7.

**Verslues PE y Bray EA (2004)** LWR1 and LWR2 are required for osmoregulation and osmotic adjustment in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 136: 2831-2842.

**Verslues PE y Sharp RE (1999)** Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. II. Metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone. *Plant Physiol.* 119, 1349–1360.

**Verslues PE y Zhu JK (2005)** Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 375–379.

**Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J y Zhu JK (2006)** Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.* 2006 Feb;45(4):523-39.

**Vij S y Tyagi AK (2007)** Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnol J* 5:361–380.

**Vij S y Tyagi AK (2008)** A20/AN1 zinc-finger domain-containing proteins in plants and animals represent common elements in stress response. *Funct Integr Genomics* 8:301–307.

**Wang L, Xu C, Wang C y Wang Y (2012)** Characterization of a eukaryotic translation initiation factor 5A homolog from *Tamarix androssowii* involved in plant abiotic stress tolerance. *BMC Plant Biol.* 2012 Jul 26;12:118.

**Wang Z, Gerstein M y Snyder M (2009)** RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10:57–63.

**Wang Z y Brown, DD (1991)** A gene expression screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:11505–11509.

**Weber H y Hellmann H (2009)** Arabidopsis thaliana BTB/POZ-MATH proteins interact with members of the ERF/AP2 transcription factor family. *FEBS Journal* 276 (2009) 6624–6635.

**Weir I, Lu J, Cook H, Causier B, Schwarz-Sommer Z y Davies B (2004)** CUPULIFORMIS establishes lateral organ boundaries in *Antirrhinum*. *Development* 131: 915-922.

**Will T y van Bel AJE (2006)** Physical and chemical interactions between aphids and plants. *J Exp Bot* 57:729–737.

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

**Wu FQ, Xin Q, Cao Z, Liu ZQ, Du SY y Mei C (2009)** The magnesium-chelatase H subunit binds abscisic acid and functions in abscisic acid signaling: new evidence in Arabidopsis. *Plant Physiol.*150: 1940–1954.

**Xiang Y, Tang N, Du H, Ye H y Xiong L (2008)** Characterization of Osb-ZIP23 as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. *Plant Physiology* 148: 1938–1952.

**Xiao BZ, Chen X, Xiang CB, Tang N, Zhang QF y Xiong LZ (2009)** Evaluation of seven function-known candidate genes for their effects on improving drought resistance of transgenic rice under field conditions. *Mol. Plant.* 2, 73–83.

**Xie Q, Frugis G, Colgan D y Chua NH (2000)** Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes & Development* 14: 3024-3036.

**Xu J, Zhang B, Jiang C y Ming F (2011)** RceIF5A, encoding an eukaryotic translation initiation factor 5A in *Rosa chinensis*, can enhance thermotolerance, oxidative and osmotic stress resistance of Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol.* 2011 Jan;75(1-2):167-78.

**Yamaguchi-Shinozaki K y Shinozaki K (2005)** Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic and cold stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science* 10, 88–94.

**Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD y Somero GN (1982)** Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217, 1214–1222.

**Yanhui C, Xiaoyuan Y, Kun H, Meihua L, Jigang L, Zhaofeng G, Zhiqiang L, Yunfei Z, Xiaoxiao W, Xiaoming Q, Yunping S, Xiaohui D, Jingchu L, Xing-Wang D, Zhangliang C, Hongya G y Li-Jia Q (2006)** The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Molecular Biology* 60: 107–124.

**Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaki K (2010)** AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal* 61: 672–685.

**Zhang J, Nguyen HT y Blum A (1999)** Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *J. Exp. Bot.* 50, 292–302.

**Zhao C, Avci U, Grant EH, Haigler CH y Beers EP (2008)** XND1, a member of the NAC domain family in *Arabidopsis thaliana*, negatively regulates lignocellulose synthesis and programmed cell death in xylem. *The Plant Journal* 53: 425-436.

**Zhu JK (2002)** Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Reviews in Plant Biology* 53, 247–273.

**Zuo J, Niu QW y Chua NH (2000)** Technical advance: an estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J* 24:265-273.