

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

Facultad de Ciencias Agrarias

Tesis para el otorgamiento del Grado Académico de Doctor de la UNNE
Área: Recursos Naturales

**"Las poliaminas como moduladoras de la respuesta a estrés
osmótico. El género *Lotus* como modelo de estudio".**

FABIANA DANIELA ESPASANDIN

Director: Dr. Pedro A. SANSBERRO

Co-director: Dr. Oscar A. Ruíz

2012

RESUMEN

En este trabajo se presentan evidencias que avalan la hipótesis de que la sobreexpresión del gen de arginina descarboxilasa (ADC) incrementa los niveles endógenos de poliaminas (PAs) favoreciendo la tolerancia de *Lotus tenuis* a estrés osmótico.

En una primera etapa, se desarrolló un sistema de regeneración basado en el cultivo *in vitro* de láminas foliares a partir del cual se elaboró un procedimiento de transformación indirecta mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, obteniéndose varias líneas transgénicas portadoras de la secuencia de arginina descarboxilasa bajo el control del promotor *RD29A* (*RD29A::oatADC*); las que resultaron fértiles, capaces de producir semillas y no presentaron alteraciones fenotípicas en relación al genotipo salvaje en condiciones óptimas de crecimiento. Posteriormente, se evaluó la funcionalidad de la expresión génica mediante la imposición de estrés hídrico y salino a plantas enteras que crecían en macetas bajo condiciones ambientales controladas determinándose que: 1) El gen promotor *RD29A* es capaz de dirigir la expresión del gen *gus* en tallos y hojas de plantas sujetas a condiciones de estrés osmótico (sequía, salinidad ó frío). 2) Las plantas transgénicas ADC expresaron actividad de la enzima arginina descarboxilasa en situaciones osmóticas desfavorables y presentaron acumulación de putrescina libre inducible por sequía. 3) Como resultado de una mayor actividad enzimática ante condiciones de déficit hídrico, éstas presentaron un mayor contenido relativo de agua en sus brotes respecto al genotipo salvaje, denotándose un elevado ajuste osmótico y modificación del destino de los fotoasimilados favoreciendo el crecimiento de raíces en desmedro de la parte aérea. 4) Las plantas ADC presentaron una mejor performance en condiciones de salinidad, observándose un menor contenido de Na^+ en raíces (acumulándose principalmente en hojas) concurrentemente con un incremento significativo del nivel de K^+ ; hecho por el cual, la relación Na^+/K^+ en este órgano se mantuvo prácticamente invariable, contribuyendo a una menor abscisión foliar, mayor brotación y crecimiento radicular.

A partir de los resultados obtenidos tres líneas de evidencia confirman la hipótesis inicial y apoyan las siguientes hipótesis parciales. Que las PAs están involucradas en el mecanismo de defensa de la planta ante situaciones de estrés hídrico y salino. Que las PAs en tales circunstancias mejoran el estado hídrico en células y tejidos de la parte aérea y controlan la homeóstasis iónica en el ámbito de las raíces.

Que las PAs modifican la relación fuente/destino favoreciendo el crecimiento y desarrollo de raíces.

ABSTRACT

This study was performed in *Lotus tenuis* and presented evidences which support the hypothesis that polyamines (PAs) improve the tolerance to osmotic stress.

In the first step, a protocol for the production of transgenic plants was developed for *Lotus tenuis* via *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf segments co-cultivated with an strain harbouring either the binary vector pBi RD29A: oat arginine decarboxylase (ADC) or pBi RD29A:GUS. Transgenic plants were shown to be fertile, capable of producing seeds and showed no phenotypic alterations in relation to untransformed plants. Subsequently, with the aim to determine the functionality of the gene expression, several plants were subject to either water or salt stress under controlled environmental conditions. The GUS transgenic line driven by the RD29A promoter showed that strong signals of osmotic stress were detected in leaves and stem tissues. The increase in the activity of arginine decarboxylase from stressed ADC lines was accompanied by a significant rise in the putrescine level under drought. The transgenic plants improved the relative water content of the leaves showed a higher osmotic adjustment respect to the wild type and enhanced the growth and development of roots. Furthermore, the salt stressed ADC-lines revealed a lesser amount of Na^+ content in the roots concomitantly with a substantial increase of K^+ level keeping stable the Na^+/K^+ ratio.

From these results, three sorts of evidences confirm the initial hypothesis and support the following partial ones. First, that PAs are involved in the plant mechanisms of tolerance to drought and salt stress. Second, that PAs improve the relative water content in leaves subject to dehydration and recover the Na^+/K^+ ratio in the roots of salt stressed plants. Third, that PAs altered the sink-source relationship under both stresses lead to enhance the root system.

Los experimentos llevados a cabo en esta tesis han sido realizados en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET), Departamento de Botánica y Ecología y el Instituto de Investigaciones Biotecnológico de Chascomús (IIB-INTECH).

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Pedro A. SANSBERRO

CO-DIRECTOR DE TESIS: Dr. Oscar A. Ruíz

TRABAJOS PUBLICADOS EN EL MARCO DE ESTA TESIS

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Lotus tenuis Mill. and regeneration of transgenic lines. Por: F. Espasandín, M. Collavino, C. Luna, J. Tarragó, R. Paz, O. Ruiz, L. Mroginski, P. Sansberro (CA). Ed. Springer ISSN: 0167-6857 (Print) 1573-5044 (Online). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 102: 181-189. 2010. DOI 10.1007/s11240-010-9720-x. Holanda. Revista Indexada, SCI-Science Citation Index. CON REFERATO.

PRESENTACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, LA PLATA, 26 al 29 de septiembre del 2010. **“Efectos fisiológicos de la sobreexpresión del gen codificante de arginina descarboxilasa en plantas de *Lotus tenuis* sujetas a estrés hídrico”**. Publicado en Libro de Resúmenes de Conferencias, Simposios y Trabajos. Autores: Fabiana Espasandín, Oscar Ruiz, Pedro Sansberro.

Plant Biology 2010. American Society of Plant Biologists and Canadian Society of Plant Physiologists. Montréal, Canadá. Del 31 de Julio al 04 de agosto de 2010. **“Physiological characterization of *Lotus tenuis* transgenic lines overexpressing gene encoding arginine decarboxylase in response to high-salinity stress”**. Autores: Espasandín F, Collavino M, Ruiz O, Sansberro P.

XXXVIII Congreso Argentino de Genética. Del 20 al 23 de Septiembre- San Miguel de Tucumán – 2009. **“Desarrollo de marcadores de AFLP y establecimiento de una población de mapeo en *Ilex paraguariensis* (yerba mate)”** ISSN: 0075-9481. Autores: Stein J, R Rebozzio, C Luna, F Espasandín, F Espinoza, JPA Ortiz, P Sansberro y S Pessino.

XIII Reunión Latinoamericana. XXVII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Del 21 al 24/09/2008. Rosario. Argentina.

“*Enterobacter aerogenes* aislada de la rizósfera de yerba mate incrementa el contenido de fosforo foliar y promueve el crecimiento de *Phaseolus vulgaris*”. Publicado en Libro de Resúmenes de Conferencias, Simposios y Trabajos. Autores: Mónica Collavino, Fabiana Espasandín, Pedro Sansberro, Luis Mroginski, O. Mario Aguilar.

XXVI Reunión de la Asociación Argentina de Fisiología Vegetal. Del 04 al 06/10/2006. Chascomús, Bs. As. Argentina. CON REFERATO

“Obtención de plantas transgénicas de *Lotus glaber* portadoras del gen codificante de arginina descarboxilasa”. Autores: F. Espasandín, P. Sansberro, M. Collavino, O. Ruiz, L. Mroginski.

TRABAJOS PUBLICADOS EN OTRAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Putrescine accumulation in *Arabidopsis thaliana* transgenic lines enhances tolerance to dehydration and freezing stress. Por: Analía I. Alet, Diego H. Sanchez, Juan C. Cuevas, Secundino del Valle, Teresa Altabella, Antonio F. Tiburcio, Francisco Marco, Alejandro Ferrando, Fabiana D. Espasandín, María E. González, Oscar A. Ruiz and Pedro Carrasco. **Plant Signaling and Behaviour** 6:2, 2011.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste donde desarrollé mis estudios de postgrado y en especial al Director del Doctorado en Recursos Naturales Ing. Agr. Luis A. Mroginski.

A mi director de la tesis Dr. Pedro A. Sansberro por el tiempo dedicado, su asesoramiento profesional y personal, por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de trabajar y realizar mi doctorado en la institución.

A mi co-director de la tesis Dr. Oscar A. Ruíz por haberme abierto las puertas de su laboratorio UB1-INTECH, brindar las instalaciones para el desarrollo de la tesis y por haberme alojado tantas veces en el centro.

A los integrantes del Instituto de Investigaciones Biotecnológico de Chascomús, de la UB1 y UB3 por guiarme y su gran ayuda prestada, en especial a María, Rosa, Santiago, Rubén y el resto del laboratorio.

Al Instituto de Botánica del Nordeste, profesionales y técnicos que estuvieron presentes en los momentos que necesite.

Al Departamento de Botánica y Ecología, especialmente a la Cátedra de Fisiología Vegetal quienes me acompañaron durante este trayecto y por su ayuda siempre dispuesta, a Mónica por su incansable asesoramiento...los nombraría a todos pero son varios.

A las Cátedras de Física, Química, Manejo de suelos, Genética, Morfología de plantas vasculares por permitirme el uso del equipamiento y sus consejos.

A mi familia, por su amor y apoyo incondicional, dedicación y contención que me brindan.

Y a todos aquellos que no figuran y que contribuyeron a llevar a cabo este proyecto.

INDICE

Capítulo I. Mecanismos de percepción, traducción de la señal y adaptación de la planta ante una situación de estrés osmótico.

1. Introducción	2
2. Respuestas fisiológicas y bioquímicas al estrés hídrico	8
Balance hídrico de la planta	8
Estrategias de las plantas para mitigar los daños producidos por la deshidratación	8
Mecanismos de respuestas que se suscitan en el ámbito de las hojas	10
3. Respuestas fisiológicas y bioquímicas al estrés salino	14
Salinidad de los suelos	14
Crecimiento y desarrollo de las plantas en condiciones de salinidad	17
Estrategias de las plantas para mitigar los daños producidos por estrés salino	20
Tolerancia al estrés osmótico	20
Tolerancia al estrés iónico	22
4. Respuestas fisiológicas y bioquímicas al estrés por bajas temperaturas	26
Generación del daño por frío	26
Estrategias de las plantas para mitigar los daños producidos por bajas temperaturas	29
5. Mecanismos de percepción y transducción de señales a estrés osmótico	30
6. Acción de las poliaminas en el contexto de la tolerancia a estrés osmótico	34
Biosíntesis	34
Localización y transporte de poliaminas	37
Papel que desempeñan poliaminas en el crecimiento y desarrollo de las plantas	39
Papel que desempeñan poliaminas en la defensa de la planta ante situaciones de estrés abiótico	39
7. Mejoramiento genético para incrementar la tolerancia a estrés osmótico	41
8. Transformación genética	44
Conceptos y métodos disponibles	44
Vectores de transformación	50

Detección del transgén	54
Plantas transgénicas tolerantes a estrés osmótico	55
Ensayos en condiciones de cultivo comercial	55
9. Planteamiento del problema	57
Objetivo general del trabajo de Tesis	58
Objetivos particulares	58
Hipótesis general	58
Anexo	59

Capítulo II. Transformación genética y producción de plantas transgénicas de *Lotus tenuis* portadoras del gen codificante de arginina descarboxilasa. 65

1. Introducción	66
El género <i>Lotus</i> como modelo de estudio	66
Transformación genética de especies de <i>Lotus</i>	67
<i>Lotus japonicus</i>	67
<i>Lotus corniculatus</i>	68
<i>Lotus tenuis</i>	68
Aplicación de la transformación genética en especies de <i>Lotus</i>	68
2. Objetivos	69
3. Materiales y métodos	70
Material vegetal	70
Organogénesis adventicia y obtención de vitroplantas	70
Análisis histológico	71
Construcción del ADN plasmídico y transformación genética mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	71
Validación de la transformación	73
Análisis de transferencia de ADN. <i>Southern blotting</i>	73
Recuento cromosómico	74
Análisis de la segregación de la progenie resultante del cruzamiento entre líneas transgénicas y no transformadas	74
Diseño experimental y análisis estadístico	74
4. Resultados y Discusión	75
Desarrollo de un protocolo de organogénesis in vitro y obtención de plantas	75

Obtención de plantas transgénicas	77
5. Conclusiones parciales del capítulo	83

Capítulo III. Análisis funcional del gen <i>adc</i> de avena en plantas de <i>Lotus tenuis</i> sometidas a estrés hídrico y salino.	84
1. Introducción	85
Modificación del metabolismo de poliaminas en otras especies vegetales y su implicancia en la tolerancia a estrés abiótico	85
2. Objetivos	88
3. Materiales y métodos	88
Material vegetal y condiciones de crecimiento	88
Imposición del estrés	88
Estrés hídrico	88
Estrés salino	88
Tratamientos hormonales	90
Determinación de los parámetros bioquímicos	90
Actividad de β -glucuronidasa (GUS)	90
Actividad de arginina descarboxilasa (ADC)	90
Contenido de poliaminas libres	91
Contenido de prolina	91
Contenido de clorofilas	92
Contenido de iones	92
Determinación del daño a membrana	92
Determinación de los parámetros fisiológicos	92
Ajuste osmótico	92
Contenido de agua	93
Intercambio gaseoso	93
Determinación de los parámetros de crecimiento	93
Diseño experimental y análisis estadístico	94
4. Resultados	94
Expresión órgano-específica	94
Respuestas bioquímicas y fisiológicas a estrés hídrico (sequía)	95
Respuestas fisiológicas y bioquímicas al estrés salino	101

5. Conclusiones parciales del capítulo	108
Anexo	109
 <u>Capítulo IV. Conclusiones y perspectivas futuras</u>	 118
 Bibliografía	 120

ABREVIATURAS Y TÉRMINOS TOMADOS DEL INGLÉS

$\Delta\Psi_{\pi}^{100}$	ajuste osmótico
$\lambda_{\text{DNA EcoRI/HindIII}}$	marcador de peso molecular, ADN del fago lambda cortado con Eco RI y Hind III
μg	microgramo
μl	microlitro
μM	micromolar
μmol	micromol
π	potencial osmótico
Ψ	potencial agua
Ψ_{suelo}	potencial agua de suelo
Ψ_{π}^{100}	potencial osmótico a plena turgencia
A	asimilación neta/fotosíntesis neta
A_{max}	asimilación máxima
ABA	ácido abscísico
ABRE	elementos de respuesta a ABA
ADC	arginina descarboxilasa
ADI	agmatina desaminasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
AF	área foliar
AFPs	proteínas anticongelantes (del inglés <i>antifreezing proteins</i>)
AIA	ácido indolacético
AIH	agmatina inminohidrolasa
ANA	ácido naftalenacético
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ATP	adenosina trifosfato
BA	6-benciladenina
Ca^{2+}	calcio
CaMs	calmodulinas
CAPs	proteínas de adaptación al frío (del inglés <i>cold adaptation proteins</i>)
CBLs	calcineurinas
Cad	cadaverina
CDPKs	quinasas dependientes de calcio
CE	conductividad eléctrica
Cl^{-}	cloruros
cm	centímetro
CNCGs	canales abiertos por nucleótidos cíclicos (del inglés <i>cyclic nucleotide gated channels</i>)
CO_2	dióxido de carbono
CO_3^{2-}	carbonatos
CORs	proteínas protectoras (del inglés <i>cold protection proteins</i>)
CPA	N-carbamoilputrescina amidahidrolasa
CRA	contenido relativo de agua
Cat	cloranfenicol acetiltransferasa
CATs	catalasas

DACCs	canales de calcio activados por despolarización (del inglés <i>depolarization-activated calcio channels</i>)
DAO	diamino-oxidasa
dATP	desoxiadenosin trifosfato
DHNs	dehidrinas
DRE	elementos de respuesta a deshidratación
dS	deciSiemens
dSAM	S-adenosil metionina descarboxilasa
DTT	ditiotreitól
E	transpiración
EDTA	etilendiaminotetraacetato
EROIs	especies reactivas de oxígeno intermedias
ERO's	especies reactivas de oxígeno
EUA	eficiencia del uso del agua
gs	conductancia estomática
gr	gramo
GABA	ácido γ -aminobutírico
GAs	giberelinas
GFP	proteína de fluorescência verde
GLR	canales receptores de glutamato (del inglés <i>glutamate receptor channels</i>)
GUS	β -glucuronidasa
h	horas
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HACCs	canales de calcio activados por hiperpolarización (del inglés <i>hyperpolarization-activated calcio channels</i>)
HCO ₃ ⁻	bicarbonatos
HCl	ácido clorhídrico
HO ⁻	radicales oxidrilos
HR	humedad relativa
IBA	ácido indolbutírico
INA	bacterias que forman núcleos de hielo (del inglés <i>ice nucleation active bacteria</i>)
INPs	proteínas que forman núcleos de hielo (del inglés <i>ice nucleating proteins</i>)
IP ₃	fosfato inositol
K ⁺	potasio
Kb	kilopares de bases
KOH	hidróxido de potasio
L	litro
LB	Luria-Bertran
LEA	proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (del inglés <i>late embryogenesis abundant proteins</i>)
LUC	luciferasa
m	metro
M	molar
MAPKs	quinasas activadas por mitógenos
mg	miligramo
Mg ²⁺	magnesio
min	minuto

ml	mililitro
mM	milimolar
MPa	mega Pascal
MS	Murashigue-Skoog
N	normalidad
Na ⁺	sodio
NaCl	cloruro de sodio
NaOCl	hipoclorito de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
Na ₂ CO ₃	carbonato de sodio
NCED	9- <i>cis</i> -epoxicarotenoide dioxigenasa
nCi	nanocurie
nm	nanómetro
NH ₂	grupo amino
NSCCs	canales de cationes no selectivos (del inglés <i>non-selective cation channels</i>)
Nt	genotipo no transformado
O ₂	oxígeno molecular
O ₂ ⁻	ion superóxido
¹ O ₂	singulete
oatADC	arginina descarboxilasa de avena
ODC	ornitina descarboxilasa
PAO	poliamino-oxidasa
p/v	peso en volumen
PA _s	poliaminas
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>polymerase chain reaction</i>)
PF	peso fresco
PS	peso seco
PSI	proporción de sodio intercambiable
Put	putrescina
QTLs	locus de caracteres cuantitativos
RAF	relación área foliar
AFE	área foliar específica
rpm	revoluciones por minuto
RuBP	ribulosa bifsosfato carboxilasa
RT-PCR	retrotranscripción- reacción en cadena de la polimerasa
s	segundos
SAM	S-adenosil-metionina
SAMDC	S-adenosil-metionina descarboxilasa
SDS	sodio dodecil sulfato
SODs	superóxido dismutasa
SOS	vía de señalización iónico-específica (del inglés <i>salt overlay sensitive</i>)
Spd	espermidina
SPDS	espermidina sintasa
Spm	espermina
SPMS	espermina sintasa
T-ADN	ácido desoxirribonucleico de transferencia
TDZ	thidiazuron

Tg	tungstato de sodio
Ubi1	promotor constitutivo del gen de ubiquitina de maíz
UV	luz ultravioleta
v/v	volumen en volumen
VI-NSCCs	canales catiónicos independientes del voltaje (del inglés <i>voltage-independent cation channels</i>)

CAPÍTULO 1

Mecanismos de percepción, traducción de la señal y adaptación de la planta ante una situación de estrés osmótico

1. Introducción

A lo largo de su vida, las plantas se encuentran expuestas a constantes variaciones y combinaciones de los elementos ambientales, denominados factores abióticos, a la vez que interactúan con distintos organismos que componen los factores bióticos. En tal escenario, éstas deben adaptarse a las condiciones imperantes a fin de mantener su integridad estructural y funcional, requiriendo de óptimas cantidades e intensidades de los distintos factores que le permitan aplicar su “modelo fisiológico normal” y expresar su crecimiento potencial. Las desviaciones a ese patrón son consideradas como reacciones subóptimas produciendo daños debido a las variaciones en la intensidad de los distintos factores, situaciones para las que se usa el término **estrés** (Schulze *et al.* 2002). Según Taiz (2003) el estrés se produce cuando un factor externo, biótico o abiótico, ejerce una influencia desventajosa sobre las plantas induciendo a un cambio fisiológico tal que como resultado del mismo, se produce una reducción en el crecimiento.

Las plantas usualmente experimentan estrés debido a la imposición de ciertas condiciones adversas propias del dosel que afectan su normal crecimiento, desarrollo y productividad. Éstas pueden ser ejercidas por otros organismos dando lugar al **estrés biótico**; o bien, se originan a partir de un déficit o exceso en el ambiente físico y/o químico dando lugar al **estrés abiótico** (Bray *et al.* 2000).

Entre las condiciones ambientales (factores abióticos) que causan daños podemos mencionar inundaciones, sequías, temperaturas extremas, salinidad, disponibilidad de nutrientes en el suelo, exceso o falta de luz y ozono; considerándose a las mismas como la principal causa de reducción del rendimiento (Junge Hur *et al.* 2004). En tal sentido, se estima que la pérdida potencial de productividad por sequía, salinidad y altas temperaturas rondarían el 17, 20 y 40% respectivamente (Ashraf *et al.* 2008).

Cualquiera sea la causa que provoque estrés, la planta en respuesta al mismo, modifica su expresión génica y metabolismo celular, alterando su crecimiento y productividad. La duración, severidad y velocidad a la cual el estrés es impuesto afecta el modo en que la planta responde; asimismo, la coacción simultánea de distintas condiciones adversas induce una respuesta diferente de aquella que se originaría en réplica a un solo tipo de estrés; estando éstas condicionadas por el órgano o tejido

afectado, estado de desarrollo y genotipo (Bray *et al.* 2000). Los mecanismos de resistencia pueden ser agrupados en dos categorías: **escape o evitación** (del inglés *avoidance*), mediante el cual la planta evade el estrés, y **tolerancia**, a través de los cuales ésta soporta la situación adversa. Los vegetales pueden obtener tolerancia a través de un mecanismo de **adaptación**, adquirida por un proceso de selección a lo largo de muchas generaciones fundada en la incorporación de ciertos caracteres constitutivos (por ejemplo, la presencia de estomas hundidos y sistemas radiculares profundos en especies de regiones semiáridas) que se expresan independientemente de si la planta padece estrés o no; o bien, a través de un proceso de **aclimatación**, como consecuencia de ajustes inducidos en respuesta a cambios ambientales experimentados previamente (Schulze *et al.* 2002, Taiz y Zeiger 2003).

El mecanismo de respuesta a la situación adversa inicia cuando la planta reconoce el estrés a nivel de sus células (Fig. 1.1). Seguidamente, se activa la ruta de traducción de la señal involucrada transmitiendo la información primero a través de células individuales y luego, extendiéndose al resto de la planta. Finalmente, cuando la señal llega al núcleo se produce un cambio en la expresión de los genes alterando el metabolismo y desarrollo del vegetal.

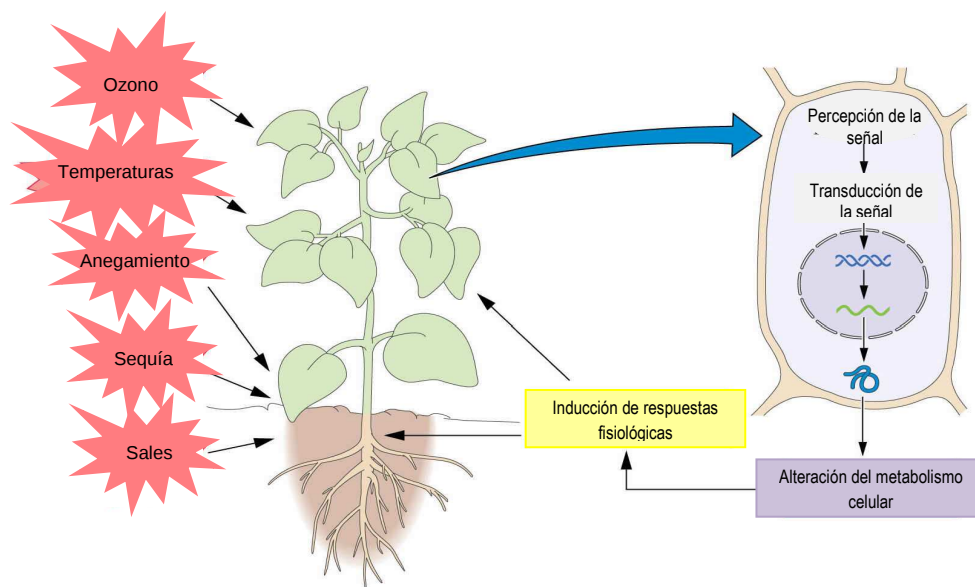


Fig. 1.1: Percepción y señalización de las variaciones ambientales que originan una situación de estrés. Tomado de Bray *et al.* 2000.

La transducción de las señales se inicia con la *percepción de un estímulo*, dado por moléculas sensoriales específicas. Estos receptores, denominados *osmosensores*,

difieren en su modo de percepción de la señal, localización, estructura e identidad dependiendo del tipo de estrés. Cambios en la presión de turgencia celular, alteraciones en las paredes y volumen celular son señales físicas, luego convertidas a señales bioquímicas, que se generan en respuesta al estrés (Bray 2007). Se incluyen receptores acoplados a proteínas G, quinasas (*receptor-like kinases*), tirosina-quinasas, histidina-quinasas, receptores acoplados a canales iónicos, hormonales y sensores de Ca^{2+} extra e intracelular. El influjo de Ca^{2+} e histidina-quinasas han sido identificadas en la respuesta a bajas temperaturas. Ciertos estudios sugieren que una proteína G heterotrimérica está relacionada con la respuesta a ABA en células guardas; mutantes de *Arabidopsis*, sometidas a estrés hídrico, son insensibles a la regulación de la apertura estomática mediada por ácido abscísico (ABA, Xiong e Ishitani 2006).

A partir de esta señal se activa la *cadena de transducción*, como una red integrada, que amplifica la señal inicial en la que participan mensajeros secundarios como fosfato inositol (IP_3), especies reactivas de oxígeno (ERO's) que pueden modular el nivel intracelular de Ca^{2+} , quien inicia una cascada de fosforilación/desfosforilación proteica corriente abajo, donde se incluyen distintos tipos de sensores de Ca^{2+} , que son proteínas que decodifican sus señales y poseen un sitio de unión al Ca^{2+} denominado EF-hand: Calmodulinas (CaMs, CMLs), calcineurinas (CBLs), quinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs), quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), fosfolípidos ligados a enzimas (*phospholipid-cleaving enzymes*, PLEs. Shi 2007; Jewel *et al.* 2010). Finalmente se alcanza a la proteína directamente involucrada en la protección celular o en factores de transcripción que controlan grupos de genes específicos (Fig. 1.2).

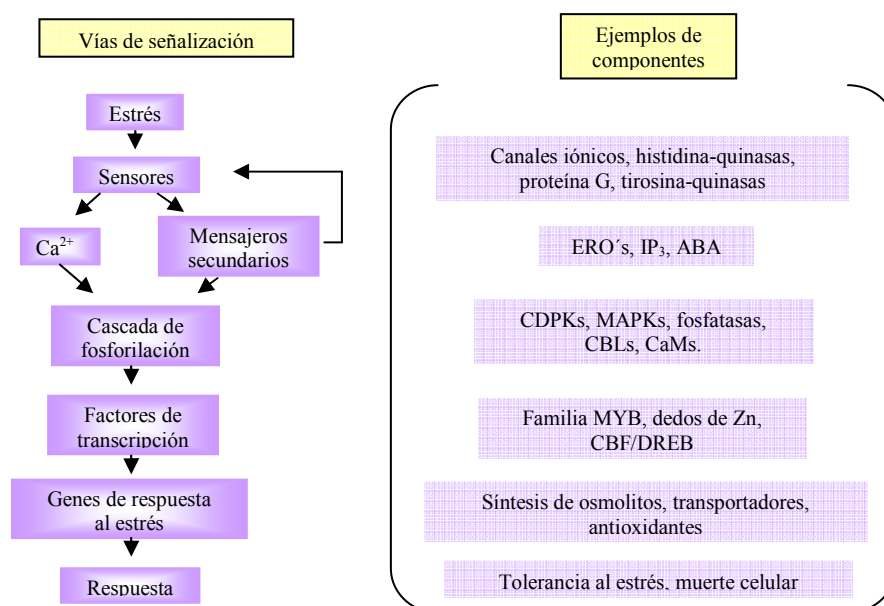


Fig. 1.2: Vía de traducción de señales ante la respuesta a estrés salino, bajas temperaturas y sequía. Ejemplos de componentes en cada uno de los pasos en la señalización. Ver comentario en texto. Dedos de Zn, CBF/DREB: *C-repeat binding factor/Dehydration-responsive elements binding protein* y MYB: *myeloblastosis* (factores de transcripción involucrados en la regulación de genes de repuesta a estrés osmótico). Tomado de Xiong e Ishitani 2006.

Las dinámicas propiedades del Ca^{2+} y su oscilación dentro del citoplasma determinan la eficacia de la respuesta obtenida. Han sido observadas numerosas vías de respuesta ante situaciones de estrés osmótico, entre éstas la señalización por Ca^{2+} se encuentra involucrada en la mayor parte de los procesos, como mensajero secundario, en diversas respuestas a estímulos internos y externos. La variación del contenido de Ca^{2+} en el citoplasma luego de tratamientos con ABA, ácido indolacético (AIA), estrés hídrico indica que es un componente esencial que mediaría la cascada de señalización en vías ABA dependientes, controlando el cierre de estomas. El Ca^{2+} modula su contenido intracelular por medio de diferentes tipos de canales de cationes no selectivos (NSCCs: CNGCs, HACCs, DACCs y GLR)¹, bombas de Ca^{2+} , presentes en membranas y sistemas de endomembranas (retículo endoplasmático y aparato de golgi) y un anti-transportador de Ca^{2+} presente en vacuolas, (CAX1), que permiten el flujo hacia y desde el citoplasma. En este contexto, diversos estudios relacionan la tolerancia al estrés mediante la modulación de los niveles de Ca^{2+} interno. Asimismo, en respuesta a estrés salino, SOS2 activa a CAX1 iniciando señales de Ca^{2+} . Los CNGCs, particularmente,

¹ Del idioma inglés. NSCCs: non-selective cation channels, DACCs: depolarization-activated Ca^{2+} channels, HACCs: hyperpolarization-activated Ca^{2+} channels, CNGCs: cyclic nucleotide gated channels y GLR: glutamate receptor channels.

controlan la homeostasis iónica mediante señalización por Ca^{2+} debido a que contienen un dominio de unión a CaMs. Otras determinaciones indican que los transportadores NHX también contienen un sitio de unión a CaMs, regulando de manera adicional la homeostasis iónica mediante compartimentalización de Na^+ bajo condiciones salinas. En síntesis, CaMs y CMLs percibirían señales de Ca^{2+} ocasionadas por salinidad y, regularían transportadores de iones, mejorando la homeostasis $\text{Na}^+:\text{K}^+$. Ciertos CaMs no sólo son inducidos por salinidad, incluso lo hacen bajo condiciones de sequía, bajas y altas temperaturas, radiación UV, hormonas (ABA, etileno) y mensajeros como ERO's (H_2O_2), metil jasmonato y ácido salicílico. La sobreexpresión de CaM4 en *Arabidopsis* regularía diferencialmente la transcripción de genes regulados por MYB2², genes y promotores RD22, P5CS1 y ADH1 relacionados en la tolerancia a estrés osmótico (Shi 2007); mientras que la sobre-expresión de CaM3 controlaría a ciertos promotores tales como RD29A (Xiong e Ishitani 2006).

El papel que desempeñan los CBLs denominados SCaBP (del inglés, *SOS3-like Ca-binding proteins*) en la tolerancia a sales se lleva a cabo en la vía de señalización SOS; activándose ésta mediante la acumulación de Ca^{2+} en el citoplasma (ver tolerancia al estrés iónico). En adición, distintos trabajos propusieron otros complejos diferentes al SOS, entre los que se encuentran el complejo CBL/CIPK quien origina una unión entre señales de Ca^{2+} y la disponibilidad y transporte de K^+ . Por ejemplo, CIPK23 promueve el ingreso de K^+ ya que interactúa con AKT1 (transportador de K^+) en plantas sometidas a baja disponibilidad del catión. El estrés ocasionado por la baja concentración externa de K^+ dispara señales de Ca^{2+} citoplasmático que conducen a la activación de los sensores CBLs que interactúan con CIPK23.

Por su parte, los CDPKs, codificados por una gran familia de genes, estarían involucrados en varios procesos del crecimiento y defensa de la planta, encontrándose ubicados en sitios estratégicos de la señalización por Ca^{2+} en el ámbito del núcleo, citoesqueleto, membrana plasmática, citosol y peroxisomas. Los CDPKs reciben la señal de Ca^{2+} y la traducen corriente abajo a través de fosforilación activando genes específicos. Otras proteínas receptoras de Ca^{2+} son las fosfolipasas C, fosfolipasas D, anexinas, EROIs (especies reactivas de oxígeno intermedias), ABI1. Ésta última es una serin-treonina fosfatasa 2C que se une al Ca^{2+} y que al interactuar con CDPKs por

² MYB: *myeloblastosis* (factor de transcripción involucrados en la regulación de genes de repuesta a estrés osmótico).

fosforilación, modulan componentes de respuesta a sales y tratamientos con ABA (Xiong e Ishitani 2006; Shi 2007).

En respuesta al estrés, se inducirá la expresión de algunos genes mientras que otros serán reprimidos. En consecuencia, el producto proteico de dicha expresión diferencial se acumulará en respuesta a la situación desfavorable. La función de tales proteínas y los mecanismos que regulan su expresión constituyen el objetivo general de las investigaciones que actualmente se realizan en fisiología del estrés vegetal. Los primeros estudios moleculares se focalizaron en la activación de la transcripción de los genes que se expresan diferencialmente, teniéndose en la actualidad evidencias de que la acumulación de sus productos es además afectada por mecanismos regulatorios postranscripcionales que incrementan la cantidad de ARNm, aumentan la traducción, estabilizan las proteínas, alteran la actividad proteica o bien, realizan alguna combinación de éstas (Forrest y Bhave 2007; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 2006). La disponibilidad de variadas técnicas de genética molecular desarrolladas en los últimos años permitió a través de su aplicación, un notable avance en los conocimientos tendientes a esclarecer los mecanismos de respuestas de las plantas asociados con la exposición a estreses específicos.

En el marco de ésta tesis nos propusimos indagar el papel que desempeñan ciertas fitohormonas en las estrategias adaptativas que despliegan las plantas para mitigar los daños ocasionados por situaciones de estrés osmótico a través de la sobre-expresión de un gen que codifica una proteína clave de la biosíntesis de poliaminas.

El estrés osmótico, disminuye la disponibilidad de agua y reduce el contenido hídrico de los tejidos; en consecuencia, se acumulan iones que resultan deletéreos para el vegetal (Munns 1993). Distintas condiciones ambientales pueden ocasionar déficit hídrico en las plantas. Un período de ausencia o escasas precipitaciones producen un estado meteorológico conocido como “sequía” cuya duración afectará el contenido de agua disponible para el crecimiento de las plantas. Sin embargo, el déficit hídrico también puede ocurrir en situaciones donde la disponibilidad de agua no es una limitante; por ejemplo, en hábitats salinos, donde las elevadas concentraciones de sales presentes en el suelo dificultan la extracción de agua por parte del sistema radicular. Del mismo modo, la acción de bajas temperaturas puede causar estrés hídrico cuando el

agua presente en las células fluye hacia el espacio intercelular formando núcleos de hielo (Busó Sáez 2005; Levitt 1980; Jewel *et al.* 2010).

2. Respuestas fisiológicas y bioquímicas al estrés hídrico

Balance hídrico de la planta

El balance hídrico de la planta está determinado por la relación entre la fracción de agua que se pierde hacia la atmósfera por evaporación (transpiración) y su absorción a partir del agua disponible del suelo. Cuando la transpiración excede la absorción, el contenido relativo de agua³ (CRA) y el volumen celular decrece, determinando la pérdida de la turgencia celular, al mismo tiempo que se incrementa la concentración de solutos en el ámbito de las células generando a su vez, la reducción del potencial osmótico (π) y el potencial agua (ψ); situación que podría ser modificada por ajuste osmótico en aquellas especies que poseen tal mecanismo de defensa (Lawlor y Cornic 2002). Un menor estado de turgencia celular y CRA provoca una disminución de la conductancia estomática y retrasa el crecimiento. En este contexto dos parámetros describen el estado hídrico de la planta: CRA y ψ (Nobel 2009). CRA es fácil de medir y es considerado un sólido indicador del contenido hídrico en situaciones que requieren la comparación de tejidos y especies, debido a que éste “normaliza” el contenido hídrico al reflejar un estado relativo a la condición de máxima turgencia. En este sentido, CRA constituye una medición relativa de los cambios que se generan en el volumen celular, mientras que ψ es la resultante de la presión de turgencia y π , dependiendo tanto de la concentración de solutos como de la rigidez de la pared celular, sin relacionarse de manera directa con el volumen de éstas (Kaiser 1987; Jones 2007).

Estrategias de las plantas para mitigar los daños producidos por la deshidratación

La falta de agua limita el crecimiento y productividad de los cultivos al generar un estado de insuficiencia hídrica en la planta denominado **déficit hídrico** (Jewel *et al.* 2010). Éste puede surgir debido a la presencia de períodos secos inesperados, por disminución de las precipitaciones (en zonas húmedas); o bien, por escasez o ausencia de lluvias por lapsos de tiempo prolongados como resultado del cambio climático (Petit

³ CRA (%) = masa fresca – masa seca / masa fresca saturada – masa seca x 100

et al. 1999). En la actividad agrícola este flagelo repercute fuertemente afectando la fenología, la fijación de carbono, la distribución de asimilados y la reproducción de la planta (Fuad-Hassan *et al.* 2008). En tal escenario, a fin de lograr el sostenimiento de su productividad, la agricultura utiliza cerca del 70% del agua, estimándose que el requerimiento con fines de riego se incrementaría en un 14% para el año 2030 (FAO 2009).

Las especies mesófitas que padecen déficit hídrico, modifican o ajustan su metabolismo celular a las nuevas condiciones impuestas por el estrés. Cuando la regulación es inadecuada y el metabolismo no es ajustado para mantener sus funciones, se desencadenan una serie de daños nocivos que pueden eventualmente ocasionar la muerte del vegetal. La regulación es fuertemente influenciada por la especie y el ambiente; mientras que los cambios metabólicos implican modificaciones bioquímicas, fisiológicas y estructurales (Passioura 2007).

Numerosos factores pueden afectar la respuesta de la planta al estrés hídrico, entre los que se incluyen la duración e intensidad de la situación adversa; como así también la posibilidad de que ésta pueda aclimatarse como resultado de una exposición previa. En la naturaleza las plantas pueden experimentar un estado de deshidratación como consecuencia de un proceso lento y paulatino de disminución hídrica (días, semanas o meses) o bien, éste puede acontecer a través de un proceso rápido y repentino (horas o días). Ante un proceso de desarrollo lento del déficit hídrico, la planta puede evitar la deshidratación acortando su ciclo de vida (un hecho común en cultivos de granos y oleaginosas), o bien maximizando la ganancia de recursos mediante distintos procesos de aclimatación. De presentarse una deshidratación rápida, ésta responde minimizando las pérdidas de agua o desplegando mecanismos de protección metabólica contra los daños deletéreos producidos por la deshidratación y co-desarrollo de estrés oxidativo (Fig. 1.3). Independientemente de la velocidad con que se genere la deshidratación, la respuesta fisiológica dependerá principalmente de la interacción entre el genotipo y el ambiente.

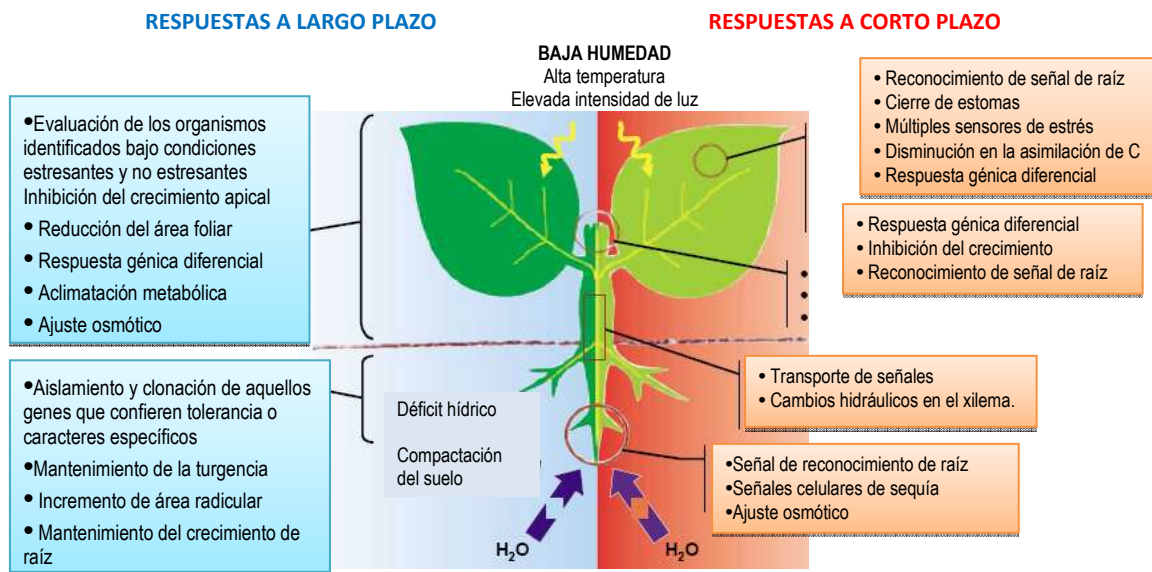


Fig. 1.3: Respuestas de la planta al déficit hídrico. Izquierda, respuestas de largo plazo (aclimatación). Derecha, Respuestas inmediatas o de corto plazo. Tomado de Chaves *et al.* 2003.

Las plantas pueden fortalecer su respuesta a una situación de sequía evitando la deshidratación de sus tejidos a través de mecanismos que permitan mantener tan alto como sea posible el potencial agua, o bien, haciendo uso de diversas estrategias metabólicas que ayuden a soportar una reducción del mismo (Bray 1997). El escape a la deshidratación es un mecanismo que emplean tanto especies anuales como perennes y está asociado a una variedad de caracteres adaptativos que involucran, por un lado, minimizar la pérdida de agua y por el otro, maximizar su absorción. En este sentido, el cierre de estomas (Bell *et al.* 2007), reducción de la absorbancia de luz, incremento de la reflectancia y disminución del área foliar son estrategias que las plantas utilizan para minimizar la pérdida de agua (Chaves *et al.* 2003; Aguirrezabal *et al.* 2006); mientras que la modificación del patrón de crecimiento favoreciendo un mayor desarrollo radicular en desmedro de la parte aérea, constituye el principal recurso para maximizar su absorción (Munns 1993; 2005). La relación del peso seco raíz/parte aérea se incrementa a medida que se intensifica el estrés hídrico en la planta (Tester y Davenport 2003).

Mecanismos de respuestas que se suscitan en el ámbito de las hojas

El cierre de los estomas conjuntamente con la reducción del área foliar constituyen las respuestas más inmediatas que las plantas despliegan ante una situación

de sequía a fin de evitar una pérdida excesiva de agua, la cual podría resultar en una deshidratación celular que, en casos severos, produciría la cavitación del xilema determinando la muerte del vegetal (Comstok 2002). Sin embargo, la apertura estomática tiene un rol preponderante en la refrigeración de la hoja mediante el intercambio del calor latente, siendo este carácter un objeto de selección en el mejoramiento genético de cultivos irrigados que crecen en regiones de climas cálidos (Lu *et al.* 1997). Tanto la apertura como el cierre de los estomas ocurre debido a los cambios de turgencia que experimentan las células oclusivas respecto a las células epidérmicas circundantes a través de un complejo mecanismo bioquímico y molecular resultante de la interacción de ABA/citocininas, pH del xilema y tejido foliar (Schroeder *et al.* 2001; Wilkinson y Davies 2002). Independientemente del mecanismo de percepción y señalización que determina el cierre estomático, muchas plantas muestran una tendencia a incrementar la eficiencia del uso del agua (EUA) cuando el estrés es moderado como resultante de una relación no lineal entre la asimilación de carbono y la conductancia estomática, hecho por el cual, la planta restringe la pérdida de agua sin afectar en demasía la actividad fotosintética (Blum 2005; Taiz y Zeiger 2003). En este contexto, estudios experimentales que analizaron la asimilación de CO₂ en plantas C-3 que soportaban déficit hídrico revelaron que el decrecimiento de CRA empobrece la asimilación neta (A) y decrece la asimilación máxima⁴ (A_{max}). La respuesta de A_{max} con relación a CRA puede suceder de dos maneras distintas, las que reciben el nombre de Tipo 1 y Tipo 2 (Lawlor y Cornic 2002). La respuesta del Tipo 1 consta de dos fases principales, comparativamente distintas. La fase estomática, ocurre con variaciones de CRA entre 100 y 75% y transcurre sin efectos sobre A_{max}; hecho por el cual A puede ser restaurada por enriquecimiento de CO₂. Dado que A_{max} no es afectada, la conductancia estomática regula A mediante la variación de los niveles de CO₂ en el apoplasto y en el cloroplasto. Cuando CRA desciende de 75% se origina una inhibición metabólica que afecta negativamente A_{max}, la cual paulatinamente se torna irreversible a medida que se acentúa la reducción del CRA. Por el contrario, en la respuesta Tipo 2, no se observa con claridad una delimitación de fases. La conductancia estomática y A decrece como en Tipo 1; sin embargo, A_{max} se deteriora progresivamente y sólo es parcialmente incrementada por enriquecimiento de CO₂, cuyo efecto disminuye a medida que

⁴ Asimilación máxima (A_{max}): se define como la máxima tasa de asimilación en condiciones óptima de turgencia celular, saturación de CO₂ y luz.

desciende CRA. Ambas respuestas reflejan un balance entre la sensibilidad de la conductancia estomática y el metabolismo en la regulación de $A_{\max}$ a medida que decrece CRA. Tipo 1 tiene baja conductancia estomática pero mantiene alto $A_{\max}$ hasta que CRA disminuye substancialmente; mientras que en la respuesta Tipo 2, $A_{\max}$ es más sensible al decrecimiento de CRA. En ambos tipos, la causa primaria de la declinación de $A_{\max}$ probablemente lo constituya la limitación de la síntesis de ribulosa bisfosfato carboxilasa (RuBP) causada por una deficiencia de ATP, resultante de la pérdida de la capacidad de síntesis. En ambos casos el transporte de electrones es mantenido en un amplio rango de variación de CRA (Sage *et al.* 2008; Taylor *et al.* 2011). Sin embargo, el decrecimiento de $A_{\max}$ como consecuencia del estrés ambiental causa un exceso de energía radiante que no es utilizada para fotosíntesis y que la planta deberá eliminar a fin de evitar la sobreproducción de especies químicas altamente reactivas que potencialmente pueden producir daños oxidativos que comprometerían la actividad fotosintética (Chaves *et al.* 2003). Los organismos autótrofos cuentan con una variedad de mecanismos directos e indirectos que detectan el excedente de fotones incidentes; entre los cuales se pueden mencionar fotoreceptores (fototropinas, neocromos, fitocromos, rodopsinas y criptocromos), variación del pH en el lumen de los tilacoides, cambios en el estado de oxido-reducción, producción de especies reactivas de oxígeno (ERO's) y acumulación de metabolitos, que inducirán cambios en la expresión génica plasmática y nuclear tendientes a mitigar los daños producidos por la situación adversa (Li *et al.* 2009). A fin de evitar el exceso de luz, las plantas pueden disminuir su absorción mediante la variación del ángulo de las hojas respecto al sol ó eliminación de clorofila; como así también, éstas pueden desviar la luz absorbida por reacciones fotoquímicas a otros procesos tales como disipación térmica (Pastenes *et al.* 2004; Baker 2008). En efectos, es ampliamente aceptado por la comunidad científica el hecho de que la regulación de la fotosíntesis es un proceso altamente dinámico y es modulado en el corto tiempo por la disipación térmica no radiante. Este incremento de la disipación de energía está vinculado (al menos parcialmente) a un incremento paralelo de los niveles de carotenoides fotoprotectores. En este escenario, el proceso mejor caracterizado lo constituye el llamado “ciclo de las xantofilas” consistente en la interconversión dependiente de la luz de tres xantofilas (carotenoides oxigenados): *violaxantina*, *antheraxantina* y *zeaxantina*. Éste constituye una reacción cíclica que involucra una secuencia de des-epoxidación del di-epóxido violaxantina vía el mono-epóxido antheraxantina para formar la zeaxantina (sin grupos epóxidos). El ciclo está

regulado por la luz, ya que la violaxantina se des-epoxida a anteraxantina y zeaxantina en condiciones de alta fluencia de fotones (o en situaciones donde la actividad fotosintética es disminuida por efectos del estrés); mientras que en oscuridad (o cuando el factor de estrés es removido), la zeaxantina es epoxidada nuevamente a violaxantina (Demming Adams y Adams 1996; Nelson y Yocum 2006). En adición, otros procesos tendrían funciones significativas de fotoprotección y estabilización entre los que se incluyen las propiedades antioxidantes de α -tocoferol como componente constitutivo de la matriz lipídica de las membranas de los tilacoides (Li *et al.* 2009). Cuando en condiciones de déficit hídrico, el uso de la luz absorbida ya sea en fotosíntesis o en fotorespiración y la disipación térmica no resulta suficiente para retener el exceso de energía, los electrones en estado altamente excitados son transferidos al oxígeno molecular (O_2) determinando la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO's), tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ion superóxido (O_2^-), radicales oxidrilos ($HO^\cdot$) y singulete (1O_2), todas las cuales son altamente tóxicas pudiendo ocasionar daños oxidativos a proteínas, ADN y lípidos (Miller *et al.* 2010). Ante esta situación, la planta cuenta con una serie de moléculas antioxidantes y enzimas, ubicadas en distintos compartimentos celulares, las que actúan como depuradores de ERO's. Éstas incluyen superóxido dismutasas (SOD's), las cuales catalizan la dismutación de superóxido en O_2 y H_2O_2 ; las catalasas (CAT's), las cuales son responsables de la remoción de H_2O_2 y las enzimas y los metabolitos del ciclo de ascorbato-glutación, los cuales también se encuentran involucrados en la remoción de H_2O_2 (Schwanz y Polle 2001; Gill y Tuteja 2010a; Miller *et al.* 2010). La actividad antioxidante es altamente dependiente del grado de severidad con que se manifiesta el estrés, como así también, del genotipo y el estado de desarrollo. La aclimatación de las plantas a la sequía está generalmente asociada al incremento en la actividad de enzimas antioxidantes que mantienen la concentración de ERO's en niveles relativamente bajos (Mittler *et al.* 2004). A pesar de que ante un estrés ambiental, un incremento de ERO's puede ocasionar daños oxidativos en el ámbito de las células, estudios recientes demostraron que éstas tendrían un rol protagónico en la traducción de la señal en respuesta a la infección de patógenos, estreses abióticos, muerte celular programada y diferentes estímulos de desarrollo (Suzuki y Mittler 2006, Gill y Tuteja 2010a, Miller *et al.* 2010).

3. Respuestas fisiológicas y bioquímicas al estrés salino

Salinidad de los suelos

En el mundo existen cerca de 800 millones de hectáreas (6% de la superficie terrestre) que, debido al origen de sus suelos, contienen altas concentraciones de sales que afectan el crecimiento y desarrollo de los cultivos (FAO 2005). Asimismo, alrededor de 32 millones de hectáreas son afectadas por salinidad secundaria o de origen antrópico representando aproximadamente el 2% de la superficie destinada a la actividad agrícola de secano (Munns y Tester 2008); a la vez que el 20% de la superficie irrigada (aproximadamente 45 millones de hectáreas) manifiestan problemas de salinidad. En términos cuantitativos, Argentina ocupa el tercer puesto en el ranking de países con problemas de salinidad (FAO 2006). En este escenario, la planicie Chacopampeana presenta cerca de 20 millones de hectáreas afectadas ya sea por salinidad y/o alcalinidad (por causas naturales y antrópicas) y exceso de agua. Asimismo, unas 600.000 ha irrigadas se consideran afectadas por sales; por lo que tomando en consideración el hecho de que el 10% de las tierras agrícolas pertenecen a regiones áridas y semiáridas, es decir, no son aptas para agricultura, un manejo inadecuado de las técnicas de cultivo, principalmente riego, determinaría un proceso de salinización con graves consecuencias en la producción (Taboada y Lavado 2009).

Los suelos normalmente contienen sales solubles que aportan nutrientes minerales a las raíces y, debido a su baja concentración, éstas no afectan sus propiedades químicas y físicas. Por el contrario, en los suelos perturbados por sales, éstas afectan negativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas, a la vez que alteran sus propiedades. Entre los cationes predominantes en condiciones salinas se encuentran el sodio (Na^+), el calcio (Ca^{2+}) y el magnesio (Mg^{2+}); mientras que los aniones cloruros (Cl^-), sulfatos (SO_4^{2-}) predominan en los llamados *suelos salinos*, y carbonatos (CO_3^{2-}) y bicarbonatos (HCO_3^-) en los *suelos alcalinos* (Läuchli y Grattan 2007). Éstos últimos a su vez son clasificados de acuerdo a la proporción de sodio intercambiable (PSI), por lo cual también se los denominan *suelos sódicos*. Posiblemente el problema más común lo constituyan aquellos suelos que contienen sales solubles y sodio intercambiable llamados *suelos salinos-sódicos*. En la Tabla 1.1 se resume las principales características de las clases antes mencionadas. En términos agronómicos, la salinidad del agua o del suelo se mide ya sea por conductividad eléctrica o bien, a través de la determinación del potencial osmótico. Cuanto mayor es la

concentración de sales, mayor es la conductividad eléctrica y menor el potencial osmótico de la solución (Taiz y Zeiger 2003).

Tabla 1.1: Clasificación de suelos según su conductividad eléctrica (CE), pH y proporción de sodio intercambiable (PSI).

Grupo de suelos	CE (ds/m)	pH	PSI	Descripción	Efecto sobre el crecimiento de las plantas
No sódicos, no salinos	< 4*	< 8,5	< 15	Muchos cultivos son afectados por una menor CE.	
Salinos	> 4	< 8,5	< 15	La CE podría reducir el rinde de cultivos. Sin embargo, muchos cultivos son afectados con menor CE.	Componentes iónicos y osmóticos inhiben el crecimiento de raíces y ápices.
Sódicos	< 4	> 8,5	> 15	El PSI afecta la estructura del suelo. Presenta un elevado pH debido a la presencia de carbonatos.	Pobre estructura del suelo inhibe crecimiento de raíces. El elevado pH afecta el ingreso de nutrientes.
Salinos-sódicos	> 4	> 8,5	> 15		

* El valor de 4 dS/m se considera equivalente a 40 mM NaCl y genera una presión osmótica de 0,2 MPa. Fuentes: Black *et al.* 1975, Munns 2005.

Los suelos salinos se caracterizan por tener una condición física normal, buena permeabilidad y buena estructura; sin embargo, éstos evidencian un desbalance nutricional, un potencial hídrico muy bajo, exceso de algunos iones y una elevada conductividad eléctrica que afectan negativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas. Por su parte, en los suelos sódicos la presencia de un alto contenido iónico determina la dispersión del complejo coloidal alterando su estructura por movilización de partículas y obstrucción de poros, disminuyendo la permeabilidad y la conductividad hidráulica (Allison *et al.* 1970, Black *et al.* 1975, Taboada y Lavado 2009). Ambos tipos de suelos se encuentran asociados en muchos casos, ya que el sodio se encuentra presente provocando diferentes efectos negativos tanto en el ámbito de las plantas como del suelo (Taiz y Zeiger 2003, Lavado y Taboada 2009).

El incremento de sales en los suelos se produce mediante un proceso de *salinización primaria* debido a causas naturales (origen geomorfológico) o en su defecto, es provocado por una *salinización secundaria* como consecuencia de una actividad agrícola inadecuada. En el primer caso, el incremento de sales puede tener un origen superficial siendo transportada por viento y precipitaciones en zonas cercanas al mar, donde el agua de lluvia, que se genera por evaporación de los océanos, contiene entre 6 y 50 ppm NaCl (Munns y Tester 2008); asimismo, en regiones áridas y semiáridas debido a las escasas precipitaciones, las sales del suelo no son lavadas, a la vez que la intensa evaporación tiende a concentrarlas en superficie dando origen a la desertificación. Por otro lado, inundaciones con agua salitrosa y/o presencia de alguna barrera física o planicies que impide el normal escurrimiento del agua hacia ríos y lagos, incrementan la salinización en las zonas bajas (Jobbágy *et al.* 2008). De la misma forma, el ascenso de agua subterránea constituye un factor cuantitativamente importante en el proceso de salinización primaria en extensas áreas de nuestro país (Allison *et al.* 1970; Black *et al.* 1975; Taboada y Lavado 2009), pudiendo acaecer tanto en regiones semiáridas como húmedas. En estas últimas se encuentran varios millones de hectáreas cubiertas por suelos halomórficos asociados a grandes planicies con pendientes menores a 0,1% y con capas freáticas cercana a la superficie del suelo (Carol *et al.* 2009). En este escenario, la **Llanura Pampeana** debido a sus características geográficas y edáficas, presenta una considerable proporción de su superficie afectada por encharcamientos periódicos y salinización. En algunas zonas de la Pampa Interior o arenosa (Hapludoles), el agua se mantiene lejos de la superficie en los suelos profundos, mientras que donde el relieve es ondulado, la capa freática se aproxima a la superficie generando problemas de salinización y exceso de sodio intercambiable en los suelos. En la región norte de la Pampa Deprimida, la presencia o ausencia de un horizonte Bt nátrico⁵ en el perfil del suelo y el tipo de inundación (agua de lluvia o napas subterráneas), afectan la capacidad de uso de los suelos. En presencia de un Bt nátrico, las sales no ascienden a la superficie quedando atrapadas en el horizonte Bt, por lo que el somero horizonte A es fértil (suelos del tipo Natracuol); debiéndose aplicar técnicas culturales que eviten mezclar los horizontes (Taboada y Lavado 2009). Los suelos de la zona centro se caracterizan por ser no salinos y no sódicos, aunque son susceptibles de sufrir salinización durante la temporada de lluvias debido al ascenso de la napa freática,

⁵ Horizonte Bt nátrico: Horizonte subsuperficial enriquecido de arcillas que posee alto contenido de Na⁺.

pudiendo alcanzar una conductibilidad eléctrica de 30 dS/m. Finalmente, la región sur debido a la presencia de sulfatos y cloruros presenta salinización temporaria y sodificación moderada (Taboada y Lavado 2009).

El proceso de *salinización secundaria* se produce en las regiones del **Bosque Chaqueño** y del **Espinal**. Éstas se caracterizan por ser bosques secos en donde el intercambio gaseoso generado principalmente por el estrato arbóreo disminuye drásticamente el contenido de agua de las napas dificultando su recarga, manteniendo niveles freáticos profundos a la vez que su cobertura reduce el escurrimiento superficial. Al ser reemplazados por pastizales o cultivos anuales, se altera el equilibrio hídrico del perfil edáfico afectando su fertilidad y contenido de sales y concomitantemente favorece la expansión del área salinizada por un mayor escurrimiento superficial del agua (Jobbagy *et al.* 2008).

Independientemente del proceso mediante el cual se incrementó el contenido de sales, la combinación de efectos salinos e inundación son frecuentes en las áreas afectadas por este flagelo. En tales condiciones, con suelos pobremente drenados se dificulta la difusión de oxígeno a las raíces limitando la respiración y el crecimiento de la planta. Asimismo, nutrientes tales como nitratos, sulfatos, hierro y manganeso se encuentran en un estado químico reducido decreciendo su disponibilidad para la planta a la vez que es interrumpido el transporte selectivo de iones (Drew *et al.* 1988).

Crecimiento y desarrollo de las plantas en condiciones de salinidad

La salinidad afecta negativamente a las plantas por efectos osmóticos, toxicidad de iones específicos y/o desórdenes nutricionales. El grado de incidencia de cada uno dependerá a su vez de otros muchos factores tales como especie, genotipo, edad de la planta, fuerza iónica, composición de la solución salinizante y del órgano en cuestión (Läuchli y Grattan 2007).

Las plantas experimentan cambios característicos desde el momento en que sufren la imposición del estrés hasta que alcanzan su madurez. Munns (2002) describe estos cambios en función de distintas escalas de tiempo del crecimiento y desarrollo de la planta. Momentos luego de la salinización, las células se deshidratan y contraen pero mantienen su volumen original por muchas horas. Sin embargo, la disminución del período de división celular acompañado de una menor expansión de las células resultantes determina una menor tasa de crecimiento de hojas y raíces. Pocos días después, la reducción de división y expansión celular se traduce en un retraso en la

aparición de las hojas y disminución del área foliar. Las plantas que son severamente afectadas por el estrés presentan además lesiones visibles debido a la absorción excesiva de sales. Luego de varias semanas de imposición, puede verse afectado el crecimiento de ramas laterales y trascurrido algunos meses puede comprobarse un claro efecto negativo en el crecimiento general de la planta estresada respecto del control no estresado. Basado en estas diferencias temporales de respuesta a salinidad, Munns (1993; 2002; 2008) desarrolló el concepto de **respuesta bifásica a salinidad** (Fig. 1.4). La **primera fase** de reducción del crecimiento ocurre rápidamente (en minutos) luego de la exposición a salinidad. Esta respuesta es inducida por los cambios osmóticos que se originan en el exterior de la raíz afectando las relaciones hídricas de las células. El efecto osmótico que se genera inicialmente reduce la habilidad de la planta para absorber agua. Este efecto es similar al estrés hídrico y presenta pocas diferencias genotípicas. Varios minutos después de la desaceleración de la expansión foliar se manifiesta una recuperación de la tasa de crecimiento hasta alcanzar un nuevo estado cuya magnitud dependerá de la concentración de sales en la solución del suelo (Munns 2002; Tester y Davenport 2003; Munns y Tester 2008). La **segunda fase** transcurre de una manera más lenta requiriendo de días, semanas o meses y se origina como consecuencia de la acumulación de sales en las hojas. Esta toxicidad puede causar la muerte de tales órganos reduciendo el área foliar fotosintéticamente activa; hecho por el cual, disminuye el suministro de fotosintatos a la planta en detrimento del balance de carbono necesario para mantener el crecimiento. La fitotoxicidad ocurre primero en las hojas más viejas debido al incremento de Na^+ y Cl^- por efecto de la transpiración. Probablemente los daños tisulares y la muerte de las hojas se deban a una elevada concentración de sales que supera la capacidad de compartimentalización en las vacuolas, hecho por el cual el contenido de éstas en el citoplasma se eleva a niveles tóxicos (Munns y Termaat 1986, Munns 2002, 2005, Munns *et al.* 2006). La velocidad con que se produce la muerte de las hojas y en consecuencia la reducción del área fotosintética determinará la sobrevivencia de la planta. Si la formación de nuevas hojas supera a la tasa de abscisión, desarrollará una superficie fotosintética que le permitirá florecer y producir semillas a pesar de que se reduzca el número de hojas. Si por el contrario, la muerte de hojas maduras supera a la tasa de formación de nuevas hojas, la planta no sobrevivirá el tiempo suficiente para suministrar fotosintatos a los órganos reproductivos y producir semillas viables.

Basados en el concepto bifásico, la reducción inicial del crecimiento tanto en genotipos sensibles como en aquellos tolerantes, es causado por un efecto osmótico debido a la alta concentración de sales en la zona radicular. En contraste, en la segunda fase, los genotipos sensibles difieren de aquellos tolerantes por su inhabilidad de prevenir o evitar la acumulación excesiva de sales en las hojas con un intercambio gaseoso activo (Munns *et al.* 2006, Munns y Tester 2008). Si bien, Munns propone en su modelo bifásico el desarrollo de las fases de manera secuencial en el tiempo y que éste ha sido validado en diversas especies vegetales, la expresión diferencial de ciertos genes en respuesta a la toxicidad iónica en etapas tempranas estaría indicando que la fase ion-específica inicia junto con la primera etapa, no encontrándose ésta desplazada en el tiempo (Rajendran *et al.* 2009; Taleisnik *et al.* 2009).

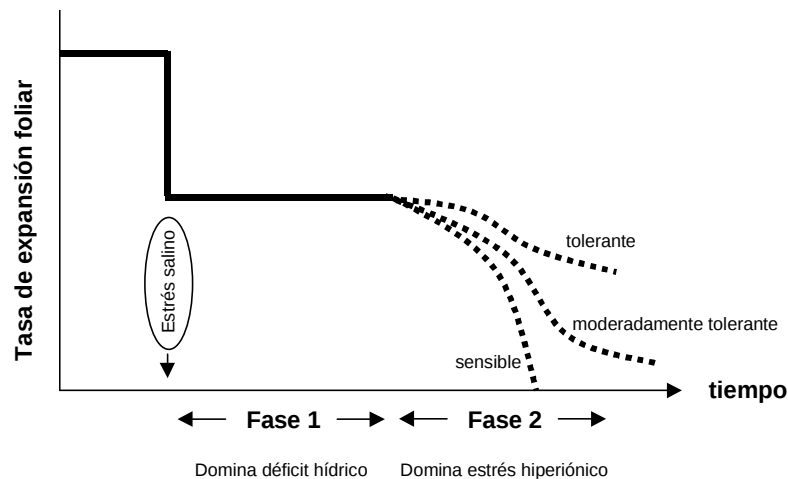


Fig. 1.4: Ilustración esquemática del modelo de crecimiento bifásico en respuesta a salinidad de distintos genotipos que difieren en la velocidad en la cual la concentración de sales alcanzan niveles tóxicos en las hojas. Tomado de Munns 1993.

En adición, es ampliamente aceptado por la comunidad científica en general el hecho de que, la sensibilidad de un determinado cultivo a la condición de salinidad, varía de un estado fenológico a otro. En este contexto, la mayoría de los cultivos anuales presentan mayor tolerancia durante la germinación de sus semillas, siendo más sensibles en el momento de la emergencia de la plántula y etapas tempranas del desarrollo vegetativo. A medida que avanza su madurez, éstas adquieren una mayor tolerancia, especialmente en los últimos estados del desarrollo (Taiz y Zeiger 2003; Flowers 2004). Si bien, esta aseveración es irrefutable en términos generales, cabe

destacar el hecho de que el concepto de tolerancia difiere en cada estado fenológico. Durante la germinación y emergencia, la tolerancia está basada en el porcentaje de sobrevivencia, mientras que en los estados fenológicos tardíos, ésta usualmente se fundamenta en la reducción del crecimiento relativo (Läuchli y Grattan 2007). La salinidad afecta tanto el desarrollo vegetativo como reproductivo y su grado de implicancia dependerá del tipo de órgano y del producto cosechado (tallo, hoja, raíz, brote, fibra o grano); favorece el crecimiento radicular en desmedro de la parte aérea y a la vez puede reducir el número de flores, incrementar su esterilidad y/o modificar el periodo tanto de floración, fructificación como de maduración.

Estrategias de las plantas para mitigar los daños producidos por estrés salino

La salinidad afecta negativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas de dos maneras. Por un lado, la elevada concentración de sales en el suelo dificulta la absorción de agua por las raíces y por el otro, el incremento del contenido de sales en la planta que ingresa en la solución acuosa resulta tóxico a la misma. En tal escenario, la adaptación de la planta a la situación adversa se basa en tres mecanismos distintos: tolerancia al estrés osmótico, exclusión de Na^+ y Cl^- y tolerancia del organismo a la acumulación de tales iones (Munns y Tester 2008; Jha *et al.* 2010).

Tolerancia al estrés osmótico.

El estrés osmótico inmediatamente reduce la expansión celular en ápices radiculares y hojas jóvenes e induce el cierre de estomas. Si bien, el incremento rápido de la salinidad edáfica puede ocasionar un estado de deshidratación celular en el ámbito de las hojas, la pérdida de turgencia y expansión es transitoria, recuperándose luego de unas horas mediante el mecanismo de ajuste osmótico (Fricke y Peters 2002; Passioura y Munns 2000; Munns y Tester 2008). No obstante, una menor división y expansión celular retrasará la formación de las hojas y el tamaño final de las mismas (Taleisnik *et al.* 2009). Además, la salinidad puede afectar el proceso reproductivo alterando la floración. Todos estos cambios producidos por el estrés osmótico son similares a aquellos producidos por sequía. El mecanismo que regula el crecimiento de hojas y tallos en condiciones de estrés aún no ha sido esclarecido en su totalidad.

La reducción del crecimiento foliar podría ser dirigido por un mecanismo de señalización a larga distancia donde probablemente participen hormonas o sus precursores dado que tal modificación es independiente del abastecimiento de carbohidratos y del contenido hídrico (Munns *et al.* 2000; Fricke y Peters 2002) sucediendo aún, en ausencia de una deficiencia de nutrientes y toxicidad iónica (Hu *et al.* 2007). Si bien, el ABA tiene un rol preponderante en la señalización raíz-parte aérea en situaciones de estrés hídrico, mediciones del contenido endógeno en hojas de cebada y maíz en condiciones de estrés salino no avala tal teoría (Fricke *et al.* 2004). Del mismo modo, mutantes ABA-deficientes en maíz y tomate presentan idéntica tasa de crecimiento foliar comparados con la planta normal en suelos secos y salinos (Mäkelä *et al.* 2003; Voisin *et al.* 2006), lo cual estaría indicando la concurrencia de otro factor limitante. Al respecto, las giberelinas (GAs) podrían estar involucradas. ABA inhibe la elongación de hojas de cebada por disminución del contenido endógeno de GAs (Munns y Tester 2008). En adición, una serie de evidencias demuestran que las proteínas DELLA, una clase de reguladores negativos del crecimiento, median la acción promotora de GAs en numerosas especies e integran la señal de un rango de hormonas en condiciones de estrés abiótico (Hussain y Peng 2003; Achard *et al.* 2006).

La salinidad afecta inmediatamente la conductancia estomática cuya respuesta es regulada por señalización radicular de manera similar al mecanismo que se concatena ante la señal de sequía edáfica (Davies *et al.* 2005). Sin embargo, la tasa fotosintética por unidad de área foliar permanece invariable debido a los cambios anatómicos que se suscitan en las hojas, brindando una lámina más pequeña, de mayor espesor y con una mayor densidad de cloroplastos. En condiciones extremas, el contenido de sales en hojas pueden alcanzar niveles excesivos desconociéndose aún cómo éstas ejercen su acción tóxica. El contenido de sales puede aumentar en el apoplasto y provocar la deshidratación de la célula, puede incrementarse en el citoplasma e inhibir la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos o puede aumentar en cloroplastos y ejercer un efecto tóxico directamente en la fotosíntesis (Munns y Tester 2008). Por otro lado, una reducción de la actividad fotosintética puede

provocar la formación de ERO's e incrementar la actividad de enzimas depuradoras de tales especies para prevenir el daño oxidativo a los fotosistemas.

Tolerancia al estrés iónico

La sintomatología producida por el exceso de Na^+ se manifiesta en las hojas maduras comenzando con una necrosis distal que se extiende por todo el órgano. La reducción del crecimiento y del rendimiento ocurre como resultado del acortamiento de la vida útil de cada hoja (Munns 1993). El periodo de tiempo que transcurre hasta la aparición de esta sintomatología característica depende de la tasa de acumulación de Na^+ en hojas y de la efectividad de su compartimentalización en el ámbito de células y tejidos (Tester y Davenport 2003). Asimismo, otros efectos deletéreos pueden estar relacionados con la deficiencia de otros nutrientes o de la interacción con otros factores ambientales, tales como sequía, que exacerban su toxicidad. La primera situación puede ocurrir debido a que la excesiva concentración de Na^+ interrumpe la asimilación de nutrientes de manera directa por interferencia de los transportadores a nivel de la membrana plasmática en raíz (tales como canales iónicos selectivos de K^+), por inhibición del crecimiento de la raíz debido a efectos osmóticos, o bien, su efecto se produce de manera indirecta a causa del deterioro que sufre la estructura del suelo (Taiz y Zeiger 2003; Jha *et al.* 2010).

La acumulación de Na^+ puede acarrear una serie de problemas osmóticos y metabólicos a la planta, siendo las hojas más vulnerables que las raíces. Estas últimas mantienen prácticamente constante los niveles de NaCl en función del tiempo, regulando mediante su exportación al suelo o a la parte aérea. El Na^+ es transportado a través del xilema favorecido por el flujo transpiratorio, existiendo evidencias de que su transporte tiene un sentido unidireccional siendo muy difícil el retorno a la raíz por floema, hecho por el cual se produce su acumulación progresiva en las hojas más viejas (Tester y Davenport 2003). La toxicidad metabólica de Na^+ es la resultante de la competencia con K^+ en muchas funciones celulares esenciales para el organismo (Rodríguez-Navarro y Rubio 2006). Altos niveles de Na^+ o una relación $\text{Na}^+:\text{K}^+$ elevada puede interrumpir varios procesos enzimáticos en el citoplasma (Yao *et al.* 2010). De hecho, la biosíntesis de proteínas precisa de altas concentraciones de K^+ debido al requerimiento de este ión para la unión del ARNt al ribosoma durante el

proceso de traducción del mensaje genético (Blaha *et al.* 2000, Jha *et al.* 2010). Por otro lado, una elevada concentración de Na^+ en el apoplasto puede ocasionar la deshidratación celular, a la vez que un nivel iónico excesivo en éstas puede originar otros problemas osmóticos en el sentido de que la planta necesita mantener un potencial agua más bajo que el suelo para mantener su turgencia y la absorción de agua; en tales circunstancias el ajuste osmótico requerido podría obtenerse a través de la absorción de solutos a partir de la solución del suelo; o bien, mediante la síntesis de osmolitos compatibles (Tester y Davenport 2003). Finalmente, los altos niveles de Na^+ causan el desbalance iónico disparando una excesiva producción de ERO's resultando en muerte celular (Zhou *et al.* 2007).

El mantenimiento de la homeostasis iónica en las plantas es un factor crítico para mitigar los daños provocados por altas concentraciones de NaCl. La habilidad que éstas presentan para crecer en tales condiciones se relaciona directamente con su capacidad para transportar, secuestrar, movilizar y extraer Na^+ (Blumwald *et al.* 2000). La tasa de influjo y eflujo en raíz establece el estado real de la entrada de Na^+ a la planta, mientras que su compartimentalización en vacuolas y el transporte radial a la estela y de allí su derrame al xilema, establece el control homeostático de Na^+ en el citoplasma de las células radicales. La remoción del Na^+ por la corriente transpiratoria, su distribución a través de la planta y su progresivo acopio en vacuolas determinará su habilidad para contrarrestar los efectos nocivos de la presencia excesiva de Na^+ (Apse y Blumwald 2007).

Estudios sobre regulación de genes han sugerido que varias ATPasas, acuaporinas y transportadores iónicos son regulados por el estrés salino tanto a nivel de transcripción como de traducción génica. El papel de varios de los transportadores iónicos en las plantas tolerantes a salinidad, ha sido un punto de mucha atención durante los últimos tiempos, evidenciándose notables avances en la caracterización de los transportadores iónicos y de la evaluación funcional de los mismos en la tolerancia a este estrés (Rodriguez-Navarro y Rubio 2006, Blumwald *et al.* 2000, Apse y Blumwald 2007, Zhang *et al.* 2008, Jha *et al.* 2010, Kronzucker y Britos 2011).

Bajo condiciones salinas, la *limitación de la absorción de Na^+* podría ser la primer línea de defensa impidiendo la acumulación del ión en la planta. Sin embargo, la similitud que presenta el ion Na^+ con respecto al K^+ favorece su

ingreso a las células. En tal escenario, la tasa de influjo de Na^+ en raíz se lleva a cabo por medio de un “*by pass* apoplástico”, de los canales de cationes no selectivos (NSCCs) y de los transportadores que responden a cambios en el potencial eléctrico de membrana o a ciertos estímulos físicos y ligandos. Se destacan los canales catiónicos independientes al voltaje (VI-NSCCs) y sus subclases CNGCs, AAG-NSCCs y ERO-NSCCs. Como su nombre lo sugiere, los VI-NSCCs no poseen una selectividad específica en el influjo de cationes y parecerían seguir un patrón de permeabilidad relativa entre los distintos cationes que podría responder a la relación $\text{Na}^+:\text{K}^+$ de 0,3:3. Sin embargo, las subclases se encuentran predominantemente relacionadas con el transporte de Ca^{2+} (Kronzucker y Britos 2011). También los CNGCs controlan la homeostasis iónica mediante la señalización por Ca^{2+} (Shi 2007).

Otras vías posibles en el ingreso de Na^+ son los transportadores de K^+ como ser las familias KUP/HAK/KT, AKT y HKT; y los transportadores del tipo CCCs (simporte Cl^-/Na^+) y LCT1 ubicados en las raíces vegetales. El LCT1 contribuye al ingreso de K^+ y Ca^{2+} conjuntamente con los NSCCs. Parecería que existen varias vías sensibles al Ca^{2+} que permiten el influjo del ión monovalente. Altas concentraciones de Ca^{2+} externo reduce el ingreso de Na^+ en canales y transportadores LCT1. El transportador HKT1 se caracteriza por la absorción del Na^+ preferentemente, a diferencia del HKT2 que posee alta afinidad en el ingreso de K^+ y que bajo condiciones salinas limita su expresión, acotando el ingreso de Na^+ . Sin embargo, el mecanismo principal del HKT1 es regular el movimiento del Na^+ desde raíces a la parte aérea, redistribución en ápices, recirculación y eliminación en el xilema (extrusión de iones) debido a su localización en células del floema y del parénquima xilemático. La **extrusión de iones** puede no ser una estrategia de tolerancia muy viable, dado que la acumulación de iones en el apoplasto impone un estrés hiperosmótico sobre el protoplasto. Sin embargo, es un mecanismo destacable cuando son considerados los fenómenos de redistribución de iones a nivel de planta entera.

El mecanismo de **compartimentalización en vacuolas** se logra a través de anti-transportadores Na^+/H^+ del tipo NHX localizados en el tonoplasto, acoplando el movimiento de Na^+ hacia dentro de vacuolas (en contra del gradiente de concentración) con el de H^+ hacia afuera, a favor del gradiente electroquímico generado por H^+ -ATPasas y H^+ -PPiase (AVP). El gen de NHX se expresa en

raíces, hojas y tejidos florales. Su sobre-expresión confiere tolerancia a sales a diversas especies vegetales (Kronzucker y Britos 2011).

Ante situaciones de altas concentraciones de Na^+ , la planta inicia la transducción de señales que le permite activar un conjunto de genes de respuesta al estrés donde interviene una plétora de proteínas. Cabe destacar la vía de señalización iónico-específica SOS (en inglés, *salt overlay sensitive*), que responde a cambios en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático, descrita en *A. thaliana*. SOS3 es una proteína unida a un grupo miristoil que se une al Ca^{2+} (en inglés, *calcineurin-like myristoylated calcium binding proteína, CBLs*) y, que interacciona directamente con SOS2, una serin/treonin-protein-quinasa (CIPK), la cual una vez activada adicionaría fósforo a las proteínas “blancos” tales como SOS1 (un antitransportador Na^+/H^+ de membrana plasmática), NHX (antitransportador Na^+/H^+ del tonoplasto), AKT1, HKT1 y en aquellas involucradas en la regulación metabólica del ABA, promoviendo el intercambio y eflujo de Na^+ (Shi 2007; Zhou 2007). La activación de SOS5, SOS4, SOS3, SOS2 y SOS1 es inducida por el estrés hiperiónico, pero no por el estrés hiperosmótico, y las mutantes correspondientes en estos genes son hipersensibles a la salinidad y a la deficiencia de K^+ . SOS4 se encuentra relacionada a la biosíntesis de vitamina B6 y al desarrollo de los pelos radiculares, mientras que SOS5 es un proteoglicano presente en células esenciales para la expansión y el crecimiento de la raíz bajo condiciones salinas. Debido a la distribución de SOS1 en las células meristemáticas de las raíces, se le atribuye la protección de la zona de elongación, debido a que dichas células carecen de vacuolas y, por lo tanto de NHX1. Además, su distribución a lo largo de los haces vasculares le proporciona un rol importante en la homeostasis y distribución del Na^+ desde las raíces a la parte aérea; desde las raíces al medio externo y de la recirculación del Na^+ en la parte aérea (Fig. 1.5, Kronzucker y Britos 2011).

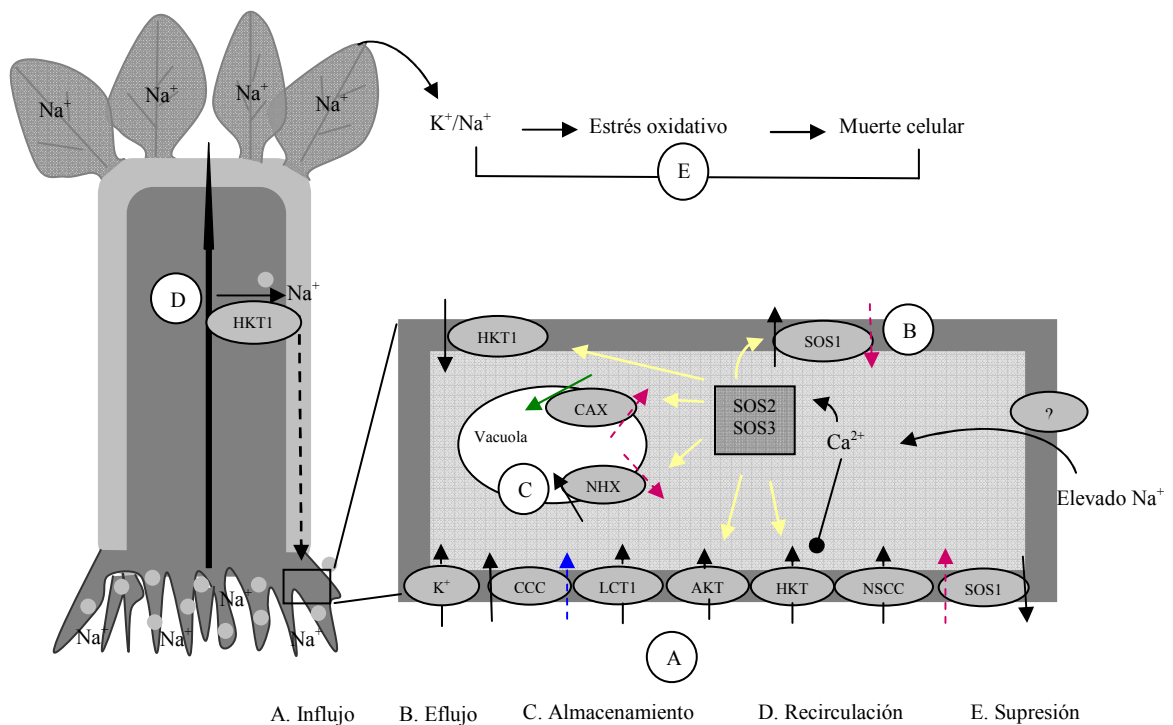


Fig. 1.5: Genes involucrados en la red de respuestas al estrés salino. Cinco grandes procesos fisiológicos en la tolerancia al estrés (A – E). Señalizaciones de Ca²⁺ y SOS2/SOS3 (flechas amarillas) median múltiples respuestas. Flechas negras indican la dirección del flujo de Na⁺, flechas rosadas discontinuas la dirección del flujo de H⁺, flecha verde indica el flujo de Ca²⁺. Modificado de Zhou *et al.* 2007 y Kronzucker y Britos 2011).

4. Respuestas fisiológicas y bioquímicas al estrés por bajas temperaturas

Generación del daño por frío

Si bien, sequía constituye uno de los principales factores que limitan el crecimiento de los cultivos, las bajas temperaturas restringen la distribución geográfica de las plantas en el planeta. El frío puede afectar a las plantas al menos de dos maneras. Por un lado, puede causar diversos daños por **enfriamiento** (*chilling*), los cuales se manifiestan a bajas temperaturas, pero superiores al punto de congelamiento. Su intensidad y duración ocasionan distintos grados de daño, siendo importante además, la interacción de ambos factores incidentes dado que los efectos adversos provocados por un período largo de frío en baja intensidad, resultaría similar a aquellos producidos en un periodo corto con alta intensidad (Schulze *et al.* 2002). Las especies que presentan mayor susceptibilidad son aquellas que, al habitar las regiones tropicales o subtropicales, están adaptadas genéticamente a un rango de temperaturas de entre 15°C y 40°C. En el caso de que la acción de éstas no llegue a ser letal para el organismo, el

estrés es considerado reversible, cuya exposición al mismo serviría para aclimatar las plantas a tales condiciones. De hecho, prácticas agronómicas tales como la exposición previa a bajas temperaturas durante un determinado período de tiempo, utilizándose un descenso gradual de la misma (Taiz y Zeiger 2003), o la aplicación de un tratamiento con ABA (Alet 2008; Langridge *et al.* 2006) son ocasionalmente empleadas a fin de minimizar daños e incrementar la tolerancia a este tipo de estrés. Ahora bien, cuando las temperaturas son inferiores al punto de congelamiento del agua, se produce el segundo tipo de daño, considerado estrés por **congelamiento**, el cual incluye un componente sequía además del componente frío, debido a la deshidratación que sufren las células y tejidos a causa de la cristalización del agua en las células y espacios intercelulares (Beck *et al.* 2007).

Los daños resultantes por **enfriamiento** determinan un lento crecimiento y desarrollo debido a una menor actividad metabólica y disminución de la respiración por desactivación de enzimas mitocondriales (Fitter y Hay 2002). Genera síntomas característicos tales como decoloración o lesiones sobre las hojas u otros órganos, los que manifiestan diferentes grados de susceptibilidad al daño. Ciertos estados del desarrollo de una planta son también particularmente sensibles al frío, se producen disrupciones fisiológicas en la germinación, florecimiento y desarrollo del fruto, rendimiento y vida de almacenamiento, considerándose la maduración del polen como uno de los estados más sensibles (Taiz y Zeiger 2003). El tamaño de las hojas en plantas de maíz fue afectado por una mayor duración del ciclo celular debido a una diferencial expresión de inhibidores del tipo *Cyclin-dependent Kinase Inhibitors* (CKIs) que se encargan de inhibir ciertas enzimas fosfotransferasas (quinasas) que regulan el ciclo celular (Taleisnik *et al.* 2009). En el ámbito de las células se produce el espesamiento de las membranas debido a que varía el estado de agregación de los lípidos que la componen (cristalización), cuya alteración física puede ocasionar la pérdida de función o una mayor permeabilidad permitiendo el ingreso y salida de iones dificultando el mantenimiento del gradiente de concentración debido al trastorno de canales, proteínas de membrana, H-ATPasas que regulan el transporte de iones (Uemura *et al.* 1995, Verslues *et al.* 2006). Por su parte, el aparato fotosintético también sufre daños debido a que el lento metabolismo ante elevadas intensidades de luz produce sobrecargas a nivel de los tilacoides inhibiendo el fotosistema II, por lo cual se produce un desequilibrio en el flujo de electrones estimulándose la producción de ERO's (Beck *et al.* 2007), a la vez que se inhibe la síntesis de sacarosa en el citosol, acumulándose varios intermediarios

de la ruta biosintética (Ruelland *et al.* 2009). De hecho, ante tal situación, las especies sensibles al frío disminuyen su actividad fotosintética en un 40% (Beck *et al.* 2007). Finalmente, por disminución de la actividad de la enzima sacarosa fosfato sintasa (SPS), se produce un desequilibrio del ritmo circadiano (Schulze *et al.* 2002). Por otro lado, en el caso de que las bajas temperaturas congelen el agua presente en el suelo, disminuye su disponibilidad para la planta generando un estrés secundario por deshidratación del organismo (Schulze *et al.* 2002).

El daño por **congelamiento** es causado por la formación de hielo dentro y/o alrededor de las células. El congelamiento extracelular ocurre cuando el descenso de la temperatura es lento y supera el punto de nucleación, las células se contraen debido a la formación de hielo que comienza en los vasos del xilema expandiéndose hacia cavidades sub-estomáticas y espacios intercelulares produciendo el desplazamiento del aire contenido. El hielo formado no ingresa al interior de las células y generalmente no resulta letal en las especies aclimatadas u originarias de regiones frías; sin embargo, el crecimiento de los cristales extracelulares disminuye el potencial agua en el apoplasto incitando el movimiento del agua hacia el mismo hasta alcanzar un nuevo equilibrio lo cual provoca una deshidratación excesiva de las células (Taiz y Zeiger 2003, Verslues *et al.* 2006, Walker *et al.* 2008). En consecuencia, disminuye el tamaño del citoplasma a la vez que se incrementa la concentración de solutos presentes en el mismo. La actividad metabólica disminuye a un mínimo o se detiene completamente, ya sea debido a la deshidratación como a las bajas temperaturas (Beck *et al.* 2007). La actividad bioquímica en general es afectada produciéndose desnaturalización de proteínas, precipitación de varios componentes esenciales, liberación de enzimas hidrolíticas, pérdida de la regulación del pH por las sustancias buffer presentes en el citoplasma, eventos que provocarían la muerte de las células (Fittler y Hay 2002).

Cuando la temperatura ambiente desciende bruscamente, el agua contenida en el citoplasma se enfría rápidamente y debido a la presencia de ciertas sustancias denominadas *nucleadores*, ésta puede formar cristales de hielo provocando daños físicos sobre los orgánulos e incluso la muerte de la célula (Taiz y Zeiger 2003). En tal situación, la formación de los cristales de hielo se inicia por un proceso de nucleación a través de los denominados “nucleadores” que podrían ser macromoléculas, algunos polisacáridos y proteínas llamadas INPs (del inglés *ice nucleating proteins*); asimismo, ciertas bacterias denominadas INA (del inglés *ice nucleation active bacteria*) que se

encuentran sobre o dentro de los vegetales también facilitarían el proceso de formación de cristales.

Estrategias de las plantas para mitigar los daños producidos por bajas temperaturas

La sobrevivencia de la planta depende básicamente de evitar la formación de hielo a través de diferentes mecanismos que se disparan por la expresión de genes inducidos por bajas temperaturas (COR o LTI o LTR) (Fittler y Hay 2002, Taiz y Zeiger 2003, Verslues *et al.* 2006).

Estos mecanismos comprenden modificaciones que se originan en el citoplasma, membrana y pared celular. En tal contexto, las proteínas “anticongelantes” o AFPs (del inglés *antifreezing proteins*), retrasan la formación de hielo y evitan el crecimiento de los cristales ya formados. Las proteínas “protectoras” de membranas denominadas CORs (del inglés *cold protection proteins*) y CAPs (del inglés *cold adaptation proteins*) alteran la composición lipídica logrando mayor crio-estabilidad y estabilizan sus funciones (Uemura *et al.* 1995, Fittler y Hay 2002, Schulze *et al.* 2002). Las proteínas dehidrinas (DHNs), forman parte de un gran grupo de proteínas altamente hidrofílicas denominadas LEA (del inglés *late embryogenesis abundant*), se acumulan en los tejidos vegetativos en respuesta a estrés osmótico. Las DHNs se localizan en diferentes compartimentos celulares, principalmente en citoplasma y núcleo y con menor frecuencia en mitocondrias, vacuola y en las proximidades de la membrana plasmática. Si bien, aún se desconoce su función exacta, experimentos *in vitro* revelaron que algunas DHNs se unen a vesículas lipídicas que contienen fosfolípidos ácidos; mientras que otras se unen a metales y actúan como depuradoras de radicales hidroxilos, protegen a los lípidos de membrana de la peroxidación y operan como crioprotectores de enzimas sensibles al congelamiento (Rorat 2006, Ruelland *et al.* 2009).

Finalmente, en la Fig. 1.6 se detallan los principales daños producidos por los factores ambientales que desencadenan el estrés osmótico.

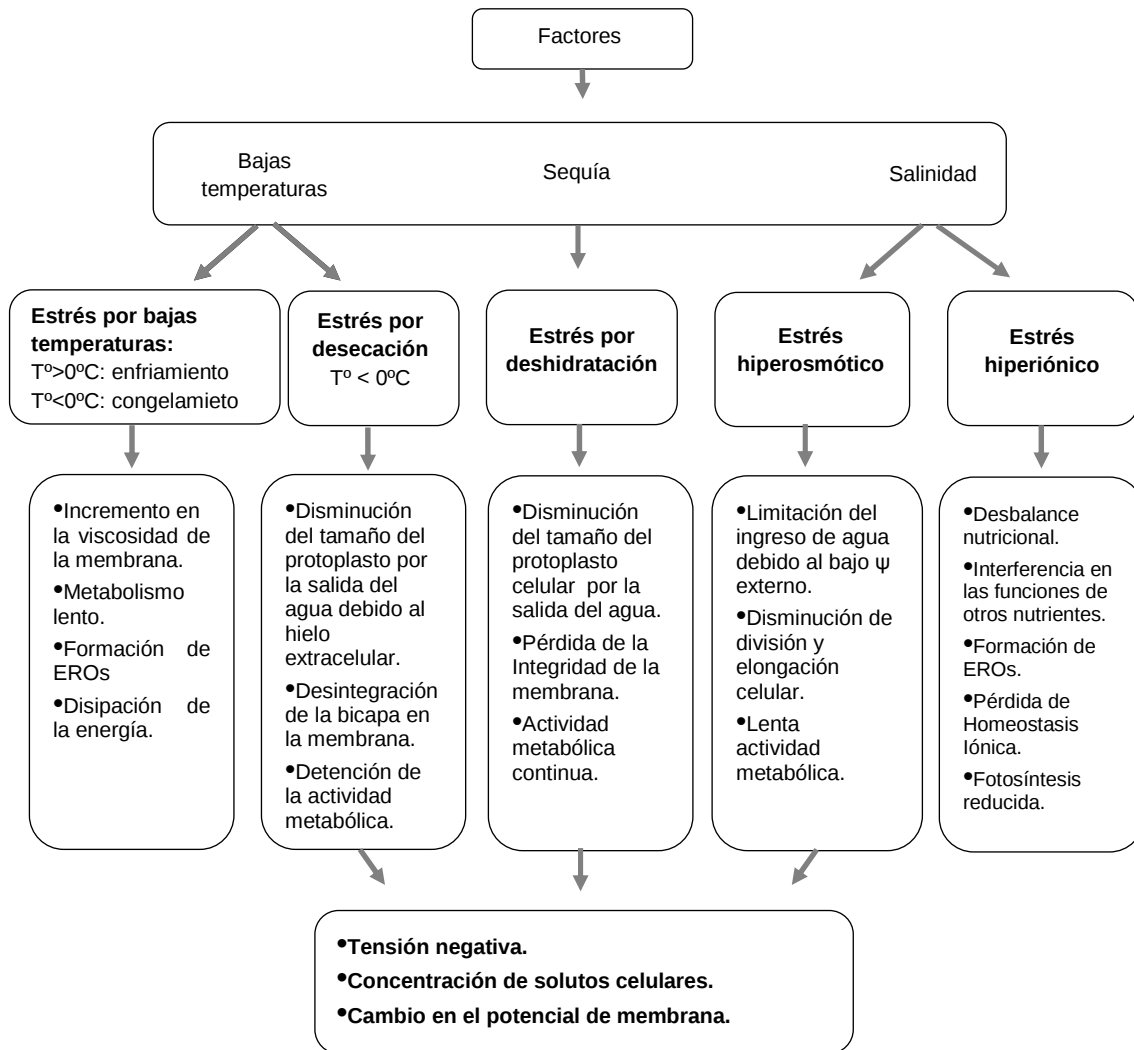


Fig. 1.6: Daños producidos por frío, sequía y salinidad en los tejidos vegetales. Modificado de Beck *et al.* 2007.

5. Mecanismos de percepción y transducción de señales a estrés osmótico

Las plantas responden ante situaciones adversas provocadas por sequía, alta concentraciones de sales y bajas temperaturas mediante mecanismos de respuestas que se suscitan tanto a nivel molecular y celular, como fisiológico y bioquímico, que les permiten aclimatarse y sobrevivir al estrés. En general, la ruta de transducción inicia con la percepción de la señal, seguida de la generación de mensajeros secundarios (fosfatos de inositol, ERO's) que pueden modular el nivel intracelular de Ca^{2+} , quien inicia una cascada de fosforilación proteica hasta que finalmente alcanza a la proteína directamente involucrada en la protección celular o en factores de transcripción que controlan grupos específicos de genes reguladores (Fig. 1.7). Los productos de estos

genes pueden participar en la generación de moléculas reguladoras tales como ABA, etileno y ácido salicílico, las que a su vez, pueden iniciar un proceso de señalización secundaria (Xiong *et al.* 2002). El sistema de señalización requiere de una estricta coordinación espacio-temporal de todos los elementos involucrados por lo que a su vez, necesita de ciertas proteínas reguladoras que participan de manera indirecta mediante la modificación, reparto o ensamble de los componentes de señalización (Xiong y Zhu 2001).

Las distintas variables ambientales que determinan el estrés osmótico constituyen un complejo de estímulos que poseen muchos atributos diferentes y a veces relacionados en donde cada uno de ellos provee una información en particular a las células. Dada esta multiplicidad de señales, es de esperarse que la planta posea múltiples sensores primarios que perciban la señal del estrés, siendo el incremento de Ca^{2+} en citoplasma, como resultado del influjo desde apoplasto o la liberación de compartimentos intracelulares, una respuesta temprana a todas las formas de estrés osmótico (Shi 2007). Del mismo modo, en su papel protector, la membrana celular separa el interior de la célula de su entorno constituyéndose en una barrera física y como tal cumple un papel preponderante en el mecanismo de respuesta de la planta a los estreses ambientales. De hecho, muchos pasos secuenciales de la cascada de señalización tales como la activación de proteínas efectoras, generación de mensajeros secundarios y alteración del metabolismo celular están asociados a la membrana plasmática en donde tanto proteínas asociadas como componentes lipídicos participan en el proceso (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 2006, Wang *et al.* 2007).

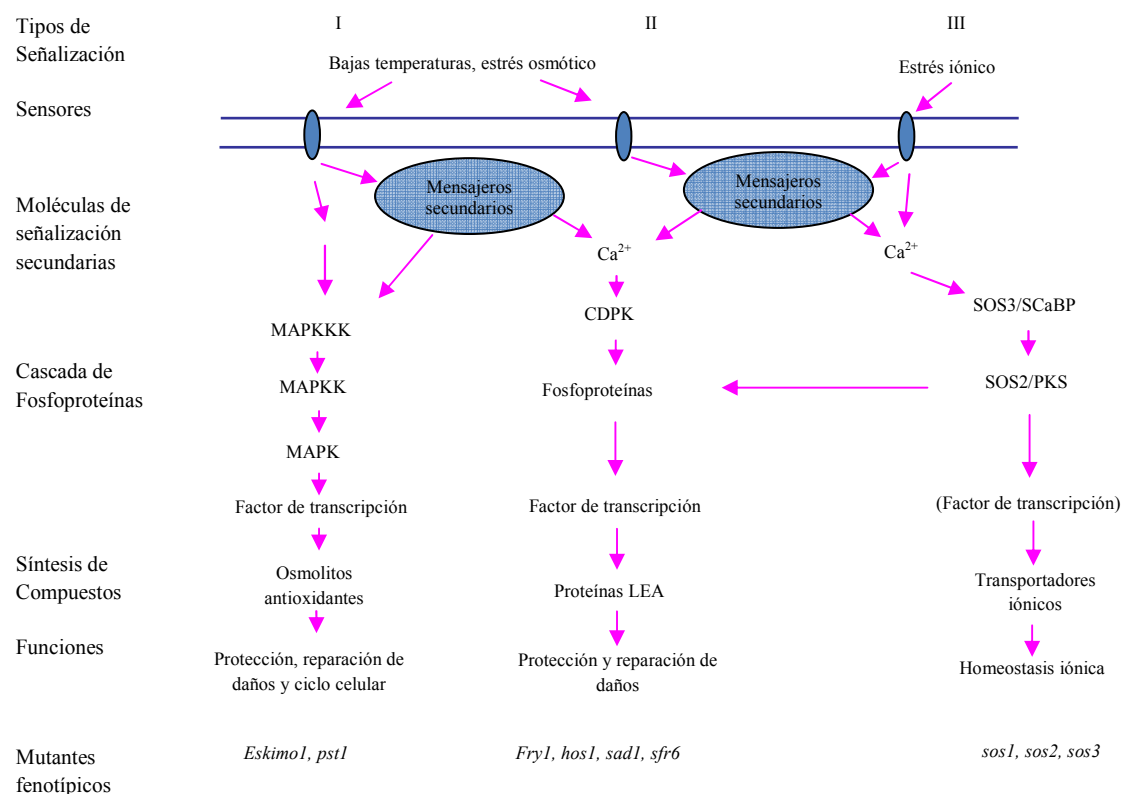


Fig. 1.7: Pasos principales que se concatenan en la señalización de la planta ante situaciones de estrés osmótico. La señalización **Tipo I** incluye la generación de enzimas depuradoras de ERO's y síntesis de sustancias antioxidantes y osmolitos compatibles; **Tipo II** comprende la síntesis de ciertas proteínas en respuesta al estrés, muchas de las cuales aún no conoce su función; mientras que la señalización **Tipo III** implica la ruta SOS específica de estrés iónico. Modificado de Xiong *et al.* 2002.

Finalmente, el proceso de señalización induce la expresión de múltiples genes diferenciales cuyos productos contribuyen a la tolerancia de manera directa o indirecta, siendo una acción multigénica perfectamente coordinada donde además coexiste la interacción entre ellos (Tuteja y Sopory 2008). Las proteínas resultantes de la expresión podrían ser catalogadas como **proteínas funcionales** o efectoras y **proteínas reguladoras**. Las primeras participan directamente en los mecanismos bioquímicos del control del daño, reparación y aclimatación donde se incluyen las acuaporinas y algunas enzimas claves de la biosíntesis de osmolitos, chaperonas, antioxidantes. Por otra parte, las proteínas reguladoras comprenden factores de transcripción (proteínas reguladoras de genes), fosfotransferasas (quinasas), fosfatasa, la vía de señalización iónica específica SOS (del inglés *salt overlay sensitive*) (Hasegawa *et al.* 2000; Tester y Davenport 2003) y otras relacionadas con cascadas de señalización (Seki *et al.* 2007).

El estrés osmótico generalmente produce acumulación de ABA por lo que no resulta sorprendente que la expresión génica esté regulada por esta fitohormona, aunque

no todos los genes que se inducen por estrés son regulados por ABA, indicando la existencia de varias vías de señalización (Ishitani *et al.* 1997). Entre las vías más importante caben destacar aquellas dependientes e independientes de ABA, aislándose y caracterizándose los elementos promotores *cis*; como así también, los factores responsables de su activación (Busk y Pages 1998). Los promotores de genes regulados por ABA, denominados ABRE (elementos de respuesta a ABA), contienen nucleótidos ACGT como *core* de su secuencia y forman parte de los elementos llamados G-box. Se han descrito más de 20 ABREs promotores de genes que responden a la deshidratación y sequía, los cuales se unen a factores *trans*- regulados por ABA como los bZIP (Nieva Boza 2003; Kobayashi *et al.* 2008; Gao *et al.* 2011). Asimismo, se identificaron otros factores de transcripción que responden al ABA conocidos como MYBR/MYCR y que constituyen una vía indirecta de regulación por ABA a través del gen promotor R22 (Tabla 1.2). Por su parte, los genes independientes de ABA se caracterizan por contener un elemento conservado de respuesta a deshidratación (DRE, TACCGACAT) en su región promotora, relacionada con la regulación génica por interacción con una cascada de señalización independiente de ABA y correspondida por el gen promotor RD29B. Es una vía de respuesta más rápida que la anterior. Ésta fue descubierta a través de estudios del gen promotor RD29A el cual se induce tanto por vías dependientes como independientes de ABA (Leung y Giraudat 1998; Thomashow *et al.* 1999; Xiong *et al.* 2002; Zhu 2002; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2007).

Tabla 1.2. Genes promotores, elementos y factores de transcripción en respuesta a estrés osmótico.

Gen promotor	Elementos <i>cis</i>	Factor de transcripción	Factor de estrés
RD29A	ABRE	CBF/DREB1	Frío
RD29A	DRE/CRT	DREB2	Sal, ABA y sequía
RD29B	ABRE	bZIP	Sal y sequía
RD22	MYB/MYC	MYBR/MYCR	Sequía y ABA

6. Acción de las poliaminas en el contexto de la tolerancia a estrés osmótico

Las poliaminas (PAs) comprenden un grupo de pequeñas moléculas policatiónicas ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se encuentran involucradas en muchos procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas, desempeñándose como agentes antisenescentes, retrasando el envejecimiento y la muerte de los órganos, como así también, cumpliendo un papel importante en la defensa de la planta ante distintos estreses ambientales, contrarrestando los efectos deletéreos promovidos por la situación adversa. Ambas funciones han sido atribuidas a sus propiedades antioxidantes y estabilizantes de membranas y pared celular (Kusano *et al.* 2008, Zhao y Yang 2008).

Desde el punto de vista químico, las PAs se caracterizan por contener más de un grupo amino-terminal ($-NH_2$) en su estructura, pudiendo además albergar grupos iminos centrales ($-NH$). Las diaminas *putrescina* (**Put**; 1,4 diaminobutano) y *cadaverina* (**Cad**; 1,5-diaminopentano), la triamina *espermidina* (**Spd**; N-[3-aminopropil]butano-1,4-diamina) y la tetramina *espermina* (**Spm**; N,N'-bis[-aminopropil]butano-1,4-diamina) comprenden las PAs más abundantes en plantas y animales por lo que se las denomina *poliaminas superiores*; mientras que noespermidina, noespermina y homoespermidina, a pesar de ser necesarias para el funcionamiento de algunos sistemas biológicos en particular, tienen una distribución acotada (Kuznetsov y Shevyakova 2007). Éstas se encuentran en formas libres, formando conjugados solubles con compuestos fenólicos de bajo peso molecular; o bien formando uniones insolubles con macromoléculas tales como ácidos nucleicos, fosfolípidos y proteínas de membrana (Duan *et al.* 2008). A pH fisiológico las PAs se encuentran como cationes, hecho por el cual adquieren muchas de sus propiedades biológicas.

Biosíntesis

La biosíntesis de PAs puede ser dividida en dos etapas principales: la primera, comprende la síntesis de Put por la descarboxilación de aminoácidos básicos tales como ornitina y arginina, cuyas reacciones son mediadas por las enzimas arginina descarboxilasa (ADC) y ornitina descarboxilasa (ODC), respectivamente (Fig. 1.8).

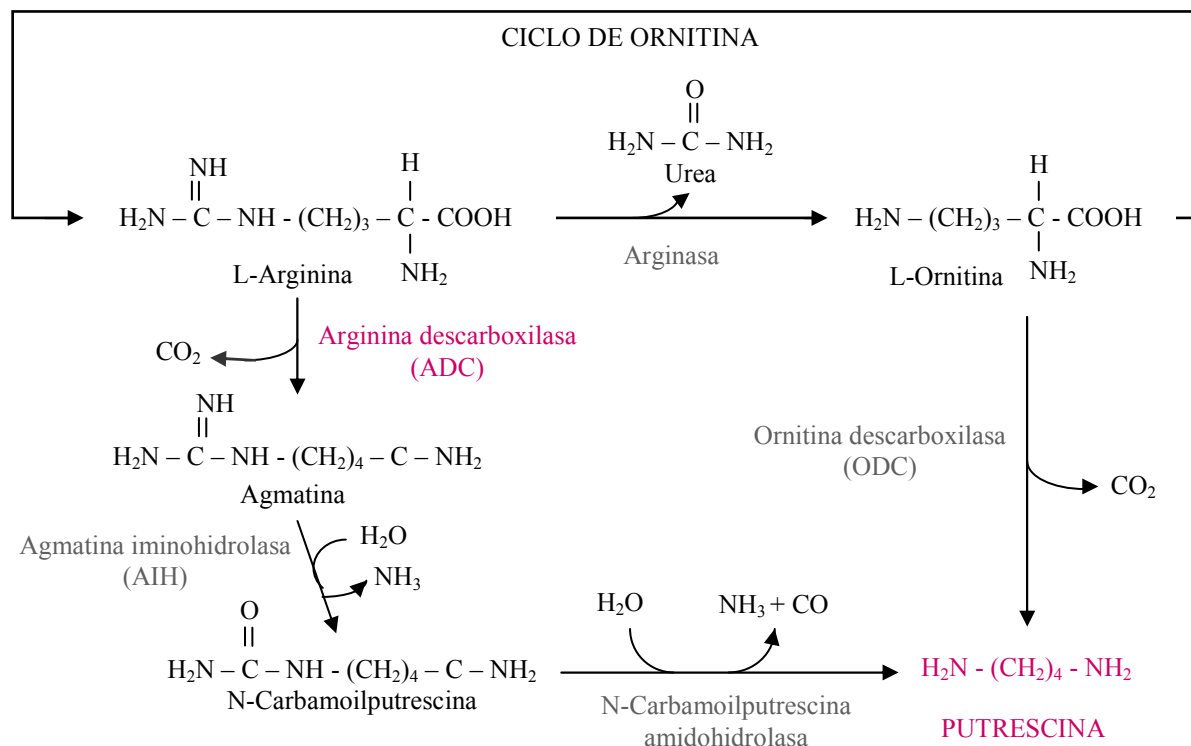


Fig. 1.8: Biosíntesis de putrescina a partir de la descarboxilación de arginina y ornitina. Tomado de Palavan-Unsal 1995.

En la mayoría de los seres vivos, las PAs son sintetizadas a partir de la ornitina donde ésta es directamente descarboxilada por ODC (Childs *et al.* 2003). En cambio, en plantas superiores la biosíntesis se realiza fundamentalmente a través de una vía indirecta que utiliza arginina como precursor (Palavan-Unsal 1995; Forero y Salvarrieta 2002), siendo ésta sintetizada a partir de ornitina presente en plástidos (Slocum *et al.* 2005). La síntesis de Put a partir de arginina es mediada por la enzima ADC seguida por dos desaminaciones consecutivas cuyas reacciones son mediadas por agmatina iminohidrolasa y N-carbamoilputrescina amidahidrolasa, respectivamente.

La segunda etapa procede con la adición secuencial de grupos amino-propilos donados por la S-adenosil metionina descarboxilasa (dSAM) a Put (Fig. 1.9). La adición del primer grupo convierte a Put en Spd por acción de espermidina sintasa. La adición de un nuevo grupo aminopropilo forma Spm a partir de Spd, siendo esta reacción catalizada por espermina sintasa.

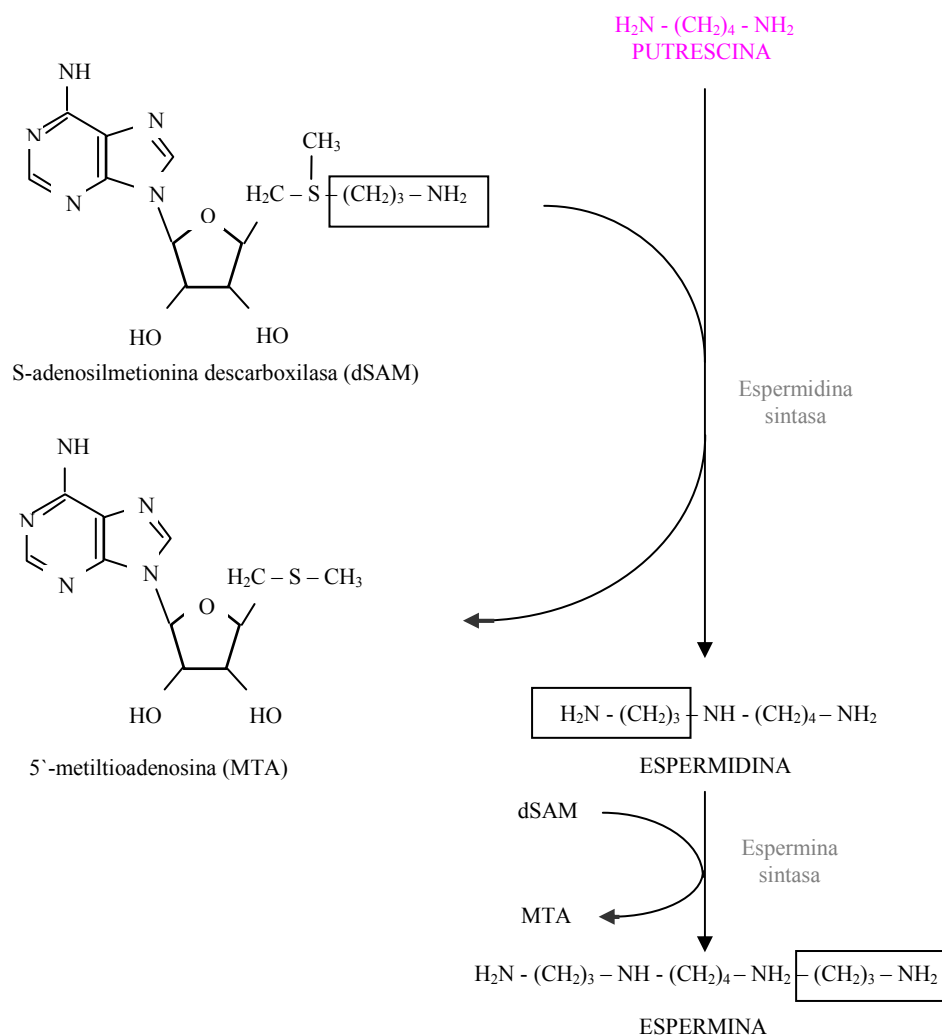


Fig. 1.9: Biosíntesis de espermidina y espermina a partir de putrescina. Tomado de Palavan-Unsal 1995.

La Put es catalizada por las diamino oxidasas (DAOs) mediante una reacción que convierte 1 diamina en Δ^1 -pirrolina, amonio y H_2O_2 . Las enzimas DAOs se ubican en las paredes celulares en donde el H_2O_2 resultante de su catabolismo podría ser de importancia en los procesos de lignificación (Moller y McPherson 1998, Tanguy 2001, Cona *et al.* 2003) y reacciones de interconexión de señales bajo condiciones normales y adversas para el crecimiento y desarrollo del organismo (Gill y Tuteja 2010b). Seguidamente, Δ^1 -pirrolina es catalizada a ácido γ -aminobutírico (GABA), el cual es finalmente convertido en ácido succínico, un intermediario del ciclo de Krebs.

También es un hecho conocido que a partir del precursor dSAM se sintetiza la fitohormona etileno. Esta vía es muy estudiada en simultáneo con las poliaminas ya que ambos tipos de compuestos han sido descriptos como antagonicos ante distintas

situaciones fisiológicas y se sintetizan a partir del mismo precursor (Palavan-Unsal *et al.* 1995).

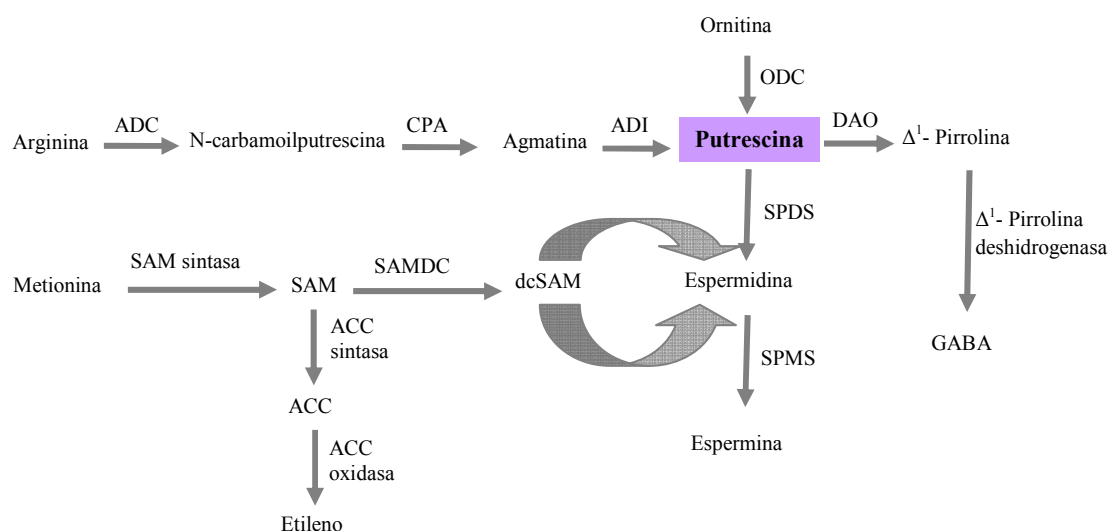


Fig. 1.10: Representación esquemática de la biosíntesis de poliaminas y su relación con la biosíntesis de etileno. **CPA**, N-carbamoylputrescina amidahidrolasa; **ADI**, agmatina desaminasa, **SPDS**, espermidina sintasa; **SPMS**, espermina sintasa; **SAM DC**, s-adenosilmetionina descarboxilasa; **dcSAM** SAM descarboxilada; las restantes abreviaciones se encuentran detalladas en el texto. Modificado de Gil y Tuteja 2010b.

El ritmo de los procesos anabólicos y catabólicos regulan los niveles internos de poliaminas durante el ciclo celular y procesos de división y expansión celular. Entre los mecanismos regulatorios que controlan las actividades de ADC, ODC y SAMDC, se destaca en animales la retroalimentación ejercida por los productos finales de PAs (Childs *et al.* 2003), aunque más tarde, Page (2007) sugirió que únicamente Put podría inhibir la actividad de SAMDC mediante tal proceso. Asimismo, existen evidencias de que los niveles de Spd y Spm están sujetos a una fuerte regulación homeostática (Bhatnagar *et al.* 2001).

Kuznetsov *et al.* (2006) sugirieron que se produce una regulación homeostática entre las vías metabólicas, Put limita la biosíntesis de Spd y Spm y que la Spm inhibiría la actividad de ADC. También es conocido el hecho de que la actividad de la ADC es controlada por condiciones de estrés, luz y otras hormonas. Existe una organización supramolecular relacionada a su biosíntesis que funcionan regulando su homeostasis.

Localización y transporte de PAs

Debido a su fuerte interacción electrostática con moléculas orgánicas cargadas negativamente, la pared celular y la vacuola constituyen los principales reservorios de

PAs en las plantas (Slocum 1991; Chattopadhyay *et al.* 2002; Legocka y Kluk 2005). Asimismo, éstas pueden encontrarse en el ámbito del citoplasma, núcleo, membrana plasmática, mitocondrias y cloroplastos. En estos últimos, las PAs se encuentran asociadas a los componentes de las cadenas de transporte de electrones, tanto por interacción electrostática como por unión covalente (Votyakova *et al.* 1999). Si bien aún son necesarios mayores estudios tendientes a esclarecer la localización sub-celular de las enzimas involucradas en el metabolismo de poliaminas en plantas, análisis inmunocitoquímicos y bioinformáticos sugieren que la ADC está presente principalmente en el cloroplasto y en menor medida en el núcleo. De igual modo, estudios de fraccionamiento y unión a inhibidores proponen que la ODC se encuentra en el citoplasma y en el núcleo, mientras que espermidina sintasa y la SAMDC se localizan generalmente en el citoplasma (Slocum 1991). Debido a su corta vida, aún se desconoce la localización subcelular de espemina sintasa en *A. thaliana* (Busó Sáez 2005).

Las PAs presentan movimiento bidireccional a través del xilema y el floema, pudiendo translocarse por toda la planta (Kuznetsov *et al.* 2002). Tanguy *et al.* (2001), demostraron que el transporte de aminos alifáticos a través de la membrana plasmática es bidireccional, saturable, dependiente de energía y regulado por hormonas (principalmente auxinas y citocininas). Asimismo, estudios recientes sugieren que la interacción entre PAs y componentes de membranas mediaría importantes eventos celulares tales como la transmisión de señales por receptores. En *E. coli* se conocen varias proteínas periplásmicas que unen poliaminas, entre ellas PotD y PotF, que forman parte de dos sistemas de transporte inter-membranales (pPT104 y pPT79) que unen Spd y Put, respectivamente (Kuznetsov y Shevyakova 2007). En *Saccharomyces cerevisiae* se identificó la proteína Gap1p, que cataliza la entrada de aminoácidos, Put y Spd a la célula. Sin embargo, no ha podido demostrarse que incorpore Spm (Uemura *et al.* 2005). En adición, el gen *YLL028* codifica para un transportador vacuolar específico de PAs (Kuznetsov y Shevyakova 2007). Asimismo, también se identificaron otros transportadores tales como TPO1-5, UGA4, DUR3 y SAM3 (Kusano *et al.* 2008).

Las distintas enzimas que participan en el metabolismo de PAs en plantas son codificadas por familias multigénicas (Urano *et al.* 2003). En el genoma de *A. thaliana* existen dos genes que codifican arginina descarboxilasas, los cuales se denominan *ADC1* y *ADC2* (Hummel *et al.* 2004; Cuevas *et al.* 2008); dos que codifican para espermidina sintasas, *SPDS1* y *SPD2*; al menos cuatro que codifican para S-

adenosilmetionina descarboxilasas, *SAMDC1*, *SAMDC2*, *SAMDC3* y *SAMDC4* (Busó Sáez 2005) y dos que codifican para espermina sintasas, *SPMS* y *ACL5* (Seki *et al.* 2002; Urano *et al.* 2003).

Papel que desempeñan PAs en el crecimiento y desarrollo de las plantas

Las PAs están involucradas en numerosos procesos del metabolismo celular, entre los que se incluyen la replicación del ADN, transcripción y transducción de la expresión génica (Childs *et al.* 2003), estabilización de membranas (Legocka y Kluk 2005), fortalecimiento de la pared celular (Verma y Sharma 2010), modulación de la actividad de enzimas, división y elongación celular en meristemas caulinares (Walden *et al.* 1997; Liu y Moriguchi 2007) y radicales (Martínez Pastur *et al.* 2007). El metabolismo de PAs está a su vez relacionado con el metabolismo del nitrógeno y del carbono, por lo que sus compuestos intermedios estarían relacionados a múltiples funciones tales como intermediarios del ciclo de Krebs (GABA), síntesis de proteínas y aminoácidos (Bhatnagar *et al.* 2001). Asimismo, intervienen en procesos morfo-fisiológicos tales como embriogénesis, crecimiento y desarrollo de órganos vegetativos (Hummel *et al.* 2004), ruptura de la dormición de tubérculos y semillas (Zeid *et al.* 2009; Verma y Sharma 2010), desarrollo de primordios florales, crecimiento y maduración de frutos (Hummel *et al.* 2004, Liu *et al.* 2006a; Marina *et al.* 2008). De igual modo, la aplicación exógena de PAs favorece el crecimiento y desarrollo *in vitro* en varias especies. La adición de Spm al medio de cultivo promueve rizogénesis adventicia en *Nothofagus nervosa* (Martínez Pasteur *et al.* 2007). La aplicación de un inhibidor de Put (D-putrescina) inhibió el crecimiento de callos de *Prunus persica*, evidenciando la participación de ésta durante la división celular en el tejido indiferenciado (Liu *et al.* 2006a). Por su parte, el agregado de Spm indujo organogénesis en *Cucumber* (Zhu y Chen 2005) y *Oryza* (Shoeb *et al.* 2001).

Papel que desempeñan PAs en la defensa de la planta ante situaciones de estrés abiótico

Los vegetales frecuentemente acumulan PAs en respuesta a estreses bióticos y abióticos (Boucherau *et al.* 1999, Urano *et al.* 2003, Walters 2003). Diferentes estudios realizados mediante la aplicación exógenas de PAs e inhibidores de su biosíntesis (Chattopadhyay *et al.* 2002; Liu *et al.* 2006; Zeid *et al.* 2009), mutantes deficientes (Cuevas *et al.* 2008) y plantas transgénicas que sobre-expresan genes codificantes de

enzimas que participan del proceso anabólico (Busó Sáez 2005; Liu y Moriguchi 2007; Alet 2008), involucran a las PAs en la respuesta de la planta a estreses ambientales tales como la deficiencia de nutrientes, la exposición a temperaturas extremas, salinidad, sequía, hipoxia y estrés oxidativo (Gill y Tuteja 2010b). Sin embargo, los mecanismos por los cuales las PAs podrían conferir tolerancia al estrés es un tema que aún sigue ofreciendo numerosos interrogantes.

Una respuesta que se observa frecuentemente es el aumento de la actividad de ADC frente a cualquier tipo de estrés abiótico (Bouchereau *et al.* 1999), concomitantemente con un mayor incremento de Put con relación a Spd y Spm (Alet 2008). Asimismo, el catabolismo de PAs regula la acumulación de ERO's y enzimas depuradoras de éstas en el ámbito de las células (Moschou *et al.* 2008). En este sentido, cabe destacar que recientemente Kamada-Nobusada *et al.* (2008), demostraron que la expresión de genes de respuestas a sequía es alterada en plantas que tienen disminuida la actividad de poliamina oxidasa en raíces, lo que sugeriría la posibilidad de que tales enzimas contribuyan a la regulación de los genes de respuestas a sequía mediante el balance de la generación y depuración de ERO's (Miller *et al.* 2010).

Las PAs podrían además participar en el mecanismo de señalización del estrés abiótico. En este sentido, plantas de *A. thaliana* portadoras del gen que codifica SAMDC incrementaron su tolerancia y atenuaron los daños producidos por salinidad y sequía incrementando el contenido de Spm, la cual a su vez induce la actividad de NCED incrementando el contenido de ABA en 3 o 4 órdenes de magnitud respecto al genotipo salvaje. Asimismo, Spm favorece la expresión de genes promotores dependientes (RD22, RD29A, RD26, COR15A) e independientes (DREB1, KIN1 y ERD10) de ABA (Busó Sáez 2005). Este hecho, respalda la hipótesis de que las vías ABA-dependientes y ABA-independientes se relacionarían a través de PAs. Por su parte, el frío activa la síntesis de Put vía ADC (Fig. 1.11). ADC1 parecería ser regulada por frío principalmente. También se ha visto que sus mutantes *adc1* son sensibles al frío y que disminuyen la expresión de genes regulados por ABA no siendo así, para los genes regulados vía ABA independiente, por lo que se supone que la Put estaría modulando los niveles de ABA regulando positivamente la expresión de NCED. Es decir que la tolerancia al frío es, al menos en parte, regulada por ABA, a la vez que la Put tendría un rol “*corriente arriba*” en las vías de señalización de ABA (Alet 2008; Cuevas *et al.* 2008). Por otra parte se hipotetiza que Put podría estar modulando en un

punto anterior a HOS10, haciendo posible el inicio en la cascada de señalización de respuesta ABA-dependiente (Alet 2008; Alet *et al.* 2011).

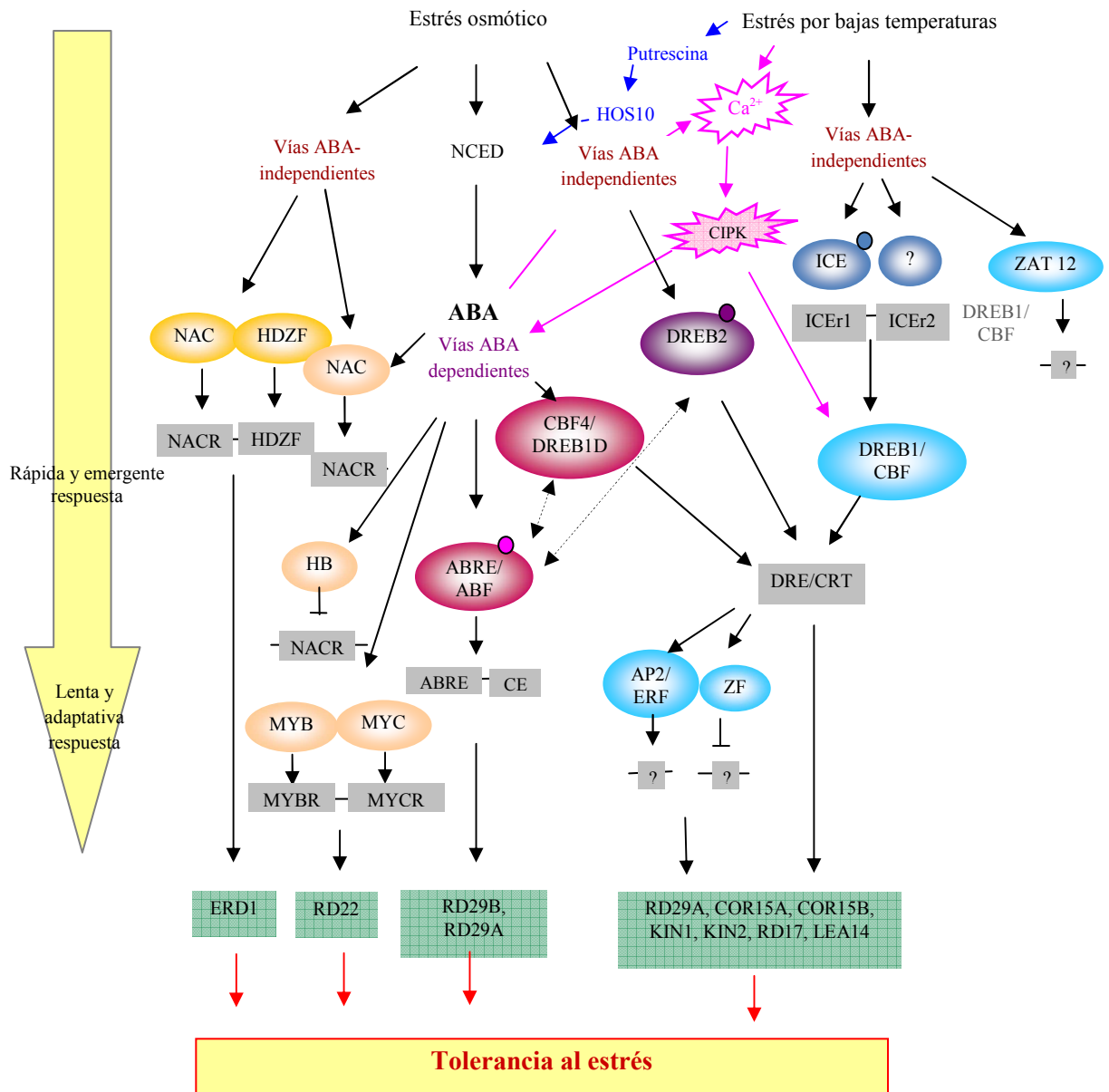


Fig. 1.11: Interacción entre ABA y putrescina en la señalización de estrés hídrico y bajas temperaturas. Se representa en forma esquemática las vías de señalización. Líneas gruesas: vía principal de señalización; Flechas: activación; Líneas terminadas en guión: inhibición; flecha con línea de puntos: interacción proteína-proteína. Pequeños círculos indican una modificación en los factores de transcripción en respuesta a la señal de estrés para su activación, como fosforilación. *Adaptado de Kim et al. 2003; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 2006.*

7. Mejoramiento genético para incrementar la tolerancia a estrés osmótico

Las condiciones ambientales adversas constituyen la principal causa de disminución del rendimiento potencial de los cultivos (Bray 2000). A pesar de haberse realizados considerables esfuerzos para revertir esta situación y estabilizar el rendimiento a través de la aplicación de programas de mejoramiento convencional, su aplicación ha tenido un éxito limitado debido a la naturaleza multigénica y complejidad de los caracteres involucrados, como así también a la reducida variación genética con que se cuenta en el germoplasma de los principales cultivos (Pardo 2010). Asimismo, el uso de parientes silvestres como fuente de recursos genéticos determinantes de tolerancia a estreses requiere de mucho tiempo y esfuerzo, a la vez que implica la transferencia de genes indeseables en combinación con los genes de interés que se desea introducir. Los experimentos de mejoramiento clásico revelaron que los caracteres relacionados con tolerancia a estrés se encuentran dispersos en varios locus de caracteres cuantitativos (QTLs), los que *a priori*, son difíciles de identificar debido a que los efectos fenotípicos de cada gen asociado con un carácter cuantitativo complejo son relativamente pequeños; existiendo sólo algunos casos exitosos (Collins *et al.* 2008).

En la era actual de las “**omics**”⁶ donde la información acerca de genes que se expresan diferencialmente y sus patrones de regulación fluye constantemente a partir de muchos laboratorios (<http://www.plantstress.com>), la utilidad de la estrategia basada en el análisis de la función de los genes individuales mediante el uso de la ingeniería genética es ilimitada. Tomando en consideración la extensa brecha que existe entre el rendimiento potencial y real de los cultivos ocasionada principalmente por estreses abióticos, se realizaron considerables esfuerzos para desarrollar plantas tolerantes a través de la ingeniería genética. Sin embargo, los eventos obtenidos aún no han sido probados en gran escala en condiciones de cultivo comercial y tampoco han sido utilizados en programas de mejoramiento (Singla-Pareek *et al.* 2007). El avance en la aplicación de técnicas de microarreglos de ADN favoreció el análisis rápido de ARNm que se expresan diferencialmente, identificándose cientos de genes candidatos para ingeniería genética; entre los que se encuentran genes funcionales (relacionados con la acumulación de metabolitos, síntesis de proteínas específicas) y genes reguladores

⁶ Neologismo del idioma inglés que informalmente agrupa las disciplinas biológicas cuyo nombres finalizan en *omic*; incluyéndose a genomic, transcriptomic, proteomic y metabolomic.

(quinasas, factores de transcripción). Si bien, ambos grupos revisten gran importancia en el mejoramiento de las plantas, la ingeniería genética de genes reguladores que a su vez, controlan un grupo de genes relacionados al estrés, se presentaría como una de las estrategias más promisorias para minimizar los efectos deletéreos asociados al menos con sequía (Fig. 1.12).

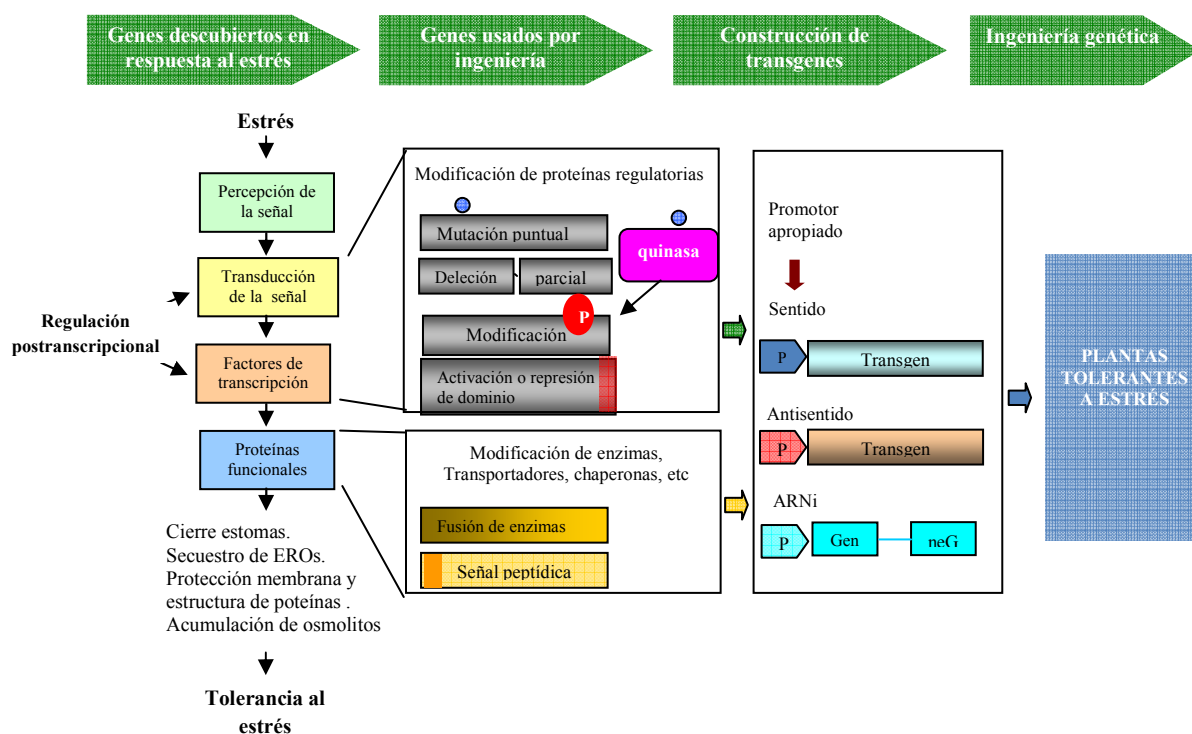


Fig. 1.12: Estrategias de ingeniería genética aplicables en la obtención de plantas tolerantes a estrés hídrico. Análisis moleculares y genómicos facilitan el descubrimiento de genes involucrados en la tolerancia, los que pueden usarse para mejoramiento. Un amplio rango de genes pueden ser empleados incluyendo proteínas funcionales como transportadores y chaperonas; funciones de enzimas; proteínas reguladoras como en vías de señalización y factores de transcripción. La actividad de proteínas reguladoras pueden ser controladas por medio de mutaciones puntuales, supresiones parciales, modificaciones post-transcripcionales (fosforilación por quinasas), o por activación o represión de dominios. Los genes pueden ser regulados a nivel de ARNm (por ejemplo una sobre-expresión del gen o una supresión por antisentido de ARNi). La intensidad y la frecuencia de expresión del transgen pueden ser manejadas mediante el empleo de un promotor adecuado. Modificado de Umezawa *et al.* 2006.

En la actualidad básicamente se utilizan dos metodologías para incrementar la tolerancia de los cultivos a las condiciones ambientales desfavorables. La primera consiste en la utilización de la variación genética natural, ya sea a través de selección directa o mapeo con QTLs, y subsecuente selección asistida por marcadores; mientras que la segunda comprende la obtención de plantas transgénicas mediante la introducción de genes de resistencia ya sea funcionales o reguladores (Ashraf *et al.* 2008).

8. Transformación genética

Conceptos y métodos disponibles

Por definición, un **cultivo transgénico** es aquel que contiene uno o varios genes que han sido insertado/s artificialmente por medio de la biotecnología moderna. Un programa de mejoramiento basado en el uso de esta tecnología inicia su labor en la búsqueda de la tolerancia a través de organismos que vivan en condiciones ambientales extremas, los que una vez identificados son evaluados en condiciones de crecimiento normal y estresante (Fig. 1.13). Seguidamente, los genes que confieran tolerancia deberán ser aislados y clonados a fin de ser introducidos en el genoma de las células vegetales a partir de las cuales deberá generarse un nuevo individuo portador del transgen que será evaluado en condiciones controladas y en ensayos de campo.

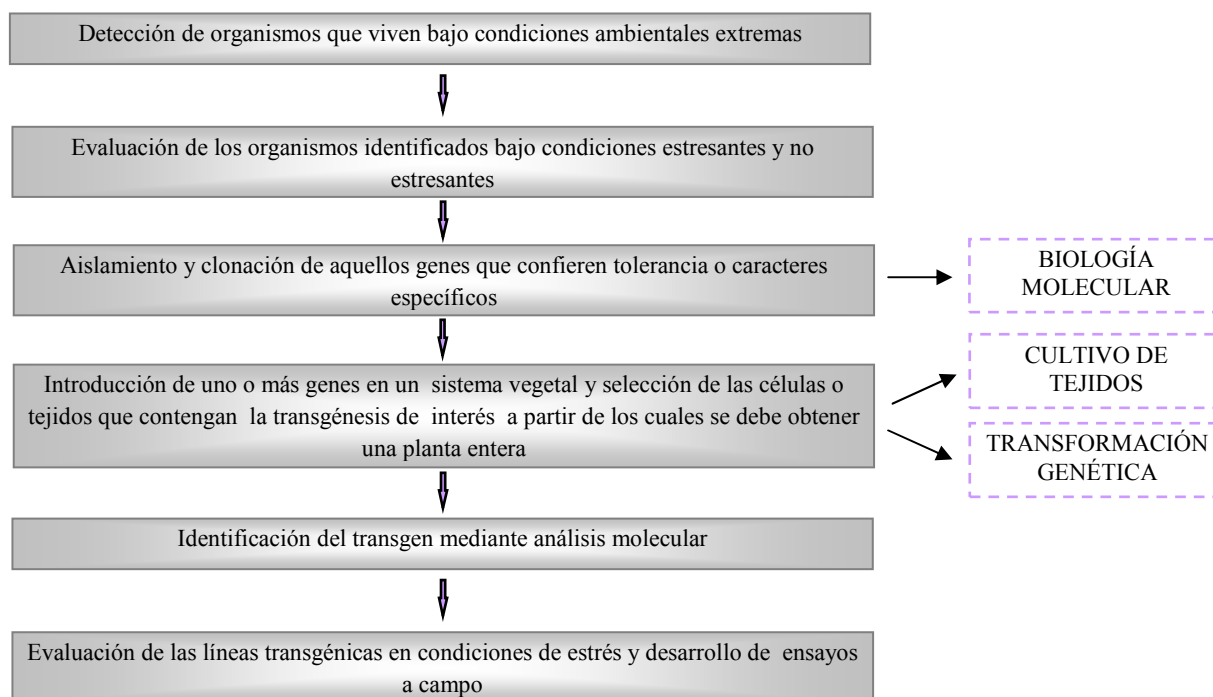


Fig. 1.13: Programa de mejoramiento genético basado en el uso de la biotecnología moderna. Su implementación requiere de la interacción de técnicas moleculares, cultivo *in vitro* de tejidos y transformación genética.

A fin de desarrollar un procedimiento exitoso de transformación genética, resulta imprescindible *i)* contar con células “*totipotentes*”, es decir que sean capaces de dividirse y generar un nuevo individuo, *ii)* disponer de un método que permita introducir ADN dentro de las células y *iii)* contar con un método para seleccionar y regenerar las plantas transformadas.

La introducción de genes foráneos a un organismo se realiza a través de vías que implican el uso de métodos directos o físicos e indirectos o biológicos.

Métodos de transferencia directa. Fueron desarrollados básicamente como alternativa al uso de métodos indirectos en especies que revisten importancia económica como los cereales pero que no son hospedantes naturales del agente biológico que se utiliza para dirigir el T-ADN. En los métodos directos el transgen es introducido en la célula vegetal ya sea mediante la *transformación de protoplastos* o bien, mediante el *bombardeo de micropartículas (gene gun)*. Dado que la pared celular constituye una barrera física para la introducción del ADN a la célula, ésta es removida temporariamente mediante enzimas. Seguidamente, los protoplastos pueden ser transformados utilizando polietilenglicol, electroporación, microinyección o liposomas, siendo los dos primeros, los métodos más utilizados. Sin embargo, la gran complejidad experimental que reviste el cultivo de protoplasto limita la utilización de esta técnica (Danilova 2007). Por su parte, el *bombardeo de micropartículas* es un proceso en el que el plásmido o porción de ADN es recubierto en su superficie por gotas de oro o tungsteno, de 0.5 a 5 micras de diámetro. Estas partículas, son aceleradas por una descarga eléctrica de un aparato o por un pulso de gas son «disparadas» a altas velocidades atravesando la pared y membrana celular sin causar daño letal en la célula (Helenius *et al.* 2000). Se puede emplear cualquier tipo de explante vegetal, desde células o protoplastos hasta plántulas enteras, sometiéndolos a un tratamiento osmótico antes y después del bombardeo para evitar el daño de las células (Finer *et al.* 1999). El ADN contenido en las partículas que son atrapadas en el núcleo, puede integrarse a los cromosomas de manera estable mediante un proceso de recombinación al azar (transformación estable). Debido a que la transformación estable ocurre a muy baja frecuencia, resulta necesario utilizar un sistema de selección *in vitro* que permita distinguir las células transformadas (Sanford 1988; Finer *et al.* 1999). A pesar de la desventaja que representa el bajo número de transformantes producido por un solo episodio de bombardeo, la biolística ha resultado exitosa en la transformación de numerosas especies en las que se incluyen soja, sorgo, caña de azúcar y trigo (Díaz *et al.* 2004; Marina *et al.* 2008; Danilova 2007).

Método de transferencia indirecta. Utiliza un sistema biológico para introducir el gen. El procedimiento más difundido es mediado por *Agrobacterium tumefaciens* o *A. rhizogenes*. Éstas son bacterias gram-negativas que se encuentran en el suelo y que naturalmente infectan a un amplio rango de especies vegetales dicotiledóneas causando enfermedades conocidas como “agalla de la corona” y “raíz en cabellera”, respectivamente. Atraídas por ciertas sustancias fenólicas que secretan las heridas de las plantas, ingresan a través de éstas provocando la proliferación de las células individuales infectadas. La capacidad patogénica está asociada a la presencia de megaplásmidos (150-200 Kb) llamados Ti (*tumor-inducing*) o Ri (*root-inducing*) en las bacterias. Se demostró que durante la patogénesis un fragmento de estos plásmidos llamado T-ADN (*transfer-DNA*), es transferido a la célula vegetal, donde se integra al ADN cromosómico y cuya expresión causa una activa división celular en la zona que dará origen al tumor o agalla a través de la síntesis de hormonas. El T-ADN está delimitado por dos repeticiones de 25 pb que lo flanquean, denominadas bordes derecho e izquierdo (Fig. 1.14), siendo éstos los únicos elementos *cis* necesarios para dirigir el procesamiento del T-ADN. Cualquier fragmento de ADN ubicado entre estos bordes puede ser transferido a la célula vegetal (Díaz *et al.* 2004).

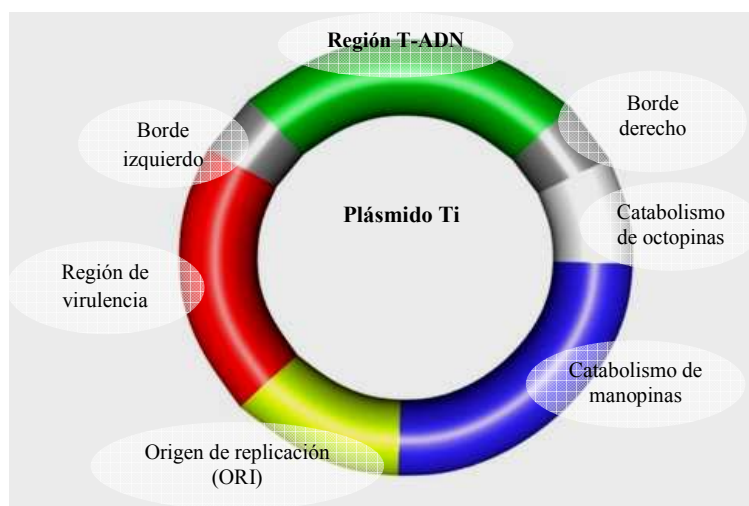


Fig. 1.14: Estructura del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. Modificado de Gómez y Echenique 2004.

El plásmido Ti contiene además una región de virulencia denominada *vir* donde se encuentran los genes responsables de la transferencia del fragmento T al genoma de la célula huésped. Esta región está compuesta por siete *loci* principales (*vir A*, *vir B*, *vir C*, *vir D*, *vir E*, *vir G* y *vir H*), que codifican la mayor parte de la maquinaria proteica involucrada en la transferencia del T-ADN. Además, se requiere de un grupo de genes de virulencia localizado en el cromosoma de la bacteria (genes *chv*) que participan en los estadios tempranos de unión a las células de la planta; como resultado, únicamente la región T se transferirá a la planta.

Ambos bordes son importantes para el reconocimiento de las endonucleasas virD1/virD2 que estarían involucradas en la liberación de la hebra T. Sin embargo, el proceso de escisión tendría características polares, como lo sugiere el hecho de que la proteína virD2 se une preferencialmente al borde derecho (extremo 5' de la hebra T). También se han identificado secuencias próximas al borde derecho que contribuirían a establecer la polaridad del proceso. En los plásmidos de octopina, una de estas secuencias incrementa el transporte del T-ADN a la célula vegetal. La proteína virC se une a esta secuencia favoreciendo el clivaje del borde derecho por la endonucleasa virD1/D2. El borde derecho es requerido en forma absoluta para la patogenicidad de *Agrobacterium tumefaciens*, mientras que el borde izquierdo es prescindible (Gelvin 2003).

Las interacciones que tienen lugar durante la transformación genética mediada por *Agrobacterium* es un proceso (Fig. 1.15) que puede dividirse en ocho pasos distintivos: 1) *Agrobacterium* reconoce y se une a la célula huésped. Esta unión es mediada por proteínas codificadas en el cromosoma de la bacteria y por receptores específicos de la célula huésped; 2) El sistema de traducción de señales de *Agrobacterium* reconoce señales químicas específicas de la planta; 3) La proteína virG media la traducción de señales y la activación transcripcional de los genes *vir*; 4) La formación de la copia de T-ADN y del complejo T inmaduro que está presente en la bacteria (dentro de la bacteria el T-ADN es inmaduro); 5) La formación del complejo de transporte a través de las membranas de la bacteria y de la pared celular, compuesto principalmente por las proteínas de la familia virB y la proteína virD4, lo que permite la exportación de la hebra T y de las proteínas virD2 la cual está unida a la región 5' del T-

ADN y virE1 al citoplasma de la célula vegetal; 6) La formación del complejo T maduro, formado por la hebra T y las proteínas virD2 y virE2 ya dentro de la célula vegetal; 7) La importación del complejo T al núcleo, proceso que es facilitado por proteínas de la planta entre las que se ha identificado a AtKAPa y VIP1; 8) El transporte dentro del núcleo y la integración del T-ADN al genoma de la planta, mediado por virD2/virE2 y por factores nucleares. Se ha reportado que virD2 es capaz de unirse a las ciclofilinas RocA, Roc4 y CypA, proteínas que actúan como chaperonas y contribuirían a mantener la conformación de virD2. Otra proteína vegetal que se une a virD2 es una fosfatasa tipo 2C (PP2C), requerida para la acumulación de virD2 en el núcleo. Finalmente, virD2 también interacciona con AtKAPa. Esta proteína, de la familia de carioferinas, participa en la importación de proteínas al núcleo. A diferencia de virD2, virE2 no se une a AtKAPa, pero si lo hace a otras dos proteínas VIP1 y VIP2. La proteína VIP1 es capaz de importar la proteína VirE1 al núcleo en un sistema de levaduras. A su vez, VIP2 no sólo se une a virE2, sino también VIP1 en ensayos de doble híbrido. Por lo tanto, VIP1, VIP2 y VirE2 pueden funcionar como un complejo multiproteico facilitando y participando el transporte hacia el núcleo de la proteína virE2 y contribuir así a la integración del complejo T. Además de AtKAPa y VIP1, se ha descrito que el complejo RAN, con actividad GTPasa, es requerido para la importación al núcleo en otros sistemas, sugiriendo que también participaría en la importación del complejo T al núcleo. Análogos de GTP no hidrolizables bloquearían la importación al núcleo de las proteínas virE2 y virD2 por inhibición de RAN. La acción combinada de proteínas bacterianas y proteínas huéspedes contribuyen a la translocación del complejo T maduro en la célula vegetal (Gelvin 2000; Tzfira y Citovsky 2006).

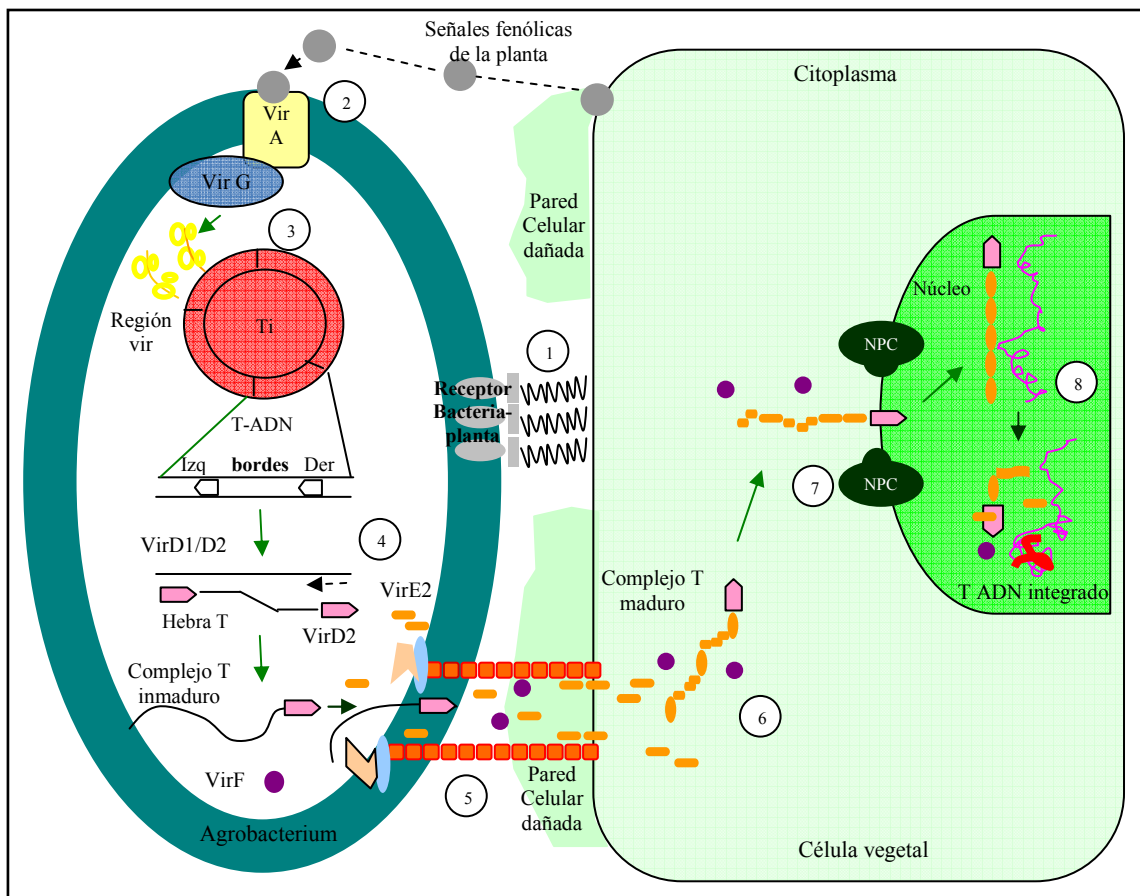


Fig. 1.15. Mecanismos moleculares implicados en la transformación por *Agrobacterium tumefaciens*. Tomado de Tzfira y Citovsky 2006.

Una vez en el núcleo, el complejo T participa de la integración de la hebra T al genoma de la planta y es liberado de su proteína acompañante. El T-ADN interacciona con VIP1, CAK2M y TATA box, este complejo guía al T-ADN hacia el sitio de unión en la cromatina. VIP1 y quizás otros factores de transcripción interaccionan con una histona (H2A), proteína esencial que integra al T-ADN. El mecanismo proteolítico podría ser por un complejo que se forma con VIP1, VirF y VirE2. Una proteína F-box bacteriana funcionaría como ligasa. A este paso seguiría un paso de síntesis reparativa de la hebra complementaria en que intervendría la maquinaria nuclear de la planta.

Sin embargo, otros estudios sugieren que la doble cadena se sintetizaría previamente a la integración al genoma vegetal. La proteína VirD2 tiene en su extremo C- terminal motivos presentes en la familia de las recombinasas. La proteína VirE2 se requeriría para la integración del extremo 3' del T-ADN.

También se ha sugerido una participación de la histona H2A en el proceso de integración (Tzfira y Citovsky 2006).

Aprovechando la infección de éste patógeno en plantas y, debido a la posible manipulación del plásmido, la ingeniería genética utiliza su metodología para obtener plantas transgénicas, siendo éste método, el más utilizado para la transformación genética de plantas (Dafny-Yelin y Tzfira 2007). Para ello, se remueven previamente todos los genes comprendidos dentro de la región T (oncogenes y genes de síntesis de opinas) que son los responsables de la patogenicidad, pero no se afecta la transferencia e integración del T-ADN. El plásmido Ti sin sus regiones intermedias es llamado “desarmado”. Sobre esta base, se desarrollan vectores de expresión que permiten clonar genes de interés dentro de la región T (Fig. 1.16). Aunque actualmente no es utilizado el vector completo, se utilizan los llamados “*cassette de transformación*”, tomándose los bordes del plásmido y se modifica “el centro” del mismo quitando las secuencias innecesarias en la transformación y que interrumpen en el proceso. Las mismas son secuencias propias del plásmido, como los elementos recombinantes que podrían producir multicopias y formar estructuras secundarias de ADN y ARN procariota en el genoma vegetal (Agrawal *et al.* 2005).

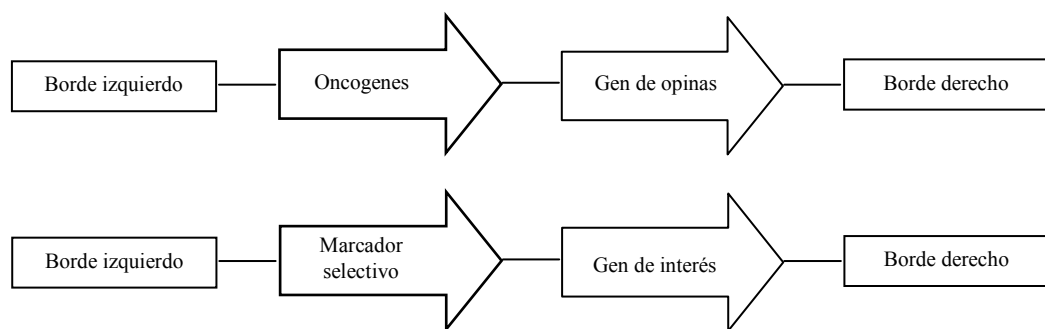


Fig. 1.16: Plásmido Ti salvaje (arriba) y modificado, llamado “*cassette de transformación*” (abajo).

Vectores de transformación

Existen dos tipos diferentes de sistemas de vectores de transformación que fueron diseñados mediante biología molecular por el hecho que los plásmidos son muy grandes. Resulta obvio que la región T desarmada con el gen de interés y los genes *vir* deben estar presentes en cualquiera de los sistemas. Por un lado, el tipo *cointegrativo*, en donde el gen de interés es introducido dentro de un plásmido Ti mediante un paso de

recombinación simple a partir del llamado vector intermediario (un plásmido común de trabajo para *Escherichia coli*). En este plásmido Ti, las secuencias comprendidas entre los bordes de la región T han sido reemplazadas por secuencias que permiten la co-integración del vector intermediario. Este plásmido Ti conserva también todos los genes comprendidos en la región *vir*. El sistema basado en un vector *binario*, el gen de interés y los genes *vir* residen en dos replicones separados capaces de coexistir y replicarse autónomamente en *Agrobacterium*. El replicón que contiene el gen de interés (en general de tamaño pequeño) se denomina *vector binario*. El desarrollo de vectores binarios y la disponibilidad de un amplio rango de cepas de *Agrobacterium* que contienen plásmidos Ti desarmados convirtieron a la transformación basada en esta bacteria en un método preferencial de transformación vegetal a pesar que ambos sistemas son herramientas eficientes (Gelvin *et al.* 2003; Díaz *et al.* 2004).

El método de transformación indirecta, a pesar de que al igual que los otros métodos la inserción es al azar, es muy utilizado debido a que no resulta una técnica costosa y es de fácil inoculación, se obtiene mayor cantidad de células transformadas (alrededor del 1%), el transgen se introduce dentro de alguna región de transcripción y la inserción dentro del genoma es controlada, a diferencia del método de transferencia por biobalística que inserta innumerables copias con un riesgo considerable de silenciamiento (Finer *et al.* 1999). Además, el método biológico, permite una transformación estable perpetuándose el transgen en la progenie. Es ampliamente utilizado en la obtención de eventos transgénicos de uso comercial aportando tolerancia a estrés, como algodón Bt tolerante a lepidópteros (MON531) y tolerante a glifosato RR (MON1445). Asimismo, esta técnica es utilizada en diversos estudios que comprenden la modificación de la expresión de genes o inserción de nuevos genes.

Poco tiempo atrás, los eventos transgénicos se obtenían por introducción de un sólo vector o un cassette de transformación con **un gen de interés**; sin embargo, actualmente se liberaron al mercado líneas transgénicas portadoras de múltiples transgenes. Se pueden introducir múltiples genes dentro de una misma planta de distintas maneras: por medio de cruzamientos sexuales entre plantas que acarrean diferentes genes como maíz RR-Bt y el triple transgénico de maíz también tolerante a glufosinato de amonio (Argenbio), retransformación integrando nuevos genes en plantas transgénicas y una co-transformación con la entrega combinada de distintos genes en el mismo proceso de transformación (Dafny-Yelin y Tzfira 2007). Hasta cinco transgenes

fueron transferidos a plantas de arroz de ésta última manera, demostrando mayor efectividad, facilidad y rapidez en el proceso (Agrawal *et al.* 2005). En todos los casos, cada gen es dirigido por su propio promotor.

Los vectores utilizados en la transformación, además del gen de interés, contienen en su constructo un gen denominado **promotor** que regulará el momento de expresión del transgen (Birch *et al.* 1997). Existe una amplia variedad de promotores vegetales caracterizados estructural y funcionalmente que pueden ser utilizados con el propósito de regular la expresión génica en el evento resultante. Entre ellos podemos citar a los promotores constitutivos (*CaMV35S*, *Ubiquitina*, *Actina*), inducibles por heridas, metales y estrés abiótico (*RD29A*), regulados por la luz (*Cab* y algunos genes de Rubisco) y específicos de órganos (tallos, raíces, frutos, semillas, entre otros) (Lacorte *et al.* 1997; Peters *et al.* 1999; Aoki *et al.* 2002; Shrawat *et al.* 2007). Es importante destacar, que en caso de estudios de especies tolerantes a estrés abiótico es conveniente utilizar promotores inducibles por estrés ya que los constitutivos presentan desventajas como variaciones fenotípicas en algunas especies e incluso generan un gasto innecesario de energía ya que sobre-expresarían el transgen (Alet *et al.* 2008).

Una vez que el experimento de transformación se llevó a cabo, se procede a seleccionar los explantes que se transformaron mediante el empleo de un medio de cultivo selectivo. En la mayoría de los casos, la selección se basa en el agregado de una sustancia tóxica al medio basal a fin de impedir el crecimiento del tejido no transformado (selección negativa). Al expresarse el **gen selectivo** en las células transformadas, permite su supervivencia y la regeneración de plantas a partir de las mismas. Los genes de resistencia a antibióticos aislados de bacterias han sido frecuentemente utilizados como selectores (Díaz *et al.* 2004). El más utilizado de ellos es el gen *nptII* (Tabla 1.3), aislado inicialmente del transposón Tn5 que está presente en *Escherichia coli*. Éste codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa, la cual inactiva a una serie de antibióticos aminoglucósidos por fosforilación (Peters *et al.* 1999; Wu *et al.* 2006; Koc *et al.* 2007; Petri *et al.* 2008; Roy *et al.* 2008). Otros genes ampliamente utilizados son los que confieren resistencia a gentamicina (*aac3*, gentamicina acetil transferasa), higromicina (*hpt*, higromicina fosfotransferasa, Yu *et al.* 1999; Aoki *et al.* 2002; Shrawat *et al.* 2007), bialofos (*bar*, Shrawat *et al.* 2007) y aquellos que confieren resistencia a los herbicidas glufosinato y glifosato (*EPSPS*, inhibidor de la 5 enolpiruvato 3-fosfato sintasa) (Danilova 2007).

Tabla 1.3. Marcadores selectivos disponibles.

<i>Gen de selección</i>	<i>Producto genético</i>	<i>Fuente</i>	<i>Selección</i>
<i>NptII</i>	Neomicina fosfotransferasa	Tn5	Kanamicina, paromomicina, neomicina
<i>Ble</i>	Resistencia a bleomicina	Tn5 y <i>Streptoalloteichus hindustanus</i>	Bleomicina, fleomicina
<i>Dhfr</i>	Dihidrobolato reductasa	Plásmido R67	Metotrexato
<i>Cat</i>	Cloranfenicol acetil transferasa	Fago p1Cm	Clorafenicol
<i>AphIV</i>	Higromicina transferasa	<i>E. coli</i>	Higromicina B
<i>SPT</i>		Tn5	Estreptomicina
<i>aacC3, aacC4</i>	Gentamicina-3-N-acetiltransferasa	<i>Serratia marcescens</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gentamicina
<i>Bar</i>	Fosfinotricin acetil transferasa	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Fosfinotricina, bialofos
<i>EPSP</i>	5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa	<i>Petunia hybrida</i>	Glifosato
<i>Bxn</i>	Bromoxinil nitrilasa	<i>Klebsiella ozaenae</i>	Bromoxinil
<i>psbA</i>	Proteína Qn	<i>Amaranthus hybridus</i>	Atrazina
<i>tfdA</i>	2,4-D monooxigenasa	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Acido 2,4 diclorofenoxiacético
<i>DHPS</i>	Dihidroxipicolinato sintasa	<i>E. coli</i>	S-aminoetil L-cisteína
<i>AK</i>	Aspartato kinasa	<i>E. coli</i>	Alta concentración de lisina y treonina
<i>Sul</i>	Dihidropteroato sintasa	Plásmido R46	Sulfonamida
<i>Csrl-I</i>	Acetolactato sintasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Herbicida sulfonilurea
<i>manA</i>	Manosa 6P-isomerasa	<i>E. coli</i>	Manosa-6-fosfato

Un **gen reportero** al permitir la rápida identificación de las células transformadas, es utilizado generalmente para explorar la localización espacio-temporal de la expresión génica. Para ello, las regiones reguladoras de los genes que se desea estudiar son ligadas al gen reportero y las construcciones así obtenidas son transferidas al genoma vegetal. Idealmente, un gen reportero debe ser de fácil ensayo, si es posible en condiciones no destructivas del tejido. Se requiere también que la actividad endógena asociada al gen reportero sea muy baja o inexistente en las plantas a transformar.

Actualmente, se cuenta con un pequeño número de genes reporteros de uso frecuente (Tabla 1.4), siendo los más utilizados, luciferasa (*LUC*), β -glucuronidasa (*GUS*; *UidA*) y proteína de fluorescencia verde (*GFP*); en menor grado, cloranfenicol acetiltransferasa (*Cat*) (Finer *et al.* 1999, Danilova 2007).

Tabla 1.4: Características de los principales genes reporteros disponibles.

<i>Genes reporteros</i>	<i>Origen</i>	<i>Detección</i>	<i>Referencias</i>
β -glucuronidasa (<i>GUS</i> ; <i>UidA</i>).	<i>Escherichia coli</i>	No radioactivo. Cualitativo, histoquímico. Cuantitativo, fluorométrico.	Jefferson <i>et al.</i> 1987
Proteína de fluorescencia verde (<i>GFP</i>)	<i>Aequorea victoria</i> (medusa)	Fluorescencia no destructiva.	Cubbit <i>et al.</i> 1995
Luciferasa (Luc)	<i>Photinus pyralis</i>	Luminescencia.	Koncz <i>et al.</i> 1989
Cloranfenicol acetil transferasa (<i>Cat</i>)	<i>Escherichia coli</i>	Radiactivo. Semicuantitativo.	Krausz y Graw 1996

El gen reportero *GUS* brinda utilidad tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, es de fácil metodología y no requiere de equipamiento especializado. Su desventaja radica en que para su detección se precisa destruir el tejido, a pesar de lo cual, es ampliamente utilizado en la determinación de la calidad y eficiencia de transformación, inducción y funcionalidad de promotores, caracterización y expresión de genes, transformación de bacterias y evaluación de transformaciones transientes o estables (Jefferson *et al.* 1986; Jefferson *et al.* 1987; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 1994; Lacorte *et al.* 1997; Serres *et al.* 1997; Aida *et al.* 1999; Humara *et al.* 1999; Kasuga *et al.* 1999; Peters *et al.* 1999; Yu *et al.* 1999; Higuchi *et al.* 2001; Aoki *et al.* 2002; Nandakumar *et al.* 2004; Nakashima *et al.* 2006; Tojo *et al.* 2006; Wu *et al.* 2006; Duque *et al.* 2007; Renying *et al.* 2007; Shrawat *et al.* 2007).

Detección del transgen

Como la selección de los explantes transformados mediante el gen de selección no es tan precisa por el hecho que algunos tejidos transformados toleran el agente selectivo o puede deberse a un “escape” de células vecinas transformadas hacia células salvajes adquiriendo cierta resistencia, se procede a identificar aquellas plantas que realmente son portadoras del transgen (Gómez y Echenique 2004; Reece 2004) empleando algunas de las siguientes técnicas moleculares:

- PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Se determina la presencia del transgen dentro del genoma.

- *Southern blotting* que determina la posición del transgen y el número de copias integradas.
- *Western blotting*. Se determina la presencia del transcripto del gen de interés, mediante la detección inmunogénica de la proteína que codifica.
- RT-PCR (transcripción reversa seguida de PCR). Se observa la presencia del transcripto del gen de interés.
- PCR en tiempo real. Detecta el nivel de amplificación de una secuencia de interés y la estima cuantitativamente.

Plantas transgénicas tolerantes a estrés osmótico

En los últimos años, la comunidad científica ha realizado denodados esfuerzos en la obtención de plantas transgénicas que expresen tolerancia a la desecación, salinidad y bajas temperaturas; sin embargo, hasta el momento no han sido liberados al mercado eventos con tales características. Se han intentado fortalecer la expresión de grupos de genes como: *i*) genes involucrados en la transmisión de señales; *ii*) reguladores transcripcionales; *iii*) genes que codifican para la síntesis de proteínas funcionales involucradas en la tolerancia, como proteínas del *shock* térmico, por frío, proteínas LEA, proteínas de transporte de iones; *iv*) genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de metabolitos protectores; *v*) antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. En el Anexo 1 se incluye un compendio de los eventos transgénicos tolerantes a estrés hídrico y salinidad, portadores de genes reguladores y funcionales.

Ensayos en condiciones de cultivo comercial

En la obtención de tolerancia “a campo”, el pronóstico se complica aún más dado que las plantas en su ambiente natural, están sometidas a múltiples factores estresantes que se presentan de manera simultánea. Esto puede agravar el daño que sufre el organismo y al mismo tiempo, desencadenar rutas protectoras diferentes e incluso opuestas (Del Viso *et al.* 2010). Debido a la existencia de interacciones negativas, se ha buscado mejorar a

las especies vegetales introduciendo varios genes que confieren tolerancia a múltiples estreses; sin embargo, esto no significa que una simple inserción no sea de utilidad ya que cada estudio aporta información sobre las características de los genes y hace posible que pueda llevarse a cabo los nuevos eventos de transformación múltiples, a la vez que, posiblemente, el desarrollo de la tolerancia a una combinación de estreses podría requerir una respuesta única (Mittler 2006). Al mismo tiempo, es importante tener bien definido que se desea obtener; por ejemplo, la eficiencia en el uso del agua (EUA) y la tolerancia a la sequía suelen estar relacionadas. Cuando el suministro de agua es limitado, resulta importante considerar EUA en términos de materia seca producida por unidad de agua utilizada. Frecuentemente, EUA y tolerancia a sequía son considerados sinónimos a pesar de que, en la mayoría de los casos, sólo tienen relación entre sí. La eficiencia en el uso del agua se refiere a un parámetro de producción y un objetivo importante de la investigación en esta área consiste en optimizar EUA manteniendo, al mismo tiempo, una elevada productividad. Por el contrario, al analizar la tolerancia a sequía, se enfatiza en la supervivencia del vegetal durante un período de bajo suministro de agua. De hecho, la capacidad para sobrevivir a intensos déficit hídricos suele estar negativamente relacionada con la productividad. Actualmente, hay gran interés en la posibilidad de incrementar la tolerancia a sequía y mejorar EUA a través del mejoramiento genético y manejo más adecuado de los cultivos. Un objetivo deseable, aunque difícil de conseguir, sería que se pudiesen obtener combinaciones de características que incrementen la tolerancia a la deshidratación y la eficiencia en el uso del agua, sin pérdidas en el rendimiento.

9. Planteamiento del problema

La aplicación de la ingeniería genética en estudios de estrés, brinda la posibilidad de analizar el comportamiento y eventual contribución diferencial que tendría un determinado gen o grupo de genes sobre el/los procesos bioquímicos y fisiológicos relacionados con la defensa de la planta y su tolerancia a dicha situación desfavorable. Quizás el más elemental de los estudios, involucra la sobre-expresión de osmolitos compatibles que aseguran un adecuado flujo de agua en los tejidos vegetales, evitando así el incremento excesivo de iones y su consecuente efecto tóxico. Es evidente que no todas las plantas producen los mismos compuestos y en el caso de que así lo hagan, no todas los sintetizan en las cantidades requeridas para regular adecuadamente el potencial osmótico. El clonado de secuencias génicas de enzimas identificadas como "reguladoras" ha generado el concepto de que su sobre-expresión podría contribuir al incremento de la tolerancia. En efecto, algunas líneas transgénicas obtenidas han presentado un mejor comportamiento frente al estrés en relación con sus pares no transformadas; sin embargo, el mecanismo involucrado permanece esencialmente desconocido y ello se debe a la gran cantidad de variables fisiológicas y metabólicas que resultan afectadas, aún en las transformaciones puntuales. Esto sin embargo no desvirtúa su uso potencial como "marcadores moleculares". Si bien la metodología de transformación del género *Lotus* reconoce antecedentes de varios años atrás, dichas técnicas fueron aplicadas mayoritariamente a las especies *L. japonicus* y *L. corniculatus* (Stiller *et al.* 1997); las que se ocupan en mayor grado de los fenómenos bioquímicos-fisiológicos que desencadenan las relaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno y con menos frecuencia, al estudio de la biosíntesis de los flavonoides.

En el contexto de un programa interdisciplinario creado con la finalidad de evaluar genes que potencialmente tengan relevancia en los procesos de tolerancia a estrés abiótico, la Unidad de Biotecnología 1 del Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECh, CONICET) ha diseñado vectores portadores de secuencias codificantes de la biosíntesis de las poliaminas, bajo el control del promotor inducible *RD29A* (Chiesa *et al.* 2004), el cual posee al menos dos secuencias DRE (respuesta a desecación e independiente del ácido abscísico -ABA-), una ABRE (respuesta a frío y salinidad y dependiente de ABA) y una que podría ser inducida por estrés oxidativo conocida como *as-1* (Ishitani *et al.* 1997); verificándose la funcionalidad del mismo en el género *Lotus* (Chiesa *et al.* 2004).

10. Objetivos

Objetivo general:

Evaluar la función del gen codificante de arginina descarboxilasa en la tolerancia a estrés osmótico de *Lotus tenuis*.

Objetivos particulares:

- I. Transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* y producción de plantas transgénicas de *Lotus tenuis*, detección y análisis de la inserción del gen de interés.
- II. Análisis molecular, bioquímico y fisiológico de las plantas controles (no transformadas) y portadoras del gen, en condiciones iónicas normales y estresantes.

11. Hipótesis

Se presume que la sobreexpresión del gen de arginina descarboxilasa incrementará los niveles endógenos de poliaminas, favoreciendo la tolerancia de *Lotus tenuis* al estrés osmótico.

ANEXO

Genes involucrados en la respuesta a la tolerancia a estrés salino y sequía.

Tomado de Zhou et al. 2007 y Ashraf et al. 2008

a. Obtención de plantas tolerantes a estrés hídrico utilizando factores de transcripción de origen vegetal.

<i>Clasificación</i>	<i>Gen</i>	<i>Especie modificada</i>	<i>Origen</i>	<i>Sistema de expresión</i>	<i>Parámetro mejorado</i>	<i>Año</i>
DREB1/CBF	DREB1A/CBF3	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP y RD29A	Retención de agua	1998 1999
DREB1/CBF	DREB1B/CBF1	Tomate	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	2002
DREB1/CBF	OsDREB1B/CBF	Tabaco	Arroz	CaMV35SP	Deshidratación, frío y EROs	2008
DREB1/CBF	CBF4	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP y RD29A	Retención de agua	2002
DREB1/CBF	ZmDREB1A	Arabidopsis	Maíz	CaMV35SP	Deshidratación	2004
DREB1/CBF	DREB1C/CBF2	Arabidopsis	Arabidopsis	<i>Knockout</i>	Deshidratación	2004
AP2/ERF	SHN1/WIN1	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	2004
DREB1/CBF	DREB1A/CBF3	Trigo	Arabidopsis	RD29A	Retención de agua	2004
DREB1/CBF	DREB1A/CBF3	Tabaco	Arabidopsis	RD29A	Retención de agua	2004
DREB1/CBF	DREB1A/CBF3	Arroz	Arabidopsis	Maíz Ubi-1P	Retención de agua	2005
AP2/ERF	WXP1	Alfalfa	<i>M. truncatula</i>	CaMV35SP	Retención de agua	2005
AP2/ERF	HRD	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Deshidratación	2007
DREB2A	DREB2A	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP y RD29A	Retención de agua	2005
bZIP	ABF3, ABRE2/ABF4	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	2002
bZIP	ABRE1/ABF2	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	2004
bZIP	ABF3	Arroz	Arabidopsis	Maíz Ubi-1P	Retención de agua	2005
bZIP	ABRE1/ABF2	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua y deshidratación	2005
bZIP	ABRE1/ABF2	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Deshidratación	2005
bZIP	GmbZIP1	Arabidopsis	Soja	CaMV35SP y RD29A	Deshidratación	2011
MYB/MYC	AtMYC2/AtMYB2	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Deshidratación	2002
MYB	CpMYB10	Arabidopsis	<i>C. plantagineum</i>	CaMV35SP	Retención de agua	2004
R2R3-MYB	AtMYB60	Arabidopsis	Arabidopsis	Knockout	Retención de agua	2005
R2R3-MYB	AtMYB41	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Expansión celular	2008
Cys2His2-type	ZPT2-3	Petunia	Petunia	CaMV35SP	Deshidratación	2003
Cys2His2-ty	CAZFP1	Arabidopsis	Pimienta	CaMV35SP	Retención de agua	2004
Cys2His2-type	STZ	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Deshidratación	2004
NAC	ANAC019/055/072	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	2004

b. Obtención de plantas tolerantes a estrés hídrico utilizando como herramientas genes que codifican proteínas protectoras.

<i>Clasificación</i>	<i>Gen</i>	<i>Especie modificada</i>	<i>Origen</i>	<i>Sistema de expresión</i>	<i>Parámetro mejorado</i>	<i>Año</i>
Fructanos	SacB	Tabaco	<i>B. subtilis</i>	CaMV35SP	Deshidratación	1995
Trealosa	TPS1	Tabaco	<i>S. cerevisae</i>	CaMV35SP	Deshidratación	1996
Mioinositol	IMT1	Tabaco	<i>C. edulis</i>	CaMV35SP	Retención de agua	1997
Prolina	P5CS	Arroz	<i>Vigna acontilifolia</i>	AIPC-ABA-inducible	Retención de agua	1998
Trealosa	OtsA,OtsB	Tabaco	<i>E. coli</i>	CaMV35SP	Riego limitado	1998
Fructanos	SacB	Remolacha	<i>B. subtilis</i>	CaMV35SP	Riego limitado	1999
Glicina betaina	COX	Arabidopsis/ Canola/ Tabaco	<i>A. pascens</i>	CaMV35SP	Riego limitado	2000
Galactinol	AtGolS2	Arabidopsis	<i>Arabidopsis</i>	CaMV35SP	Retención de agua	2002
Trealosa	TPSP (OtsA,OtsB)	Arroz	<i>E. coli</i>	ABA-inducible/ rbcSP	Retención de agua	2002
Trealosa	TPSP (OtsA,OtsB)	Arroz	<i>E. coli</i>	Maíz Ubi- 1P	Retención de agua	2003
Manitol	mtID	Trigo	<i>E. coli</i>	Maíz Ubi- 1P	Limitación de agua	2003
Poliaminas	ADC	Arroz	<i>D. stramonium</i>	Maíz Ubi- 1P	Deshidratación	2004
Poliaminas	ADC2	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Deshidratación	2010
Poliaminas	ADC	Arabidopsis	Avena	RD29A	Deshidratación y frío	2011
Poliaminas	SAMDC	Arroz	<i>D. stramonium</i>	Maíz Ubi- 1P	Rápida recuperación luego del estrés	2009
Poliaminas	SPDS	Arabidopsis	<i>C. ficifolia</i>	CaMV35SP	Retención de agua	2004
Prolina	P5CS	Petunia	Arabidopsis/ Arroz	CaMV35SP	Retención de agua	2005
Trealosa	TPS1	Tomate	<i>S. cerevisae</i>	CaMV35SP	Retención de agua	2005
Glicina betaina	GSMT+DMT	Arabidopsis	<i>A. halophytica</i>	CaMV35SP	Retención de agua	2005
LEA	HVA1	Arroz	Cebada	Arroz Act-1P	Retención de agua	1996, 2001
LEA	HVA1	Trigo	Cebada	Maíz Ubi-1P	Limitación hídrica	2000
Chaperona	BiP	Tabaco	Soja	CaMV35SP	Retención de agua	2001
Proteína shock térmico	AyHsp17.6A	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	2001
LEA	LEA	<i>Chinese Babbage</i>	Canola	CaMV35SP	Retención de agua	2005
Detoxificación	Mn SOD	Alfalfa	<i>N. plumbaginifolia</i>	CaMV35SP	Retención de agua	1996
Peroxidación de lípidos	MsALR	Tabaco	Alfalfa	CaMV35SP	Retención de agua	2000
NAD+ ruptura	PARP	Canola	-	CaMV35SP (ARNi)	Retención de agua	2005
Otros	CDT1	<i>C. plantagenium</i>	<i>C. plantagenium</i>	Agrobacterium pg5	Callos	1997
Transporte de iones	AVP1	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	2001
Biosíntesis de ABA	AtNCED3	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	2001
Estomas	Chl-NADP-ME	Tabaco	Maíz	Agrobacterium MAS	Conductancia estomática	2002
Catabolismo de ABA	CYP707A3	Arabidopsis	Arabidopsis	<i>Knockout</i>	Retención de agua	2005

c. Obtención de plantas transgénicas tolerantes a déficit hídrico utilizando genes involucrados en vías de señalización.

<i>Clasificación</i>	<i>Gen</i>	<i>Especie modificada</i>	<i>Origen</i>	<i>Sistema de expresión</i>	<i>Parámetro mejorado</i>	<i>Año</i>
Proteína kinasa, CDPK	Os CDPK7	Arroz	Arroz	CaMV35SP	Retención de agua	2000
GSK3/Shaggy	AtGSK1	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	2001
MAPKKK	NPK1	Maíz	Tabaco	CaMV35SP	Estrés hídrico	2004
SnRK2	SRK2C	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	2004
Medidor de Calcio	CBL1	Arabidopsis	Arabidopsis	Agrobacterium MAS	Retención de agua	2003
Proteína 14-3-3	GF14I	Algodón	Algodón	CaMV35SP	Retención de agua	2004
CC-NBS-LRR	ADR1	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	2004
Famesil-transferasa	ERA1	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP/RD29AP (antisentido)	Retención de agua	2005

d. Obtención de plantas transgénicas tolerantes a estrés salino utilizando genes involucrados en la síntesis de proteínas protectoras y funcionales.

<i>Clasificación</i>	<i>Gen</i>	<i>Planta transformada</i>	<i>Origen</i>	<i>Parámetro mejorado</i>	<i>Año</i>
Glicina betaina	betA	Tabaco/Brassica oleracea	<i>E. coli</i>	Aumenta biomasa y retiene agua	1996/2004
Glicina betaina	BADH	Arroz	<i>E. coli</i>	Mejoramiento de relación K^+/Na^+	2000
Glicina betaina	BADH	Zanahoria	<i>E. coli</i>	Mejora crecimiento	2004
Glicina betaina	BADH	Tabaco	<i>E. coli</i>	Mejora crecimiento y actividad fotosintética	1997/2000
Glicina betaina	BADH	Tomate	<i>Atriplex</i>	Mejora crecimiento y reduce pérdida de iones	2002
Glicina betaina	CodA	Arabidopsis/Arroz	<i>Arthrobacter globiformis</i>	Incrementa crecimiento y capacidad de fotosíntesis	1997/1998/2000
Prolina	P5CS	Tabaco/Arroz	<i>Vigna acantifolia</i>	Incrementa crecimiento	1995/1998
Prolina	P5CS	Tabaco	<i>Vigna acantifolia</i>	Reduce estrés oxidativo y mejora germinación	2000
Prolina	P5CS	Batata	Arabidopsis	Mejora crecimiento y rendimiento	2005
Prolina	ProDH	Arabidopsis	Arabidopsis	Mantiene mayor turgencia	2005
Prolina	COX	Arabidopsis/Tabaco/Brassica napus	<i>Arthrobacter pascens</i>	Mejora crecimiento	2000
Ectoína	Hmect ABC	Tabaco	<i>B. alcalophilus</i>	Mejora crecimiento de raíz, fotosíntesis, relación K^+/Na^+ y absorción de nitrógeno.	2006
Manitol	Mt1D	Arabidopsis/Tabaco/Berenjena/Trigo	<i>E. coli</i>	Mejora germinación y crecimiento	1993/1995/2002/2003
Manitol	Mt1D	<i>Populus tomentosa</i>	<i>E. coli</i>	Mejora crecimiento, conductancia estomática, fotosíntesis, tasa transpiratoria y reduce permeabilidad de membrana	2005
Mio-inositol	IMT1	Tabaco	<i>C. edulis</i>	Mejora actividad fotosintética	1997

Trealosa	OstA y OstB	Arroz	<i>E. coli</i>	Mejora crecimiento y reduce daños fotooxidativos	2002
Trealosa	TPS y TPP	Arroz	<i>E. coli</i>	Mejora crecimiento y capacidad de fotosíntesis	2003
Transportador de iones	AVP1	Arabidopsis		Mayor compartimentalización	2001
	HAL1	Melón/Tomate/Arabidopsis		Mejora relación K^+/Na^+	1997/2000/2001
	AtHal3	Arabidopsis	Arabidopsis	Mejora relación K^+/Na^+	2000
	AtNHX1	Arabidopsis/Tomate/ <i>Brassica napus</i> /Trigo/Festuca	Arabidopsis	Mejora crecimiento y rinde	1999/2001/2001/2004/2005/2006
	AtNHX1	Algodón	Arabidopsis	Mejora rinde, calidad de fibra, fotosíntesis y asimilación de N.	2005
	AtNHX1	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Arabidopsis	Mejora relación K^+/Na^+ bajo condiciones salinas.	2008
	AgNHX1	Arroz	<i>A. gmelini</i>	Mejora crecimiento	2002
	GhNHX1	Tabaco	Algodón	Mejora crecimiento	2004
	SsVP	Arabidopsis	<i>Suaeda salsa</i>	Mejora crecimiento, actividad ATP-asas y compartimentalización de sodio	2005
	SOD2	Arroz	<i>S. cerevisae</i>	Incrementa asimilación de iones y reduce Na^+ , mayor fotosíntesis, actividad ATP-asas y reduce generación de EROs	2006
LEA Proteínas shock térmico	SsNHX1 y AVP1	Arroz	<i>Suaeda salsa</i>	Incrementa actividad de ATP-asas, mejora relación K^+/Na^+ , mayor tasa de asimilación de CO_2 y reduce EROs.	2006
	PgNHX1 y AtAVP1	Tomate	<i>Pennisetum glaucum</i> y <i>Arabidopsis</i>	Incrementa tolerancia a salinidad, acumula prolina, retiene clorofila y mantiene homeostasis iónica.	2011
	HKT1	Arabidopsis	Arabidopsis	Mejora ingreso de K^+	2001/2004
	SOS1	Arabidopsis	Arabidopsis	Incrementa tolerancia	2003
	LEA	Arroz		Mejora crecimiento	1996
	DnaK1	Tabaco	<i>Aphanethece halophytica</i>	Reduce Na^+ y mejora fijación de CO_2	1999
	AtHsP17.6 A	Arabidopsis	Arabidopsis	Incrementa biomasa	2001

e. Obtención de plantas tolerantes a estrés salino utilizando factores de transcripción.

<i>Clasificación</i>	<i>Gen</i>	<i>Especie modificada</i>	<i>Origen</i>	<i>Parámetro mejorado</i>	<i>Año</i>
EREBP/AP2	Tsil	Tabaco	Tabaco	Incrementa tolerancia a sal y patógenos	2001
AP2	DREB1A	Arabidopsis/Arroz	Arabidopsis	Mejora crecimiento	1999/2004/2005
	OsDREB1A	Arabidopsis	Arroz	Incrementa tolerancia a sal, frío y virus	2003
	OsDREB1	Tabaco	Arroz	Incrementa tolerancia a sal y frío	2008
	Mtzpt2-1	<i>M. trunculata</i>	<i>M. trunculata</i>	Mejora crecimiento y tolerancia al estrés	2003
	CAP2	Tabaco	<i>Cicer arietinum</i>	Mejora crecimiento y aumenta transcritos de tolerancia al estrés	2006
	CpMYB10	Arabidopsis	<i>Craterostigma plantagineum</i>	Germinación	2004
	Alfin1		Alfalfa	Mejora crecimiento	1999
	STO	Arabidopsis	Arabidopsis	Mejora crecimiento	2003
	CBF3	Arroz	Arabidopsis	Incrementa tolerancia a sal	2005
	SNAC1	Arroz	Arroz	Incrementa tolerancia a sal	2006
CBF/DREBs	HvCBF4	Arroz	Cebada	Incrementa tolerancia a sal, sequía y frío	2007
NAC	SNAC2	Arroz	Arroz	Incrementa tolerancia a sal, sequía y frío	2008

f. Obtención de plantas transgénicas tolerantes a estrés salino utilizando genes involucrados en vías de señalización.

<i>Clasificación</i>	<i>Gen</i>	<i>Especie modificada</i>	<i>Origen</i>	<i>Parámetro mejorado</i>	<i>Año</i>
Proteína kinasa	MKK2	Arabidopsis	Arabidopsis	Incrementa tolerancia a sales	2004
MAPKKK	NPK1	Arabidopsis	Tabaco	Incrementa tolerancia a sales	2000
Proteína de unión a calmodulina	AtCaMBP25 (antisentido)	Arabidopsis	Arabidopsis	Incrementa tolerancia a sales	2004
Proteína kinasa Ser/Thr	SOS2	Arabidopsis	Arabidopsis	Reduce transporte de Na ⁺	2000
Sensor de Ca ²⁺	SOS3	Arabidopsis	Arabidopsis	Incrementa tolerancia a sales	1998

g. Obtención de plantas transgénicas tolerantes a estrés salino mediante otros mecanismos.

<i>Clasificación</i>	<i>Gen</i>	<i>Especie modificada</i>	<i>Origen</i>	<i>Parámetro mejorado</i>	<i>Año</i>
Glutation peroxidada	FeSOD	Tabaco	-	Mayor capacidad antioxidante y reduce estrés oxidativo	1996/1997/2000
Ascorbato peroxidasa	Ascorbato peroxidada	Tabaco	Arabidopsis	Mejora capacidad de fotosíntesis	2004
Glutamina sintasa	Glutamina sintasa	Arroz	-	Reduce fotorrespiración	2000
	Glioxilasa	Tabaco	-	Protege pigmentos fotosintéticos	1999
Cu/Zn SOD	Mn-SOD	Arroz	-	Reduce EAOs	1999
	PaSOD	Arabidopsis	<i>Potentilla atrosanguinea</i>	Tolerancia a estrés salino en germinación y crecimiento	2010
	MSR4	Arabidopsis	Arabidopsis	Incrementa resistencia a estrés oxidativo	2004
	AtLDH3	Arabidopsis	Arabidopsis	Reduce peroxidación de lípidos	2003
	GmALDH7	Tabaco/Arabidopsis	Soja	Incrementa germinación, tolerancia a sequía, sal y estrés oxidativo	2006/2006
Proteínas del tipo “dedos de Zn”	OsISAPI	Tabaco	Arroz	Incrementa tolerancia a sales	2004
	SDIR1	Tabaco, Arroz	Arabidopsis	Incrementa tolerancia a sales y deshidratación	2008
	ZFP252	Arroz	Arroz	Incrementa tolerancia a sales y deshidratación	2008

CAPÍTULO 2

**Transformación genética y producción de plantas transgénicas de
Lotus tenuis portadoras del gen codificante de arginina descarboxilasa**

1. Introducción

El género Lotus como modelo de estudio

Si bien, el género *Lotus* es integrado por más de 180 especies, sólo algunas de ellas revisten interés en la producción pecuaria. En este contexto, *Lotus corniculatus*, *L. tenuis* y *L. uliginosus* se caracterizan por producir forrajes de alta calidad que son utilizados en sistemas de pastoreo directo (Damiani *et al.* 2008). Debido a que éstas presentan una elevada plasticidad que les permite adaptarse a variadas situaciones estresantes tales como inundaciones, suelos ácidos, salinos y baja fertilidad, hace posible su uso en la recuperación de áreas marginales. *L. corniculatus* posee su centro de origen en Europa donde se lo cultiva de manera intensiva, extendiéndose su uso al norte de América y Australia. *L. tenuis*, especie originaria del Mediterráneo y naturalizada en el país, sembrada inicialmente en Pigüé (Buenos Aires) en la década de 1930, continuó su expansión por la zona bonaerense y finalmente fue establecida en una superficie considerable de los pastizales de la Pampa Deprimida del Salado en el año 1980 (Vignolio y Fernández 2006). Por su parte, *L. uliginosus* originaria de Europa y Norte de África, naturalizada en Argentina, es una especie apropiada para suelos poco fértiles, húmedos y ácidos (Díaz *et al.* 2005; Damiani *et al.* 2008).

La manifestación de un fuerte carácter heterocigótico en las poblaciones silvestres limitó el mejoramiento genético convencional (*breeding*) en algunas especies de *Lotus* (Kade *et al.* 2003). Sin embargo, el esfuerzo realizado en los últimos años por varios grupos de trabajo posibilitó la incorporación de la ingeniería genética como una alternativa válida aplicable a los planes de mejoramiento; reportándose la transformación genética mediada por *Agrobacterium* en *L. angustissimus* (Nenz *et al.* 1996), *L. corniculatus* (Armstead y Webb 1987; Belluci *et al.* 2000; Damiani *et al.* 1993, 2008), *L. japonicus* (Stiller *et al.* 1997; Lohar *et al.* 2001; Aoki *et al.* 2002; Díaz *et al.* 2005) y *L. tenuis* (Damiani *et al.* 1993).

Los protocolos de transformación desarrollados hasta el momento se basan en la sensibilidad de las especies de *Lotus* en la transferencia de genes mediante *Agrobacterium tumefaciens* (Aoki *et al.* 2002; Armstead y Webb 1987; Lohar *et al.* 2001; Nikolic *et al.* 2007) y *A. rhizogenes* (Damiani *et al.* 1993; Nenz *et al.* 1996; Stiller *et al.* 1997).

Dado que la mayoría de estas especies poseen la particularidad de integrar fácilmente genes foráneos en sus genomas, a la vez que presentan una alta capacidad de regeneración *in vitro*, capaces de diferenciar sus tejidos sin formación de callos durante la regeneración, (especialmente *L. corniculatus*) (Nikolic *et al.* 2007), son utilizadas como *especies modelos* en estudios de genética clásica y molecular relacionados con la simbiosis planta-rizobios, en la biosíntesis de metabolitos secundarios y en la composición de proteínas en el forraje (Stougaard *et al.* 1986; Forde *et al.* 1989). En 1990, se propuso a *L. japonicus* como modelo de estudio genómico dado que reúne ciertas características ventajosas que facilitarían el análisis científico tales como su pequeño genoma, nivel de ploidía estable ($2n=2x$), sistema de reproducción mediante autofecundación, facilidad en el manejo de flores y ciclo corto (Handberg y Stougaard 1992).

Transformación genética de especies de *Lotus*

Lotus japonicus

Considerada leguminosa modelo, ha despertado el interés de la comunidad científica a fines de su utilización en estudios genéticos y moleculares tendientes a esclarecer aspectos relacionados con la fijación y metabolismo del nitrógeno en leguminosas, simbiosis bacteria-planta e interacciones micorríticas (Lombardi *et al.* 2003). La transformación genética mediada por *A. tumefaciens* ha sido escogida principalmente por la simplicidad y eficiencia del método, como así también por la posibilidad de obtener una integración estable del gen foráneo en el genoma de la especie vegetal (Tirichine *et al.* 2005). En tal contexto, se utilizan con fines de cultivo hipocótilos o raíces extraídas de plántulas de 7 días (Lombardi *et al.* 2005; Tirichine *et al.* 2005; Damiani *et al.* 2008). Los protocolos de transformación a partir de hipocótilos fueron propuestos inicialmente por Handberg y Stougaard (1992) y Stiller *et al.* (1997) con el objeto de superar ciertas limitaciones que presentaba el protocolo de transformación desarrollado a partir de raíces. Por otro lado, a pesar de que el Ri-ADN contiene genes *rol* que interfieren las vías de traducción de señales en plantas, a la vez que, como resultado de su expresión frecuentemente se producen efectos pleiotrópicos en las plantas resultantes, la transformación del sistema radical con *A. rhizogenes* aún es muy utilizada con el fin de reducir el tiempo de cultivo, de obtener regeneración directa y de minimizar el riesgo de variación somaclonal (Damiani *et al.* 2008). Como agentes

selectivos se utilizan principalmente antibióticos tales como kanamicina e higromicina, destacándose el hecho de que existen evidencias que avalan el uso del gen *bar*, quien confiere resistencia a fosfotricina, como alternativa para reducir la variación somaclonal y esterilidad en plantas (Lohar *et al.* 2001).

Lotus corniculatus

Durante el desarrollo del cultivo *in vitro*, transformación vegetal y obtención de especies transgénicas, *L. corniculatus* fue la primer especie con resultados positivos en cuanto a obtención de callos y regeneración. Se desarrollaron protocolos de transformación mediados por *A. tumefaciens*; a partir de segmentos de cotiledones, tallos y hojas (Damiani *et al.* 2008; Jian *et al.* 2009; Nikolic *et al.* 2007). Otros protocolos de transformación incluyeron el uso de *A. rhizogenes*, el cual puede ser inoculado en el hipocótilo de plantas mediante el uso de agujas hipodérmicas induciéndose la regeneración directa de raíces adventicias (Chiesa *et al.* 2004; Damiani *et al.* 2008); o bien, mediante el co-cultivo de la bacteria junto a raíces inmersas en medio líquido (Jian *et al.* 2009). Como agentes selectivos se utilizan higromicina y kanamicina (Nikolic *et al.* 2007; Jian *et al.* 2009).

Lotus tenuis

En el caso de *L. tenuis*, debido a la falta de un procedimiento adecuado que permita la regeneración y producción de “vitroplantas”, el método de transformación disponible se fundamentó en el uso de *A. rhizogenes* mediante la inoculación del hipocótilo, de la misma manera que lo desarrollado para *L. corniculatus*. (Damiani *et al.* 2008).

A fin de implementar el uso de *A. tumefaciens* en estudios fisiológicos relacionados con esta especie, resulta imprescindible desarrollar un procedimiento que permita la inducción de embriogénesis somática u organogénesis de yemas adventicias y subsecuente obtención de plántulas.

Aplicación de la transformación genética en especies de *Lotus*

La transformación genética es utilizada como medio para estudios genéticos y fisiológicos (Damiani *et al.* 2008). La mayor parte de los enfoques genómicos fueron

dirigidos al aislamiento de genes implicados en la fijación simbiótica de nitrógeno e interacciones planta-patógeno, basados en el silenciamiento de genes en etapas de reconocimiento bacteria-planta, control de la infección y formación de nódulos (Schauser *et al.* 1998; Kumagai y Kouchi 2003; Heckmann *et al.* 2006).

En este contexto, Thykjaer *et al.* (1995) insertaron transposones de maíz en *L. japonicus* demostrando la posibilidad de reinsertar elementos genéticos foráneos y transponibles en la especie. Del mismo modo, se realizaron transformaciones con genes reporteros (*uidA*) *gus* (Nikolic *et al.* 2004; 2007) y *gfp* (Jian *et al.* 2009) con el fin de demostrar la inserción de genes foráneos, promotores y agentes selectivos, como así también evaluar la eficiencia del procedimiento de transformación. Asimismo, esta herramienta biotecnológica ha sido utilizada en estudios relacionados con la biosíntesis de taninos condensados (Robbins *et al.* 1992; Turchetti *et al.* 2001), posibilitando la obtención de mutantes, aislamiento de genes desconocidos y transformación de plantas con genes en orientaciones sentido y antisentido (Carron *et al.* 1994; Spangenberg *et al.* 2010) que favorecen la comprensión de los distintos procesos involucrados.

La ingeniería genética también ha sido utilizada en el género *Lotus* para abordar estudios relacionados con los mecanismos de tolerancia que éste presentaría ante situaciones de estrés abiótico en donde se incluye la modificación de la biosíntesis de poliaminas en *L. tenuis* (Chiesa *et al.* 2004) y la inserción del gen *TaNHX2* (antitransportador Na^+/H^+) en *L. corniculatus* (Jian *et al.* 2009).

Finalmente, con el propósito de alterar la composición proteica, se indujo la síntesis de zeínas de maíz en *L. corniculatus* (Guang-Li *et al.* 1994; Bellucci *et al.* 1998, 2000).

2. Objetivos

Producción de plantas transgénicas de *Lotus tenuis* mediante el empleo del método indirecto mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, detección y análisis de la inserción del gen de interés.

3. Materiales y métodos

Material vegetal

Plántulas de *Lotus tenuis* cv. INTA PAMPA (diploide, $2n = 2x = 12$) de 30 días de edad obtenidas mediante germinación *in vitro* de sus semillas fueron utilizadas como fuente de explantes. Las semillas fueron sometidas a un tratamiento previo de inmersión en una solución acuosa de NaOH (2,5 mM) por 15 minutos. Seguidamente, éstas fueron transferidas a una solución desinfectante compuesta por NaOCl 1,2% y 0,1% de Triton[®] durante 15 minutos y finalmente, lavadas con agua destilada estéril. Las semillas desinfectadas fueron cultivadas en tubos de vidrio de 11cc de capacidad (3 semillas/tubo) que contenían 3 ml del medio basal de Murashige y Skoog (1962), semisólido (agar Sigma A-1296, 6,5 g·L⁻¹), suplementado con 30 g·L⁻¹ de sacarosa (MS). El pH se ajustó a 5,8 antes de la esterilización por autoclave (121°C durante 20 min). Los cultivos fueron incubados en condiciones de luz (116 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR, fotoperíodo 14 hs) y temperatura (27±2°C) controladas.

Organogénesis adventicia y obtención de vitroplantas

Se utilizaron segmentos de raíces, hojas y cotiledones. Cada raíz primaria (sin el meristema radical) y los cotiledones fueron fragmentados con 2 o 3 cortes transversales; mientras que, en el caso de las hojas, se utilizaron las tres próximas al meristema apical, separando sus folíolos. Los explantes fueron cultivados en los recipientes descritos anteriormente, conteniendo 3 ml de MS suplementado con ácido naftalenacético (ANA 0,5 μM), 6-benciladenina (BA; 5, 10 o 20 μM) y thidiazuron (TDZ; 2,5; 5; 10 o 20 μM), incubándose durante 45 días. Seguidamente, los explantes regenerantes fueron subcultivados por 30 días a medios frescos desprovistos de reguladores del crecimiento. Finalmente, los brotes elongados fueron separados y enraizados mediante un pretratamiento con IBA (ácido indolbutírico 500 μM) durante 2 horas y transferencia a un medio de cultivo MS sin hormonas.

Por su parte, la multiplicación vegetativa de las líneas transgénicas obtenidas se realizó mediante el cultivo de segmentos caulinares que contenían una yema axilar en medio MS suplementado con ácido indolacético (AIA, 0,2 μM) y BA (2,5 o 5 μM) por 30 días. Posteriormente, los propágulos obtenidos fueron aislados y transferidos a la fase de enraizamiento siguiendo el protocolo antes mencionado.

Todos los cultivos fueron incubados bajo las mismas condiciones físicas antes descritas.

Las “*vitroplantas*” fueron transferidas a macetas de 250 cc de capacidad conteniendo un sustrato estéril (tierra negra:arena, proporción 2:1 v/v) y puestas en una cámara climatizada, manteniéndose un régimen diario de temperatura (27 ± 2 °C), luz (fotoperiodo 12 hs, $320\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ PAR) y humedad relativa (65 %) durante 45 días; momento en el cual fueron transferidas a condiciones ambientales externas.

Análisis histológico

Transcurridos 30 días de cultivo, se recolectaron muestras a partir de los explantes que brindaron organogénesis, las que fueron fijadas en una solución formol:etanol:ácido acético (FAA) y deshidratadas a través de una serie Biopur, siguiendo el protocolo desarrollado por González y Cristobal (1997). Las secciones seriales, transversales y longitudinales, de 8-10 μm de espesor fueron teñidas con safranina (CI50240)-Astra Blue y montadas con bálsamo de Canadá. Las microfotografías fueron obtenidas mediante una cámara Sony ExwaveHAD (Sony, Tokio, Japón) montada a un microscopio Olympus CH30 (Olympus, Tokio, Japón). Las muestras fueron tomadas 30 días después del inicio de la fase de inducción.

Construcción del ADN plasmídico y transformación genética mediada por Agrobacterium tumefaciens

Los constructos utilizados en el marco de esta tesis fueron desarrollados por Chiesa *et al.* (2004). Discos de hojas fueron inoculados con *A. tumefaciens* cepa GV3101 (pMP90). El vector binario utilizado para la transformación contenía el promotor inducible por estrés osmótico RD29A tomado de *Arabidopsis thaliana* y el gen de interés ADC de avena (pBiRD29:ADC); o bien el gen reportero β -glucuronidasa (pBiRD29:GUS); ambos constructos contenían el gen marcador selectivo neomicina fosfotransferasa II (nptII), el que confiere resistencia a kanamicina (Fig. 2.1).

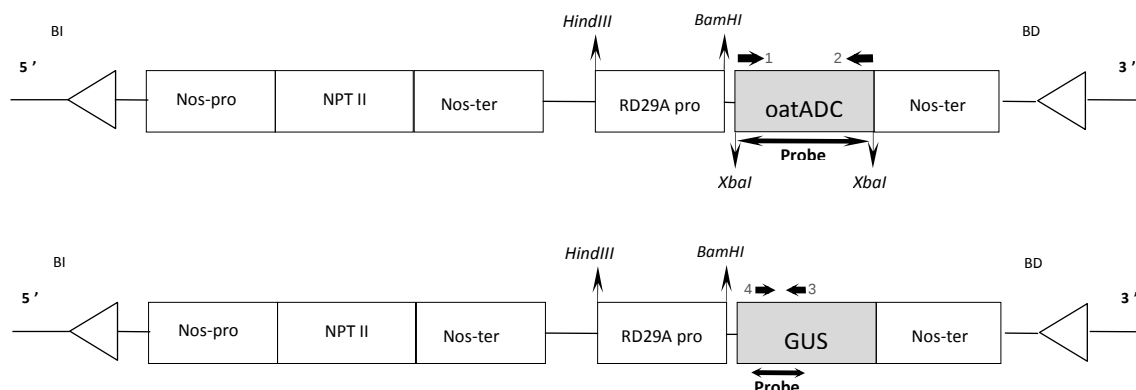


Fig. 2.1: Mapa del T-ADN con los sitios de restricción HindIII, BamHI y XbaI usados para digerir el ADN vegetal y la posición de la sonda del gen. El vector binario contiene un promotor inducible por estrés osmótico (RD29A) y un gen de interés, ya sea el gen ADC (pBiRD29:ADC) o el gen reportero GUS (pBiRD29:GUS); asimismo incluye como marcador selectivo al gen nptII que codifica para neomicina fosfotransferasa. BD: borde derecho, BI: borde izquierdo, NOS-pro: promotor de la nopalina sintasa, NOR-ter: terminador de la nopalina sintasa.

Las cepas de *A. tumefaciens* portadoras de cada uno de los vectores binarios fueron transferidas a erlenmeyers que contenían 50 mL del medio de cultivo Luria-Bertani (LB; Sambrook *et al.* 1989), suplementado con kanamicina $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, estreptomicina $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y rifampicina $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Los cultivos fueron incubados en agitación constante (200 rpm), en condiciones de oscuridad y temperatura constante (28°C) durante 12 hs. Seguidamente, se extrajeron una alícuota (1 mL) de cada suspensión bacteriana, las que fueron transferidas a medio fresco e incubadas en las condiciones antes mencionadas hasta alcanzar una absorbancia de 0,8 a 600 nm ($\text{OD}_{600} = 0,8$). Posteriormente, éstas fueron centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C , resuspendiéndose el pellet en 50 mL de medio de regeneración y transferido nuevamente a oscuridad y 28°C durante 60 minutos.

A continuación, segmentos foliares extraídos de plantas que crecían en condiciones *in vitro* fueron inoculadas mediante inmersión en la suspensión bacteriana por 20 minutos. Una vez escurridas sobre papel de filtro estéril, los explantes fueron co-cultivados durante 3 días en un medio de regeneración (MS adicionado con ANA $0,5 \mu\text{M}$ y BA $20 \mu\text{M}$). Seguidamente, los explantes transformados fueron seleccionados adicionándose al medio de cultivo kanamicina ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$) y cefotaxima ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$) e incubados en luz (fotoperíodo 14 hs., $118 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) y $27\pm 2^\circ\text{C}$. Cada 2 semanas, los explantes fueron sub-cultivados a medios selectivos frescos a fin de mantener la presión de selección y evitar la proliferación bacteriana. Después de 45 días

de cultivo bajo las condiciones de incubación antes mencionadas, los explantes regenerados fueron transferidos a los medios de elongación y enraizamiento.

Validación de la transformación

Las plantas resistentes a kanamicina fueron analizadas mediante amplificación (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos para los genes GUS y ADC. A tal fin, se extrajo ADN genómico a partir de brotes de las plantas obtenidas mediante el protocolo modificado de CTAB modificado (Yamamoto *et al.* 2000). Un fragmento interno (0,67 kb) del gen *gusA* fue amplificado usando cebadores GUSA F (5'-GCAACGTCTGGTATCAGCGC-3') y GUSA R (5'-ACGGTTTGTGGTTAATCAGG-3'). El protocolo de PCR consistió de una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min y una extensión final de 10 min a 72°C. El fragmento amplificado del gen ADC de avena fue de 1,8 kb usando cebadores oatADC F (5'-CACCTATCATGGCCAAGAACTAC-3') y oatADC R (5'-CAGCCAGCTAGGCCATTG-3') (Chiesa *et al.* 2004). Las condiciones del ciclo consistían en una inicial desnaturalización a 95°C por 1 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 45 seg, 72°C por 1 min y una extensión final de 5 min a 72°C.

Para detectar la potencial contaminación latente de *Agrobacterium* en los tejidos transformados, se realizó una PCR basada en la amplificación del gen que codifica para 23s ARNr presente en *A. tumefaciens*, usando cebadores específicos UF y B1R desarrollados por Pulawska *et al.* (2006).

Análisis de transferencia de ADN: Southern blotting

A fin de confirmar la integración estable del gen foráneo, el ADN genómico (15 µg) aislado de las hojas de líneas transgénicas fue digerido con EcoRI, separados por electroforesis en gel de agarosa y luego transferido a una membrana Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) por métodos de capilaridad (Sambrook *et al.* 1989). Las membranas fueron hibridadas con sondas *adc* y *gusA* marcadas con [³²P]dATP, fragmentos obtenidos con sus respectivos cebadores oatADCF/oatADCR y GUSA F/GUSA R. Luego de 16 horas de hibridación a 65°C, las membranas fueron lavadas tres veces a 65°C con 2X SSC y 0,1% sodio dodecil sulfato (SDS), 1X SSC más 0,1% SDS por 20 min y finalmente transferidas a 0,1X SSC más 0,1% SDS por 10 min.

Las membranas lavadas fueron envueltas en papel de nylon junto a una placa autorradiográfica a -70°C por 10 días (Sambrook *et al* 1989).

Recuento cromosómico

Se extrajeron ápices radicales (13:00 h) de las “*vitroplantas*” obtenidas, los que fueron pre-tratados con solución acuosa saturada de 8-hidroxiquinolina por 3 horas a temperatura ambiente, luego fijados en 3:1 etanol/ácido acético por 24 hs y, finalmente teñidos con el reactivo de Schiff. Los meristemas aislados fueron macerados en una gota de solución de 2% orceína acética y macerados en ácido acético 45%. El conteo cromosómico se realizó en metafase de la mitosis.

Análisis de la segregación de la progenie resultante del cruzamiento entre líneas transgénicas y no transformadas

Debido a que *Lotus tenuis* es una especie auto-incompatible, la presencia de polinizadores es vital para la obtención semillas. En el contexto de esta Tesis, dada la imposibilidad de controlar a los insectos (abejas) polinizadores y luego de varios intentos frustrados, se procedió a realizar la polinización en forma manual siguiendo el protocolo desarrollado por Lundqvist (1993), para lo cual, mediante el empleo de un pincel de cerdas finas se extrajo el polen del progenitor masculino (plantas no transformada) colocándose luego sobre el estigma de las plantas consideradas como progenitoras femeninas (línea 19 y línea 21).

El análisis de segregación mendeliana de la progenie obtenida durante los cruzamientos se realizó mediante amplificación (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos para el gen ADC.

Diseño experimental y análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron en diseños completamente aleatorizados. En los experimentos de regeneración y micropropagación se cultivaron 10 explantes por tratamiento; mientras que en los experimentos de transformación se emplearon 100 explantes. En todos los casos, los experimentos fueron repetidos 3 veces; distribuyéndose azarosamente los tratamientos en la cámara de crecimiento. Los resultados son expresados por el valor promedio de las repeticiones incluyéndose su desvío estándar. La tasa de regeneración se expresa como el porcentaje promedio de las raíces, cotiledones u hojas que diferenciaron brotes del número total de explantes

cultivados. Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) (GraphPad Software San Diego, CA) empleando el test de comparación múltiple de Tukey. Para evaluar el grado de significancia estadístico se optó por un nivel de probabilidad de 0,05.

4. Resultados y discusión

Desarrollo de un protocolo de organogénesis in vitro y obtención de plantas

A fin de desarrollar un procedimiento adecuado de regeneración, inicialmente se estudió el origen del explante a utilizar, evaluándose raíces, cotiledones y hojas. Transcurridos 45 días de cultivo, se observó la formación de yemas adventicias en todos los tratamientos ensayados, independientemente del tipo de explante utilizado. La tasa de regeneración varió entre un 7 y 97% (Tabla 2.1).

Tanto la presencia de una citocinina derivada de la adenina (BA) como su par derivada de la fenilurea (TDZ) en bajas concentraciones (5 y 25 μM , respectivamente), favoreció la organogénesis; a la vez que la adición al medio de cultivo con una pequeña proporción de auxina (ANA) permitió un crecimiento normal de las yemas neoformadas. El número promedio de yemas adventicias por explante varió entre 1 y más de 33 (Tabla 2.2).

A pesar que los resultados obtenidos en las combinaciones de ANA y BA ensayadas no evidenciaron diferencias estadísticas, la adición de 5 o 10 μM BA promovió fuertemente la proliferación de callos. Desde el punto de vista cualitativo, los mejores resultados se obtuvieron cuando se cultivaron porciones de lámina foliar en un medio basal suplementado con ANA 0.5 μM y BA 20 μM en donde el $67\pm 8,8\%$ de las hojas brindaron $10\pm 4,4$ yemas por explante a través de un sistema directo de regeneración, sin proliferación de callos. El uso de TDZ si bien favoreció el proceso morfogénico, causando vitrificación y otras anormalidades del crecimiento que comprometieron la sobrevivencia del material vegetal durante la fase de rusticación donde la planta debe adaptarse a las condiciones ambientales externas (Gribble *et al.* 2003). Adicionalmente, los explantes cultivados en medio con TDZ en combinación con BA produjeron menos brotes que aquellos que crecieron en medios que contenían únicamente la citocinina derivada de la adenina debido a la alta proliferación de callos.

En una segunda etapa y tomando en consideración que la especie objeto del estudio, posee hojas compuestas conformadas por 5 folíolos, utilizando el medio basal escogido en el apartado anterior, se desarrolló un sistema experimental factorial a fin de evaluar el efecto de la ubicación del explante en la planta madre (“topófisis”) sobre el proceso morfogénico. Transcurridos 45 días de incubación en las condiciones descriptas en materiales y métodos pudo observarse que tanto la posición de la hoja como sus folíolos no inciden sobre el mismo, siendo sus diferencias estadísticamente no significativas.

Tabla 2.1: Efectos de la suplementación al medio basal con ANA, BA y TDZ sobre la regeneración de brotes adventicios de distintos explantes de *Lotus tenuis*.

Reguladores del crecimiento (μM)			Explantos que brindan yemas (%)		
ANA	BA	TDZ	Raíces	Cotiledones	Hojas
-	5	-	47 $\pm$ 24 ²	86 $\pm$ 3,2	93 $\pm$ 3,3
-	10	-	73 $\pm$ 6,7	86 $\pm$ 7	60 $\pm$ 5,8
-	20	-	73 $\pm$ 17,6	74 $\pm$ 12,8	80 $\pm$ 10
-	-	2,5	62 $\pm$ 21,7	63 $\pm$ 6,7	97 $\pm$ 3,3
-	-	5	60 $\pm$ 11,5	87 $\pm$ 8,8	81 $\pm$ 5,9
-	-	10	60 $\pm$ 11,5	75 $\pm$ 12,5	53 $\pm$ 3,3
-	-	20	47 $\pm$ 13,3	60 $\pm$ 5,8	35 $\pm$ 7,4
0,5	5	-	55 $\pm$ 10,4	90 $\pm$ 5,8	87 $\pm$ 8,8
0,5	10	-	63 $\pm$ 8,8	93 $\pm$ 6,7	83 $\pm$ 6,7
0,5	20	-	73 $\pm$ 17,6	80 $\pm$ 5,8	67 $\pm$ 8,8
0,5	-	2,5	57 $\pm$ 3,3	83 $\pm$ 6,7	70 $\pm$ 10
0,5	-	5	62 $\pm$ 21,7	83 $\pm$ 8,8	70 $\pm$ 5,8
0,5	-	10	65 $\pm$ 5	60 $\pm$ 5,8	77 $\pm$ 3,3
0,5	-	20	58 $\pm$ 10,1	63 $\pm$ 6,7	70 $\pm$ 15,2
0,5	5	2,5	73 $\pm$ 17,6	80 $\pm$ 11,5	67 $\pm$ 6,7
0,5	5	5	51 $\pm$ 14,6	70 $\pm$ 11,5	57 $\pm$ 8,8
0,5	5	10	44 $\pm$ 8,1	58 $\pm$ 7,6	43 $\pm$ 12
0,5	5	20	27 $\pm$ 17,6	52 $\pm$ 1,7	43 $\pm$ 3,3
0,5	10	2,5	55 $\pm$ 8,1	73 $\pm$ 8,2	43 $\pm$ 3,3
0,5	10	5	60 $\pm$ 23	55 $\pm$ 7,9	47 $\pm$ 14,5
0,5	10	10	74 $\pm$ 3,8	62 $\pm$ 7,9	40
0,5	10	20	27 $\pm$ 17,6	45 $\pm$ 17,2	27 $\pm$ 2,7
0,5	20	2,5	7 $\pm$ 6,7	75 $\pm$ 12,6	70 $\pm$ 10
0,5	20	5	42 $\pm$ 21,3	63 $\pm$ 18,6	33 $\pm$ 3,3
0,5	20	10	36 $\pm$ 19,5	62 $\pm$ 7,3	24 $\pm$ 3,3
0,5	20	20	58 $\pm$ 19,5	60 $\pm$ 2,9	24 $\pm$ 4,3
<i>Análisis de Varianza</i>					
F valor			1,34	0,97	7,78
P valor			0,18	0,51	< 0,0001

¹ Los valores expresan el promedio de 3 repeticiones $\pm$ el desvío estándar de la media.

Tabla 2.2: Efectos de la adición al medio basal con ANA, BA y TDZ sobre la proliferación de brotes adventicios de distintos explantes de *Lotus tenuis*.

Reguladores del crecimiento (μM)			Número promedio de brotes por explante		
ANA	BA	TDZ	Raíces	Cotiledones	Hojas
-	5	-	33 $\pm$ 4 ²	27 $\pm$ 4,6	28 $\pm$ 2,9
-	10	-	20 $\pm$ 4,9	17 $\pm$ 1,5	10 $\pm$ 1
-	20	-	9 $\pm$ 0,8	20 $\pm$ 1,3	19 $\pm$ 3,4
-	-	2,5	12 $\pm$ 4,2	13 $\pm$ 4,6	12 $\pm$ 1,3
-	-	5	9 $\pm$ 3,2	13 $\pm$ 3,3	9 $\pm$ 2,3
-	-	10	16 $\pm$ 11	7 $\pm$ 0,2	12 $\pm$ 3,2
-	-	20	11 $\pm$ 7,4	12 $\pm$ 3,4	7 $\pm$ 1
0,5	5	-	15 $\pm$ 3,1	31 $\pm$ 7,1	25 $\pm$ 6,8
0,5	10	-	14 $\pm$ 2,1	22 $\pm$ 4	10 $\pm$ 1,5
0,5	20	-	16 $\pm$ 1,4	12 $\pm$ 3,7	10 $\pm$ 4,4
0,5	-	2,5	9 $\pm$ 2,9	8.8 $\pm$ 0,5	13 $\pm$ 1,4
0,5	-	5	11 $\pm$ 3,5	11 $\pm$ 1,4	10 $\pm$ 3,6
0,5	-	10	9 $\pm$ 1,8	7 $\pm$ 3,7	8 $\pm$ 0,9
0,5	-	20	10 $\pm$ 2,6	8 $\pm$ 1,8	13 $\pm$ 2,6
0,5	5	2,5	12 $\pm$ 0,1	9 $\pm$ 1,8	10 $\pm$ 1,3
0,5	5	5	13 $\pm$ 2,8	8 $\pm$ 0,9	7 $\pm$ 2,2
0,5	5	10	9 $\pm$ 3,5	10 $\pm$ 0,8	11 $\pm$ 1,8
0,5	5	20	12 $\pm$ 2,1	10 $\pm$ 2,3	12 $\pm$ 3,5
0,5	10	2,5	11 $\pm$ 2,2	8 $\pm$ 1,8	7 $\pm$ 3
0,5	10	5	12 $\pm$ 2,3	8 $\pm$ 1,8	12 $\pm$ 2,2
0,5	10	10	13 $\pm$ 1,8	9 $\pm$ 3	11 $\pm$ 2,6
0,5	10	20	6 $\pm$ 3	6 $\pm$ 1,6	13 $\pm$ 0,3
0,5	20	2,5	1	9 $\pm$ 0,8	10 $\pm$ 2,7
0,5	20	5	12 $\pm$ 0,5	11 $\pm$ 2,7	12 $\pm$ 2,2
0,5	20	10	6 $\pm$ 3,4	7 $\pm$ 0,8	8 $\pm$ 3,2
0,5	20	20	5 $\pm$ 0,3	7 $\pm$ 1,3	17 $\pm$ 9,1
<i>Análisis de Varianza</i>					
F valor			1,66	5,02	2,88
P valor			0,069	0,0001	0,0007

¹ Los valores expresan el promedio de 3 repeticiones $\pm$ el desvío estándar de la media.

Obtención de plantas transgénicas.

Transcurridos 45 días de cultivo en MS suplementado con ANA 0,5 μM y BA 20 μM , 40 $\pm$ 15% de los explantes foliares inoculados con la cepa pBiRD29:ADC (ADC) brindaron de 8 a 10 yemas adventicias por explante (Fig. 2.2a) a través de un sistema directo de regeneración. El meristemoide se originó por divisiones periclinales de células epidérmicas resultando en una zona meristemática situada en la superficie de la hoja a partir de las cuales se diferenciarán las yemas adventicias (Fig. 2.2b). Asimismo, 69,3 $\pm$ 6,1% de los explantes inoculados con la cepa pBi RD29A:GUS (GUS) produjeron 14 $\pm$ 0,8 yemas adventicias por explante. Los brotes resultantes fueron transferidos a un medio fresco desprovisto de reguladores de crecimiento a fin de estimular su elongación (Fig. 2.2c).

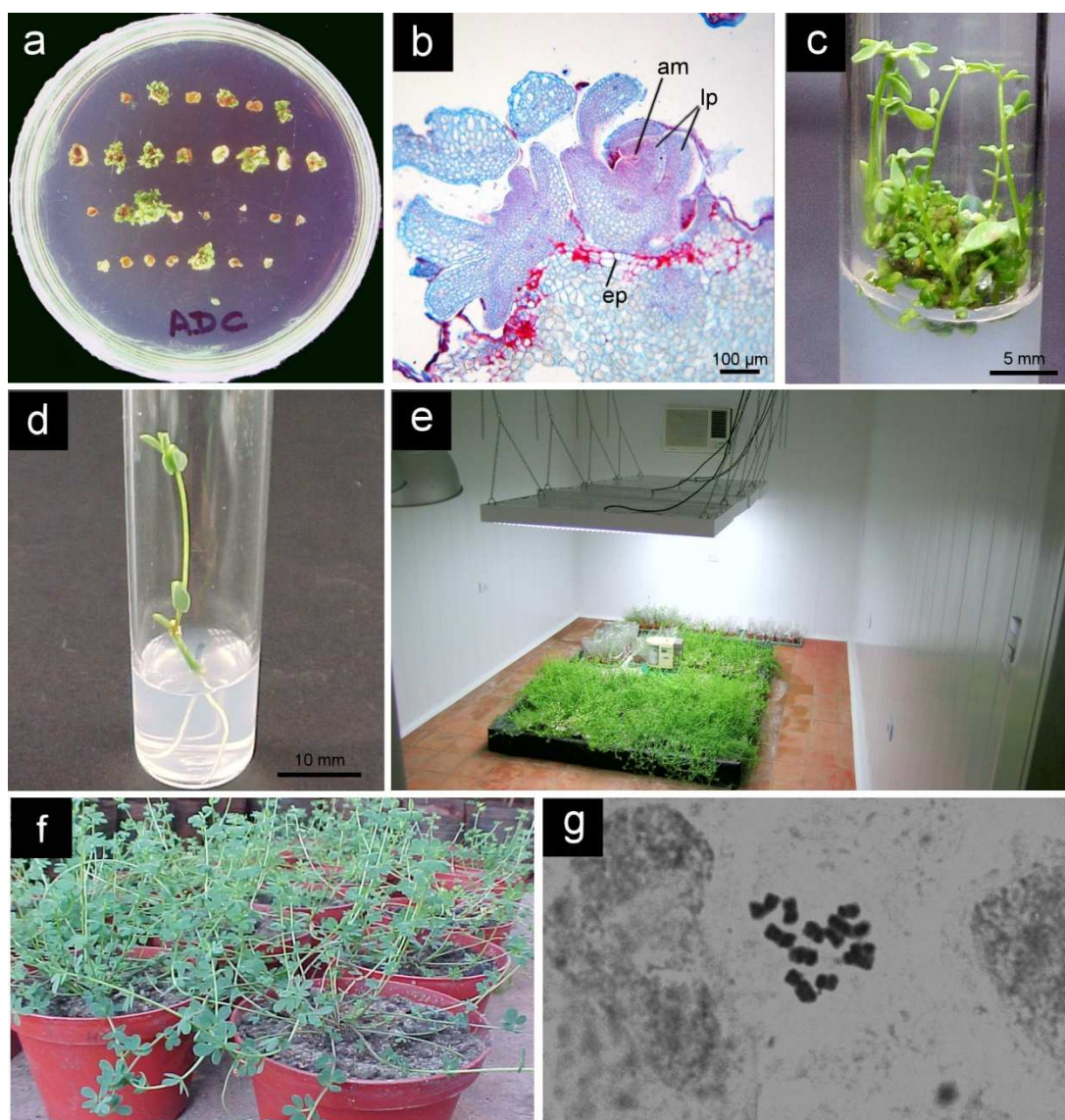


Fig. 2.2: Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y regeneración de plantas a partir del cultivo *in vitro* de segmentos foliares de *Lotus tenuis*. **(a)** Regeneración de yemas adventicias a partir de segmentos foliares co-cultivados con *A. tumefaciens* GV3101 PMP90, portador del vector binario pBiRD29:ADC y subcultivados en un medio de cultivo selectivo adicionado con kanamicina. La fotografía fue tomada 45 días después del co-cultivo. **(b)** Formación de yemas adventicias por organogénesis directa a partir de tejidos foliares. Am, meristema apical, ep epidermis, lp primordio foliar. **(c)** Elongación de los brotes en un medio de cultivo desprovisto de reguladores del crecimiento. **(d)** Rizogénesis directa. **(e)** Rustificación de las vitroplantas en una cámara de crecimiento bajo las condiciones ambientales descritas en materiales y métodos. **(f)** Plantas rustificadas en condiciones de invernadero. **(g)** Cromosomas mitóticos durante la metafase $2n=2x=12$.

Se confirmó la integración del gen a partir de secciones de hojas extraídas de las líneas transgénicas mediante análisis de PCR usando un conjunto de cebadores para *adc* obteniendo el producto de amplificación del tamaño esperado. Todas las líneas transformadas testeadas, revelaron una banda de 1,8 kb señalada para el mencionado gen (Fig. 2.3). En un primer experimento se obtuvieron tres líneas transgénicas ADC a partir de 30 explantes inoculados con pBiRD29:ADC, mientras que en un ensayo

posterior donde se infectaron 100 explantes, se obtuvieron 3 nuevas líneas. Por su parte, 29 líneas transgénicas fueron obtenidas de 160 explantes infectadas con pBiRD29:GUS sobre la base del análisis utilizando cebadores específicos para el gen *gusA*. Estos resultados se corresponden a una eficiencia de transformación de 6,5 y 18,1%, respectivamente.

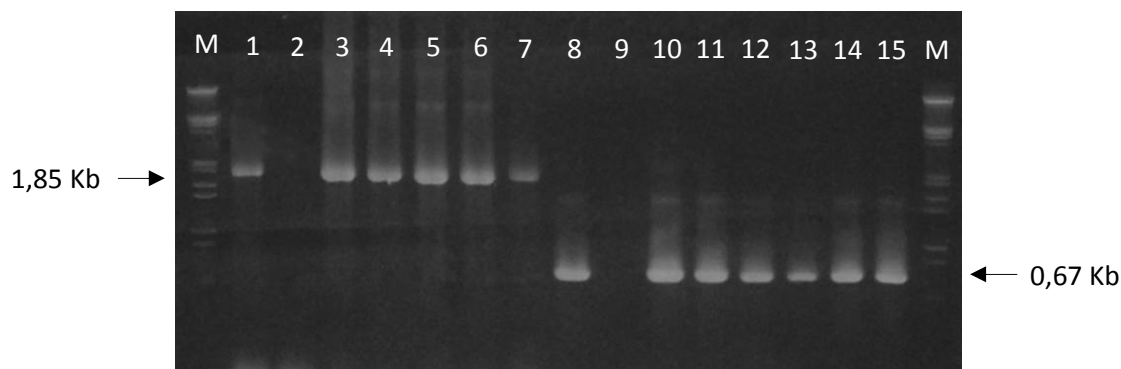


Fig. 2.3: Análisis por PCR de líneas transgénicas putativas de *Lotus tenuis* utilizando cebadores específicos para los genes *arginina descarboxilasa* (ADC, calles 1-7) o β -*glucuronidasa* (GUS, calles 8-15). Calles: M, marcador de peso molecular (λ DNA EcoRI/HindIII); 1, 8 plásmidos pBiADC y pBiGUS (controles positivos); 2, 9 plantas no transformadas; 3-7 plantas transgénicas ADC; 10-15 plantas transgénicas GUS.

La ausencia de una eventual contaminación por la cepa de *Agrobacterium* (falso positivo) en los tejidos transformados fue confirmada mediante la amplificación (por PCR) del gen ribosomal 23S de *A. tumefaciens* (Fig. 2.4).

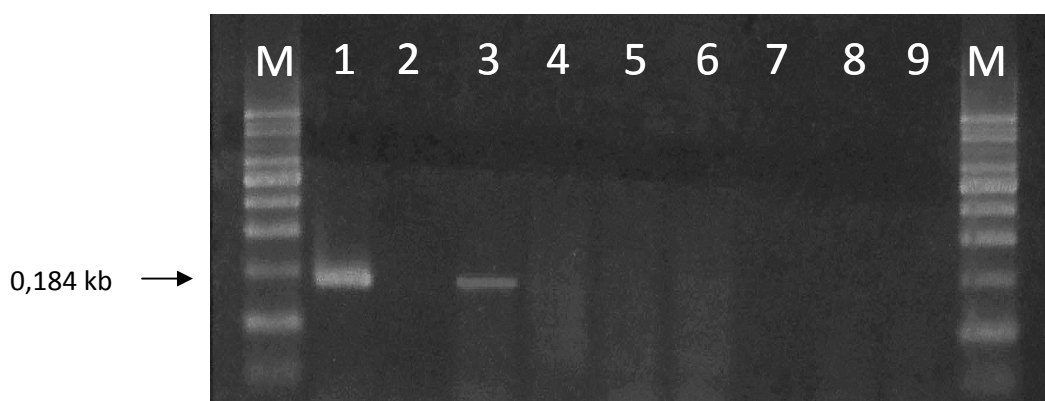


Fig. 2.4: Análisis para detectar contaminación endógena con células de *Agrobacterium*. El ADN extraído de las líneas transgénicas fue utilizado como molde de PCR para la amplificación del gen ARNr 23S de *A. tumefaciens*. Calles: M, marcador de peso molecular 100 pb (Promega, Madison, WI), 1 ADN total de *A. tumefaciens*, 2 ADN de planta no transgénica como control negativo, 3 planta no transgénica contaminada con células de *Agrobacterium*, 9 agua y 4-8 ADN de plantas transgénicas (líneas 19, 21, A1, A9 y A14 respectivamente). La ausencia de la banda de amplificación de las líneas transgénicas indica la completa eliminación de la bacteria *A. tumefaciens* debido al tratamiento con el antibiótico cefotaxima.

Los análisis de *Southern blotting* fueron realizados para verificar la integración de los transgenes en el genoma y para determinar el número de copias respectivas. Cuando el ADN de plantas transgénicas *adc* fueron digeridas con *EcoRI*, el análisis de *Southern blot* indicó una simple inserción de pBiRD29:ADC (líneas 19 y 21), detectándose una única banda de hibridación (Fig. 2.5). En contraste, dos bandas fueron identificadas en todas las líneas transgénicas pBiRD29:GUS testeadas, sugiriendo que dos copias del T-ADN fueron integradas en el genoma de las plantas. No se detectaron bandas de hibridación en las plantas controles, no transformadas.

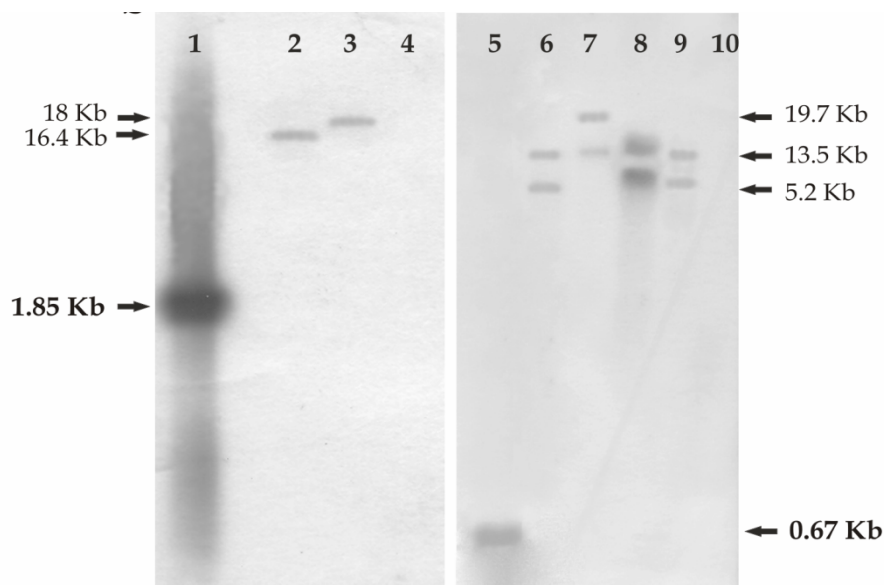


Fig. 2.5: Análisis de hibridación Southern blot de líneas transgénicas ADC y GUS hibridadas con secuencias de *adc* y *gus* respectivamente. El ADN genómico (10 µg) fue fragmentado con enzimas de restricción *EcoRI* a fin de demostrar la integración dentro del genoma y el número de integraciones.

Calles: 1, 5 fragmentos de *adc* (1,85 kb) y *gus* (0,67 kb) utilizados como controles positivos; 2, 3, plantas transformadas de ADC; 4, 10 plantas no transformadas, 6–9 plantas transformadas de GUS.

Los brotes transgénicos fueron subsecuentemente identificados y transferidos a distintos medios de cultivo con el propósito de inducir su multiplicación vegetativa. Transcurridos 30 días de cultivo, los mejores resultados se obtuvieron cuando los segmentos nodales crecieron en un medio de cultivo compuesto por las sales del MS suplementado con sacarosa 30 gr·L⁻¹ y BA 2,5 µM; brindando una tasa de micropropagación de 14 ± 2,6 brotes por explante. Finalmente, más del 60% de los brotes sometidos a un pre-tratamiento con IBA, formaron raíces adventicias mediante un proceso rizogénico directo, sin proliferación de callos (Fig. 2.2d). Las “*vitroplantas*” con hojas expandidas y raíces desarrolladas fueron aclimatadas en macetas cubiertas

con polietileno transparente retirándose gradualmente para reducir la humedad (Fig. 2.2e). Finalmente, las plantas aclimatadas fueron transferidas exitosamente a las condiciones de invernadero (Fig. 2.2f). El estudio citogenético realizado confirmó que el procedimiento desarrollado para la regeneración no produjo ninguna alteración en el cariotipo y todas las líneas testeadas revelaron el número normal de cromosomas de la especie, $2n=2X=12$ (Fig. 2.2g). La estabilidad del gen introducido en el material clonado fue confirmada por análisis de PCR. Todas las plantas transgénicas portadoras del gen que sobre-expresa la actividad de la enzima ADC obtenidas en este estudio exhibieron el mismo fenotipo que las plantas controles no transformadas bajo condiciones normales de crecimiento (sin estrés).

Ciertas plantas transformadas con el gen para la expresión de la enzima β -glucuronidasa (GUS) presentaron variaciones fenotípicas, mostrando una mayor producción de raíces y alteraciones en las hojas como moteados y albinismo (Fig. 2.6). No se observaron variaciones en las plantas transgénicas de las líneas oat:ADC. No obstante, las plantas del evento 19 muestran una adaptación mayor cuando se las somete a distintas condiciones ambientales con respecto a plantas de la línea 21 y genotipo salvaje (Capítulo 3).



Fig. 2.6: Aspectos fenotípicos de vitroplantas no transformadas (tubo izquierdo) y transgénicas portadoras del gen β -glucuronidasa (tubo derecho). Se observa un mayor área foliar acompañado de un notable incremento del desarrollo radicular en la línea GUS. Asimismo, algunos eventos transgénicos que crecían en macetas bajo condiciones de invernadero evidenciaron distintos matices de variegado en sus hojas.

Lotus tenuis presenta un ciclo de crecimiento que se extiende desde la primavera y hasta el otoño. Debido a su hábito de crecimiento indeterminado, éste presenta un periodo prolongado de floración y formación de semillas que ocurre entre los meses de noviembre y marzo, estimulado principalmente por el incremento de la longitud del día.

Se caracteriza por ser una especie con autoincompatibilidad parcial (Lundqvist 1993), posee flores entomófilas de color brillante (amarillo) (Fig. 2.7a). De esta forma, la transferencia de los granos de polen de las anteras al estigma receptivo la realizan los insectos por lo que predomina la polinización cruzada. Este modo de polinización permite llevar a cabo la fertilización cruzada entre las plantas transgénicas y el genotipo silvestre. Ésta se produce entre las 24 y 48 horas posteriores a la polinización observándose la formación del fruto (Fig. 2.7b). Las semillas comienzan a adquirir viabilidad alrededor de los 30 días posteriores a la polinización con la maduración de las vainas (Fig 2.7c-d).



Fig. 2.7: (a) Detalle de inflorescencias, umbelas simples, compuestas de 4 a 8 flores de color amarillo. (b) Desarrollo del fruto (vaina cilíndrica, alargada y angosta de 4 a 5 cm de largo). (c) Estado maduro de frutos y su disposición característica. (d) Forma y tamaño de semillas, pequeñas de 1,2 a 1,4 mm de diámetro, de esféricas a ovales y algo aplastadas.

En concordancia con los trabajos realizados por Webb *et al.* (1999) y Yin *et al.* (2004), la simple inserción del transgen evidenciada en el marco experimental de esta tesis, ofrece la posibilidad de explicar la transmisión de caracteres a la descendencia mediante el estudio de la segregación mendeliana. En tal escenario, fruto de los cruzamientos dirigidos realizados entre genotipos femeninos de las líneas 19 o 21 y el genotipo no transformado, se obtuvieron 8 y 4 semillas viables, respectivamente. El análisis de PCR de la generación F1 reveló que el 50% de las semillas presentaban el transgen, indicando una tasa de segregación mendeliana 1:1 (Fig 2.8), presentando carácter heterocigota las plantas portadoras del gen que codifica para la enzima ADC.

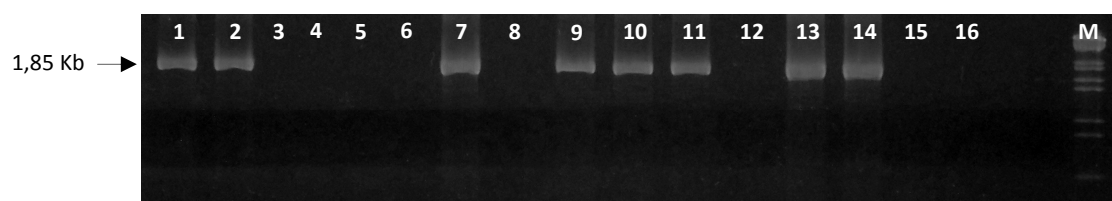


Fig. 2.8: Análisis por PCR de la generación F1 de *Lotus tenuis* utilizando cebadores específicos para el gen *arginina descarboxilasa* (ADC). Las plantas transgénicas putativas presentan la amplificación del transgen.

Calles: M, marcador de peso molecular (λ DNA EcoRI/HindIII); 1 - 3 progenitores; 1 y 2, líneas transgénicas 19 y 21 respectivamente; 3, genotipo salvaje; 4–11 generación F1 de cruzamientos dirigidos con la línea 19 como progenitor femenino; 12–15 generación F1 de cruzamientos dirigidos con la línea 21 como progenitor femenino; 16, agua.

Finalmente, cabe destacar el hecho de que la mayoría de los procedimientos de transformación que, mediados por *Agrobacterium tumefaciens*, han sido desarrollados en especies de *Lotus*, se basan en la aplicación de un sistema de regeneración indirecta a través de la proliferación de células indiferenciadas o “callos” provenientes ya sea de raíces, hipocótilos o cotiledones (Aoki *et al.* 2002, Lohar *et al.* 2001, Lombardi *et al.* 2003) que predisponen a la ocurrencia de variaciones somaclonales u otras alteraciones genotípicas en el material clonado. En el marco de esta Tesis, se desarrolló un simple procedimiento de transformación y obtención plantas transgénicas de *Lotus tenuis* basado en un sistema directo de regeneración de brotes, sin proliferación de callos. Este hecho, en adición al uso de segmentos foliares como fuente de explante, podría reducir el riesgo de producirse variación somaclonal (Webb y Watson 1991).

5. Conclusiones parciales del capítulo

- Se desarrolló un procedimiento que permite la regeneración de *Lotus tenuis* a partir del cultivo *in vitro* de raíces, hipocótilos y folíolos.
- A partir del empleo del protocolo de organogénesis desarrollado se obtuvieron plantas transgénicas con la construcción pBi *RD29A::oatADC* y pBi *RD29A::GUS*, las cuales **no presentaron diferencias fenotípicas** respecto a sus pares no transformadas bajo condiciones óptimas de crecimiento.
- Las plantas transgénicas son fértiles y capaces de producir semillas, determinándose que las plantas portadoras del gen que codifica para la enzima arginina descarboxilasa son heterocigotas.

CAPÍTULO 3

**Análisis funcional del gen *adc* de avena en plantas de
Lotus tenuis sometidas a estrés hídrico y salino**

1. Introducción

Modificación del metabolismo de poliaminas en otras especies vegetales y su implicancia en la tolerancia a estrés abiótico.

Tradicionalmente se consideró a la actividad de la enzima arginina descarboxilasa (ADC) como un paso clave en la biosíntesis de poliaminas (PAs) en condiciones ambientales adversas. De hecho, ante una situación de estrés abiótico, es frecuente observar un incremento de su actividad (Bouchereau *et al.* 1999; Hao *et al.* 2005), coincidentemente con un aumento del contenido de putrescina (Put) con relación a espermidina (Spd) y espermina (Spm) (Alet 2008). Recientemente, Gill *et al.* (2010b) informaron que la sobre-expresión de la actividad de ADC, espermidina sintasa (SPDS) ó S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC) en diversas líneas transgénicas, podría mejorar la tolerancia a estreses originados por alta concentraciones de sales, reducida disponibilidad hídrica y ocurrencias de temperaturas extremas. En los últimos años, diversos genes que participan en la biosíntesis de PAs han sido aislados y clonados brindando la posibilidad de manipular genéticamente el metabolismo de estas aminas (Kuznetsov *et al.* 2007; Liu *et al.* 2007). En tal sentido, Capell *et al.* (1998), demostraron una posible integración y sobre-expresión del gen ADC de avena (*Avena sativa*) en plantas de arroz bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S, hallando una correlación positiva entre la transcripción del transgen, la actividad de la enzima y la acumulación de Put. No obstante, estos autores presumen un umbral fisiológico máximo en la acumulación del producto debido al rol inhibitorio que éste ejercería sobre la diferenciación *in vitro* de tejidos en callos de arroz, afectando el normal desarrollo de las vitroplantas resultantes. Al mismo tiempo, éstos observaron que el incremento de Put no se correspondería con una mayor acumulación de Spd y Spm, evidenciándose una importante regulación de la biosíntesis de las PAs superiores. Las experiencias previas realizadas por Burtin y Michael (1997) revelaron que, como resultado de la sobre-expresión de CaMV35S:*AsADC* en plantas de tabaco, el contenido de agmatina incrementó 65 veces; sin embargo, tal variación no se correspondió con un incremento en los niveles de Put, PAs superiores y alcaloides; sugiriendo que la acumulación de estas últimas sería regulada, principalmente en respuesta al estrés.

Si bien, la introducción de *AsADC* en tejidos indiferenciados de arroz bajo el control del promotor constitutivo del gen de ubiquitina de maíz (Ubi1), incrementó el

contenido de PAs durante la división celular, ésta no se mantuvo en los tejidos vegetativos de la mayoría de las plantas regeneradas, excepto en una línea transformada la que incrementó 20 veces su contenido de Put, poniendo de manifiesto la importancia que además tendría el sitio de inserción del transgen (Noury *et al.* 2000). En la literatura existen suficientes datos que avalarían el hecho de que el gen promotor Ubi1 tendría una mayor aptitud que el CaMV35S, presentando una mayor actividad enzimática en tales circunstancias (Capell *et al.* 1998, Noury *et al.* 2000, Bassie *et al.* 2000). En adición, Capell *et al.* (2004) demostraron posteriormente que las plantas de arroz transgénicas que expresaban el gen ADC de *Datura stramonium* (*DsADC*) controladas por Ubi1, no presentaban alteraciones fenotípicas bajo condiciones de estrés hídrico, mientras que el genotipo no transformado presentaba marchitamiento y aberraciones foliares; comprobándose que cuando el contenido de Put supera cierto umbral, se induce la síntesis de poliaminas superiores favoreciendo la tolerancia de las plantas al estrés. Resultados similares fueron reportados por Bassie *et al.* (2008) a partir de líneas transgénicas de trigo portadoras del gen *AsADC* bajo el control del mismo promotor. Concomitantemente, Peremarti *et al.* (2009), determinaron que la sobre-expresión del gen heterólogo *DsSAMDC* en plantas de arroz no incrementa por sí solo la tolerancia de los tejidos al déficit hídrico, siendo que además resulta necesario en tales circunstancias, la existencia de un balance adecuado entre Put y PAs superiores.

Por otro lado, Alcazar *et al.* (2005) observaron que plantas de *Arabidopsis* portadoras del gen homólogo *AtADC2* bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S, sujetas a condiciones normales de crecimiento, acumulaban Put en concentraciones elevadas, provocando toxicidad, enanismo y retraso en floración como resultado de la deficiencia de giberelinas (GAs). Sin embargo, tal efecto deletéreo se revertía mediante la aplicación exógena de GA₃, indicando que, posiblemente, las PAs alterarían el metabolismo de las GAs afectando específicamente el último paso de su biosíntesis el cual es catalizado por las enzimas dioxigenasas. No obstante, en condiciones de estrés hídrico dicho genotipo incrementó moderadamente el nivel de Put correlacionándose de manera proporcional el grado de tolerancia a sequía a causa de una disminución de la conductancia estomática y de la consecuente reducción de la transpiración, sin concurrentes cambios en los contenidos de Spd y Spm (Alcázar *et al.* 2010).

Recientemente, Wang *et al.* (2011), informaron acerca de los efectos fisiológicos observados en plantas sujetas a distintas situaciones de estrés abiótico como resultado del aislamiento, clonación e inserción del gen ADC de *Poncirus trifoliata* (PtADC) en el mutante *adc1-1* de *A. thaliana* bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S. En tal escenario, las líneas transgénicas incrementaron la tolerancia a los efectos letales causados por deshidratación y bajas temperaturas con relación a las líneas mutantes y el genotipo salvaje, correlacionándose con un mayor contenido de PAs y una menor acumulación de especies reactivas del oxígeno (ERO's). Asimismo, los autores observaron un mayor crecimiento radicular en las plantas transgénicas considerando que el gen objeto del estudio cumpliría un papel funcional en tales condiciones. Sin embargo, el hecho de utilizar un promotor constitutivo trae consigo la desventaja de estimular una continua sobre-expresión del transgen, lo cual por un lado dificulta el análisis de su función ante condiciones ambientales específicas, y por el otro, causa variaciones fenotípicas que restringen el crecimiento y el desarrollo e inclusive, en ciertos casos, determinan la muerte del vegetal (Masgrau *et al.* 1997, Capell *et al.* 1998 y 2004, Panicot *et al.* 2002, Wang *et al.* 2011). En este sentido, Roy y Wu (2001), insertaron el gen ADC de *Avena sativa* en plantas de arroz, bajo el control de un promotor inducible por ABA, observándose que, como resultado de la exposición a 150 mM NaCl, se triplicó la actividad enzimática a la vez que se duplicaron los niveles endógenos de Put y poliaminas totales, evidenciándose un mayor crecimiento aéreo respecto a las plantas controles. Trabajos recientes realizados por nuestro grupo brindan suficientes evidencias que, contrariamente a la aseveración realizada por Wang *et al.* (2011), pondrían de manifiesto el hecho de que en condiciones de estrés, las PAs estarían involucradas en los procesos de señalización. En este sentido, Alet *et al.* (2011) observaron que plantas de *A. thaliana* portadoras del gen ADC de avena bajo el control del promotor RD29A inducible por estrés, incrementaron su tolerancia y atenuaron los daños producidos por la sequía y las bajas temperaturas, manteniendo la estabilidad de las membranas celulares, el control de la apertura estomática y, por ende, el contenido relativo de agua. Estas respuestas bioquímicas se correlacionaron con el incremento de la actividad de ADC y el contenido de Put, determinándose que ésta, a su vez, promovió una mayor actividad de 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED), la cual constituye una enzima clave de la biosíntesis de ABA regulada por el estrés osmótico. Considerando estas evidencias se podría considerar que tales mecanismos de tolerancia serían, al menos en parte, mediados por ABA y que la Put tendría un rol “corriente

arriba” en las vías de señalización de ABA (Cuevas *et al.* 2008; Alet *et al.* 2011). Asimismo, se presume que la Put podría estar modulando en un punto anterior a HOS10, forjando el inicio en la cascada de señalización de respuesta ABA-dependiente (Alet 2008).

2. Objetivo

Efectuar un análisis molecular, bioquímico y fisiológico de las plantas controles (no transformadas) y portadoras del gen *adc* en condiciones normales y estresantes.

3. Materiales y métodos

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se trabajó con plantas salvajes (no transformadas) y líneas transgénicas portadoras ya sea del gen *adc* (líneas 19 y 21) o *gus* (línea 07) obtenidas mediante el protocolo que se detalla en el Capítulo 2. Los ensayos se realizaron con plantas de los tres orígenes descriptos, de similar edad y tamaño, que crecieron en macetas de 2 L de capacidad conteniendo un sustrato compuesto por tierra y perlita (2:1, v/v), en condiciones de luz (PAR, 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ciclo de luz/oscuridad 14/10 h), temperatura (27 ± 2 °C) y HR (55-60%) controladas (Fig. 3.1a).

Imposición del estrés

Estrés hídrico (sequía): Las plantas fueron irrigadas al inicio del experimento (suelo en capacidad de campo, cc), suspendiéndose el mismo hasta que el potencial agua del suelo (ψ_{suelo}) alcanzara -2MPa, generándose un descenso paulatino del contenido de agua (Fig. 3.1b). Las macetas se cubrieron con papel aluminio a fin de evitar la pérdida de agua por evaporación desde la superficie del suelo. El potencial agua del suelo se midió con termocuplas ubicadas en el seno de la rizósfera. Se incluyó un tratamiento control, manteniéndose el contenido de agua del suelo en cc, y un tratamiento de rehidratación consistente en el descenso del contenido hídrico hasta $\psi_{\text{suelo}} = -2\text{MPa}$ momento en el cual se irrigó la planta, analizándose su comportamiento transcurridas 48 hs. de la rehidratación.

Estrés salino: La situación adversa se generó mediante un incremento paulatino del contenido de sales en el suelo a través de una irrigación periódica con NaCl,

iniciando con un riego de 50 mM hasta alcanzar una concentración final de 300 mM (Fig. 3.1c).

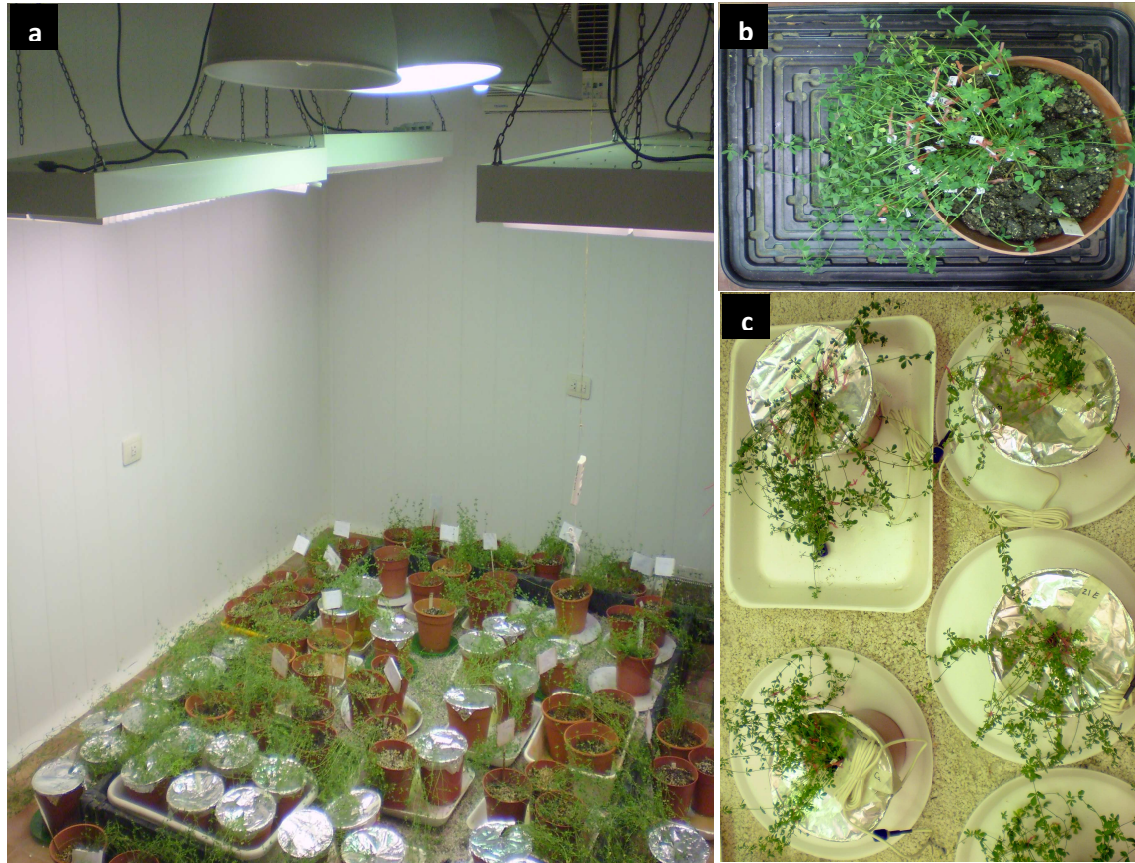


Fig. 3.1: Condiciones experimentales, materiales y métodos utilizados en los experimentos de estrés osmótico. (a) Cámara de crecimiento. (b) Detalle de una planta sometida a estrés salino donde se observa la bandeja colectora de los productos de la abscisión foliar y los rótulos de identificación individual de los brotes. (c) Detalle del cierre de macetas con papel aluminio donde se observa la salida a superficie del cableado que conecta la termocupla ubicada en el seno del sustrato con el microvoltímetro.

Se incluyó un tratamiento control (no salino) y un tratamiento de supresión consistente en el incremento de sales hasta alcanzar la concentración final, momento en el cual se procedió a lavar las raíces y transferir las plantas a un sustrato de idéntica composición pero libre de NaCl, analizándose su comportamiento transcurridas 48 hs. de la supresión de la condición de estrés. La conductividad eléctrica de la solución del suelo se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Caviglia *et al.* 1998. A tal fin, se preparó una suspensión suelo-agua (1:1) mezclando 100 gr de suelo secado al aire con 100 ml de agua destilada, dejando reposar durante 3 horas antes de su

filtración. La conductibilidad eléctrica (dS/m) del extracto obtenido fue determinada mediante el empleo de un conductímetro marca HANNA, modelo HI 98304. A fin de simplificar la interpretación de los datos obtenidos, la temperatura a la cual se realizó la medición fue estandarizada a 25°C mediante el uso de las tablas de corrección correspondientes (Allison *et al.* 1970).

En ambos experimentos se empleó un control no transformado, evaluándose su respuesta tanto en condiciones óptimas de crecimiento como ante la situación adversa provocada por el estrés.

Tratamientos hormonales

Se realizaron aplicaciones exógenas (pulverizaciones a punto de goteo) de soluciones acuosas que contenían ABA (100 ppm), Put (100 ppm) o tungstato de sodio (inhibidor de la síntesis de ABA, 100 ppm) con una frecuencia semanal hasta que se alcanzara las condiciones máximas de estrés preestablecidas para sequía ($\Psi_{\text{suelo}} = -2\text{MPa}$) y salinidad (riego con 300 mM NaCl).

Determinación de los parámetros bioquímicos

Actividad de β -glucuronidasa (GUS). A fin de realizar la determinación histoquímica de GUS de acuerdo con el procedimiento desarrollado por Stomp (1992), plantas transgénicas portadoras del gen GUS (línea 07) fueron sometidas a condiciones de sequía (deshidratación tisular), salinidad (300 mM NaCl) y bajas temperaturas (exposición a 8°C durante 12 hs.), incluyéndose un tratamiento control sin estrés. Seguidamente se extrajeron brotes y raíces que fueron sumergidos en una solución de 1 mg ml⁻¹ de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D glucuronido (X-Gluc) en 100 mM de buffer fosfato de sodio (pH 7.2), 0.1% (v/v) Triton X-100, 10 mM EDTA, 1 mM ferricianuro de potasio. La reacción colorimétrica visible fue obtenida luego de incubar las muestras en oscuridad a 37 °C durante 12 hs.

Actividad de arginina descarboxilasa (ADC). Muestras homogeneizadas de tejidos tallos y hojas (500 mg PF) fueron sometidas a extracción en 2 volúmenes de 100 mM de buffer fosfato pH 7,5 que contenía EDTA 0.5 mM, ditioneitol (DTT) 10 mM, piridoxal fosfato 1 mM y ascorbato de sodio 20 mM. Seguidamente, los extractos crudos fueron clarificados por centrifugación a 10.000g durante 10 min manteniéndose una temperatura de 4°C. La concentración de proteínas del sobrenadante fue cuantificada aplicando el método estándar de Bradford (1976). A fin de determinar la

actividad enzimática se procedió a mezclar 190 ml del extracto sobrenadante con 10 ml de solución de sustrato (1 mM de L-arginina modificada con 5 nCi ml⁻¹ L-[¹⁴C₁]arginina) en un tubo de vidrio provisto de un tapón de goma y un disco de papel de filtro empapado con KOH 2N, incubándose a 37°C durante 60 min. Seguidamente, se detuvo la reacción mediante el agregado de 200 ml de ácido perclórico 10% v/v; manteniéndose el sistema en agitación constante a 37°C durante 45 min para permitir la completa liberación del ¹⁴CO₂, el cual fue atrapado en los papeles de filtro. Finalmente los papeles fueron colocados en viales líquido de centelleo (4g Omnifluor en tolueno), y la radioactividad se midió en un contador de centelleo marca BeckMan, modelo LS 5000 TD.

Contenido de poliaminas libres. Las muestras foliares (300 mg) fueron pulverizadas con nitrógeno líquido, adicionándose 600 ml de ácido perclórico (5%, v/v). Posteriormente éstas fueron incubadas a 4°C durante 12 horas. Seguidamente, los extractos obtenidos fueron centrifugados durante 15 min a 10.000g a 4°C, agregándose 10 ml de 1,7-diaminoheptano (100 mM, ICN Biomedicals) como estándar interno, en un volumen de 200 ml del extracto. A continuación se agregó 200 ml de Na₂CO₃ saturado y 400 ml de una solución de cloruro de dansilo en acetona (10 mg ml⁻¹, Sigma) incubándose la mezcla en oscuridad y temperatura ambiente por 12 hs. La reacción se detuvo por adición de 100 ml de prolina (100 mg ml⁻¹), extrayéndose las aminas dansiladas con 500 ml de tolueno. A continuación, se evaporó al vacío la fase orgánica. Los productos dansilados de la reacción fueron disueltos en 200 ml de acetonitrilo al momento de usar, separándose los mismos por cromatografía líquida de alta presión utilizándose una columna de fase reversa (Garriz *et al.* 2004).

Contenido de prolina. Se utilizó el método de la ninhidrina desarrollado por Magné y Larher (1992). Se realizó una extracción acuosa en ebullición durante 30 min partiendo de una alícuota de 500 mg de muestra molida en nitrógeno líquido y 2 ml de agua destilada. Una vez que la reacción se enfrió alcanzando la temperatura ambiente, se procedió a centrifugar a 2.000 rpm durante 10 min. Posteriormente, se retomó 500 µl del sobrenadante al que se le adicionó 500 µl de citrato de sodio 0,2 M (pH 4,6) y 2 ml de una solución de ninhidrina 1% p/v (en ácido acético:agua 60:40). La mezcla se hirvió durante 1 h, se extrajo con 2 ml de tolueno y se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 min. Finalmente, la absorbancia de la fase orgánica se determinó a 520 nm. La curva de

calibración se realizó con estándar de prolina, en las mismas condiciones de reacción que los extractos vegetales.

Contenido de clorofilas. Se utilizó el procedimiento desarrollado por Arnon (1949) partiendo de 0,1 gr PF de muestra foliar, la cual fue molida en nitrógeno líquido y puesta en un tubo de vidrio que contenía 15 ml de solución extractora (acetona al 80%). Seguidamente, 4 ml del homogeneizado fueron distribuidos en tubos eppendorf (1 ml por tubo) para su centrifugación (12.000 rpm durante dos minutos). Finalmente, en el momento de la medición, los sobrenadantes obtenidos fueron mezclados en una cubeta de espectrofotómetro determinándose la absorbancia de la muestra a 652 nm. La concentración de clorofila se determinó aplicando la ley de Lambert-Beer (coeficiente de extinción de la clorofila a 652 nm = 34.5 ml / mg cm).

Contenido de iones. El contenido de iones sodio y potasio en material digerido fue determinado por espectroscopía de fotometría de llama. El material vegetal fue secado en estufa a 70°C, pulverizado en molino y finalmente fraccionado en alícuotas de 10 a 40 mg. Posteriormente, se agregó 1 ml de HCl 0,1 N, se agitó con vortex cada tubo y se sumergió en baño térmico a 60 °C durante 2 hs, dejando enfriar hasta temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugó por 5 minutos a 10.000 rpm. Las mediciones fueron realizadas a partir del sobrenadante empleándose un fotómetro de llama marca Zeltec, modelo ZF-250 (Dicrom Ingeniería, Arg.), calibrándose el equipo previamente mediante el empleo de una solución patrón (100 ml), consistente en 20 ppm de Na⁺ y 40 ppm K⁺.

Determinación del daño a membrana. Se determinó por medio del ensayo de pérdida de iones siguiendo las recomendaciones de Verslues *et al.* (2006). Para ello se transfirieron las plántulas a un tubo de vidrio conteniendo 10 ml de agua milliQ y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Luego de este lapso de tiempo, se midió la conductividad de la solución a cada tubo antes y después de autoclavar el sistema durante 20 minutos a 1 atmósfera, con la ayuda de un conductímetro marca ALTRONIX, modelo CT2. El porcentaje de pérdida de electrolitos se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Delta \text{conductividad}(\%) = \frac{\text{conductividad antes de autoclavar}}{\text{conductividad después de autoclavar}} \times 100$$

Determinación de los parámetros fisiológicos

Ajuste osmótico. A fin de determinar el potencial osmótico a plena turgencia (Ψ_{π}^{100}), los brotes fueron recolectados al mediodía y rehidratados hasta peso constante introduciéndolos en cajas de petri que contenían agua destilada e incubados bajo condiciones ambientales controladas. Seguidamente, éstos fueron introducidos en una jeringa de 5 mm de capacidad, congelados en nitrógeno líquido y almacenados en un freezer -80 °C. Finalmente, las jeringas fueron descongeladas hasta que las muestras alcanzaran la temperatura ambiente determinándose el Ψ_{π}^{100} del extracto xilemático con una termocupla C-52 (Wescor Inc.). El ajuste osmótico ($\Delta\Psi_{\pi}^{100}$) por imposición del estrés se calculó por diferencia de Ψ_{π}^{100} entre el tratamiento de estrés y el control sujeto a condiciones óptimas de crecimiento para cada genotipo evaluado.

Contenido de agua. La determinación del contenido de agua se realizó a través de la medición de CRA (contenido relativo de agua). Inicialmente se tomó el peso fresco de un brote (PF), luego se lo dejó en agua durante unas horas para determinar su peso turgente (PT) y finalmente se lo secó en estufa a 110 °C para determinar su peso seco (PS). El CRA se calculó de la siguiente manera:

$$\text{CRA} = \frac{\text{Peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{Peso turgente} - \text{peso seco}} \times 100$$

Intercambio gaseoso. Fotosíntesis, conductancia estomática y transpiración fueron determinados mediante el empleo de un medidor portátil de fotosíntesis marca LiCor, modelo LI-6400 (LiCor, Nebraska, USA), equipado con inyector de CO₂ y luz LED. Las mediciones de fotosíntesis fueron realizadas en las siguientes condiciones: [CO₂]_{ref}= 350 µmol mol⁻¹, HR= 60%, PPFD= 1500 µmol·m⁻²·s⁻¹, temperatura de hoja: 30 °C. Las plantas fueron seleccionadas al azar y las mediciones fueron realizadas en la tercera hoja totalmente expandida empleando una cámara IRGA estándar.

Determinación de los parámetros de crecimiento

El área foliar se determinó mediante el empleo de un medidor de área foliar portable marca LiCor, modelo LI-3000 (LiCor, Nebraska, USA). El peso seco de tallos, hojas y raíces se realizó en estufa a 70 °C hasta peso constante. Los valores obtenidos

fueron empleados para determinar relación área foliar [$RAF = AF \text{ (cm}^2\text{) / PS total (gr)}$], área foliar específica [$AF \text{ esp} = AF \text{ (cm}^2\text{) / PS hojas (gr)}$] y relación parte aérea/raíz.

Diseño experimental y análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron en diseños completamente aleatorizados. Cada tratamiento constó de 5 plantas distribuidas al azar, repitiéndose cada experimento 3 veces. Los resultados presentados se corresponden con el promedio de tres repeticiones incluyéndose el error estándar de la media ($\pm$ SEM). Los datos fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) (GraphPad Software San Diego, CA) usando el test de comparación múltiple de Tukey. Para evaluar el grado de significancia estadístico se optó por un nivel de probabilidad de 0,05.

4. Resultados y Discusión

Expresión órgano-específica.

La generación de plantas transgénicas constituye una de las variadas herramientas que ofrece la biotecnología moderna cuya potencialidad de aplicación convalidan una estrategia a seguir dentro de un programa de mejoramiento genético. Para cumplir con este fin, es necesario contar con un gen que haya demostrado la factibilidad de conferirle a la planta una característica ventajosa comparada con su par sin transformar. Por otro lado, es necesario contar con una región promotora capaz de dirigir la expresión del gen elegido en los órganos donde éste sea necesario y/o en los momentos en los que la planta lo necesite. La expresión constitutiva lograda con promotores muy fuertes como el 35S del CaMV, puede generar a las plantas gastos metabólicos innecesarios que generalmente se traducen en cambios fenotípicos no deseados. Este hecho crea la necesidad de contar, por un lado, con un promotor inducible por estrés y por el otro, determinar su expresión específica de órgano en respuesta a los factores ambientales objetos del estudio. Con esta finalidad hemos obtenido plantas transformadas en forma estable portadoras del gen promotor RD29A fusionado con la región codificante del gen de la β -glucuronidasa (*gus*), el cual funciona como gen reportero. Con estas plantas se realizaron ensayos histoquímicos con el fin de determinar la expresión del gen reportero en diferentes tejidos y condiciones de crecimiento. A partir del análisis de los resultados obtenidos se pudo determinar que el promotor es capaz de dirigir la expresión del gen *gus* en tallos y hojas de plantas sujetas

a condiciones de estrés osmótico impuestas ya sea por sequía, salinidad ó frío, no detectándose expresión en los tejidos radiculares (Fig. 3.2).

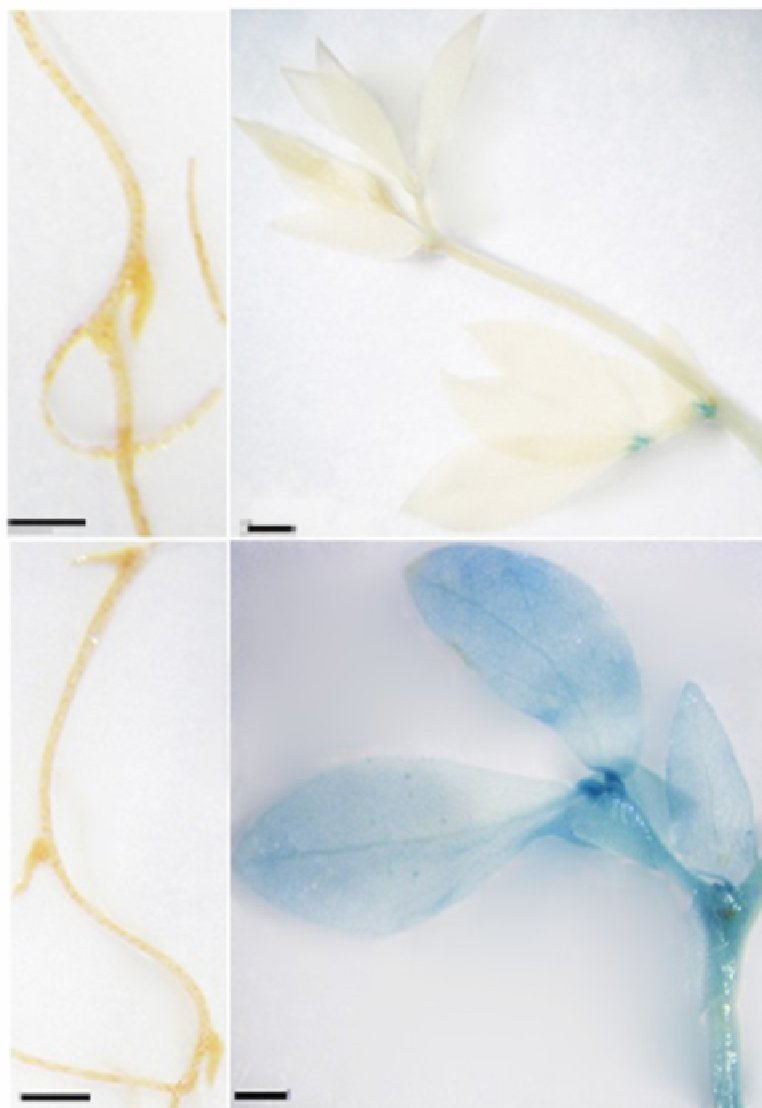


Fig. 3.2: Localización histoquímica de la actividad de GUS en tejidos de líneas transgénicas de *Lotus tenuis*. Patrones de expresión del gen GUS en raíces, tallos y hojas de líneas transgénicas no estresadas (parte superior) y estresadas (parte inferior). En todos los casos, la barra indica 1mm.

Respuestas bioquímicas y fisiológicas a estrés hídrico (sequía).

La Tabla 3.1 revela la variación de la actividad de arginina descarboxilasa (EC 4.1.1.19) en los genotipos evaluados ante distintas situaciones de crecimiento, observándose una mayor actividad enzimática en las líneas transgénicas sujetas a estrés en comparación con el genotipo salvaje. En tal escenario, éstas duplicaron su actividad enzimática en respuesta al déficit hídrico, disminuyendo la misma una vez superada la

situación desfavorable (rehidratación). El genotipo salvaje no evidenció un comportamiento diferencial de la actividad enzimática en las condiciones ensayadas; siendo ésta extremadamente inferior con respecto a las líneas transgénicas en situaciones de estrés.

Tabla 3.1: Variación de la actividad de arginina descarboxilasa en respuesta al déficit hídrico.

Tratamiento	Línea 19	Línea 21	Nt
Sin estrés	1,4 ± 0,2	1 ± 0,1	0,09 ± 0,015
-2MPa	2,89 ± 0,005**	2,03 ± 0,9 ^{ns}	0,076 ± 0,02 ^{ns}
Rehidratación	1,36 ± 0,01	0,23 ± 0,005**	0,075 ± 0,005 ^{ns}

Los valores de actividad enzimática se expresan en nmoles $^{14}\text{CO}_2$ mg prot⁻¹ min⁻¹ y corresponden al promedio de tres muestras independientes ± SEM. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas respecto al tratamiento control (sin estrés). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ***, $p < 0,0005$ (Test de Comparaciones Múltiples de Dunnett). Referencias: **Nt**, genotipo no transformado (planta salvaje).

En consecuencia, su contenido endógeno de PAs en tallos y hojas se modificó en relación con la variación de la actividad enzimática, evidenciándose en condiciones óptimas de crecimiento un aumento en el contenido de Put, Spd y Spm en la línea ADC-19 y Put en ADC-21 respecto al genotipo salvaje (Fig. 3.3). Asimismo, se observaron variaciones estadísticamente significativas del nivel endógeno de Put con respecto a sus controles en plantas sometidas a sequía en ambos genotipos transformados. La relación (Spm+Spd) : Put fue menor en ADC-19 y ADC-21 respecto al genotipo no transformado, indicando un incremento del contenido relativo de Put (2,4±0,5; 1,9±0,4 y 10,1±2,1; ADC-19, ADC-21 y genotipo no transformado, respectivamente). Por su parte, la aplicación foliar de Put incrementó el contenido endógeno de su forma libre en los brotes del genotipo salvaje sujeto a estrés ($p=0,03$); mientras que su concentración se mantuvo impasible en las líneas que sobre-expresan el gen ADC en tales condiciones, cuyo hecho podría eventualmente atribuirse a un efecto de auto-regulación por conjugación de la forma libre (Bagni y Tassoni 2001, Gill y Tuteja 2010b). La pulverización con ABA ejerció un efecto inhibitor sobre la síntesis de Put en plantas no transformadas que experimentaban déficit hídrico ($p=0,01$), siendo este hecho revertido cuando se interrumpió la biosíntesis de ABA con tungstato⁷ ($p=0,02$). De igual modo, la aplicación de ABA disminuyó los niveles de Put en las plantas transgénicas sujetas a

⁷ Tungstato (Tg): inhibidor de la síntesis de ABA. Afecta el último paso de la biosíntesis de ABA interrumpiendo la actividad de la enzima ABA aldehído oxidasa.

condiciones similares de crecimiento, principalmente en la línea ADC-21 ($p=0,003$). Finalmente, cuando éstas fueron tratadas con el inhibidor de ABA, se observó una disminución del contenido de Put libre tanto en condiciones hídricas óptimas ($p= 0,025$ y $0,019$; líneas ADC-19 y ADC-21, respectivamente) como deficitarias ($p= 0,019$ y $0,0002$; líneas ADC-19 y ADC-21, respectivamente).

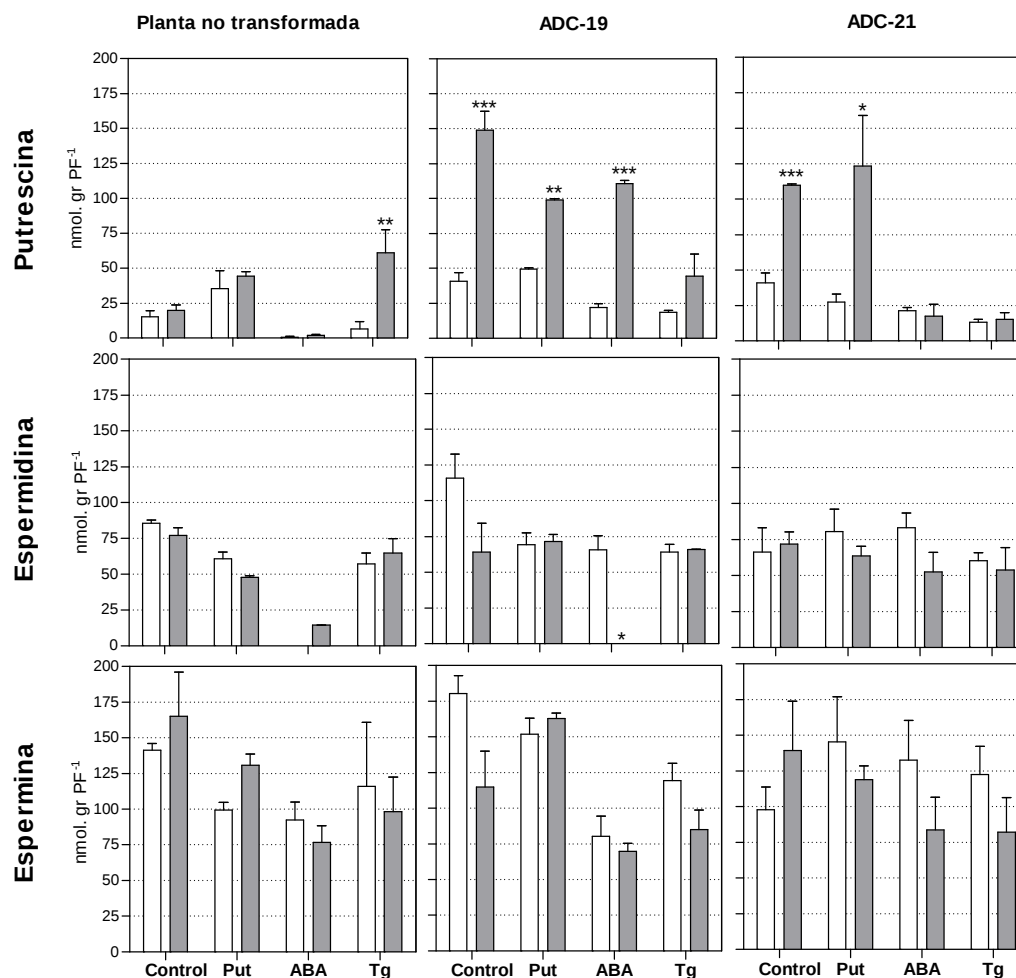


Fig. 3.3: Efecto de la aplicación de putrescina, ABA y tungstato sobre el nivel endógeno de poliaminas en plantas sujetas a estrés hídrico. Barras blancas y grises indican tratamientos de irrigación (capacidad de campo) y sequía, respectivamente. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (Test de Student) respecto al tratamiento control sujeto a capacidad de campo. *, $p<0,05$; **, $p<0,005$.

En condiciones óptimas de crecimiento, la tasa fotosintética (A) fue mayor en ambas líneas transgénicas con respecto a la planta no transformada (Tabla 3.2), a expensas de una mayor conductancia estomática (g_s) y transpiración (E). Cuando éstas experimentaron déficit hídrico, A fue similar en todos los casos; evidenciándose claramente una disminución de g_s en respuesta a la situación adversa. Si bien, este

hecho favoreció el descenso de E en los tres genotipos estudiados, el contenido relativo de agua (CRA) fue mayor en los brotes de la línea 19, siendo estadísticamente no significativa su variación respecto al par no estresado ($p=0,05$ Tukey). Al mismo tiempo, se observó un descenso del potencial osmótico (ψ_{π}^{100}) en ambas líneas evaluadas, constatándose la coexistencia del proceso de ajuste osmótico ($\Delta\psi_{\pi}^{100}$) como herramienta bioquímica para paliar la situación desfavorable. En este escenario, cabe esperar que la variación de los niveles endógenos de prolina estuviera vinculada a $\Delta\psi_{\pi}^{100}$; sin embargo, tomando en consideración que tal variación suscitada en el genotipo salvaje, no se correspondió con una modificación considerable del potencial osmótico, cabría la posibilidad de considerar que prolina no constituya el único osmo-protector empleado por el mecanismo de defensa que utiliza la planta. Asimismo, cabe destacar que, probablemente como resultado de un mejor balance hídrico, disminuyó el consumo de agua en las plantas ADC-19, requiriendo de un periodo más prolongado para que el potencial agua del suelo alcanzara -2MPa (diferencia de 10 días respecto a los otros genotipos).

Tabla 3.2: Efectos de sequía sobre el intercambio de gases, relaciones hídricas y ajuste osmótico de plantas transgénicas RD29A:oaADC.

	Capacidad de campo			Nt	Sequía	
	Nt	ADC-19	ADC-21		ADC-19	ADC-21
A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	35,6 $\pm$ 0,4	37,4 $\pm$ 0,7	37,9 $\pm$ 0,55	33,25 $\pm$ 0,26	33 $\pm$ 0,33**	34,35 $\pm$ 0,52***
gs ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,047 $\pm$ 0,000	0,068 $\pm$ 0,002	0,077 $\pm$ 0,0005	0,006 $\pm$ 0,002***	0,009 $\pm$ 0,001***	0,016 $\pm$ 0,002***
E ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	1,15 $\pm$ 0,086	1,59 $\pm$ 0,11	1,76 $\pm$ 0,06	0,16 $\pm$ 0,03***	0,27 $\pm$ 0,03***	0,38 $\pm$ 0,08***
CRA (%)	89,7 $\pm$ 1,2	92,3 $\pm$ 3,08	90,5 $\pm$ 0,7	70,2 $\pm$ 4,5*	80,2 $\pm$ 6,5	60,0 $\pm$ 4,0*
ψ_{π}^{100} (MPa)	-2,36 $\pm$ 0,21	-1,68 $\pm$ 0,14	-1,5	-2,7 $\pm$ 0,05	-2,74 $\pm$ 0,31**	-3,06**
$\Delta\psi_{\pi}^{100}$	-	-	-	-0,18 $\pm$ 0,12	-1,06 $\pm$ 0,31**	-1,56 $\pm$ 0,33**
Prolina ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ PF}$)	2,53 $\pm$ 0,2	0,28 $\pm$ 0,08	2,44 $\pm$ 0,37	13,2 $\pm$ 2,14**	16,33 $\pm$ 2,05***	13,8 $\pm$ 0,78***
Clorofila a+b (mg gr PF^{-1})	0,97 $\pm$ 0,04	1,47 $\pm$ 0,02	1,02 $\pm$ 0,06	1,28 $\pm$ 0,02***	1,33 $\pm$ 0,02	1,59 $\pm$ 0,02***

Los valores representan el promedio $\pm$ SEM de 5 repeticiones. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (Test de Student) respecto al tratamiento control sujeto a capacidad de campo. *, $p<0,05$; **, $p<0,005$; ***, $p<0,0005$. Referencias: **Nt**, genotipo no transformado (salvaje); **A**, fotosíntesis neta, **gs**, conductancia estomática; **E**, transpiración; **CRA**, contenido relativo de agua del brote.

Si bien, por efecto del déficit hídrico, tanto el genotipo salvaje como la línea 21, incrementaron sus contenidos de clorofila a+b, éste no resultó suficiente para mantener la tasa fotosintética. En consecuencia, el análisis de la partición de los fotoasimilados

(Tabla 3) indica que, en el caso de la línea ADC-19, a pesar de no existir diferencias estadísticas respecto al tratamiento irrigado, la disminución del área foliar (AF) afectó negativamente la relación de área foliar (RAF)⁸ y el área foliar específica (AFE)⁹; sin embargo, el peso seco de la parte aérea (tallos+hojas) se mantuvo invariable, incrementando el crecimiento de raíces (cuantificado a través de la determinación de su peso seco); razón por la cual, la relación parte aérea/raíz disminuyó significativamente, denotando una clara respuesta de defensa a sequía (Munns *et al.* 2003, Tester y Davenport 2003). En adición, se detectó una correlación positiva entre el contenido de Put y el peso seco de raíz ($r=0,983$), concordando este hecho con los recientes resultados obtenidos por Wang *et al.* (2011) en el sentido de que la variación de los niveles endógenos de PAs podrían modular el crecimiento radicular en situaciones de estrés osmótico.

Por su parte, la reducción del AF en la línea ADC-21 no afectó los restantes parámetros directamente relacionados (RAF, AFE), observándose un incremento no significativo de los mismos; no obstante, pudo determinarse una notable disminución del crecimiento radicular, acrecentando en consecuencia la relación parte aérea/raíz. Finalmente, a pesar de que el déficit hídrico no afectó los parámetros indicativos del crecimiento aéreo (AF, RAF, AFE y PS_{tallos+hojas}) del genotipo salvaje, éste afectó negativamente el crecimiento radicular.

Tabla 3.3: Efecto del déficit hídrico sobre la distribución de fotoasimilados.

	Capacidad de campo			Nt	Sequía	
	Nt	ADC-19	ADC-21		ADC-19	ADC-21
AF (cm ²)	105,5±11,2	274,1±46,2	273,0±33,4	116,3±14	160,1±19,9	180,7±38,5
RAF (cm ² gr PS total ⁻¹)	36,7±0,05	78,6±5,9	31,5±11,3	48,5±9,2	39,3±5,7**	42,6±9,6
AFE (cm ² gr PS hoja ⁻¹)	333,8±19,8	367,8±14,01	203,9±24,9	401,4±59,1	286,6±21,8*	242,9±45,6
PS tallo + hojas	2,14 ± 0,29	3,06 ± 0,75	4,21 ± 1,34	1,56 ± 0,15	3,02 ± 0,06	3,21 ± 0,06
PS raíz	0,73±0,02	0,76±0,191	4,25±0,87	0,46±0,11	1,10±0,14	1,10±0,14*
PS tallo + hojas/PS raíz	2,92±0,31	4,15±0,8	1,36±0,8	2,97±0,7	2,63 ± 0,19*	3,02±0,34

Los valores son los promedios ± SEM de 5 repeticiones. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (Test de Student) respecto al tratamiento control sujeto a capacidad de campo. *, $p<0,05$; **, $p<0,005$; ***, $p<0,0005$. Referencias: **Nt**, genotipo no transformado (salvaje). **AF**, área foliar promedio por planta; **RAF**, relación área foliar; **AFE**, área foliar específica.

⁸ RAF: indica la relación entre el área foliar y el peso seco de la planta.

⁹ AFE: indica la relación entre el área foliar y el peso seco de las hojas.

Por su parte, la aplicación foliar ya sea de Put, ABA ó Tg afectó principalmente la relación parte aérea/raíz (Fig. 3.4). En tal sentido, tanto el agregado de Put como de ABA disminuyó el crecimiento y el desarrollo radicular de ADC-19 en condiciones de sequía (Anexo a), incrementando la relación parte aérea/raíz ($p= 0,02$ y $0,01$; Put y ABA, respectivamente). Este efecto fue aún mayor en la línea ADC-21, manifestándose inclusive en condiciones óptimas de hidratación (Anexo b). Finalmente, en el genotipo salvaje, donde el enriquecimiento tisular de Put y ABA, proviene principalmente de una fuente exógena, éstas alteran la distribución de los fotoasimilados promoviendo el crecimiento y desarrollo radicular (Anexo c), en desmedro de la relación parte aérea/raíz ($p= 0,034$ y $0,029$; Put y ABA, respectivamente), observándose una respuesta antagónica con el agregado de Tg.

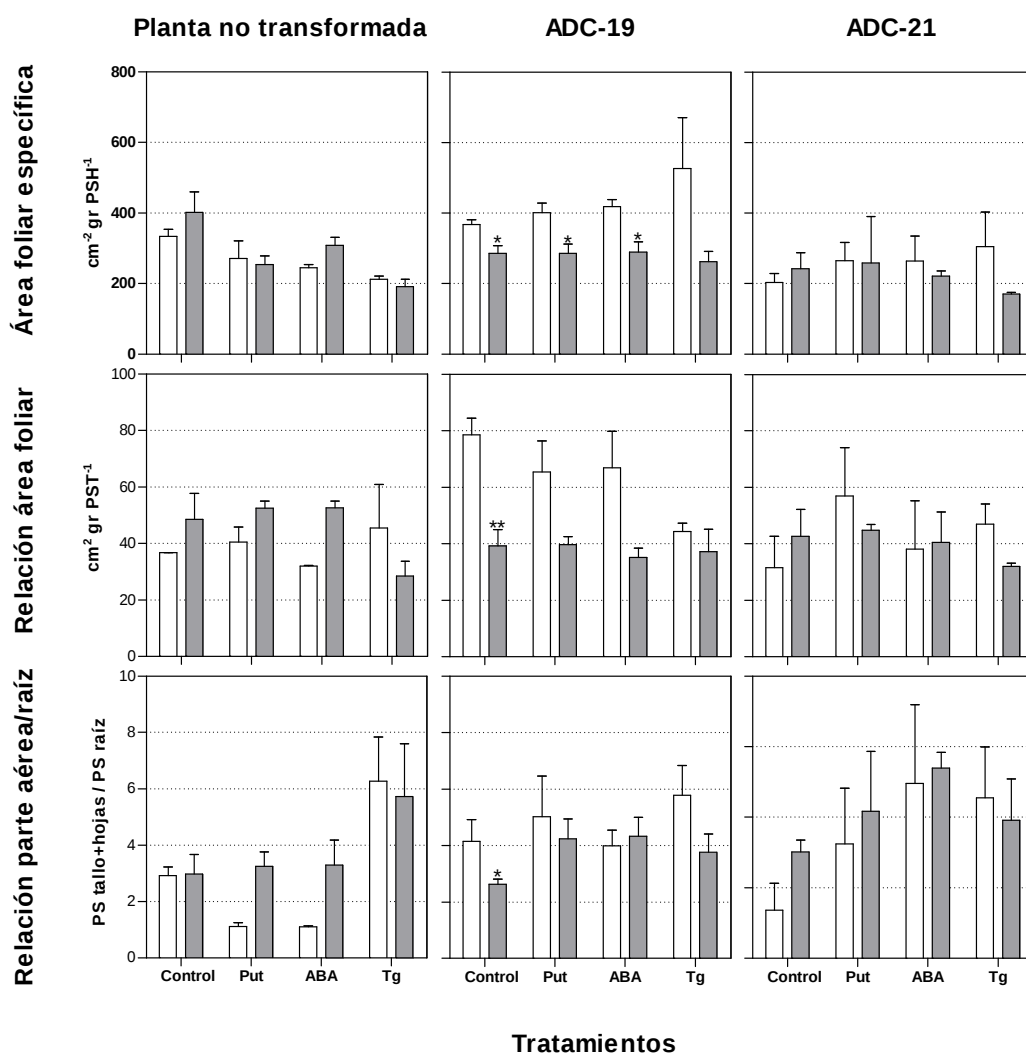


Fig. 3.4: Efecto de la aplicación de putrescina, ABA y tungstato sobre la partición de biomasa en plantas sujetas a estrés hídrico. Barras blancas y grises indican tratamientos de irrigación (capacidad de campo) y sequía, respectivamente. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (Test de Student) respecto al tratamiento control sujeto a capacidad de campo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$.

Respuestas bioquímicas y fisiológicas a estrés salino.

La Tabla 3.4 indica la variación de la actividad enzimática en respuesta al estrés. En general, el exceso de sales promovió la actividad de ADC en los genotipos evaluados, disminuyendo ésta una vez superada la situación desfavorable (supresión). Ambas líneas transgénicas denotaron una mayor actividad enzimática aún en condiciones óptimas de crecimiento, vislumbrándose una variación de 3,1; 3,35 y 2,1 órdenes de magnitud en ADC-19, ADC-21 y el genotipo salvaje, respectivamente.

Tabla 3.4: Variación de la actividad de arginina descarboxilasa en respuesta a estrés salino.

<i>Tratamiento</i>	<i>Línea 19</i>	<i>Línea 21</i>	<i>Nt</i>
Sin estrés	1,4 ± 0,2	1,0 ± 0,1	0,07 ± 0,02
Estrés salino	4,32 ± 0,35***	3,35 ± 0,34***	0,15 ± 0,03*
Supresión	2,8 ± 0,17**	1,64 ± 0,15*	0,04 ± 0,01 ^{ns}

Los valores de actividad enzimática se expresan en nmoles $^{14}\text{CO}_2$ mg prot⁻¹ min⁻¹ y corresponden al promedio de tres muestras independientes ± SEM. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas respecto al tratamiento control (sin estrés). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ***, $p < 0,0005$ (Test de Comparaciones Múltiples de Dunnett). Referencias: **Nt**, genotipo no transformado (salvaje).

La variación de la actividad enzimática promovida por el estrés aparentemente no se tradujo en un mayor contenido de Put libre, siendo aún menor su concentración en las líneas transformadas (Fig. 3.5). Este hecho, en concordancia con lo informado por Santa Cruz *et al.* (1997) en el sentido de que la acumulación de PAs libres ocurre de manera temprana, disminuyendo a medida que se prolonga la duración del estrés, podría estar relacionado con el momento del muestreo, en donde las plantas probablemente experimentaron la segunda fase del estrés salino caracterizado por el estrés iónico. Asimismo, no se descarta la posibilidad de que prevalezca un mecanismo de desintoxicación por conjugación u oxidación (Kuznetsov *et al.* 2006). Por su parte, el contenido de Spd disminuyó en los genotipos estudiados como consecuencia de la imposición del estrés, concordando estos resultados con aquellos informados previamente por Maiale *et al.* (2004) y Pesqueira (2008) para la especie objeto del estudio. En general, la aplicación foliar de Put, ABA ó Tg no afectó los niveles endógenos de PAs libres.

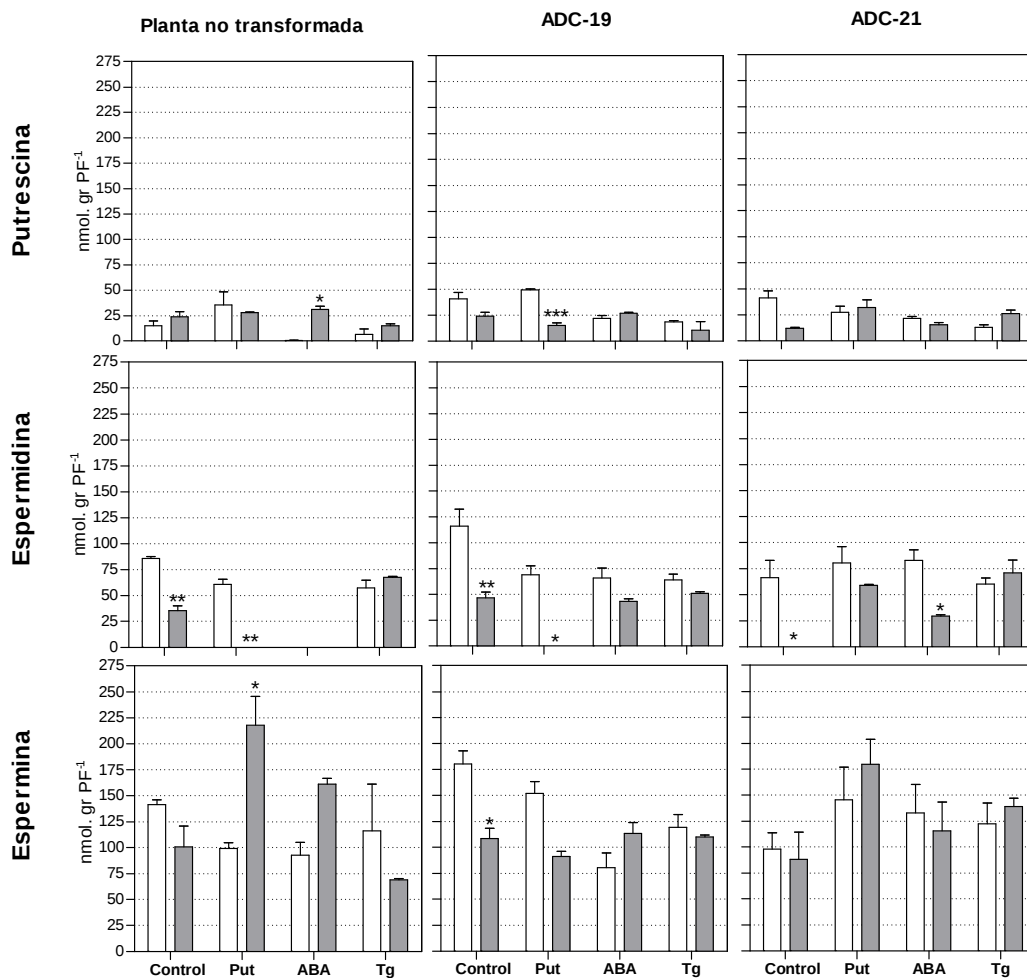


Fig. 3.5: Efecto de la aplicación de putrescina, ABA y tungstato sobre el nivel endógeno de poliaminas en plantas sujetas a estrés salino. Barras blancas y grises indican tratamientos control y salinidad, respectivamente. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (Test de Student) respecto al tratamiento control. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ***, $p < 0,0005$.

Como consecuencia de la salinidad se observó una alteración en la absorción de los iones monovalentes cuya intensidad y grado de compartimentalización en los diferentes órganos de la planta dependió del genotipo en estudio (Tabla 3.5). La absorción de Na^+ en el ámbito de las raíces fue mayor en el genotipo no transformado (Nt), incrementándose su contenido más de cuatro veces respecto al tratamiento control que permaneció en condiciones óptimas de crecimiento; por su parte, ambas líneas transgénicas evidenciaron una menor concentración iónica en tales órganos ocasionando una merma en la magnitud de la variación por efecto del estrés respecto a Nt. Asimismo, cabe destacar el hecho de que a pesar de determinarse una elevada acumulación de Na^+ en hojas de la línea ADC-19, la ausencia de síntomas visibles de estrés oxidativo concurrentemente con una menor abscisión foliar respecto a Nt, ponen

de manifiesto su habilidad para mitigar los daños producidos por la elevada concentración de NaCl. Si bien, en el contexto del Capítulo I, se presentó una profusa revisión y actualización del estado del arte acerca de los procesos moleculares y bioquímicos que participan en el mantenimiento de la homeostasis iónica en las plantas, motiva resaltar en este punto el hecho de que la tasa de influjo y eflujo en raíz establece el estado real de la entrada de Na^+ a la planta, mientras que su compartimentalización en vacuolas y el transporte radial a la estela y de allí su derrame al xilema, establece el control homeostático de Na^+ en el citoplasma de las células radicales; a la vez que su remoción por la corriente transpiratoria, su distribución a través de la planta y su progresivo acopio en las hojas más viejas determinará la habilidad del genotipo para contrarrestar los efectos nocivos de la presencia excesiva de Na^+ (Tester y Davenport 2003, Apse y Blumwald 2007). De hecho, la toxicidad metabólica de Na^+ es la resultante de la competencia con K^+ en muchas funciones celulares esenciales para el organismo (Rodríguez-Navarro y Rubio 2006), en donde altos niveles de Na^+ o una relación $\text{Na}^+ : \text{K}^+$ elevada puede interrumpir varios procesos enzimáticos en el citoplasma (Yao *et al.* 2010). En este sentido, pudo determinarse un incremento estadísticamente significativo del contenido de K^+ en raíces de la línea ADC-19 manteniendo prácticamente invariable la relación $\text{Na}^+ : \text{K}^+$; lo cual podría guardar cierta relación con lo sugerido por Zhao *et al.* (2008) en el sentido de que, probablemente, las poliaminas mejorarían la homeostasis celular bajo condiciones de estrés, restringiendo el ingreso de Na^+ y la salida de K^+ en las células de la raíz. En adición, pudo observarse que la aplicación foliar de Put redujo substancialmente el contenido de Na^+ en raíces del genotipo no transformado; duplicando el contenido de K^+ en el ámbito de las hojas (Anexo g); observándose a la vez, una significativa disminución de Na^+ en raíces, tallos y hojas como consecuencia de la pulverización con ABA (6,1; 1,4 y 1,9 órdenes de magnitud, respectivamente); existiendo en este caso un alto grado de correlación entre el contenido de Put libre, promovido por ABA (Fig. 3.5), y los niveles de Na^+ en hojas ($r= 1,0$), tallos ($r= 1,0$) y raíces ($r= 0,94$). Durante el experimento, las plantas debieron soportar valores elevados de conductividad eléctrica de sustrato saturado de suelo, muy por encima de aquellos considerados por Mass y Hoffman (1977) como aptos para una normal productividad de los cultivos, oscilando entre 20 y 30 dS/m suelo; asimismo, pudo constatar que plantas de la línea ADC-19 soportaron y continuaron brotando aún cuando la conductividad del suelo alcanzara 49,8 dS/m (Fig. 3.6).

Tabla 3.5: Efectos de la salinidad sobre el contenido de potasio, sodio y su relación en los distintos órganos de la planta.

	Sin estrés			Con estrés		
	Hojas	Tallos	Raíces	Hojas	Tallos	Raíces
Na⁺ (mg gr ⁻¹ PS)						
Nt	3,0±0,5	4,0±1,1	8,1±2,1	14,6±1,5***	10,8±1,0**	33,2±6,0***
ADC-19	2,0±0,4	2,7±0,3	9,5±1,6	19,7±8,6**	18,4±7,2*	24,9±2,6***
ADC-21	6,5 ± 2,1	5,7 ± 1,2	7,2 ± 1,1	13,1 ± 2,3	10,3 ± 2,7	21,2 ± 4,7*
K⁺ (mg gr ⁻¹ PS)						
Nt	38,1±4,1	40,0±5,7	17,5±17,1	43,3±4,25	34,1±4,6	21,6±1,9
ADC-19	25,7±3,0	38,2±4,2	19,3±2,9	29,0±4,5	37,7±4,4	41,8±5,5*
ADC-21	30,5±4,2	36,5±3,2	19,6±3,5	31,3±3,2	44,6±3,6	31,3±3,7
Na⁺/K⁺						
NT	0,08 ± 0,01	0,12 ± 0,04	0,7 ± 0,27	0,33 ± 0,005**	0,35 ± 0,06	1,53 ± 0,25***
ADC-19	0,07 ± 0,008	0,07 ± 0,004	0,5 ± 0,08	0,72 ± 0,31*	0,6 ± 0,26	0,63 ± 0,12
ADC-21	0,2 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,42 ± 0,08	0,42 ± 0,07	0,25 ± 0,08	0,73 ± 0,22

Los valores constituyen los promedios ± SEM de 5 repeticiones ($p \leq 0,05$; Test de Comparaciones Múltiples de Tukey).



Fig. 3.6: Plantas sometidas a estrés salino (300mM NaCl). Izquierda: genotipo no transformado. Centro: línea ADC-19. Derecha: Línea ADC-19 transcurridas 48 hs. de la supresión del estrés.

En condiciones normales de crecimiento, ambas líneas transgénicas evidenciaron una mayor actividad fotosintética (A) respecto al genotipo salvaje a expensas de una mayor conductancia estomática y transpiración (Tabla 6); sin embargo, cuando éstas experimentaron estrés salino, A disminuyó significativamente en la línea ADC-21 en la cual además se observó un menor contenido de clorofila a+b. En tal escenario, la conjunción de una menor conductancia estomática (g_s) que determinó una menor transpiración por un lado, y la disminución del potencial osmótico (ψ_{π}^{100}) que causó un considerable ajuste osmótico ($\Delta\psi_{\pi}^{100}$) por el otro, posibilitaron el mantenimiento del contenido relativo de agua en el ámbito de tallos y hojas; correlacionándose este hecho con el incremento de la actividad de ADC ($r = 0,97$). El descenso de ψ_{π}^{100} se relacionó con un incremento del contenido de prolina de 3,2; 6,6 y 23,9 veces en tallos y hojas del genotipo salvaje, ADC-21 y ADC-19, respectivamente; lo cual concuerda con los

resultados obtenidos anticipadamente por Bouchereau *et al.* (1999), quienes informaron que en condiciones de alta salinidad, el catabolismo de Put (vía diamina oxidasa) contribuiría a la acumulación de prolina.

Tabla 3.6: Efectos de salinidad sobre el intercambio de gases, relaciones hídricas y ajuste osmótico de plantas transgénicas RD29A:oaADC.

	Nt	Control ADC-19	ADC-21	Nt	Estrés salino ADC-19	ADC-21
A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	35,6 $\pm$ 0,4	37,4 $\pm$ 0,7	37,9 $\pm$ 0,55	34,7 $\pm$ 0,4	33,8 $\pm$ 1,1	34,27 $\pm$ 0,51***
g _s (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	0,047 $\pm$ 0,0005	0,068 $\pm$ 0,002	0,077 $\pm$ 0,0005	0,022 $\pm$ 0,006	0,032 $\pm$ 0,08*	0,025 $\pm$ 0,003***
E (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	1,15 $\pm$ 0,086	1,59 $\pm$ 0,11	1,76 $\pm$ 0,06	0,50 $\pm$ 0,12	0,72 $\pm$ 0,17**	0,48 $\pm$ 0,07***
CRA (%)	89,7 $\pm$ 1,2	92,3 $\pm$ 3,08	90,5 $\pm$ 0,7	86,97 $\pm$ 8,13	80,53 $\pm$ 11,78	82,57 $\pm$ 3,88
Ψ_{π}^{100} (MPa)	-2,36 $\pm$ 0,21	-1,68 $\pm$ 0,14	-1,5 $\pm$ 0,26	-2,7 $\pm$ 0,05	-3,65 $\pm$ 0,31**	-3,5 $\pm$ 0,05**
$\Delta\Psi_{\pi}^{100}$	-	-	-	-0,34 $\pm$ 0,05	-1,97 $\pm$ 0,31**	-2,26 $\pm$ 0,03**
Prolina ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ PF)	2,53 $\pm$ 0,2	0,28 $\pm$ 0,08	2,44 $\pm$ 0,37	9,17 $\pm$ 0,83*	6,71 $\pm$ 0,49***	16,12 $\pm$ 3,58***
Clorofila a+b (mg gr PF ⁻¹)	0,97 $\pm$ 0,04	1,47 $\pm$ 0,02	1,02 $\pm$ 0,06	0,94 $\pm$ 0,007	1,16 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,003***

Los valores representan el promedio $\pm$ SEM de 5 repeticiones. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (Test de Student) respecto al tratamiento control sujeto a condiciones óptimas de crecimiento. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0005$. Referencias: **Nt**, genotipo no transformado (salvaje); **A**, fotosíntesis neta, **g**, conductancia estomática; **E**, transpiración; **CRA**, contenido relativo de agua del brote.

El análisis de la partición de los fotoasimilados (Tabla 3.7) indica que ésta sufrió una alteración de su patrón normal a consecuencia del estrés impuesto por el exceso de sales. En este contexto, el área foliar (AF) disminuyó significativamente en ambas líneas transgénicas. La línea ADC-19 se destacó por mantener e inclusive promover levemente su crecimiento radicular (expresado en PS) en desmedro de la relación de área foliar (RAF). De manera contrapuesta, los genotipos restantes incrementaron RAF afectando seriamente el crecimiento de raíces. De igual modo, las plantas ADC-19 mostraron una menor abscisión foliar (1,3 veces) respecto al genotipo no transformado (3,2 veces), observándose una mayor brotación en el período evaluado (Anexos d, e y f); siendo este último una clara respuesta a salinidad (Läuchli y Grattan 2007) y un factor clave en la productividad de *Lotus tenuis* en ambientes salinos (Pesqueira 2008).

Tabla 3.7: Efecto del estrés salino sobre la distribución de fotoasimilados.

	Nt	Control ADC-19	ADC-21	Nt	Salinidad ADC-19	ADC-21
AF (cm ²)	105,5±11,2	274,1±46,2	273,0±33,4	61,4±1,4	110,7±2,7**	103,4±3,99**
RAF (cm ² gr PS total ⁻¹)	36,7±0,05	78,6±5,9	31,5±11,3	48,87±1,13*	37,14±3,4**	44,4±9,3
AFE (cm ² gr PS hoja ⁻¹)	333,8±19,8	367,8±14,01	203,9±24,9	153,3±13,3**	214,4±1,63	168,2±36,9
PS tallo + hojas	2,14 ± 0,29	3,06 ± 0,75	4,21 ± 1,34	1,1 ± 0,28	2,21 ± 2,24	1,97 ± 0,48
PS raíz	0,73±0,02	0,76±0,191	4,25±0,87	0,16±0,02**	0,82±0,21	0,67±0,28*
PS tallo + hojas/PS raíz	2,92±0,31	4,15±0,8	1,36±0,8	7,23±2,67	3,39 ± 1,38	3,47±0,86

Los valores son los promedios ± SEM de 5 repeticiones. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (Test de Student) respecto al tratamiento control sujeto a condiciones óptimas de crecimiento. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ***, $p < 0,0005$. Referencias: **Nt**, genotipo no transformado (salvaje). **AF**, área foliar promedio por planta; **RAF**, relación área foliar; **AFE**, área foliar específica.

En condiciones de estrés, la aplicación exógena de Put, ABA o Tg en las plantas transgénicas no afectó, prácticamente, los parámetros estudiados (Fig. 3.7). Finalmente, en el genotipo salvaje, el enriquecimiento de Put y ABA alteran la distribución de los fotoasimilados favoreciendo el AFE y RAF, a diferencia de lo ocurrido en los genotipos transformados, observándose una respuesta antagónica en el crecimiento radicular con el agregado de Tg, Put y ABA (Fig. 3.7).

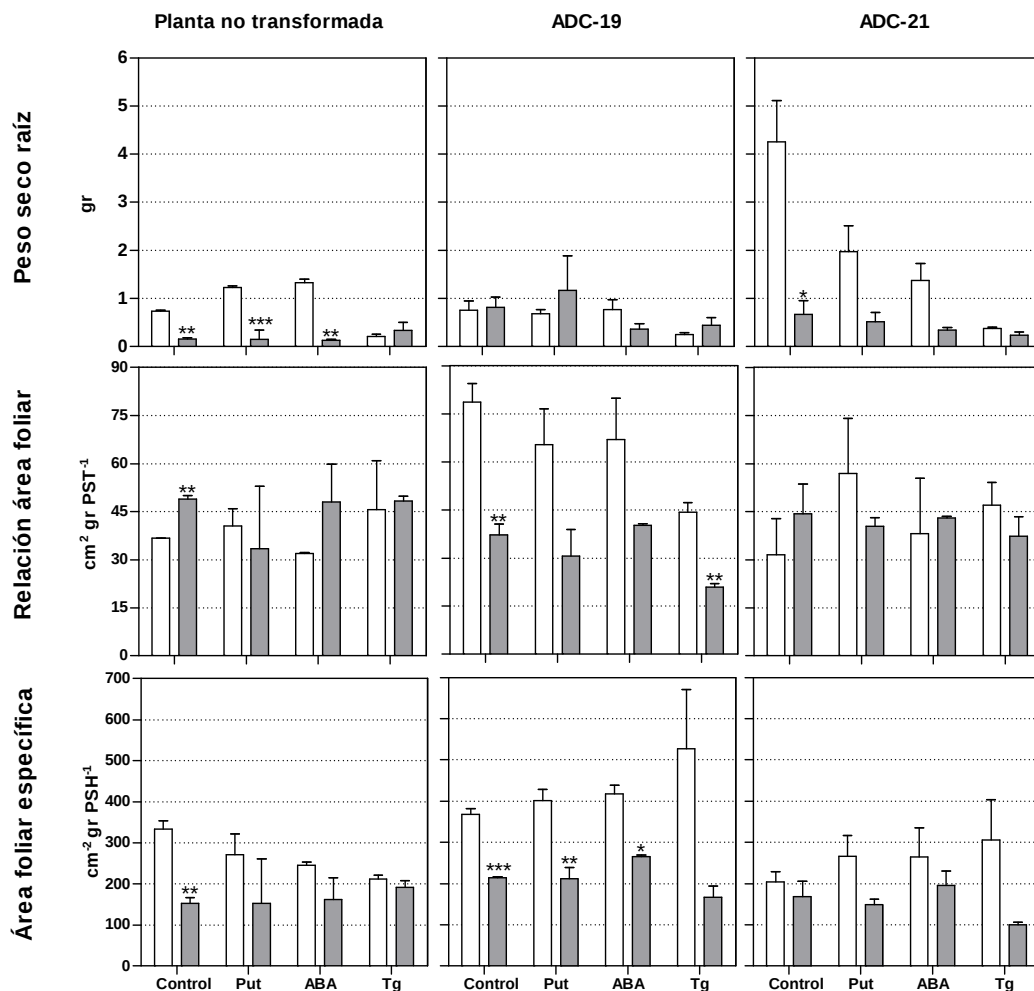


Fig. 3.7: Efecto de la aplicación de putrescina, ABA y tungstato sobre la partición de biomasa en plantas sujetas a estrés salino. Barras blancas y grises indican tratamientos control (sin estrés) y salinidad, respectivamente. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (Test de Student) respecto al tratamiento control. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0005$.

5. Conclusiones parciales del capítulo

- El promotor RD29A es capaz de dirigir la expresión del gen *gus* en tallos y hojas de plantas sujetas a condiciones de estrés osmótico impuestas ya sea por sequía, salinidad ó frío, no detectándose expresión en los tejidos radiculares.
- Las plantas transgénicas portadoras de la construcción pBi *RD29A::oatADC* expresan actividad de la enzima arginina descarboxilasa y presentan acumulación de putrescina libre inducible por estrés hídrico.
- Las plantas transgénicas *pRD29A::oatADC* (principalmente línea ADC-19), ante condiciones de déficit hídrico presentaron un mayor contenido relativo de agua en sus brotes respecto al genotipo salvaje, denotándose un elevado ajuste osmótico y modificación del destino de los fotoasimilados que favoreció el crecimiento de raíces en desmedro de la parte aérea.
- Las plantas transgénicas *pRD29A::oatADC* presentaron una mejor performance en condiciones de salinidad. Se observó un menor contenido de Na^+ en raíces concurrentemente con un incremento significativo del nivel de K^+ ; hecho por el cual, la relación $\text{Na}^+ : \text{K}^+$ en este órgano se mantuvo prácticamente invariable. El ion Na^+ se acumuló principalmente en hojas. Se observó una menor abscisión foliar, mayor brotación y mayor crecimiento radicular con respecto al genotipo salvaje.

ANEXO

a. Efectos de la aplicación foliar de putrescina (Put), ABA ó tungstato (Tg) sobre la distribución de fotoasimilados, relaciones hídricas, ajuste osmótico y contenido de clorofila de **plantas transgénicas RD29A: oatADC-19** sujetas a sequía.

Parámetro	Tratamiento control				Tratamiento de estrés hídrico			
	Línea 19	Línea 19 Put	Línea 19 ABA	Línea 19 Tg	Línea 19	Línea 19 Put	Línea 19 ABA	Línea 19 Tg
AF (cm ²)	274,1 ± 46,23	248,3 ± 43,05	222,9 ± 32,86	72,73 ± 3,88	160,1 ± 19,9	123,2 ± 8,65*	121,2 ± 5,25*	141,4 ± 6,8***
Área tallos (cm ²)	403 ± 81,96	412,9 ± 8,2	416,7 ± 69,7	182,9 ± 32,1	319,4 ± 33,17	274,0 ± 15,87	288,8 ± 29,11	272,9 ± 23,9
PS raíz (gr)	0,76 ± 0,191	0,68 ± 0,092	0,77 ± 0,21	0,25 ± 0,04	1,09 ± 0,14	0,62 ± 0,11	0,64 ± 0,08	0,97 ± 0,33
PS total (gr)	3,82 ± 0,88	3,87 ± 0,65	3,68 ± 0,99	1,65 ± 0,08	4,11 ± 0,2	3,11 ± 0,13	3,54 ± 0,51	4,33 ± 1,2
PS aéreo (gr)	3,06 ± 0,75	3,19 ± 0,71	2,92 ± 0,79	1,39 ± 0,06	3,02 ± 0,06	2,49 ± 0,10	2,89 ± 0,46	3,37 ± 0,95
Nro. de brotes por planta	29,7 ± 4,05	S/D	S/D	S/D	3,4 ± 1,4***	S/D	S/D	S/D
PS aéreo/PS raíz	4,15 ± 0,77	5,02 ± 1,44	3,99 ± 0,56	5,79 ± 1,05	2,63 ± 0,19*	4,24 ± 0,71	4,33 ± 0,67	3,76 ± 0,64
RAF (cm ² gr ⁻¹)	78,59 ± 5,86	65,34 ± 11,18	66,89 ± 12,91	44,31 ± 3,04	39,32 ± 5,71**	39,69 ± 2,77	35,18 ± 3,23	37,22 ± 7,95
AFE (cm ² gr hoja ⁻¹)	367,8 ± 14,01	401,5 ± 27,62	418 ± 20,3	526,9 ± 144,1	286,6 ± 21,77*	285,6 ± 27,66*	290,5 ± 28,24*	263,2 ± 28,64
Daño membrana (%)	4,93 ± 0,03	3,13 ± 0,68	2,22 ± 0,27	2,65 ± 0,15	1,7 ± 1,21	1,53 ± 0,54	2,55 ± 0,62	2,52 ± 0,2
CRA (%)	92,3 ± 3,08	92,46 ± 5,3	91,74 ± 1,01	88,92 ± 6,38	80,2 ± 6,5	72,96 ± 11,1	65,96 ± 2,53	65 ± 1,3
Clorofilas a+b (mg gr ⁻¹ PF)	1,47 ± 0,02	1,03 ± 0,011	1,76 ± 0,015	0,67 ± 0,003	1,33 ± 0,017	1,15 ± 0,015	1,13 ± 0,05***	0,78 ± 0,013
Prolina (μmol mg ⁻¹ PF)	0,28 ± 0,085	0,67 ± 0,03	0,31 ± 0,02	1,34 ± 0,51	16,33 ± 2,05***	11,61 ± 0,89**	9,6 ± 0,4***	9,37 ± 0,33**

Los valores son los promedios ± SEM de 5 repeticiones. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (Test de Student) respecto al tratamiento control sujeto a capacidad de campo. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0005$.

b. Efectos de la aplicación foliar de putrescina (Put), ABA ó tungstato (Tg) sobre la distribución de fotoasimilados, relaciones hídricas, ajuste osmótico y contenido de clorofila de **plantas transgénicas RD29A: oatADC-21** sujetas a sequía.

Parámetro	Tratamiento control				Tratamiento de estrés hídrico			
	Línea 21	Línea 21 Put	Línea 21 ABA	Línea 21 Tg	Línea 21	Línea 21 Put	Línea 21 ABA	Línea 21 Tg
AF (cm ²)	273,0 ± 33,41	178,7 ± 33	168,2 ± 47,07	94,7 ± 3,3	180,7 ± 38,5	209,2 ± 53,6	190,9 ± 35,25	107,7 ± 5,02
Área tallos (cm ²)	377,3 ± 55,1	254,3 ± 23,16	255,5 ± 40,04	217,2 ± 7,35	297,7 ± 55,13	321,1 ± 18,95	316,3 ± 22,5	172 ± 24,37
PS raíz (gr)	4,25 ± 0,87	1,97 ± 0,55	1,38 ± 0,34	0,37 ± 0,03	1,09 ± 0,14*	0,92 ± 0,03	0,76 ± 0,12	0,76 ± 0,16
PS total (gr)	8,46 ± 1,41	4,33 ± 2,04	9,67 ± 2,89	2,01 ± 0,37	4,3 ± 0,2*	4,72 ± 1,39	4,82 ± 0,41	3,38 ± 0,18*
PS aéreo (gr)	4,21 ± 1,34	2,36 ± 0,61	8,29 ± 5,45	1,64 ± 0,4	3,21 ± 0,06	3,79 ± 1,42	4,05 ± 0,29	2,62 ± 0,17
Nro. de brotes por planta	20,67 ± 4,48	S/D	S/D	S/D	5,67 ± 0,33*	S/D	S/D	S/D
PS aéreo/PS raíz	1,36 ± 0,77	3,25 ± 1,57	4,96 ± 2,23	4,55 ± 1,45	3,02 ± 0,34	4,17 ± 1,7	5,39 ± 0,45	3,92 ± 1,17
RAF (cm ² gr ⁻¹)	31,5 ± 11,3	56,93 ± 17,19	38,1 ± 17,3	47,07 ± 7,03	42,6 ± 9,64	44,89 ± 1,87	40,56 ± 10,8	31,95 ± 1,29
AFE (cm ² gr hoja ⁻¹)	203,9 ± 24,9	265,6 ± 51,22	264,4 ± 70,6	305,2 ± 98	242,9 ± 45,64	259,3 ± 131,8	221,6 ± 14,02	171,7 ± 4,29
Daño membrana (%)	1,89 ± 0,45	2,75 ± 1,05	2,12 ± 0,08	5,64 ± 0,81	1,25 ± 0,51	4,42 ± 1,68	1,42 ± 0,48	2,67 ± 0,82
CRA (%)	90,5 ± 0,7	93,07 ± 3,68	84,5 ± 1,68	85,25 ± 0,35	60 ± 4*	56 ± 0,387*	62,76 ± 1,5	71,61 ± 15,06
Clorofilas a+b (mg gr ⁻¹ PF)	1,017 ± 0,058	1,223 ± 0,009	0,91 ± 0,012	1,43 ± 0,051	1,59 ± 0,02***	1,17 ± 0,03	1,27 ± 0,027	0,86 ± 0,006***
Prolina (μmol mg ⁻¹ PF)	2,44 ± 0,37	0,94 ± 0,17	3,01 ± 0,13	5,16 ± 0,04	13,78 ± 0,78***	9 ± 0,92**	10,04 ± 0,2**	3,25 ± 0,05**

Los valores son los promedios ± SEM de 5 repeticiones. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (Test de Student) respecto al tratamiento control sujeto a capacidad de campo. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0005$.

c. Efectos de la aplicación foliar de putrescina (Put), ABA ó tungstato (Tg) sobre la distribución de fotoasimilados, relaciones hídricas, ajuste osmótico y contenido de clorofila de **plantas no transformadas** sujetas a sequía.

Parámetro	Tratamiento control				Tratamiento de estrés hídrico			
	Salvaje	Salvaje Put	salvaje ABA	Salvaje Tg	Salvaje	Salvaje Put	salvaje ABA	Salvaje Tg
AF (cm ²)	105,5 ± 11,25	105,3 ± 2,5	109,3 ± 16,25	90,97 ± 21,7	116,3 ± 14	142,9 ± 10,9	124 ± 19,95	57,5 ± 5
Área tallos (cm ²)	239,5 ± 21	144,3 ± 32,3	234,7 ± 15,8	115,7 ± 9,85	148,9 ± 9,21*	213 ± 11	186,7 ± 10,4	169,6 ± 8,94
PS raíz (gr)	0,73 ± 0,02	1,23 ± 0,03	1,33 ± 0,07	0,21 ± 0,05	0,46 ± 0,11	0,68 ± 0,16	0,58 ± 0,18	0,55 ± 0,16
PS total (gr)	2,87 ± 0,31	2,63 ± 0,24	2,79 ± 0,21	1,56 ± 0,65	2,61 ± 0,65	2,74 ± 0,35	2,34 ± 0,27	3,1 ± 0,24
PS aéreo (gr)	2,14 ± 0,29	1,4 ± 0,21	1,46 ± 0,13	1,36 ± 0,61	1,56 ± 0,15	2,15 ± 0,16	1,76 ± 0,09	2,55 ± 0,41
Nro. De brotes por planta	18,3 ± 1,2	S/D	S/D	S/D	2,3 ± 0,3**	S/D	S/D	S/D
PS aéreo/PS raíz	2,92 ± 0,31	1,12 ± 0,13	1,1 ± 0,04	6,27 ± 1,58	2,97 ± 0,7	3,25 ± 0,51	3,30 ± 0,88	5,72 ± 1,88
RAF (cm ² gr ⁻¹)	36,75 ± 0,05	40,51 ± 5,35	32,01 ± 0,27	45,57 ± 15,32	48,55 ± 9,23	52,47 ± 2,69	52,62 ± 2,43	28,54 ± 5,1
AFE (cm ² gr hoja ⁻¹)	333,8 ± 19,82	270,9 ± 51,5	245,7 ± 7,66	212,3 ± 9,28	401,4 ± 59,15	253,5 ± 25,6	309 ± 21,7	191,7 ± 20,8
Daño membrana (%)	4,05 ± 0,45	3,03 ± 0,67	4,93 ± 1,38	2,57 ± 0,11	1,6 ± 0,7	3 ± 0,6	2,95 ± 1,55	9,45 ± 2,65*
CRA (%)	89,75±1,2	93 ± 5	85,66 ± 0,66	93,44 ± 1,96	70,24 ± 4,55*	82,51 ± 3,67	73,07 ± 5,8	58,35 ± 3,76***
Clorofilas a+b (mg gr ⁻¹ PF)	0,97 ± 0,038	0,8 ± 0,006	0,83 ± 0,006	0,93 ± 0,003	1,28 ± 0,024***	1,16 ± 0,017***	1,34 ± 0,021***	0,95 ± 0,01
Prolina (μmol mg ⁻¹ PF)	2,53 ± 0,2	1,2 ± 0,48	1,48 ± 0,09	2,9 ± 0,13	13,2 ± 2,14**	9,34 ± 1,63**	9,52 ± 2,12*	5,44 ± 0,5*

Los valores son los promedios ± SEM de 5 repeticiones. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (Test de Student) respecto al tratamiento control sujeto a capacidad de campo. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0005$.

d. Efectos de la aplicación foliar de putrescina (Put), ABA ó tungstato (Tg) sobre la distribución de fotoasimilados, relaciones hídricas, ajuste osmótico y contenido de clorofila de **plantas transgénicas RD29A: oatADC-19** sujetas a salinidad.

Parámetro	Tratamiento control				Tratamiento de estrés salino			
	Línea 19	Línea 19 Put	Línea 19 ABA	Línea 19 Tg	Línea 19	Línea 19 Put	Línea 19 ABA	Línea 19 Tg
AF (cm ²)	274,1 ± 46,23	248,3 ± 43,05	222,9 ± 32,86	72,73 ± 3,88	110,7 ± 2,7**	92,57 ± 7.34***	109±14,85**	45,85±7,15***
Área tallos (cm ²)	403 ± 81,96	412,9 ± 8,2	416,7 ± 69,7	182,9 ± 32,1	207,2 ± 24,77	223,2 ± 24.1**	218,5 ± 19,2	155,7 ± 5,7
PS raíz (gr)	0,76 ± 0,191	0,68 ± 0,092	0,77 ± 0,21	0,25 ± 0,04	0,82 ± 0,21	1,17 ± 0.72	0,36 ± 0,11	0,44 ± 0,16
PS total (gr)	3,82 ± 0,88	3,87 ± 0,65	3,68 ± 0,99	1,65 ± 0,08	3,02 ± 0,24	3,39 ± 0.67	2,71 ± 0,34	2,22 ± 0,46
PS aéreo (gr)	3,06 ± 0,75	3,19 ± 0,71	2,92 ± 0,79	1,39 ± 0,06	2,21 ± 0,24	2,23 ± 0.49	2,34 ± 0,24	1,78 ± 0,3
Nro. de brotes por planta	29,7 ± 4,05	S/D	S/D	S/D	17,18 ± 5,89	S/D	S/D	S/D
PS aéreo/PS raíz	4,15 ± 0,77	5,02 ± 1,44	3,99 ± 0,56	5,79 ± 1,05	3,39 ± 1,38	3,94 ± 1.64	6,78 ± 1,29	4,38 ± 0,91
RAF (cm ² gr ⁻¹)	78,59 ± 5,86	65,34 ± 11,18	66,89 ± 12,91	44,31 ± 3,04	37,14 ± 3,43**	30,56 ± 8.36	40,23 ± 0,36	20,89 ± 1,1**
AFE (cm ² gr hoja ⁻¹)	367,8 ± 14,01	401,5 ± 27,62	418 ± 20,3	526,9 ± 144,1	214,4±1,63***	211,7 ± 26.91**	265,3 ± 3,87*	166,5 ± 27,02
Daño membrana (%)	4,93 ± 0,03	3,13 ± 0,68	2,22 ± 0,27	2,65 ± 0,15	1,6 ± 0,6*	2,8 ± 0.61	3 ± 1,01	7,08 ± 0,81*
CRA (%)	92,3 ± 3,08	92,46 ± 5,3	91,74 ± 1,01	88,92 ± 6,38	80,53 ± 11,78	84,15 ± 5,51	72,56 ± 1,95***	65,36 ± 2,65*
Clorofilas a+b (mg gr ⁻¹ PF)	1,47 ± 0,02	1,03 ± 0,011	1,76 ± 0,015	0,67 ± 0,003	1,16 ± 0,03**	0,93 ± 0.006***	1,58±0,006***	1,12±0,03**
Prolina (μmol mg ⁻¹ PF)	0,28 ± 0,085	0,67 ± 0,03	0,31 ± 0,02	1,34 ± 0,51	6,71±0,49***	7,58 ± 1.74*	11,94 ± 0,06***	8,57±0,47**

Los valores son los promedios ± SEM de 5 repeticiones. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (Test de Student) respecto al tratamiento control (sin estrés).

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0005$.

e. Efectos de la aplicación foliar de putrescina (Put), ABA ó tungstato (Tg) sobre la distribución de fotoasimilados, relaciones hídricas, ajuste osmótico y contenido de clorofila de **plantas transgénicas RD29A: oatADC-21** sujetas a salinidad.

Parámetro	Tratamiento control				Tratamiento de estrés salino			
	Línea 21	Línea 21 Put	Línea 21 ABA	Línea 21 Tg	Línea 21	Línea 21 Put	Línea 21 ABA	Línea 21 Tg
AF (cm ²)	273 ± 33,41	178,7 ± 32,99	168,2 ± 47,07	94,7 ± 3,3	103,4 ± 3,99**	106,1 ± 10,11	74,05 ± 6,7	65,65 ± 16,65
Área tallos (cm ²)	377,3 ± 55,1	254,3 ± 23,16	255,5 ± 40,04	217,2 ± 7,35	143,6 ± 6,81*	135,7 ± 14,51*	133,8 ± 6,325*	105,9 ± 12,9*
PS raíz (gr)	4,25 ± 0,87	1,97 ± 0,55	1,38 ± 0,34	0,37 ± 0,03	0,67 ± 0,28*	0,52 ± 0,19	0,34 ± 0,05	0,23 ± 0,07
PS total (gr)	8,46 ± 1,41	4,33 ± 2,04	9,67 ± 2,89	2,01 ± 0,37	2,63 ± 0,74*	2,66 ± 0,34	1,73 ± 0,17*	1,73 ± 0,17
PS aéreo (gr)	4,21 ± 1,34	2,36 ± 0,61	8,29 ± 5,45	1,64 ± 0,4	1,97 ± 0,48	2,14 ± 0,29	1,38 ± 0,12	1,5 ± 0,24
Nro. De brotes por planta	20,67 ± 4,48	S/D	S/D	S/D	3 ± 2,52*	S/D	S/D	S/D
PS aéreo/PS raíz	1,36 ± 0,77	3,25 ± 1,57	4,96 ± 2,23	4,55 ± 1,45	3,47 ± 0,86	5,12 ± 1,51	4,11 ± 0,23	7,92 ± 3,72
RAF (cm ² gr ⁻¹)	31,5 ± 11,3	56,93 ± 17,19	38,1 ± 17,3	47,07 ± 7,03	44,38 ± 9,31	40,42 ± 2,78	42,98 ± 0,475	37,42 ± 6,01
AFE (cm ² gr hoja ⁻¹)	203,9 ± 24,9	265,6 ± 51,22	264,4 ± 70,6	305,2 ± 98	168,2 ± 36,93	148,9 ± 13,03	195,5 ± 35,18	99,76 ± 6,77
Daño membrana (%)	1,89 ± 0,45	2,75 ± 1,05	2,12 ± 0,08	5,64 ± 0,81	2,12 ± 1,06	1,39 ± 0,08	2,16 ± 0,5	2,3 ± 0,17
CRA (%)	90,5 ± 0,7	93,07 ± 3,68	84,5 ± 1,68	85,25 ± 0,35	82,57 ± 3,88	81,33 ± 6,95	81,17 ± 5,17	76,19 ± 6,77
Clorofilas a+b (mg gr ⁻¹ PF)	1,017 ± 0,06	1,22 ± 0,009	0,91 ± 0,012	1,43 ± 0,051	0,43±0,003***	0,81±0,01	1,25±0,04	0,88±0,009***
Prolina (μmol mg ⁻¹ PF)	2,44 ± 0,37	0,94 ± 0,17	3,01 ± 0,13	5,16 ± 0,04	16,12±3,58***	7,85±0,66**	9,14 ± 0,64*	11,73 ± 1,23*

Los valores son los promedios ± SEM de 5 repeticiones. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (Test de Student) respecto al tratamiento control (sin estrés).

*, p<0.05; **, p<0.005; ***, p<0.0005.

f. Efectos de la aplicación foliar de putrescina (Put), ABA ó tungstato (Tg) sobre la distribución de fotoasimilados, relaciones hídricas, ajuste osmótico y contenido de clorofila de plantas no transformadas sujetas a salinidad.

Parámetro	Tratamiento de estrés salino				Tratamiento control			
	Salvaje	Salvaje Put	salvaje ABA	Salvaje Tg	Salvaje	Salvaje Put	salvaje ABA	Salvaje Tg
AF (cm ²)	105,5 ± 11,25	105,3 ± 2,5	109,3 ± 16,25	90,97 ± 21,7	61,4 ± 11,4	47,1 ± 8,4*	32,35 ± 10,65	70,55 ± 12,75
Área tallos (cm ²)	239,5 ± 21	144,3 ± 32,3	234,7 ± 15,8	115,7 ± 9,85	89,35 ± 19,85*	47,1 ± 8,4*	45,05 ± 4,85**	96,25 ± 13,55
PS raíz (gr)	0,73 ± 0,02	1,23 ± 0,03	1,33 ± 0,07	0,21 ± 0,05	0,16 ± 0,02**	0,15 ± 0,05***	0,125 ± 0,025***	0,33 ± 0,18
PS total (gr)	2,87 ± 0,31	2,63 ± 0,24	2,79 ± 0,21	1,56 ± 0,65	1,26 ± 0,26	0,93 ± 0,24	0,66 ± 0,06*	1,47 ± 0,31
PS aéreo (gr)	2,14 ± 0,29	1,4 ± 0,21	1,46 ± 0,13	1,36 ± 0,61	1,1 ± 0,28	0,79 ± 0,195	0,53 ± 0,035*	1,135 ± 0,125
Nro. De brotes por planta	18,3 ± 1,2	S/D	S/D	S/D	8,3 ± 3,7**	S/D	S/D	S/D
PS aéreo/PS raíz	2,92 ± 0,31	1,12 ± 0,13	1,1 ± 0,04	6,27 ± 1,58	7,23 ± 2,67*	5,4 ± 0,5*	4,4 ± 0,6*	4,57 ± 2,15
RAF (cm ² gr ⁻¹)	36,75 ± 0,05	40,51 ± 5,35	32,01 ± 0,27	45,57 ± 15,32	48,87 ± 1,13**	33,44 ± 19,5	47,95 ± 11,8	48,32 ± 1,5
AFE (cm ² gr hoja ⁻¹)	333,8 ± 19,82	270,9 ± 51,5	245,7 ± 7,66	212,3 ± 9,28	153,3 ± 13,3**	153,3 ± 107,4	161,8 ± 53,25	191,7 ± 16,55
Daño membrana (%)	4,05 ± 0,45	3,03 ± 0,67	4,93 ± 1,38	2,57 ± 0,11	2,35 ± 0,25	4,5 ± 1,6	7,75 ± 1,45	7,03 ± 2,05
CRA (%)	89,75 ± 1,2	93 ± 5	85,66 ± 0,66	93,44 ± 1,96	86,97 ± 8,13	65 ± 1*	67,05 ± 5,95	86,46 ± 4,16
Clorofilas a+b (mg gr ⁻¹ PF)	0,97 ± 0,038	0,8 ± 0,006	0,83 ± 0,006	0,93 ± 0,003	0,94 ± 0,007	0,64 ± 0,012**	0,85 ± 0,017	0,52 ± 0,003 ***
Prolina (μmol mg ⁻¹ PF)	2,53 ± 0,2	1,2 ± 0,48	1,48 ± 0,09	2,9 ± 0,13	9,17 ± 0,83*	11,06 ± 0,64**	8,25 ± 0,75*	6,62 ± 0,38

Los valores son los promedios ± SEM de 5 repeticiones. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (Test de Student) respecto al tratamiento control (sin estrés).
*, p<0.05; **, p<0.005; ***, p<0.0005.

g. Efectos de salinidad sobre el contenido de potasio, sodio y relación Na/K de plantas transgénicas RD29A: oatADC y no transformadas.

	Sin estrés			Estrés salino		
	Hojas	Tallos	Raíces	Hojas	Tallos	Raíces
Na⁺ (mg/gr⁻¹ PS)						
Genotipo salvaje						
sin aplicación exógena	3,01 ± 0,54	4,03 ± 1,12	8,1 ± 2,09	14,57 ± 1,51***	10,78 ± 1,01**	33,22 ± 5,99***
Put	3,07 ± 0,5	2,39 ± 0,01	1,69 ± 0,11	37,56 ± 4,52***	22,86 ± 2,55***	16,78 ± 1,06**
ABA	2,32 ± 1,13	3,73 ± 0,16	1,79 ± 0,19	7,58 ± 0,43	7,92 ± 0,02	5,45 ± 0,43
Tg	2,19 ± 0,19	2,44 ± 0,06	2,8 ± 0,02	13,23 ± 0,13*	12,76 ± 1,24*	26,07 ± 0,58**
ADC-19						
sin aplicación exógena	1,99 ± 0,39	2,71 ± 0,27	9,54 ± 1,59	19,66 ± 8,63*	18,41 ± 7,25*	24,93 ± 2,57***
Put	1,93 ± 0,23	2,19 ± 0,19	2 ± 0,02	16,95 ± 0,27***	12,27 ± 1,01**	24,61 ± 0,39***
ABA	2,79 ± 0,01	1,49 ± 0,3	2,46 ± 0,08	19,77 ± 0,08***	12,91 ± 0,18***	26,66 ± 0,88***
Tg	1,6 ± 0,015	1,66 ± 0,03	3,92 ± 0,04	33,77 ± 0,77***	18,04 ± 0,96***	26,53 ± 0,29***
ADC-21						
sin aplicación exógena	6,49 ± 2,1	5,68 ± 1,17	7,25 ± 1,12	13,13 ± 2,31	10,28 ± 2,67	21,17 ± 4,7*
Put	3,58 ± 0,01	1,69 ± 0,11	1,69 ± 0,11	29,33 ± 0,35***	21,92 ± 0,08**	17,54 ± 0,46
ABA	1,64 ± 0,05	2,44 ± 0,06	5,78 ± 0,22	42,04 ± 0,04***	23,71 ± 0,29**	21,63 ± 1,37*
Tg	6,76 ± 0,01	6,53 ± 0,55	20,53 ± 1,47	32,98 ± 0,02***	29,92 ± 0,58***	28,53 ± 0,21

Los valores son los promedios ± SEM de 5 repeticiones. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (Test de Student) respecto al tratamiento control (sin estrés).
*, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0005$.

	Sin estrés			Estrés salino		
	Hojas	Tallos	Raíces	Hojas	Tallos	Raíces
K⁺ (mg/gr⁻¹ PS)						
Genotipo salvaje						
sin aplicación exógena	38,12 ± 4,13	40 ± 5,69	17,54 ± 4,26	43,33 ± 4,25	34,09 ± 4,6	21,66 ± 1,91
Put	22,33 ± 3,27	42,08 ± 2,36	36,55 ± 0,75	83,35 ± 5,55***	32,71 ± 0,96	22,17 ± 1,92
ABA	43,04 ± 0,965	36,29 ± 1,36	22,86 ± 0,16	47,08 ± 1,82	51,23 ± 4,33	18,22 ± 0,7
Tg	72,22 ± 0,78	63,1 ± 2,77	24,8 ± 1,39	74,38 ± 7,38	47,37 ± 1,33	33,11 ± 1,69
ADC-19						
sin aplicación exógena	25,73 ± 3,01	38,24 ± 4,2	19,28 ± 2,89	29,02 ± 4,52	37,69 ± 4,44	41,80 ± 5,54*
Put	25,64 ± 0,27	25,46 ± 0,85	11,16 ± 0,84	23,02 ± 0,59	41,29 ± 0,58	32,77 ± 0,23*
ABA	44,56 ± 2,26	35,46 ± 1,34	20,82 ± 0,18	26,59 ± 0,4	44,15 ± 0,59	22,61 ± 0,39
Tg	36,34 ± 0,96	49,01 ± 1,32	19,82 ± 0,82	28,99 ± 0,38	37,81 ± 0,5	7,23 ± 2,47
ADC-21						
sin aplicación exógena	30,48 ± 4,19	36,58 ± 3,27	19,62 ± 3,54	31,34 ± 3,22	44,59 ± 3,63	31,31 ± 3,68
Put	53,43 ± 1,33	37,72 ± 0,38	16,56 ± 0,89	28,17 ± 0,39	44,72 ± 0,27	22,37 ± 3,33
ABA	28,93 ± 0,43	26,69 ± 1,09	21,28 ± 1,09	36,05 ± 0,5	34,86 ± 0,86	17,68 ± 1,02
Tg	46,01 ± 0,03	34,31 ± 0,66	44,22 ± 1,82	63,59 ± 3,09	52,95 ± 1,13	11,17 ± 0,74***

Los valores son los promedios ± SEM de 5 repeticiones. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (Test de Student) respecto al tratamiento control (sin estrés).
 *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0005$.

	Sin estrés			Estrés salino		
	Hojas	Tallos	Raíces	Hojas	Tallos	Raíces
Na⁺/K⁺						
Genotipo salvaje						
sin aplicación exógena	0,08 ± 0,01	0,12 ± 0,04	0,7 ± 0,27	0,33 ± 0,005**	0,35 ± 0,06	1,53 ± 0,25***
Put	0,14 ± 0,04	0,05 ± 0,003	0,04 ± 0,003	0,45 ± 0,02	0,7 ± 0,09*	0,76 ± 0,06
ABA	0,05 ± 0,02	0,1 ± 0,0005	0,08 ± 0,007	0,16 ± 0,002	0,15 ± 0,01	0,3 ± 0,01
Tg	0,03 ± 0,002	0,04 ± 0,0007	0,11 ± 0,007	0,18 ± 0,02*	0,27 ± 0,01**	0,79 ± 0,02
ADC-19						
sin aplicación exógena	0,07 ± 0,008	0,07 ± 0,004	0,5 ± 0,08	0,72 ± 0,31*	0,6 ± 0,26	0,63 ± 0,12
Put	0,07 ± 0,009	0,08 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,73 ± 0,03***	0,29 ± 0,02	0,75 ± 0,006
ABA	0,06 ± 0,003	0,04 ± 0,007	0,12 ± 0,003	0,74 ± 0,01***	0,29 ± 0,02	1,15 ± 0,06**
Tg	0,04 ± 0,001	0,34 ± 0,001	0,2 ± 0,006	1,16 ± 0,01***	0,47 ± 0,02	4,13 ± 1,45***
ADC-21						
sin aplicación exógena	0,2 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,42 ± 0,08	0,42 ± 0,07	0,25 ± 0,08	0,73 ± 0,22
Put	0,07 ± 0,001	0,05 ± 0,003	0,1 ± 0,01	1,04 ± 0,002***	0,49 ± 0,001***	0,79 ± 0,09*
ABA	0,05 ± 0,002	0,09 ± 0,006	0,26 ± 0,006	1,16 ± 0,01***	0,68 ± 0,02**	1,22 ± 0,007***
Tg	0,14 ± 0,0004	0,17 ± 0,005	0,47 ± 0,05	0,52 ± 0,02	0,58 ± 0,02	2,6 ± 0,2***

Los valores son los promedios ± SEM de 5 repeticiones. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (Test de Student) respecto al tratamiento control (sin estrés).
*, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0005$.

CAPÍTULO 4

Conclusiones y perspectivas futuras

A partir del desarrollo de un protocolo que permitió la modificación genética de *Lotus tenuis* y obtención de plantas transgénicas portadoras de la construcción pBi RD29A::oatADC, las cuales no presentaron diferencias fenotípicas respecto a sus pares no transformadas bajo condiciones óptimas de crecimiento, resultando fértiles y capaces de producir semillas, se constataron varias evidencias que soportan la hipótesis inicial.

La primera evidencia señala que el gen promotor RD29A es capaz de dirigir la expresión del gen *gus* en tallos y hojas de plantas sujetas a condiciones de estrés osmótico impuestas ya sea por sequía, salinidad ó frío. La segunda indica que las plantas transgénicas ADC expresan actividad de la enzima arginina descarboxilasa en situaciones osmóticas desfavorables y presentan acumulación de putrescina libre inducible por estrés hídrico. A la vez que la tercera evidencia, suscitada a partir del análisis funcional de la expresión génica, demuestra que como resultado de la mayor actividad enzimática ante condiciones de déficit hídrico, éstas presentan un mayor contenido relativo de agua en sus brotes respecto al genotipo salvaje, denotándose un elevado ajuste osmótico y modificación del destino de los fotoasimilados que favorece el crecimiento de raíces en desmedro de la parte aérea. Asimismo, las plantas ADC presentan una mejor performance en condiciones de salinidad, observándose un menor contenido de Na^+ en raíces (acumulándose principalmente en hojas) concurrentemente con un incremento significativo del nivel de K^+ ; hecho por el cual, la relación $\text{Na}^+ : \text{K}^+$ en este órgano se mantiene prácticamente invariable, contribuyendo a una menor abscisión foliar, mayor brotación y crecimiento radicular.

Teniendo en cuenta que los resultados del presente trabajo constituyen el punto de partida en la comprensión tanto de los procesos bioquímicos como fisiológicos de la modulación de poliaminas en la tolerancia a estreses osmótico, se prevé la continuidad de la línea de trabajo a través del estudio de la interacción de poliaminas y otras hormonas relacionadas con la defensa de la planta (*cross-talk*) y su relación con mensajeros secundarios como Ca^{2+} . Asimismo, se completará este estudio con un profundo análisis del papel que desempeñarían las poliaminas para mitigar los daños deletéreos causados por bajas temperaturas, el que se realizará en el marco de la beca

posdoctoral otorgada recientemente por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas con el asesoramiento de ambos Directores de Tesis.

BIBLIOGRAFÍA

- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schutteten H (2006). Integration of plant responses to environmentally activated fitohormonal signals. *Science* 311: 91-94.
- Agrawal PK, Kohli A, Twyman RM, Christou P (2005). Transformation of plants with multiple cassettes generates simple transgenes integration patterns and high expression levels. *Molecular Breeding* 16: 247-260.
- Aguirrezábal L, Bouchier-Combaud S, Radziejwoski A, Dauzat M, Cookson SJ, Granier G (2006). Plasticity to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana*: dissection of leaf development into underlying growth dynamic and cellular variables reveals invisible phenotypes. *Plant, Cell and Environment* 29:2216–2227.
- Aida R, Hirose Y, Kishimoto S, Shibata M (1999). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Science* 148: 1-7.
- Alcázar R, García-Martínez JL, Cuevas JC, Tiburcio AF, Altabella T (2005). Overexpression of ADC2 in *Arabidopsis* induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. *The Plant Journal* 43:425-436.
- Alcázar R, Planas J, Saxena T, Zarza X, Bortolotti C, Cuevas JC, Bitrián M, Tiburcio AF, Altabella T (2010). Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants over-expressing the homologous *arginine decarboxylase 2* gene. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:547-552.
- Alet Analía I (2008). Evaluación del rol de las poliaminas en la señalización del estrés abiótico en vegetales. *Tesis doctoral*.
- Alet AI, Chaves A, Fracaroli V, Sánchez D, Ruíz OA, Maiale S (2008). Transformación vegetal con genes de la biosíntesis de poliaminas regulados por un promotor inducible por estrés. Su potencial aplicación biotecnológica a variedades nacionales de arroz. *Revista Colombiana Biotecnológica* 10: 135-138.
- Alet AI, Sanchez D, Cuevas J, Del Valle S, Altabella T, Tiburcio A, Marco F, Ferrando A, Espasandin F, González M, Carrasco P, Ruiz O (2011). Putrescine accumulation in *Arabidopsis thaliana* transgenic lines enhances tolerance to dehydration and freezing stress. *Plant Signaling and Behavior* 6: 1-9.
- Allison LE, Brown JW, Hayward HE, Richards LA, Bernstein L, Fireman M, Pearson GA, Wilcox LV, Bower CA, Hatcher JT, Reeve RC (1970). En L.A. Richards

- (ed). *Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos*. Departamento de Agricultura de los EUA. 172 págs.
- Aoki T, Kamizawa A, Ayabe S (2002). Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lotus japonicus* with reliable antibiotic selection. *Plant Cell Report* 21:238–243.
- Apse M, Blumwald E (2007). Na⁺ transport in plants. *FEBS Letters* 581: 2247–2254.
- Armstead I, Webb W (1987). Effect of age and type of tissue on genetic transformation of *Lotus corniculatus* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 9: 95-101.
- Arnon DI (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24:1-15.
- Ashraf M, Athar HR, Harrsi PJC, Kwon TR (2008). Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Advances in agronomy* 97: 45-110.
- Bagni N, Tassoni A (2001). Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20: 301-317.
- Baker N (2008). Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis *in vivo*. *Annual Review of Plant Biology* 59: 89–113.
- Bassie L, Noury M, Lepri O, Lahaye T, Christou P, Capell T (2000). Promoter strength influences polyamine metabolism and morphogenic capacity in transgenic rice tissues expressing the oat *adc* cDNA constitutively. *Transgenic Research* 9:33-42.
- Bassie L, Zhu C, Romagnosa I, Christou P, Capell T (2008). Transgenic wheat plants expressing an oat arginine decarboxylase cDNA exhibit increases in polyamine content in vegetative tissue and seeds. *Molecular Breeding* 22:39-50.
- Beck Erwin H, Fettig S, Knake C, Hartig K, Bhattarai T (2007). Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal Bioscience* 32: 501-510.
- Bell LW, Williams AH, Ryan MH, Ewing MA (2007). Water relations and adaptations to increasing water deficit in three perennial legumes, *Medicago sativa*, *Dorycnium hirsutum* and *Dorycnium rectum*. *Plant Soil* 290:231–243.
- Bellucci M, Lazzari B, Viotti A, Arcioni S (1998). Differential expression of a γ -zein gene in *Medicago sativa*, *Lotus corniculatus* and *Nicotiana tabacum*. *Plant Science* 127:161-169.

- Belluci M, Alpini A, Arcioni S (2000). Expression of maize γ -zein and β -zein genes in transgenic *Nicotiana tabacum* and *Lotus corniculatus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62: 141-151.
- Bhatnagar P, Glasheen BM, Bains SK, Long SL, Minocha R, Walter C, Minocha SC (2001). Transgenic manipulation of the metabolism of polyamines in poplar cells. *Plant Physiology* 125: 2139–2153.
- Birch RG (1997). Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:297–326.
- Black CA (1975). Relaciones suelo-planta. Tomo I. Editorial Hemisferio Sur. 444 págs.
- Blaha G, Stelzl U, Spahn CMT, Agrawal RK, Frank J, Nierhaus KH (2000). Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Methods in Enzimology* 317: 292-309.
- Blum A (2005) Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential- are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agriculture Research* 56: 1159-1168.
- Blumwald E, Aharon G, Apse M (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochimica and Biophysica Acta* 1465: 140-151.
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* 140: 103-125.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Anal Biochemistry* 72: 248-254.
- Bray EA (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2: 48-54.
- Bray EA (2007). Molecular and physiological responses to water deficit stress. In: M.A. Jenks et al. (eds.). *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops* 121-140.
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000). Responses to abiotic stress. In: B. Buchanan, W Gruissem, R Jones (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Maryland, USA. 1158-1201.
- Burtin D, Michael A (1997). Overexpression of arginine decarboxylase in transgenic plants. *Biochemistry Journal* 325:331-337.

- Busk K, Pages M (1998). Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Molecular Biology* 37:425-435.
- Busó Sáez E (2005). Efectos de la sobreexpresión de S-Adenosil-Lmetionina descarboxilasa 1 en la respuesta a estrés en *Arabidopsis*. *Tesis doctoral*.
- Capell T, Escobar C, Liu H, Burtin D, Lepri O, Christou P (1998). Over-expression of the oat arginine decarboxylase cDNA in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) affects normal development patterns in vitro and results in putrescine accumulation in transgenic plants. *Theoretical and Applied Genetics* 97:246-254.
- Capell T, Bassie L, Christou P (2004). Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Plant Biology* 101: 9909-9914.
- Carol E, Kruse E, Mas-Pla J (2009). Hydrochemical and isotopical evidence of ground water salinization processes on the coastal plain of Samborombón Bay, Argentina. *Journal of Hydrology*. 365: 335–345.
- Carron TR, Robbins MP, Morris P (1994). Genetic modifications of condensed tannin biosynthesis in *Lotus corniculatus*. Heterologous antisense dihydroflavonol reductase down-regulates tannin accumulation in “hairy roots” cultures. *Theoretical and Applied Genetics* 87:1006-1015.
- Caviglia OP, Melchori RJM, Paparotti OF (1998). Conductividad eléctrica del extracto de saturación estimada a partir de relaciones fijas de suelo:agua. *Artículo de divulgación, INTA EEA Paraná, Entre Ríos*.
- Chattopadhyay MK, Tiwari BS, Chattopadhyay G, Bose A, Sengupta D, Ghosh B (2002). Protective rol of exogenous polyamines on salinity-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* 116: 192-199.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003). Understanding plant responses to droguht from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239-264.
- Chiesa M, Ruiz O, Sánchez D (2004). Lotus hairy roots expressing inducible arginine decarboxylase activity. *Biotechnology Letters* 26:729–733.
- Childs AC, Mehta DJ, Gerner EW (2003). Polyamine-dependent gene expresión. *Cellular and Molecular Life Science* 60: 1394–1406.
- Collins N, Tardieu F, Tuberosa R (2008). QTL approaches for improving crop performance under abiotic stress conditions: Where do we stand? *Plant Physiology* 147: 469-486.

- Comstok J (2002). Hydraulic and chemical signaling in the control of stomatal conductance and transpiration. *Journal of Experimental Botany* 53: 195-200.
- Cona A, Cenci F, Cervelli M, Federico R, Mariottini P, Moreno S, Angelini R (2003). Polyamine oxidase, a hydrogen peroxide-producing enzyme, is up-regulated by light and down-regulated by auxin in the outer tissues of the maize mesocotyl. *Plant Physiology* 131: 803-813.
- Cubbit AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochemistry Science* 20:448-455.
- Cuevas JC, Lopez-Cobollo R, Alcázar R, Zarza X, Koncz C, Altabella T, Salinas J, Tiburcio AF, Ferrando A (2008). Putrescine is involved in Arabidopsis freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant physiology* 148:1094-1105.
- Dafny-Yelin M, Tzfira T (2007). Delivery of multiple transgenes to plant cells. *Plant Physiology* 145: 1118-1128.
- Damiani F, Nenz E, Paolocci F, Arcioni S (1993). Introduction of hygromycin resistance in *Lotus* spp. through *Agrobacterium rhizogenes* transformation. *Transgenic Research* 2:330-335.
- Damiani F, Paolocci F, Arcioni S (2008). Genetic transformation of *Lotus* species. In: Kirti P (ed). *Handbook of new technologies for genetic improvement of legumes*. The Haworth Press 301-315.
- Danilova SA (2007). The technologies for genetic transformation of cereals. *Russian Journal of Plant Physiology* 54: 569-581.
- Davies WJ, Kudoyarova G, Hartung W (2005). Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of plant's response to drought. *Journal of Plant Growth Regulation* 24: 285-295.
- Del Viso F, Puebla AF, Carrillo N, Chan R (2010). Obtención de plantas tolerantes a distintos tipos de estreses abióticos. En: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L (eds.). *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. Capítulo XII. Buenos Aires, Argentina, 170-183.
- Demming-Adams B, Adams WW (1996). The role of xanthophylls cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1: 21-26.

- Díaz ML, Zappacosta DC, Franzone PM, Ríos RD (2004). Transformación genética. En: *Echenique V, Rubinstein C y Mroginski L. (eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Parte III Capítulo 3. Buenos Aires, Argentina, 15 págs.
- Díaz P, Borsani O, Monza J (2005). *Lotus*-related species and their agronomic importance. In: *A.J Marquez (ed.) Lotus japonicus Handbook* 25-37.
- Drew MC, Guenther J, Läuchli A (1988). The combined effects of salinity and root anoxia on growth and net Na⁺ and K⁺ accumulation in *Zea mays* grown in solution culture. *Annals of Botany* 61: 41-43.
- Duan JJ, Li J, Guo SR, Kang YY (2008). Exogenous spermidine affects polyamine metabolism in salinity-stressed *Cucumis sativus* roots and enhances short-term salinity tolerance. *Journal of Plant Physiology* 165:1620-35.
- Duque AS, Sousa Araujo S, Cordeiro MA, Santos DM, Fevereiro MP (2007). Use of fused *gfp* and *gus* reporters for the recovery of transformed *Medicago truncatula* somatic embryos without selective pressure. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90: 325-330.
- FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations (2005). *Global Network on Integrated Soil Management for Sustainable Use of Salt-affected Soils*. Rome, Italy: FAO Land and Plant Nutrition Management Service. ftp://ftp.fao.org/agl/agll/docs/salinity_brochure_eng.pdf.
- FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations (2006). www.fao.org/ag/agl/agll/spush/topic/htm.
- FAO Food and Agriculture Organisation of the United Nations (2009). www.fao.org/askfao/topicsList.do?mainAreaId=20263.
- Finer JJ, Finer KR, Ponappa T (1999). Particle bombardment mediated transformation. *Current topics in Microbiology and Immunology Plant Biotechnology. Products and applications* 240: 59-80.
- Fitter Alastair H, Hay Robert KM (2002). *Environmental Physiology of Plants*. 3^o Edición. Academic Press. London, California, Tokyo 397 págs.
- Flowers JA (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 55: 307-319.
- Forde BG, Day HM, Turtin JF, Wen-jun S, Cullimore JV, Oliver JE (1989). Two glutamine synthase genes in *Phaseolus vulgaris* L. display with contrasting developmental and spatial patterns of expression in transgenic *Lotus corniculatus* plants. *Plant Cell* 1:391-401.

- Forero C, Salvarrieta JR (2002). Poliaminas: reguladores del crecimiento con múltiples efectos en plantas. *Palmas* 23: 39- 46.
- Forrest KL, Bhawe M (2007). Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype. *Functional and Integrative Genomics* 7:263–289.
- Fricke W, Peters W (2002). The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. *Plant Physiology* 129: 374-388.
- Fricke W, Akhiyarova G, Veselov D, Kudoyarova G (2004). Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate response to salinity in barley leaves. *Journal of Experimental Botany* 55: 1115-1123.
- Fuad-Hassan A, Tardieu F, Turc O (2008). Drought-induced changes in anthesis-silking interval are related to silk expansion: a spatio-temporal growth analysis in maize plants subjected to soil water deficit. *Plant, Cell and Environment* 31: 1349–1360.
- Gao SQ, Chen M, Xu ZS, Zhao CP, Li L, Xu H, Tang Y, Zhao X, Ma Y (2011). The soybean GmbZIP1 transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 75: 537–553.
- Garriz A, Dalmasso MC, Marina M, Rivas EI, Ruiz OA, Pieckenstein FL (2004). Polyamine metabolism during the germination of *Sclerotinia sclerotiorum* ascospores and its relation with host infection. *New Phytology* 161: 847–854.
- Gelvin SB (2000). *Agrobacterium* and plants genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51:223-56.
- Gelvin SB (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “Gene-Jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67:16-37.
- Gill SS, Tuteja N (2010a). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Gill SS, Tuteja N (2010b). Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling and Behavior* 5: 26-33.
- Gómez M, Echenique V (2004). Herramientas básicas de ingeniería genética. En: *Echenique V, Rubinstein C y Mroginski L. (eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Parte II Capítulo 3. Buenos Aires, Argentina, 17 págs*

- González A, Cristóbal C (1997). Anatomía y ontogenia de semillas de *Helicteres lhotzkyana* (Sterculiaceae). *Bomplandia* 9:287–294.
- Gribble K, Sarafis V, Conroy J (2003). Vitrified plants: towards an understanding of their nature. *Phytomorphology* 53:1–10.
- Guang-li W, Mao-zhi T, Zhong-ping L (1994). Genetic transformation of *Lotus corniculatus* with 10 kD zein Gene. *Acta Botanica Sinica* 36:03.
- Handberg K, Stougaard J (1992). *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant Journal* 2:487-496.
- Hao YJ, Kitashiba H, Honda C, Nada K, Moriguchi T (2005). Expression of arginine decarboxylase and ornithine decarboxylase genes in apple cells and stressed shoots. *Journal of Experimental Botany* 56:1105–1115.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Plant Molecular Biology* 51:463-499.
- Heckmann AN, Lombardo F, Miwa H, Perry JA, Bunnewell S, Parniske M, Wang TL, Downie JA (2006). *Lotus japonicus* nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume. *Plant Physiology* 142:1739–1750.
- Helenius E, Boije M, Niklander-Teeri V, Palva, Teeri TH (2000). Gene delivery into intact plants using the helios™ gene gun. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 287a-287l.
- Higuchi K, Tani M, Nakanishi H, Yoshiwara T, Goto F, Nishizawa NK, Mori S (2001). The expression of a barley HvNAS1 nicotianamine synthase gene in transgenic tobacco is induced by Fe-deficiency in roots. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 65:1692-1696.
- Hu Y, Burues Z, Von Tucher S, Schmidhalter U (2007). Short-term effects of drought and salinity on mineral nutrient distribution along growing leaves of maize seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 60: 268-275.
- Humara JM, López M, Ordás RJ (1999). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformations of *Pinus pinea* L. cotyledons: an assessment of factors influencing the efficiency of *uidA* gene transfer. *Plant Cell Report* 19:51-58.
- Hummel I, Bourdais G, Gouesbet G, Couée I, Malmberg RL, Amrani AE (2004). Differential gene expression of *arginine decarboxylase ADC1* and *ADC2* in *Arabidopsis thaliana*: characterization of transcriptional regulation during seed germination and seedling development. *New Phytologist* 163: 519–531.

- Hussain A, Peng J (2003). DELLA proteins and GA signaling in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Growth Regulation* 22: 134-140.
- Ishitani M, Xiong L, Stevenson B, Zhu JK (1997). Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: Interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *The Plant Cell* 9: 1935-1949.
- Jewell MC, Campbell BC, Godwin ID (2010). Transgenic plants for abiotic stress resistance. In Kole C, Michler C, Abbott AG, Hall TC (eds). *Transgenic Crop Plants*, 67–132.
- Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D (1986). β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 83: 8447-8451.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987). GUS fusions: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6:3901-3907.
- Jha D, Shirley N, Tester M, Roy J (2010). Variation in salinity tolerance and shoot sodium accumulation in *Arabidopsis* ecotypes linked to differences in the natural expression levels of transporters involved in sodium transport. *Plant, Cell and Environment*. 33: 793–804.
- Jian B, Hou W, Wu C, Liu B, Liu W, Song S, Bi Y, Han T (2009). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Superroot*-derived *Lotus corniculatus* plants: a valuable tool for functional genomics. *BMC Plant Biology* 9:78-92.
- Jobbágy EG, Nosetto MD, Santoni CS, Baldi G (2008). El desafío ecohidrológico de las transiciones entre sistemas leñosos y herbáceos en la llanura Chaco-Pampeana. *Ecología Austral. Asociación Argentina de Ecología, Sección especial* 18: 305-322
- Jones HG (2007). Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58: 119-130.
- Junge Hur, Ki-Hong Jung, Choon-Hwan Lee, Gynheung A (2004). Stress-inducible *OsP5CS2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Science* 16: 417–426.
- Kade M, Pagani E, Mendoza R (2003). A morphological study of populations of *Lotus glaber* Mill. (Fabaceae). *Agronomie* 23:203-207.

- Kaiser WM (1987). Effect of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum* 71: 142-149.
- Kamada-Nobusada T, Hayashi M, Fukazawa M, Sakakibara H, Nishimura M (2008). A putative peroxisomal polyamine oxidase, AtPAO4, is involved in polyamine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 49: 1272–1282.
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology* 17:287-291.
- Kim KN, Cheong YW, Grant JJ, Pandey GK, Luan S (2003). *CIPK3*, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 15: 411–423.
- Kobayashi F, Maeta E, Terashima A, Kawaura K, Ogihara Y, Takumi S (2008). Development of abiotic stress tolerance via bZIP-type transcription factor LIP19 in common wheat. *Journal of Experimental Botany* 59: 891–905.
- Koc NC, Kayim M, Yetisir H, Sari N, Unlu Yuceer S, Arici SE (2007). The improvement of resistance to bacterial speck in transgenic tomato plants by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Russian Journal of Plant Physiology* 54: 89-96.
- Koncz C, Landridge WHR, Olsson O, Schell J, Szallay AA (1989). Bacterial and firefly luciferase genes in transgenic plants: advantages and disadvantages of a reporter gene. *Developmental Genetics* 11:224-232.
- Krausz E, Graw J (1996). A new *cat* reporter gene vector designed for rapid and efficient cloning of PCR products. *Gene* 177: 99-102.
- Kronzucker HJ, Britos DT (2011). Sodium transport in plants: a critical review. *New Phytologist* 189: 54–81.
- Kumagai H, Kouchi H (2003). Gene silencing by expression of hairpin RNA in *Lotus japonicus* roots and root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:663-688.
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 228:367–381.
- Kuznetsov VV, Shevyakova NI (2007). Polyamines and stress tolerance of plants. *Plant Stress* 1:50-71.

- Kuznetsov V, Rakitin VY, Sadomov NG, Dam DV, Stetsenko LA, Shevyakova NI (2002). Do polyamines participate in the long-distance translocation of stress signals in plants? *Russian Journal of Plant Physiology* 49:120-130.
- Kuznetsov VV, Radyukina NL, Shevyakova NI (2006). Polyamines and stress: biological role, metabolism, and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology* 53: 583–604.
- Lacorte C, Aragao FJL, Almeida ER, Mansur E, Rech EL (1997). Transient expression of GUS and the 2S albumin gene from Brazil nut in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed explants using particle bombardment. *Plant Cell Reports* 16:619-623.
- Langridge P, Paltridge N, Fincher G (2006). Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 4: 343-353.
- Läuchli A, Grattan SR (2007). Plant growth and development under salinity stress. In: *Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SM (eds.). Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Springer, The Netherlands 1–32.
- Lavado RS, Taboada MA (2009). Los problemas de salinización globales y específicos de la Pampa Húmeda. *Conferencia dictada en el 1º Congreso de la Red Argentina de Salinidad*. Organizado por Dra. Taleisnik E, en Córdoba, capital. Del 11 al 13 de marzo del 2009.
- Lawlor DW, Cornic G (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment* 25:275-294.
- Legocka J, Kluk A (2005). Effect of salt and osmotic stress on changes in polyamine content and arginine decarboxylase activity in *Lupinus luteus* seedlings. *Journal of Plant Physiology* 162: 662—668.
- Leung J, Giraudat J (1998). Absciscic acid signal transduction. *Plant Molecular Biology* 49: 199-222.
- Levitt J (1980). Chilling, freezing and high temperature stress. Responses of Plants to Environmental Stress. Volume 1. London, New York, Toronto. *Academic Press*. 497 págs.
- Li Z, Wakao S, Fischer B, Niyogi K (2009). Sensing and responding to excess light. *Annual Review of Plant Biology* 60: 239–60.

- Liu JH, Moriguchi T (2007). Changes in free polyamine titers and expression of polyamine biosynthetic genes during growth of peach *in vitro* callus. *Plant Cell Report* 26:125–131.
- Liu JH, Nada K, Honda C, Kitashiba H, Wen XP, Pang XM, Moriguchi T (2006). Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: importance of the arginine decarboxylase pathway in stress response. *Journal of Experimental Botany* 57:2589-2599.
- Liu JH, Nada K, Pang XM, Honda C, Kitashiba H, Moriguchi T (2006a). Role of polyamines in peach fruit development and storage. *Tree Physiology* 26:791–798.
- Lohar D, Schuller K, Buzas D, Gresshoff P, Stiller J (2001). Transformation of *Lotus japonicus* using the herbicide resistance *bar* gene as a selectable marker. *Journal Experimental Botany* 52:1697-1702.
- Lombardi P, Ercolano E, El Alaoui H, Chiurazzi M (2003). A new transformation-regeneration procedure in the model legume *Lotus japonicus*: root explants as a source of large numbers of cell susceptible to *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Report* 21: 771-777.
- Lombardi P, Ercolano E, Alaoui HE, Chiurazzi M (2005). *Agrobacterium*-mediated in vitro transformation. In: A.J Marquez (ed.) *Lotus japonicus Handbook* 251-259.
- Lu ZM, Cheng JW, Percy RG, Zeiger E (1997). Photosynthetic rate, stomatal conductance and leaf area in two cotton species (*Gossypium barbadense* y *Gossypium hirsutum*) and their relation with heat resistance and yield. *Australian Journal of Plant Physiology* 24: 693-700.
- Lundqvist A (1993). The self-incompatibility system in *Lotus tenuis* (Fabaceae). *Hereditas* 119:59-66.
- Maas EV, Hoffman GJ (1977). Crop salt tolerance— current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division. ASCE.* 103: 115-134.
- Magné C, Larher F (1992). High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Analytical Biochemistry* 200: 115-118.
- Maiale S, Sanchez DH, Guirado A, Vidal A, Ruiz OA (2004). Spermine accumulation under salt stress. *Journal Plant Physiology* 161:35-42.

- Mäkelä P, Munns R, Colmer TD, Peltonen-Sainio P (2003). Growth of tomato and its ABA-deficient mutant (*sitiens*) under saline conditions. *Physiologia Plantarum* 117: 58-63.
- Marina M, Maiale S, Rossi FR, Rivas EI, Gárriz A, Ruiz OA, Pieckenstain FL (2008). Apoplastic polyamine oxidation plays different roles in local responses of tobacco to infection by the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and the biotrophic bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiology* 147: 2164-2178.
- Martínez Pastur G, Arena ME, Benavides MP, Eliasco E, Curvetto N (2007). Role of polyamines during in vitro rhizogenesis of *Nothofagus nervosa* using successive culture media. *New Forests* 34:83–93.
- Masgrau C, Altabella T, Farras R, Flores D, Thompson AJ, Besford RT, Tiburcio AF (1997). Inducible overexpression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. *Plant Journal* 11:465–473.
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment* 33: 453–467.
- Mittler R (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11: 15-19.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490–498.
- Moller SG, McPherson MJ (1998). Developmental expression and biochemical analysis of the *Arabidopsis atao1* gene encoding an H₂O₂-generating diamine oxidase. *Plant Journal* 13: 781-791.
- Moschou P, Paschalidis K, Delis I, Andriopoulou A, Lagiotis G, Yakoumakis D, Roubelakis-Angelakis K (2008). Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that direct tolerance responses in tobacco. *The Plant Cell* 20: 1708–1724.
- Munns R (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell and Environment* 16: 15-24.
- Munns R (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 239-250.
- Munns R (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* 167: 645-663.

- Munns R, Termaat A (1986). Whole plant response to salinity. *Australian Journal of Plant Physiology* 13: 143-160.
- Munns R y Tester M (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Plant Biology* 59: 651-81.
- Munns R, Guo J, Passioura JB, Cramer GR (2000). Leaf water status controls day-time but not daily rates of leaf expansion in salt-treated barley. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 949-957.
- Munns R, James RA, Läuchli A (2006). Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany* 57: 1025-1043.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497.
- Nakashima K, Fujita Y, Katsura K, Maruyama K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006). Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including RD29B and RD29A in seeds, germinating embryos, and seedlings of Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 60:51-68.
- Nandakumar R, Chen L, Roger SMD (2004). Factors affecting the *Agrobacterium*-mediated transient transformation of the wetland monocot, *Typha latifolia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 31-38.
- Nelson N, Yocum CF (2006). Structure and function of photosystems I and II. *Annual Review of Plant Biology* 57:521-65.
- Nenz E, Pupilli F, Paolocci F, Damián F, Cenci C, Arcioni S (1996). Plant regeneration and genetic transformation of *Lotus angustissimus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45:145-152.
- Nieva Boza C (2003). Aislamiento y caracterización funcional de dos factores de transcripción bZIP de maíz. *Tesis doctoral*.
- Nikolic R, Mitic N, Ninkovic S, Miljus-Djukic J, Neskovic M (2004). Efficient genetic transformation of *Lotus corniculatus* L. and growth of transformed plants in field. *Biologia Plantarum* 47:137-140.
- Nikolic R, Mitic N, Ninkovic S, Neskovic M (2007). Efficient genetic transformation of *Lotus corniculatus* L. using a direct shoot regeneration protocol, stepwise hygromycin B selection, and a super-binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Archives of Biological Sciences Belgrade* 59: 311-317.
- Nobel P (2009). Physicochemical and environmental plant physiology. 4ta. Edición. Elsevier, Canada. 582 págs.

- Noury M, Bassie L, Lepri O, Kurek I, Christou P, Capell T (2000). A transgenic rice cell lineage expressing the oat arginine decarboxylase (*adc*) cDNA constitutively accumulates putrescine in callus and seeds but not in vegetative tissues. *Plant Molecular Biology* 43:537-544.
- Page AF, Mohapatra S, Minocha R, Minocha SC (2007). The effects of genetic manipulation of putrescine biosynthesis on transcription and activities of the other polyamine biosynthetic enzymes. *Physiologia Plantarum* 129: 707-724.
- Palavan-Unsal N (1995). Stress and polyamine metabolism. *Bulgarian Journal Plant Physiology* 21:3-14.
- Panicot M, Masgrau C, Borrell A, Cordeiro A, Fernández Tiburcio A, Altabella T (2002). Effects of putrescine accumulation in tobacco transgenic plants with different expression levels of oat arginine decarboxylase. *Physiologia Plantarum* 114:281-287.
- Pardo J (2010). Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Current Opinion in Biotechnology* 21: 185-196.
- Passioura J (2007). The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. *Journal of Experimental Botany* 58: 113-117.
- Passioura J, Munns R (2000). Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 941-948.
- Pastenes C, Pimentel P, Lillo J (2004). Leaf movements and photoinhibition in relation to water stress in field-grown beans. *Journal of Experimental Botany* 56:425-433.
- Peremarti A, Bassie L, Christou P, Capell T (2009). Spermine facilitates recovery from drought but does not confer drought tolerance in transgenic rice plants expressing *Datura stramonium* S-adenosylmethionine decarboxylase. *Plant Molecular Biology* 70: 253-264.
- Pesqueira J (2008). Cambios bioquímicos, morfológicos y ecofisiológicos en plantas del género *Lotus* bajo estrés salino. *Tesis doctoral*.
- Peters NR, Ackerman S, Davis EA (1999). A modular vector for *Agrobacterium* mediated transformation of wheat. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 323–331.
- Petit JR, Jouzel J, Raynaud D, Barkov NI, Barnola JM, Basile I, Bender M, CHappelaz J, Davis M, Delaygue G, Delmotte M, Kotlyakov VM, Legrand M, Lypenkov

- VY, Lorius C, Pepin L, Ritz C, Saltman E, Stievenard M (1999). Climate and atmospheric history from the past 420,000 years from the Vostok ice core Antarctic. *Nature* 399: 429-436.
- Petri C, López-Noguera S, Albuquerque N, Egea J, Burgos L (2008). An antibiotic-based selection strategy to regenerate transformed plants from apricot leaves with high efficiency. *Plant Science* 175:777-783.
- Pulawska J, Willems A, Sobiczewski P (2006). Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR. *Systematic and Applied Microbiology* 29:470–479.
- Rajendran K, Tester M, Roy SJ (2009). Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant, Cell and Environment* 32: 237–249.
- Reece R (2004). Analysis of genes and genomes. In: *Jhon Wiley and Sons Inc.* USA. 469 págs.
- Renying Z, Guirong Q, Zongxiu S (2007). Transgene expression in Chinese sweetgum driven by the salt induced expressed promoter. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88:101–107.
- Robbins MP, Carron TR, Morris P (1992). Transgenic *Lotus corniculatus*: A model system for the modification and genetic manipulations of condensed tannin biosynthesis. In *Hemingway and P.E. Laks (eds.). Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance* 111-133.
- Rodríguez-Navarro A, Rubio F (2006). High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany* 57: 1149–1160.
- Rorat T (2006). Pant dehydrins – tissue location, structure and function. *Cellular and Molecular Biology Letter* 11: 536 – 556.
- Roy M, Wu R (2001). Arginine decarboxylase transgene expression and analysis of environmental stress tolerance in transgenic rice. *Plant Science* 160: 869-875.
- Roy SD, Saxena M, Bhomkar PS, Pooggin M, Hohn T, Bhalla-Sarin N (2008). Generation of marker free salt tolerant transgenic plants of *Arabidopsis thaliana* using the *gly I* gene and *cre* gene under inducible promoters. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95:1–11.
- Ruelland E, Vaultier MN, Zachowski A, Hurry V (2009). Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in Botanical Research* 49: 35-150.

- Sage RF, Way DA, Kubien DS (2008). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Journal of Experimental Botany* 59: 1581–1595.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 2° Edition. New York*, 1659 págs.
- Sanford JC (1988). The biolistic process. *Trends in Biotechnology* 6:299-302.
- Santa-Cruz A, Acosta M, Pérez-Alfocea F, Bolarin MC (1997). Changes in free polyamine levels induced by salt stress in leaves of cultivated and wild tomato species. *Physiology Plant* 101: 341-346.
- Schauser L, Handberg K, Sandal N, Stiller J, Thykjaer T, Pajuelo E, Nielsen A, Stougaard J (1998). Symbiotic plant mutants identified after T-DNA transformation of *Lotus japonicus*. *Molecular and General Genetics* 259:414-423.
- Shoeb F, Yadav JS, Bajaj S, Rajam MV (2001). Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. *Plant Science* 160: 1229-1235.
- Schroeder J, Allien G, Hugouvieux Kwak J, Waner D (2001). Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 627-658.
- Schulze ED, Beck E, Müller-Hohenstein K (2002). Plant Ecology. In: *Springer*, Germany, 692 págs.
- Schwanz P, Polle A (2001). Differential stress responses of antioxidants systems to drought in pedunculate oak (*Quercus robur*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high CO₂ concentrations. *Journal of Experimental Botany* 52: 133-143.
- Seki M, Narusaka M, Kamiya A (2002). Functional analysis of a full length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science* 296: 141-145.
- Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K (2007). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 296–302.
- Serres R, McCown B, Zeldin E (1997). Detectable β -glucuronidase activity in transgenic cranberry is affected by endogenous inhibitors and plant development. *Plant Cell Reports* 16: 641–646.

- Shi H (2007). Integration of Ca^{2+} in plant drought and salt stress signal transduction pathways. In: Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SM (eds.). *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt tolerant Crops*. Springer, The Netherlands. 141-182.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58: 221–227.
- Shoeb F, Yadav JS, Bajaj S, Rajam MV (2001). Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. *Plant Science* 160: 1229-1235.
- Shrawat AK, Becker D, Lorz H (2007). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science* 172: 281–290.
- Singla-Pareek S, Pareek A, Sopory S (2007). Transgenic plans for dry and saline environments. In: Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SM (eds.). *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Springer, The Netherlands 501-530.
- Slocum RD (1991). Tissue and subcellular localization of polyamines and enzymes of polyamine metabolism. In Slocum RD, Flores HE (CRC Press, Boca Raton. eds.). *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants* 93-103.
- Slocum RD (2005). Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 729-745.
- Spangenberg G, Meier M, Echenique V (2010). Mejoramiento de Plantas Forrajeras en la Era Genómica. En Levitus G, Echenique V, Hopp E, Rubinstein C, Mroginski L (eds.). *Biotechnology y Mejoramiento Vegetal II. Ejemplos y aplicaciones de la biotecnología vegetal. Parte V. Capítulo 2*. Buenos Aires, Argentina, 389-402.
- Stiller J, Martirani L, Tupale S, Chian R-J, Chiurazzi M, Gresshoff P (1997). High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal Experimental Botany* 48:1357-1365.
- Stomp AM (1992). Histochemical detection of GUS. In: Gallagher SR (ed.). *GUS protocols*. Academic Press Inc. 103-113.
- Stougaard, J., K.A. Marcker, L. Otten, and J. Schell (1986). Nodule-specific expression of chimeric soybean leghaemoglobin gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Nature* 321:669-674.

- Suzuki N, Mittler R (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* 126: 45–51.
- Taboada MA, Lavado RS (2009). El problema de la salinización de suelos en la Argentina. Diferenciación y aptitud de uso de los suelos salino-sódicos. *Conferencia dictada en el 1º Congreso de la Red Argentina de Salinidad*. Organizado por Dra. Taleisnik E, en Córdoba, capital. Del 11 al 13 de marzo del 2009.
- Taboada MA, Damiano F, Lavado RS (2009). Inundaciones en la región pampeana. Consecuencias sobre los suelos. Alteraciones de la fertilidad de los suelos. El halomorfismo, la acidez, el hidromorfismo y las inundaciones. Facultad Agronomía, UBA. Buenos Aires. Argentina 5:103-127.
- Taiz L, Zeiger E (2003). Plant physiology. 3^o edition. In: *Sinauer Associates Inc.* USA. 690 págs.
- Taleisnik E, Rodriguez AA, Bustos D, Erdei L, Ortega L, Senn ME (2009). Leaf expansion in grasses under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 166:1123-1140.
- Tanguy JM (2001). Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation* 34: 135–148.
- Taylor SH, Ripley BS, Woodward FI, Osborne CP (2011). Drought limitation of photosynthesis differs between C3 and C4 grass species in a comparative experiment. *Plan, Cell and Environment* 34: 65–75.
- Tester M, Davenport R (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91:503-527.
- Thomashow MF (1999). Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Plant Molecular Biology* 50:571-599.
- Thykjaer T, Stiller J, Handberg K, Jones J, Stougaard J (1995). The maize transposable element *Ac* is active in the legume *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology* 27:981-993.
- Tirichine L, Herrera Cedrera JA, Stougaard J (2005). Transformation-regeneration procedure for *Lotus japonicus*. In: *A.J Marquez (ed.) Lotus japonicus Handbook* 279-284.

- Tojo T, Tsuda K, Wada TS, Yamazaki K (2006). A simple and extremely sensitive system for detecting estrogenic activity using transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64:106-114.
- Tuteja N, Sopory S (2008). Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. *Plant Signaling and Behavior* 3: 525-536.
- Turchetti V, Ragano Caracciolo M, Tosti N, Paolocci F, Damiani F (2001). Sn transgenic plants of *Lotus corniculatus* are utilized for isolating genes involved in the biosynthetic pathway of condensed tannins. *Animal Production and Health Division* 261-264.
- Tzfira T, Citovsky V (2006). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 17:147–154.
- Uemura M, Joseph RA, Steponkus PL (1995). Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. *Plant Physiology* 109: 15-30.
- Uemura T, Kashiwagi K, Igarashi K (2005). Uptake of putrescine and spermidine by Gap1p on the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328: 1028-1033.
- Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006). Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Current Opinion in Biotechnology* 17:113–122.
- Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T, Igarashi T, Seki M, Sekiguchi F, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2003). Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant Cell Environmental* 26: 1917-1926.
- Verma G, Sharma S (2010). Role of H₂O₂ and cell wall monoamine oxidases in germination of *Vigna radiata* seeds. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 47:249-253.
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal* 45: 523–539.
- Vignolio OR, Fernández ON (2006). Bioecología de *Lotus glaber* Mill. (Fabaceae) en la Pampa Deprimida (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Revista Argentina de Producción Animal* 26:113-130.

- Voisisn A, Reidy B, Parent B, Rolland G, Redondo E (2006). Are ABA, ethylene or their interaction involved in the response of leaf growth to soil water deficit? An analysis using naturally occurring variation or genetic transformation of ABA production in maize. *Plant, Cell and Environment* 29: 1829-1840.
- Votyakova TV, Wallace HM, Dunbar B, Wilson SB (1999). The covalent attachment of polyamines to proteins in plant mitochondria. *European Journal Biochemistry* 260: 250-257.
- Walden R, Cordeiro A, Tiburcio AF (1997). Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiology* 113: 1009-1013.
- Walker DJ, Romero P, Hoyos A, Correal E (2008). Seasonal changes in cold tolerance, water relations and accumulation of cations and compatible solutes in *Atriplex halimus* L. *Environmental and Experimental Botany* 64: 217–224.
- Walters DR (2003). Polyamines and plant diseases. *Phytochemistry* 64: 97-107.
- Wang X, Zhang W, Li W, Mishra G (2007). Phospholipid signaling in plant response to drought and salt stress. In: Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SM (eds.). *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt tolerant Crops*. Springer, The Netherlands 183-192.
- Wang J, Sun P, Chen C, Wang Y, Fu X, Liu JH (2011). An arginine decarboxylase gene PtADC from *Poncirus trifoliata* confers abiotic stress tolerance and promotes primary root growth in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 62: 2899-2914.
- Webb K, Watson E (1991). *Lotus corniculatus* L.: morphological and cytological analysis of regenerants from three sources of tissue and selected progeny. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25:27–33.
- Webb Jk, Humphreys MO, Skot L, Gibbs M, Gatehouse J (1999). Inheritance and expression of transgenes in T2 and T3 generations of *Lotus corniculatus* transformed using *Agrobacterium tumefaciens*. *Euphytica* 108: 169–179.
- Wilkinson S, Davies J (2002). ABA-based chemical signaling: the coordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell and Environment* 25: 195-210.
- Wu YL, Chen Y, Liang XM, Wang XZ (2006). An experimental assessment of the factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation in tomato. *Russian Journal of Plant Physiology* 53: 252-256.
- Xiong L, Zhu JK (2001). Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiologia Plantarum* 112: 152-166.

- Xiong L, Ishitani M (2006). Stress signal transduction: components, pathways and network integration. In *Ashwani K. Rai and Teruhiro Takabe (eds.) Abiotic Stress Tolerance in Plants*. Springer, The Netherlands 3-29.
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell* 5:165–S183.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994). A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low temperature or high salt stress. *The plant cell* 6:251-264.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* 57: 781-803.
- Yamamoto T, Iketani H, Ieki H, Nishizawa Y, Notsuka K, Hibi T, Hayashi T, Matsuta N (2000). Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhance resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Report* 19:639–646.
- Yao X, Horie T, Xue S, Leung H-Y, Katsuhara M, Brodsky D, Wu Y, Schroeder J (2010). Differential sodium and potassium transport selectivities of the rice OsHKT2;1 and OsHKT2;2 transporters in plant cells. *Plant Physiology* 152: 341–355.
- Yin Z, Plader W, Malepszy S (2004). Transgene inheritance in plants. *Journal of Applied Genetic* 45:127-144.
- Yu Z, Chen M, Nie L, Lu H, Ming X, Zheng H, Qu LJ, Chen Z (1999). Recovery of transgenic orchid plants with hygromycin selection by particle bombardment to protocorms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 87–92.
- Zeid IM (2009). Effect of arginine and urea on polyamines content and growth of bean under salinity stress. *Acta Physiologia Plantarum* 31:65–70.
- Zhang H, Kim MS, Sun Y, Dowd SE, Shi H, Paré PW (2008). Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter *HKT1*. *The American Phytopathological Society* 21: 737–744.
- Zhao H, Yang H (2008). Exogenous polyamines alleviate the lipid peroxidation induced by cadmium chloride stress in *Malus hupehensis* Rehd. *Scientia Horticulturae* 116: 442-7.
- Zhou F, Sosa J, Feldmann KA (2007). High throughput approaches for the identification of SALT tolerance genes in plants. In: *M.A. Jenks et al. (eds.). Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops* 359-379.

Zhu JK (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Plant Biology* 53: 247-273.

Zhu J, Chen Z (2005). Role of polyamines in adventitious shoot morphogenesis from cotyledons of cucumber in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81:45–53.