

Tesis Doctoral:

La senescencia foliar como factor de  
resistencia a la sequía en la soja  
(*Glycine max L. Merr.*).

Tesista: Lic. Virginia Martha Cristina Luquez.

Director de Tesis: Ing. Edgardo Montaldi.

Co- director: Dr Juan José Guiamét.

## Agradecimientos

# A mis padres Alberto y Martha, y a mis hermanas Sonia y Gabriela, por su aliento y apoyo durante todo este tiempo de trabajo.

# Al Dr Juan J. Guiamét, por su invaluable aporte en la discusión de ideas y sus sugerencias sobre el desarrollo del trabajo y la redacción de este manuscrito.

# Al Ing. Edgardo Montaldi, por sus sugerencias sobre la redacción de este manuscrito.

# Al Lic. Eduardo Tambussi y al Dr Carlos Bártoli, por sus aportes en la discusión de ideas.

# A todo el personal del INFIVE que ha colaborado de diversas maneras con el desarrollo de este trabajo, y especialmente a la Prof. Olga Peluso y la Sra Laura Wahnán por su asistencia técnica.

# A la Dra Ana Arambarri, por facilitar el equipo para tomar las imágenes de la epidermis de *Impatiens holstii*.

# Al Dr José Luis Araus por sus sugerencias en la preparación del material para microscopio electrónico de barrido.

## RESUMEN.

El objetivo general de esta tesis fue determinar el papel de la senescencia foliar en la tolerancia de las plantas superiores al déficit hídrico. La aproximación experimental consistió en comparar la respuesta a la sequía de líneas casi isogénicas de soja que senescen normalmente (genotipo silvestre, *ggD1D1D2D2*) o con mutaciones que provocan un fenotipo *stay green* (genotipo *GGd1d1d2d2*). La combinación al estado homocigota de los genes *G* (dominante) y *d1* y *d2* (recesivos) provoca la inhibición de un amplio espectro del síndrome de senescencia foliar, manteniendo la integridad del cloroplasto cuando en el genotipo silvestre se han degradado la mayor parte de los componentes del estroma y la membrana tilacoidal. Sin embargo, se comprobó que la combinación al estado homocigota recesivo de los genes *d1* y *d2* también provoca una mayor sensibilidad a la sequía. Ante una situación de estrés hídrico, las hojas del mutante *d1d1d2d2* (con o sin *G*) experimentan una deshidratación irreversible a niveles de estrés mucho menores que los necesarios para causar el mismo fenómeno en el genotipo silvestre. La deshidratación comienza en los bordes de la hoja y luego se extiende hacia el resto de la lámina, primero en las hojas basales y luego progresa hacia las apicales. La deshidratación de las hojas de *GGd1d1d2d2* ocurre tanto en plántulas como en plantas al estado reproductivo sometidas a sequía. Un fenómeno similar se observa en plantas con adecuado suministro hídrico al final del ciclo vital. En el genotipo silvestre, en cambio, las hojas abscinden al final del ciclo con un alto grado de hidratación.

Se efectuaron varios experimentos con el objetivo de caracterizar cuantitativamente la respuesta a la sequía del genotipo silvestre (cv. Clark) y del mutante *stay green GGd1d1d2d2*, a través de la medición de indicadores del estado hídrico de las hojas. El contenido relativo de agua (CRA) y el potencial agua de las hojas del mutante sometidas a un período de estrés hídrico declinaron más rápidamente que en el genotipo silvestre. Sin embargo, la conductancia estomática

disminuyó en forma semejante en las plantas de *GGd1d1d2d2* y del genotipo silvestre. Tampoco hubo diferencias en el potencial soluto en el estado de hidratación máxima de hojas de plántulas de Clark y *GGd1d1d2d2* sometidas previamente a sequía. Estas observaciones indican que la mayor sensibilidad a la sequía en *GGd1d1d2d2* no se debe a diferencias en la capacidad para el ajuste osmótico o cierre estomático.

La deshidratación de las hojas del mutante podría explicarse por una obstrucción permanente del xilema que impidiera el flujo de agua durante la sequía y luego de reasumidas las condiciones de adecuado suministro hídrico. Para probar esta hipótesis, se realizaron experimentos donde se midieron el CRA, el contenido porcentual de agua y el potencial agua de plántulas de Clark y *GGd1d1d2d2* sometidas a sequía y luego rehidratadas. En estos experimentos se encontró que los indicadores del estado hídrico se recuperan en pocas horas a niveles semejantes en las hojas de Clark y en las de *GGd1d1d2d2* que se han deshidratado parcialmente. De estos experimentos se puede deducir que la deshidratación de las hojas de *GGd1d1d2d2* no se debe a que una obstrucción permanente del xilema impida el flujo de agua.

La aplicación exógena de ácido abscísico causó una marcada reducción de la conductancia estomática tanto en el genotipo silvestre como en *GGd1d1d2d2*. Sin embargo, la aplicación exógena de ácido abscísico no evita la deshidratación de las hojas de *GGd1d1d2d2*, ni revierte el fenotipo *stay green* del mutante. De estos experimentos se puede concluir que la mayor sensibilidad de *GGd1d1d2d2* a la sequía probablemente no está relacionada con alteraciones en la percepción, sensibilidad o biosíntesis del ácido abscísico.

Dado que no se encontraron diferencias en la respuesta de la conductancia estomática de Clark y *GGd1d1d2d2* frente al estrés hídrico, se examinó la pérdida de agua del mutante a través de la cutícula, midiendo la pérdida de agua de hojas mantenidas en la oscuridad y a elevada concentración de CO<sub>2</sub>, situación en la cual

los estomas están cerrados. Debido a que las hojas de soja son anfiestomáticas y es imposible descartar totalmente la pérdida de agua a través de los estomas, la pérdida de agua en oscuridad y a alta concentración de CO<sub>2</sub> se menciona aquí como transpiración superficial mínima en lugar de transpiración cuticular, reservando este último término para las superficies foliares desprovistas de estomas. La transpiración superficial mínima (Tsm) disminuyó durante la sequía en las plantas del genotipo silvestre. En *GGd1d1d2d2* la disminución de la Tsm durante el tratamiento de estrés fue mucho menor. Es posible que la mayor Tsm en *GGd1d1d2d2* sea debida a alteraciones en la deposición de ceras epicuticulares. Pero observaciones con el microscopio electrónico de barrido no mostraron diferencias en la morfología de las ceras epicuticulares entre el mutante y el genotipo silvestre.

Para comprobar cuál (o cuales) de las mutaciones que causan el fenotipo *stay green* determinan la mayor sensibilidad a la sequía del mutante, se realizaron experimentos utilizando líneas casi isogénicas con diferentes combinaciones de los genes *G*, *d1* y *d2*. Las plantas de todas las isolíneas fueron sometidas a sequía y se midió su contenido relativo de agua. Se encontró que las isolíneas que portaban los genes *d1* y *d2* al estado homocigota recesivo, al ser sometidas a estrés hídrico, experimentan la deshidratación irreversible de sus hojas. De estos experimentos se puede concluir que los genes causantes de la mayor sensibilidad a la sequía del mutante son *d1* y *d2* combinados.

Además de los efectos sobre la tolerancia al estrés, las mutaciones que causan el fenotipo *stay green* también tienen efectos pleiotrópicos sobre el rendimiento en semillas en condiciones naturales. En estas condiciones el rendimiento fue menor en *GGd1d1d2d2* que en el genotipo silvestre. Experimentos previos mostraron que el rendimiento de plantas cultivadas en cámaras de crecimiento era mayor en *GGd1d1d2d2*, debido probablemente a que el mutante prolonga su actividad fotosintética porque mantiene la integridad del cloroplasto. La actividad fotosintética no resulta prolongada en *GGd1d1d2d2* en condiciones naturales, probablemente

debido a que el mutante experimenta estrés hídrico en condiciones naturales aún con adecuada disponibilidad hídrica. Esto no sucede en cámaras de crecimiento donde las condiciones de humedad, temperatura e irradiancia son menos extremas que a la intemperie durante la estación normal de crecimiento de la soja.

El resultado mas importante hallado en esta tesis es que la combinación de genes que causan el fenotipo *stay green* en soja provocan también una mayor sensibilidad a la sequía. Esta vinculación entre la senescencia y la tolerancia a la sequía no ha sido encontrada en otros mutantes *stay green*. Los datos obtenidos sugieren que los genes *d1* y *d2* se encuentran en un punto de una cadena de transducción de señales donde convergen la senescencia foliar y algunas respuestas al estrés hídrico. En esta tesis se realizó una extensa caracterización fisiológica del comportamiento del mutante *GGd1d1d2d2* ante la sequía. Queda pendiente determinar cuáles genes de resistencia a la sequía son controlados por *G*, *d1* y *d2* como un primer paso del camino que conduzca a dilucidar la interrelación genética entre la senescencia foliar y las respuestas de las plantas al estrés hídrico.

## INDICE GENERAL.

|   |     |
|---|-----|
| 1) Capítulo 1: Introducción General.....  | 1   |
| 2) Capítulo 2: La senescencia foliar y su influencia en la tolerancia a la sequía y la recuperación luego de un episodio de estrés hídrico..... | 26  |
| 3) Capítulo 3. Caracterización de la respuesta del mutante <i>GGd1d1d2d2</i> a la sequía y posterior rehidratación.....                         | 45  |
| 4) Capítulo 4: Regulación de la apertura estomática en el mutante <i>GGd1d1d2d2</i> por el estrés hídrico y el ácido abscísico.....             | 68  |
| 5) Capítulo 5: Interrelación entre la senescencia foliar y la transpiración cuticular.....  | 80  |
| 6) Capítulo 6: Identificación de las mutaciones determinantes de la susceptibilidad al estrés hídrico en el mutante <i>GGd1d1d2d2</i> .....     | 100 |
| 7) Capítulo 7: Influencia de la sensibilidad al estrés hídrico del mutante <i>GGd1d1d2d2</i> sobre el rendimiento y sus componentes.....        | 106 |
| 8) Capítulo 8: Discusión General y conclusiones.....  | 115 |
| Referencias.....  | 123 |

## INDICE DE TABLAS.

|               |     |
|---------------|-----|
| Tabla 1.....  | 35  |
| Tabla 2.....  | 36  |
| Tabla 3.....  | 37  |
| Tabla 4.....  | 43  |
| Tabla 5.....  | 52  |
| Tabla 6.....  | 58  |
| Tabla 7.....  | 59  |
| Tabla 8.....  | 60  |
| Tabla 9.....  | 61  |
| Tabla 10..... | 62  |
| Tabla 11..... | 63  |
| Tabla 12..... | 64  |
| Tabla 13..... | 77  |
| Tabla 14..... | 78  |
| Tabla 15..... | 89  |
| Tabla 16..... | 92  |
| Tabla 17..... | 104 |
| Tabla 18..... | 105 |
| Tabla 19..... | 110 |
| Tabla 20..... | 111 |
| Tabla 21..... | 112 |
| Tabla 22..... | 113 |



## INDICE DE FIGURAS.

|                |                   |
|----------------|-------------------|
| Figura 1.....  | 31                |
| Figura 2.....  | 38                |
| Figura 3.....  | 39                |
| Figura 4.....  | 41                |
| Figura 5.....  | 42                |
| Figura 6.....  | 53 – 54 - 55      |
| Figura 7.....  | 56                |
| Figura 8.....  | 57                |
| Figura 9.....  | 73                |
| Figura 10..... | 75                |
| Figura 11..... | 76                |
| Figura 12..... | 88                |
| Figura 13..... | 90                |
| Figura 14..... | 91                |
| Figura 15..... | 93                |
| Figura 16..... | 94 – 95 – 96 - 97 |

## CAPITULO 1

### Introducción General.

## 1.1) GENERALIDADES.

De todos los factores abióticos que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas, la disponibilidad de agua es el más importante en la determinación del área de distribución de las especies y la productividad de los ecosistemas terrestres y, por consiguiente, es la principal limitante del rendimiento de los cultivos (Hsiao 1973; Tardieu 1996; Nilsen y Orcutt 1996). Aún en regiones húmedas pueden ocurrir episodios temporarios de sequía que limitan el rendimiento. La mayor parte de las especies de importancia económica son mesófitas, y experimentan una serie de alteraciones fisiológicas y bioquímicas ante una situación de sequía. Estos cambios se pueden producir en períodos de tiempo que varían entre minutos y horas (v.g., pérdida de turgencia, cierre estomático), semanas (alteración de la expansión foliar, aceleración de la senescencia y abscisión foliar) hasta meses (disminución del rendimiento), (Tardieu 1996).

La senescencia foliar ha sido extensamente caracterizada en plantas con adecuada disponibilidad hídrica (Noodén 1988 a). Es bien conocido que el estrés hídrico acelera la senescencia (Begg 1980; Noodén 1988 a; Tardieu 1996). Sin embargo, el rol adaptativo de este proceso ante una situación de estrés, así como los mecanismos que lo desencadenan, aún no han sido completamente aclarados. Se ha postulado que la senescencia y la abscisión foliar son mecanismos de resistencia a la sequía, ya que la disminución del área foliar causado por ambos procesos reduce el flujo de agua a través de la planta, contribuyendo a evitar una declinación rápida del potencial agua y la turgencia en las hojas remanentes (Begg 1980, Tardieu 1996). La aceleración de la senescencia foliar permite, además, la redistribución hacia las semillas de prácticamente todo el nitrógeno y parte del carbono y nutrientes minerales previamente almacenados en las hojas (Tardieu 1996). Desde este punto de vista, la aceleración de la senescencia puede verse como un mecanismo adaptativo, que al disminuir el área foliar disminuye la transpiración y permite que los nutrientes se redistribuyan hacia los órganos en

crecimiento (Tardieu 1996).

Sin embargo, si el estrés se produce durante el llenado de las semillas, el efecto combinado de la senescencia monocárpica inducida por el fruto (Noodén y Guiamét 1989) y la aceleración de la senescencia inducida por la sequía, puede reducir en forma dramática el área foliar fotosintetizante (Tardieu 1996). Esto ocurre en el caso de la soja, donde el estrés hídrico acelera la senescencia foliar y este hecho es sólo parcialmente revertido por la poda de frutos (De Souza et al 1997). La duración del área foliar fotosintetizante está fuertemente correlacionada con el rendimiento, y cuando dicha área es reducida por la sequía, el rendimiento disminuye. Esto ocurre en el caso de la soja (De Souza et al 1997), del maíz (Aparicio Tejo y Boyer 1983, Wolfe et al 1988 a, Wolfe et al 1988 b), y del caupí (*Vigna unguiculata* (L) Walp.; Gwathmey et al 1992 a). Se puede especular que en los genotipos en los cuales la senescencia foliar fuera retrasada o inhibida durante la sequía, la reducción del área foliar fotosintetizante sería menor que en aquellos con senescencia normal, ya que dicha reducción se debería solamente a la menor expansión foliar (Begg 1980, Tardieu 1996). Al retener una mayor proporción de hojas fotosintéticamente activas, la disminución del rendimiento sería menor en genotipos con senescencia foliar retrasada. En el caupí, un genotipo con senescencia foliar retrasada produce un mayor rendimiento en condiciones de buena disponibilidad hídrica en relación a otro genotipo con tasa de senescencia normal (Gwathmey et al 1992 a y 1992 b). Ese mismo genotipo con senescencia retrasada al ser sometido a estrés hídrico durante el llenado y vuelto a regar, mantiene una mayor área foliar, mayor eficiencia del uso del agua y una mejor recuperación del estado hídrico al volver a regar que el genotipo con senescencia normal, aunque no hay diferencias en el rendimiento final en semillas (Gwathmey y Hall 1992).

Estos resultados indican que la interrelación entre senescencia y sequía es compleja, lo cual no es sorprendente, ya que de por sí son complejos cada uno de

ellos, sujetos a diversos factores de control (genéticos, hormonales y ambientales). A continuación, se realizará una revisión de dichos fenómenos, y se enunciarán los objetivos de esta tesis.

## 1.2) SENESCENCIA FOLIAR.

### 1.2.1) Definición.

Se define a la *senescencia* como el conjunto de cambios degenerativos *endógenos*, controlados genéticamente, que son la causa natural de la muerte en células, tejidos, órganos u organismos. Por lo tanto, es el evento final (y normal) del desarrollo (Noodén 1988 a). El término *senescencia* no es sinónimo de envejecimiento, ya que el concepto de *envejecimiento* (aging) se refiere a los procesos degenerativos provocados por factores *exógenos* y, por lo tanto, no controlados, que no necesariamente conducen a la muerte, aunque incrementan su probabilidad (Noodén 1988 a). El amarillamiento de las hojas de árboles caducifolios en otoño y la muerte post-reproductiva de plantas monocárpicas son casos de *senescencia*. La pérdida de viabilidad de las semillas almacenadas es un caso de envejecimiento (Noodén 1988 a).

A nivel de organismos, se puede diferenciar la *senescencia* en las plantas monocárpicas (llamada simplemente *senescencia monocárpica*) del proceso que ocurre en las plantas policárpicas (Noodén 1988 b). En el caso de la *senescencia monocárpica*, la muerte del individuo se produce luego de un único ciclo reproductivo, lo que no ocurre con las plantas policárpicas que experimentan varios ciclos reproductivos antes de morir (Noodén 1988 b). En muchas plantas monocárpicas, la *senescencia* es controlada por el fruto, como es el caso de la soja (Noodén 1988 b; Noodén y Guiamét 1989). Sin embargo, esto no es general, ya que hay excepciones donde los frutos no parecen controlar la *senescencia foliar* como es el caso de *Arabidopsis thaliana* (Noodén et al 1997).

Dado que la senescencia está programada e involucra la muerte celular, se la incluye como un caso de *muerte celular programada* (mcp) (Noodén et al 1997, Beers 1997). La mcp se produce cuando se ponen en marcha los mecanismos de suicidio celular (Beers 1997). La mcp no es lo mismo que la *necrosis*, ya que esta última resulta de un daño severo y no parece disparar los mecanismos de suicidio celular (Beers 1997). Existen numerosos ejemplos de procesos que involucran la muerte celular programada de determinados tipos de células, como parte normal del crecimiento y desarrollo. Algunos de estos casos son (Beers 1997):

# producción de flores unisexuales : se produce la mcp de los carpelos o estambres que abortan para originar una flor unisexual (v.g, sólo con carpelos o con estambres).

# la dehiscencia de las anteras, donde se produce la mcp del células del tejido de los sacos polínicos, permitiendo la liberación del polen.

# luego de la fertilización, la cigota de las angiospermas se divide en una célula basal y otra terminal. El embrión se desarrolla a partir de la célula terminal, y la basal se divide originando el suspensor del embrión. A medida que el embrión crece, el suspensor degenera por un proceso de mcp de las células que lo componen.

# diferenciación de los vasos del xilema y las esclereidas, que pierden sus protoplastos a la madurez por un proceso de mcp.

Un tipo particular de mcp, bien caracterizado en animales, es la *apoptosis*. En este caso se presentan alteraciones características en la morfología celular. La cromatina y el citoplasma se condensan, y sus bordes adquieren un aspecto lobado. Luego se fragmenta el núcleo y los lóbulos se separan en cuerpos apoptóticos que contienen organoides intactos. Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por células adyacentes. A nivel bioquímico, la apoptosis causa la fragmentación del DNA por la hidrólisis de los segmentos internucleosomales

(Noodén et al 1997, Beers 1997). En las plantas, se produce apoptosis en los estadios finales de la senescencia foliar (Yen y Yang 1998), como respuesta al ataque de patógenos (Greenberg, 1997), y al estrés salino (Katsuhara 1997). Sin embargo, la apoptosis no es la vía universal para la mcp en plantas, ya que muchos programas de suicidio celular parecen depender de mecanismos de autólisis y autofagia no relacionados con la apoptosis (Beers 1997).

En el caso de la senescencia foliar, la muerte celular ocurre después que la mayor parte del carbono y el nitrógeno han sido redistribuidos (Yen y Yang 1998), lo que sugeriría que ambos procesos ocurren en paralelo y pueden ser separados (Beers 1997).

### **1.2.2) Principales eventos de la senescencia foliar.**

El término senescencia se utiliza generalmente en sentido amplio incluyendo, tanto a los eventos que causan la muerte celular como a otros procesos que la preceden o están asociados con ella, sin ser su causa directa (v.g, desmantelamiento del cloroplasto; Noodén y Guiamét, 1996). Todavía no está claro cuáles eventos pertenecen a cada categoría, y muchos de los cambios observados durante la senescencia foliar no son la causa directa de la muerte celular (Noodén et al 1997). En las hojas, los primeros cambios consisten en alteraciones de las membranas tilacoidales del cloroplasto, y la disminución del número de ribosomas y polisomas, tanto en el citoplasma como en el cloroplasto. La pérdida de clorofila resultante de la degradación de la membrana tilacoidal es el índice de senescencia mas utilizado en el tejido fotosintético. La mitocondria, el núcleo y el tonoplasto persisten con pocos cambios hasta etapas más tardías. La membrana plasmática es la última estructura en colapsar, pero su desintegración marca el final de la vida de la célula (Noodén y Guiamét 1996).

La síntesis de proteínas y de RNA disminuye en un estadio temprano de la senescencia, aunque la transcripción de algunos genes puede incrementarse y

mantenerse hasta etapas tardías. La senescencia parece requerir energía, lo cual explicaría el mantenimiento de la estructura de la mitocondria hasta etapas avanzadas (Noodén y Guiamét 1996, Noodén et al 1997, Gan y Amasino 1997, Buchanan Wollaston 1997).

### **1.2.3) Degradación de los cloroplastos.**

El desmantelamiento de la estructura del cloroplasto, con la consecuente caída y, finalmente, desaparición de la actividad fotosintética es uno de los eventos mas importantes de la senescencia foliar (Noodén 1988 a, Gepstein 1988). Se manifiesta macroscópicamente con el amarillamiento de las hojas, ya que las clorofilas se degradan desenmascarando a los carotenoides (Newcomb 1990). Algunos autores utilizan el término *gerontoplasto* para referirse a los cloroplastos senescentes (Newcomb 1990, Thomas 1997). La desintegración del cloroplasto es un proceso ordenado, que involucra la degradación de las clorofilas y proteínas tilacoidales y de las enzimas del ciclo de Calvin (especialmente la Rubisco). La membrana tilacoidal se desorganiza, y al microscopio electrónico se observan glóbulos osmiofílicos característicos en el estroma del cloroplasto (Stoddart y Thomas 1982). Mientras la membrana tilacoidal pierde su estructura durante estos eventos, las membranas externas del cloroplasto mantienen su integridad (Stoddart y Thomas 1982). La degradación de la clorofila ocurre en dicha membrana (Matile et al 1992). Una vez que se han separado de la clorofila, las proteínas tilacoidales son degradadas (Thomas 1997). Los aminoácidos resultantes de la degradación de dichas proteínas, así como de la Rubisco, son exportados a los órganos en crecimiento, lo cual tiene gran importancia en el metabolismo del nitrógeno de la planta (Peoples & Dalling 1988, Thomas 1997, Feller y Fischer 1994).

### **1.2.4) Degradación y reutilización de los componentes del cloroplasto en hojas senescentes.**



En las plantas monocárpicas luego de la antesis los órganos vegetativos se convierten en fuentes de nutrientes minerales móviles para los órganos reproductivos. El traslado de los mismos se produce a través del floema (Feller y Fischer 1994). Los iones como el potasio son simplemente cargados en el floema, pero en el caso de los elementos que forman parte de macromoléculas (N, P, S) estas deben ser degradadas previo a su exportación a los frutos. Consecuentemente, durante la senescencia foliar se incrementa la actividad de enzimas que degradan proteínas, lípidos y ARN (Buchanan-Wollaston 1997), mientras la actividad de las enzimas encargadas de la asimilación del nitrógeno (nitrato y nitrito reductasa) disminuye hasta desaparecer por completo (Feller y Fischer 1994).

La mayor parte del N en las hojas se encuentra formando parte de las proteínas cloroplásticas, principalmente de la Rubisco (Peoples y Dalling 1988). La proteólisis ocurre en hojas no senescentes, ya que es necesaria para el recambio normal de proteínas y el procesamiento de precursores inactivos de las mismas, pero experimenta un notable incremento durante la senescencia (Peoples y Dalling 1988, Feller y Fischer 1994).

En las plantas existen proteasas en el cloroplasto, en el citosol y en la vacuola. Muchas de las proteínas del cloroplasto son codificadas en el núcleo, sintetizadas en el citosol e importadas al cloroplasto con gasto de energía (Robinson y Klosgen 1994). Estas proteínas tienen una secuencia consenso en el extremo N- terminal que las dirige al cloroplasto. Esta secuencia no está presente en la proteína madura, y es removida por una proteasa (Andersson y Aro 1997).

El sitio donde se produce la degradación masiva de las proteínas durante la senescencia no está claramente establecido todavía. Durante la senescencia se expresan genes que codifican proteasas, algunos de los cuales tienen secuencias consenso que dirigen las enzimas a las vacuolas, mientras que de otros no se conoce el compartimiento subcelular al cual se dirigen los polipéptidos (John et al

1997, Drake et al 1996). Sería posible que las proteínas se degradaran, en parte, fuera del cloroplasto, en la vacuola por ejemplo, como ocurre con las últimas etapas de la degradación de la clorofila (Feller y Fischer 1994, Buchanan Wollaston 1997, Smart 1994). Para que esto fuera posible, debería existir un mecanismo por el cual los componentes del cloroplasto se trasladaran a otros compartimientos; una posibilidad sería por medio de la secreción de vesículas (Guamét et al 1999).

Una vez que las proteínas son degradadas a aminoácidos, estos sufren una serie de reacciones de transaminación a través de las cuales se sintetizan los aminoácidos glutamina y glutamato (ácido glutámico), que son las formas en que el nitrógeno es trasladado a través del floema hacia los órganos reproductivos (Feller y Fischer 1994). Las enzimas involucradas en la síntesis de estos aminoácidos son la glutamina sintasa y la glutamato sintasa (Layzell 1990), y durante la senescencia se produce un cambio notable en las isoformas de la glutamina sintasa (Kamachi et al 1992, Feller y Fischer 1994). La glutamina sintasa (GS) tiene dos isoformas denominadas GS<sub>1</sub> y GS<sub>2</sub>. GS<sub>2</sub> es cloroplástica, está localizada en el tejido fotosintético y su expresión disminuye durante la senescencia; se ha propuesto que GS<sub>2</sub> se encargaría de la reasimilación del amonio liberado durante la fotorrespiración (Feller y Fischer 1994). GS<sub>1</sub> es citosólica, y su expresión aumenta notablemente durante la senescencia en los haces vasculares. Sobre la base de estos datos, y considerando que la glutamina es el aminoácido más abundante en el floema, se ha propuesto que GS<sub>1</sub> se encarga de sintetizar glutamina a partir de otros aminoácidos, y de esta forma el N es exportado hacia los órganos reproductivos (Feller y Fischer 1994, Buchanan Wollaston y Ainsworth 1997).

El nitrógeno contenido en las moléculas de clorofila no se exporta fuera de la hoja, sino que los compuestos resultantes de la degradación de la misma se acumulan en la vacuola (Feller y Fischer 1994, Thomas 1997, Matile et al 1999).

La degradación de los lípidos aumenta durante la senescencia (Feller y Fischer 1994; Buchanan Wollaston 1997). Se produce un incremento de la actividad

de las enzimas involucradas en la  $\beta$  – oxidación de los ácidos grasos a acetil coA, el cual al ser degradado en la mitocondria proporciona energía para los procesos de removilización (Feller y Fischer 1994). El acetil coA puede tener otro destino, ya que también se induce la síntesis de las enzimas del ciclo del glioxilato, que convierten el acetil CoA en compuestos intermediarios del ciclo de Krebs, los cuales pueden convertirse en azúcares por gluconeogénesis (Gut y Matile 1988, Landolt y Matile 1990, Graham et al 1992, Pistelli et al 1992; Pistelli et al 1996; Buchanan Wollaston 1997). Estos intermediarios del ciclo de Krebs también pueden ser sustrato para la síntesis de aminoácidos que serán exportados a otros órganos (Buchanan Wollaston 1997).

### **1.2.5) Control genético de la senescencia foliar.**

Si la senescencia es un proceso activo y ordenado, debe encontrarse necesariamente bajo control genético. La primera pregunta que surge es si la causa de la senescencia es la activación de genes que no se expresan en las hojas no senescentes, o por el contrario, la inactivación de genes que se expresan en hojas jóvenes. En una hoja, además de los genes nucleares, existe el genoma del cloroplasto, que posee su propia maquinaria de síntesis de RNA y proteínas, y es necesario distinguir si los genes que se expresan durante la senescencia pertenecen a uno u otro genoma (Noodén y Guiamét 1996). El DNA del cloroplasto, así como su maquinaria de síntesis de RNA y proteínas, es semejante a la de los procariontes (Sugiura 1992), y existen inhibidores de la traducción específicos para eucariotas (cicloheximida) y procariontes (cloramfenicol). La aplicación de cicloheximida retarda la senescencia, mientras que esto no ocurre al aplicar cloramfenicol. La aplicación de un inhibidor de la transcripción en eucariotas (actinomicina D) inhibe la senescencia en hojas y pétalos (Noodén 1988 a). Esto significa que para que la senescencia se produzca deben sintetizarse proteínas de novo, y que los genes causantes de la senescencia son genes nucleares (Noodén y

Guiamét 1996). Pero además de estos genes que se podrían denominar “causales” de la senescencia y que todavía no han sido identificados, ocurren cambios en la expresión de otros genes (Smart 1994, Noodén y Guiamét 1996, Buchanan Wollaston 1997). Estos genes se pueden dividir en dos grandes grupos:

a) Genes cuya expresión disminuye durante la senescencia.

A esta categoría pertenecen los genes que codifican las subunidades grande y pequeña de la Rubisco (Jiang et al 1993, Crafts Brandner et al 1996), Rubisco activasa y fosforribuloquinasa (Crafts Brandner et al 1996), ferredoxina (John et al 1997), polipéptido de 10 kD del PSII (John et al 1997), así como otros de función desconocida (John et al 1997). En general, estos genes codifican proteínas involucradas en la fotosíntesis, las cuales son degradadas y exportadas a los órganos reproductivos durante la senescencia, por lo tanto es razonable que, en esta etapa, su síntesis por parte de las células disminuya hasta desaparecer.

b) Genes cuya expresión se incrementa durante la senescencia.

La mayor parte de estos genes están relacionados con el desmantelamiento del cloroplasto y la reutilización de sus componentes (Buchanan Wollaston 1997). Algunos autores los denominan genes SAG (senescence associated genes, Teramoto et al 1995).

b.1) Genes involucrados en la degradación de proteínas.

Se han clonado varios genes que codifican distintas proteasas; algunos se expresan sólo durante la senescencia y otros en otras etapas también (Drake et al 1996, Buchanan Wollaston y Ainswoth 1997). Algunas de estas proteasas tienen secuencias consenso que las dirigen hacia la vacuola (Drake et al 1996) o el retículo endoplasmático (Buchanan Wollaston y Ainswoth 1997). No se han encontrado aún proteasas que se expresen exclusivamente durante la senescencia con secuencias que las dirijan al cloroplasto (Buchanan Wollaston 1997). Pese a

que en el cloroplasto existe actividad proteolítica (como se describió en el punto 1.2.4), no está claramente determinado si son estas u otras enzimas las involucradas en la degradación de las proteínas fotosintéticas (Buchanan Wollaston 1997, Andersson y Aro 1997).

#### b.2) Genes involucrados en la degradación de ácidos nucleicos.

El DNA permanece estable hasta estadios avanzados, y es fragmentado en las etapas finales de la senescencia (Yen y Yang 1998). El contenido de RNA ribosómico disminuye con la senescencia, lo que es consecuente con el aumento de la expresión de los genes de ribonucleasas (Buchanan Wollaston 1997).

No se conoce bien el destino de la purinas y pirimidinas resultantes de la degradación del RNA. El incremento de la uricasa y xantina oxidasa que las metabolizan en los peroxisomas indicaría que su degradación ocurre allí (Buchanan Wollaston 1997).

#### b.3) Genes involucrados en la degradación y reutilización de lípidos.

Durante la senescencia, el desmantelamiento del cloroplasto disminuye la disponibilidad de fotoasimilados. Sin embargo, la actividad respiratoria es elevada (Buchanan Wollaston 1997), ya que los procesos de redistribución de nutrientes requieren ATP. El sustrato respiratorio lo constituyen principalmente los ácidos grasos provenientes de la degradación de los fosfolípidos de la membrana tilacoidal. Consecuentemente, se ha encontrado que aumenta la expresión del gen de la fosfolipasa D, y de la  $\beta$  galactosidasa que participa en la movilización de la galactosa de los galactolípidos, que son los principales constituyentes de la membrana tilacoidal (Buchanan Wollaston 1997, Fan et al 1997). Otro destino posible para los lípidos degradados es originar azúcares por gluconeogénesis por medio del ciclo del glioxilato (Gut y Matile 1988).

b.4) Genes involucrados en la degradación de la clorofila.

No se han clonado hasta ahora los genes de las enzimas implicadas en la degradación de la clorofila (Buchanan Wollaston 1997, Matile et al 1999).

b.5) Genes involucrados en la reutilización del nitrógeno.

El nitrógeno se transporta hacia los órganos en crecimiento, principalmente en forma de glutamina y asparagina (Feller y Fischer 1994). Ambos aminoácidos se sintetizan a partir de intermediarios del ciclo de Krebs, que se reponen a partir del ciclo del glioxilato (Buchanan Wollaston 1997).

b.6) Otros genes que aumentan su expresión durante la senescencia.

Existen otros genes que aumentan su expresión, pero no intervienen directamente en la degradación y reutilización de compuestos, como en los casos anteriores (Buchanan Wollaston 1997). Algunos de los genes cuya expresión aumenta durante la senescencia codifican proteínas de función desconocida, mientras que otros tienen secuencias homólogas con genes conocidos. Entre los genes cuyas secuencias coinciden con genes conocidos se encuentran algunos que codifican *metalotioneínas*, que son proteínas que ligan iones metálicos (Buchanan Wollaston y Ainsworth 1997). Es posible que durante la senescencia se liberen iones en tal magnitud que haga necesaria su detoxificación, o que las metalotioneínas se ligan transitoriamente a los iones hasta que estos sean exportados (Buchanan Wollaston y Ainsworth 1997). En los mamíferos, se ha encontrado que las metalotioneínas protegen al DNA del daño por radicales libres, y no se debe descartar que cumplan una función similar en las plantas (Buchanan Wollaston y Ainsworth 1997). En el caso de la catalasa se ha clonado un gen de la misma que disminuye su expresión durante la senescencia (John et al 1997) y otro que aumenta en la etapas tardías (Buchanan Wollaston y Ainsworth 1997). La catalasa degrada el peróxido de hidrógeno a oxígeno molecular y agua, y está

localizada en los peroxisomas. Estos organoides durante la senescencia se convierten en glioxisomas, ya que en ellos se localizan las enzimas del ciclo del glioxilato. La catalasa pertenece a una familia multigénica (Buchanan Wollaston y Ainsworth 1997) y se puede especular que los genes clonados codifican dos isoformas, una que interviene en la fotorrespiración y por lo tanto, disminuye durante la senescencia, mientras que la otra que se incrementa en las etapas tardías estaría involucrada en la detoxificación de productos resultantes de los procesos de degradación. También se incrementa la expresión de genes de proteínas relacionadas con la patogénesis, cuya función en la senescencia es desconocida (Buchanan Wollaston 1997).

Muchas de las caracterizaciones bioquímicas de la senescencia foliar se han efectuado en hojas cortadas y en oscuridad, pero se ha demostrado que la expresión génica en estos casos difiere bastante de la que ocurre durante la senescencia en condiciones naturales (v.g., en hojas iluminadas unidas a la planta). En cebada, algunos de los genes expresados en hojas cortadas no se expresan en condiciones naturales de senescencia, pero sí en situaciones de estrés hídrico (Becker y Apel 1993). En *Arabidopsis*, un gen relacionado con la senescencia responde en forma diferente si el proceso transcurre en oscuridad o en la luz (Oh et al 1996). Evidentemente, hay genes relacionados exclusivamente con la senescencia, mientras que otros también responden a otros estímulos hormonales, situaciones de estrés, etc (Buchanan Wollaston 1997; Weaver et al 1998).

Una fuerte evidencia del control genético de la senescencia es la existencia de mutantes de diferentes especies en los cuales parte del síndrome de senescencia está alterado (Noodén 1988 a). Básicamente, en estos mutantes la degradación de la clorofila y diversas proteínas del cloroplasto está bloqueada, por lo cual las hojas permanecen verdes durante la senescencia (*stay-green* o *non-yellowing*). Entre estos se encuentran un mutante de festuca (Thomas 1982,

Thomas et al 1992), otro de tomate (Shaheen Akhtar et al 1999) y algunos genotipos de *Phaseolus vulgaris* (Bachmann et al 1994). En el caso de la soja, en el mutante *GGd1d1d2d2* está inhibida la degradación de los cloroplastos en hojas, y la degradación de clorofila en hojas, frutos, cubierta seminal y embriones (Bernard & Weiss 1973, Guiamét et al 1990, Guiamét et al 1991). También en soja, el factor citoplasmático *cyt G* provoca que las hojas, la cubierta seminal y embrión permanezcan verdes (Bernard & Weiss 1973, Guiamét et al 1990). El fenotipo *stay green* de este mutante está causado por la retención preferencial de los polipéptidos ligados a la clorofila a/b de LHCII (Guiamét et al 1991).

#### **1.2.6) Controles hormonales de la senescencia foliar.**

La senescencia foliar está sujeta a control por varias hormonas vegetales. Las hormonas que juegan un papel preponderante en la senescencia foliar son las citocininas y el etileno (Buchanan Wollaston 1997).

Las citocininas actúan como retardantes de la senescencia al ser aplicadas exógenamente, y sus niveles endógenos muestran una estrecha correlación negativa con el grado de senescencia (Noodén y Letham 1986; Noodén, Singh y Letham 1990; Noodén y Letham 1993). Consecuentemente con lo anterior, las citocininas inhiben la expresión de genes asociados con la senescencia (Teramoto et al 1995, Weaver et al 1998). En plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan el gen de la isopentenil transferasa (la enzima que cataliza la reacción limitante en la vía de síntesis de las citocininas) la senescencia se retrasa considerablemente (Gan y Amasino 1997).

El etileno (ET) acelera la senescencia foliar, aunque no es el factor desencadenante de la misma (Buchanan Wollaston 1997). La vía de síntesis del ET a partir de la metionina es conocida, e involucra los siguientes compuestos: metionina; S-adenosilmetionina (Ado-Met); ácido aminociclopropano carboxílico (ACC); Etileno (Abeles 1992). La conversión de la metionina en S-



adenosilmetionina es catalizada por la enzima Ado-Met sintasa; la conversión de S-Adenosilmetionina en ACC por la ACC sintasa, y la conversión de ACC a etileno por la ACC oxidasa (también denominada enzima formadora de etileno). En plantas transgénicas deficientes en ACC oxidasa, la síntesis de etileno está inhibida y la senescencia se retrasa (Buchanan Wollaston 1997). En el mutante de *Arabidopsis* insensible al etileno (*etr1-1*) la senescencia foliar está retrasada (Buchanan Wollaston 1997). Además, la aplicación exógena de etileno estimula la expresión de genes asociados a la senescencia (SAG) en mayor medida en las hojas viejas, con poco efecto en las jóvenes, lo que implicaría que el etileno no puede actuar hasta que la hoja esté “preparada” para senescer (Buchanan Wollaston 1997, Weaver et al 1998). Todo esto indica que el etileno es un modulador de la senescencia, pero no es el factor desencadenante (Buchanan Wollaston 1997).

La aplicación exógena de ácido abscísico (ABA) promueve la senescencia en las hojas cortadas, pero tiene poco efecto sobre las hojas adheridas a la planta (Noodén, 1988 b). El ABA induce la expresión de algunos SAGs con mayor intensidad en hojas viejas, siguiendo un patrón semejante al descrito anteriormente para el etileno (Weaver et al 1998). El ABA acelera la senescencia, pero no la causa.

### 1.3) ESTRES HIDRICO.

#### **1.3.1) Definición y tipos de estrés.**

El término *estrés hídrico* ha sido utilizado para describir situaciones distintas; que van desde la reducción lenta de la transpiración y el área foliar, pasando por la desecación rápida y extrema (con estrés a nivel celular) hasta la muerte de la planta (Tardieu 1996). Si el desarrollo del estrés es lento, la planta se adapta gradualmente, y las células no se ven afectadas en forma catastrófica (vg, deshidratación y muerte). En el caso de las especies de interés agrícola este

parece ser el caso mas común (Tardieu 1996). Si el estrés es rápido y severo puede afectar al citoplasma por desecación extrema (estrés celular) produciendo la muerte de las células. Algunos autores (Morgan y Drew 1997) proponen reservar el término *estrés por sequía* (o *estrés hídrico*) para denominar los efectos causados por el cese del suministro de agua sobre plantas creciendo en volúmenes de suelo lo suficientemente grandes como para que el potencial agua disminuya gradualmente a lo largo de varios días. Proponen llamar *déficit hídrico* para referirse a plantas o partes de plantas sometidas a una desecación rápida por excisión, o cese de irrigación en volúmenes de suelo tan pequeños que un déficit severo se desarrolla en un día o menos. En este trabajo, se impuso un estrés gradual a las plantas, ya que los procesos a estudiar (senescencia y abscisión foliar) son afectados luego de un tiempo de estrés moderado (Tardieu 1996).

### **1.3.2) Respuestas al estrés hídrico de las plantas mesófitas a nivel de planta entera.**

Las principales alteraciones en las mesófitas sometidas a estrés hídrico son un menor crecimiento (debido a la disminución de las divisiones y alargamiento celular); la disminución de la expansión de nuevas hojas y la menor área de las mismas; el incremento del desarrollo de las raíces a expensas de la parte aérea; el cierre de los estomas (con la consiguiente disminución de la transpiración); cambios en la posición de las hojas (heliotropismo, enrollamiento); la aparición de cavitaciones en el xilema; y la aceleración de la senescencia y abscisión foliar (Begg 1980; Hsiao 1973; Bradford y Hsiao 1982; Passioura 1982; Aparicio Tejo y Boyer 1983, Tardieu 1996).

Por lo general, las plantas en estas condiciones desarrollan diversos mecanismos de protección tendientes a evitar las disfunciones (v.g., desecación celular, cavitación del xilema) que las conducen a la muerte, y las consecuencias a nivel celular aparecen en un plazo mas largo. En el corto plazo, se puede evitar la

deseccación controlando la apertura estomática (Passioura 1982, Tardieu 1996) pero si el estrés se prolonga esta respuesta resulta insuficiente. Por lo tanto, las plantas deben adaptar su arquitectura al menor suministro de agua, reduciendo la expansión foliar, incrementando la relación raíz / tallo y reduciendo el área foliar al acelerar la senescencia y abscisión (Begg 1980, Tardieu 1996).

Se ha observado la ocurrencia de cavitaciones en el xilema cuando el suelo comienza a secarse (Tyree y Sperry 1989) y, como consecuencia, disminuye la conductancia hidráulica (o aumenta la resistencia) del xilema, que puede impedir casi completamente el transporte de agua hacia las hojas (Tardieu 1996). Las plantas pueden escapar a este acontecimiento catastrófico ajustando el flujo de agua de manera que la tensión en el xilema nunca alcance el umbral de cavitación (Jones y Sutherland 1991).

### **1.3.3) Respuestas de las mesófitas al estrés hídrico a nivel celular.**

A nivel celular las respuestas de las plantas varían de acuerdo a la especie y a la intensidad y duración del estrés (Mullet y Whitsitt 1996). Si la pérdida de agua es muy grande, el metabolismo celular será alterado (Tardieu 1996). La desecación es caracterizada por el contenido relativo de agua (CRA), y a valores muy bajos del mismo, procesos como la fotosíntesis y la asimilación de nitratos se ven interrumpidos.

El primer efecto del déficit hídrico es disminuir la tasa de crecimiento de las células del tallo, pero este fenómeno no ocurre en las células de la raíz, que continúan creciendo (Mullet y Whitsitt 1996). Esto conduce al incremento de la relación raíz / tallo indicada anteriormente (1.4.2).

Durante la sequía, la concentración de CO<sub>2</sub> en el cloroplasto disminuye debido a la reducción de la conductancia estomática y, como consecuencia, la fijación de CO<sub>2</sub> por la Rubisco es menor. Simultáneamente, el cierre estomático disminuye la transpiración y, consecuentemente, el flujo de nitratos y otros

nutrientes a la hojas. Debido a esto, la asimilación del nitrógeno y la síntesis de aminoácidos puede ser inhibida en condiciones de sequía (Mullet y Whitsitt 1996).

Una respuesta celular importante es el ajuste osmótico por acumulación de compuestos osmóticamente activos. Esto permite a las células reestablecer la turgencia y continuar extrayendo agua del suelo (Munns y Sharp 1993; Mullet y Whitsitt 1996). En general, el ajuste osmótico es importante en las zonas en crecimiento activo, ya que al mantener la turgencia permite que las células continúen creciendo en situaciones de sequía (Nilssen y Orcutt 1996). En la soja, las zonas del tallo en crecimiento activo acumulan azúcares (v.g realizan ajuste osmótico), mientras que las zonas que no se están elongando no lo hacen y su turgencia es menor (Mullet y Whitsitt 1996).

El ajuste osmótico puede ocurrir por la acumulación de solutos o por la degradación de compuestos osmóticamente inactivos. La utilización de iones es más económica para las plantas, ya que el único gasto energético es el requerido para acumularlos en la vacuola, y no necesitan invertir esqueletos carbonados o ATP para su síntesis. En la vacuola también se pueden acumular ácidos orgánicos. En el citosol, donde no se acumulan iones debido a su toxicidad, se acumulan los denominados *solutos compatibles*. La síntesis de estos solutos implica un gasto de energía y de esqueletos carbonados. El costo de los mismos varía según el tipo de soluto que se acumule, los mas económicos son los carbohidratos solubles, ya que son intermediarios comunes del metabolismo. La acumulación de otros compuestos como glicina betaína es mas costosa, ya que su síntesis implica rutas metabólicas mas largas que los azúcares y una inversión extra de nitrógeno (Nilsen y Orcutt 1996). En las hojas, los esqueletos carbonados para el ajuste osmótico pueden provenir de la fotosíntesis, el almidón o proteínas de reserva. Se pueden reconocer diferentes tipos de ajuste osmótico (Nilsen y Orcutt 1996):

- Tipo 1: es el verdadero ajuste osmótico, donde se incrementa el número de

osmóticos manteniendo constante la fracción simplástica de agua.

- Tipo 2: hay un aumento de la concentración de osmóticos debido a la disminución de la fracción simplástica de agua.

- Tipo 3: hay tanto disminución de la fracción simplástica de agua como aumento de la concentración de osmolitos.

Esto implica que la disminución del potencial agua en los tejidos sometidos a sequía puede deberse a un mecanismo activo de concentración de iones, o a una disminución del contenido de agua del citoplasma.

#### **1.3.4) Respuestas hormonales ante el estrés hídrico.**

Las principales hormonas involucradas en las respuestas al estrés hídrico son el ácido abscísico (ABA) y el etileno (ET).

La síntesis de ET aumenta con el estrés (Abeles 1992, Beltrano et al 1997). Se considera que el principal control de la síntesis de ET está a nivel de la transcripción de los genes de la ACC sintasa, enzima que cataliza la conversión de ADO Met en ACC (Abeles 1992, ver punto 1.2.6). Esta enzima pertenece a una familia multigénica, cada gen es regulado en forma independiente y algunos de estos genes son inducidos por el estrés (Morgan y Drew 1997). También puede ser regulada por el estrés la expresión de la ACC oxidasa (Kim et al 1998) y en menor medida, la Ado – Met sintasa (Morgan y Drew 1997).

El ABA induce el cierre de los estomas, y aquellos mutantes deficientes en ABA (por ejemplo *aba* en *Arabidopsis thaliana*, *droopy* en papa; *flacca* en tomate, *viviparous* en maíz) muestran un incremento de la pérdida de agua en la parte aérea (Vartanian 1996). El ABA también promueve el ajuste osmótico de la raíz en condiciones de sequía, permitiendo que continúe creciendo en dichas condiciones,

así aumenta el volumen de suelo explorado y consecuentemente la disponibilidad de agua (Munns y Sharp 1993; Vartanian 1996, Mullet y Whitsitt 1996).

Se ha propuesto que las raíces “sensan” el contenido de agua del suelo, y cuando este disminuye, envían señales a las hojas provocando el cierre de los estomas y disminuyendo la expansión foliar (Davies y Zhang 1991). Las señales serían de naturaleza química y no hidráulica, entendiéndose por señal hidráulica a la transmisión de la menor disponibilidad de agua en el suelo a través de los cambios en la tensión del xilema (Dodd et al 1996). Estas señales químicas pueden ser positivas o negativas. Una señal negativa consistirá en una sustancia sintetizada por las raíces turgentes que promovería la apertura estomática y el crecimiento del vástago, y cuya síntesis y transporte disminuiría a medida que el suelo se seca. Este sería el caso de las citocininas, las cuales son sintetizadas por las raíces y transportadas por la corriente transpiratoria hacia las hojas, donde promueven la apertura estomática (Dodd et al 1996). Una señal positiva sería aquella que se incrementara a medida que el suelo se seca, disminuyendo la apertura estomática. Se ha sugerido que el ABA podría ser esa señal, ya que promueve el cierre estomático y disminuye el crecimiento (Davies y Zhang 1991, Dodd et al 1996). El contenido de ABA del xilema en muchos casos muestra una elevada correlación con la conductancia estomática y la tasa de elongación foliar de plantas estresadas (Dodd et al 1996), aunque algunos autores proponen que existe otra sustancia antitranspirante distinta del ABA (Dodd et al 1996). Además de los efectos en la apertura estomática, el ABA y las citocininas están involucrados en la senescencia foliar (ver punto 1.2.6). Tanto la disminución del flujo de citocininas desde las raíces a las hojas, como un aumento de la síntesis de ABA, o una combinación del efecto de ambos fenómenos, podrían contribuir a la aceleración de la senescencia foliar durante la sequía.

En definitiva, la naturaleza de la señal química es todavía motivo de controversia, aunque el ABA es un candidato probable.

### **1.3.5) Cambios en la expresión genética en respuesta al estrés hídrico.**

El estrés hídrico induce la expresión de diversos genes, algunos de los cuales también se expresan bajo condiciones de estrés salino y bajas temperaturas (Crowell et al 1992; Shinozaki y Yamaguchi- Shinozaki 1997, Thomashow 1998). Los RNAs mensajeros de los genes inducidos por el estrés disminuyen al desaparecer las condiciones de estrés, lo cual es consistente con la evidencia de que responden al estrés hídrico (Shinozaki y Yamaguchi- Shinozaki 1997).

Algunos genes responden al ABA, y sus promotores tienen secuencias características (ABRE: ABA responsive elements; Bartels et al 1996; Shinozaki y Yamaguchi- Shinozaki 1997), pero en otros casos parece haber una respuesta al estrés independiente del ABA (Vartanian 1996; Shinozaki y Yamaguchi- Shinozaki 1997).

Los genes activados por el estrés hídrico se pueden dividir en 3 grandes grupos (Shinozaki y Yamaguchi- Shinozaki 1997):

#### **a) Genes que codifican proteínas que incrementan la tolerancia a la sequía.**

Este grupo incluye :

##### **a.1) Acuaporinas.**

La visión del transporte de agua en las plantas ha cambiado en los últimos años con el descubrimiento de proteínas que funcionan como canales de agua en plantas denominadas *acuaporinas* (Chrispeels y Maurel 1994, Steudle y Henzler 1995). Estas proteínas están relacionadas con la superfamilia de las proteínas intrínsecas de membrana (MIP, membrane intrinsic protein) que fueron caracterizadas primero en *Escherichia coli*, y que también están presentes en mamíferos (Chrispeels y Maurel 1994). Algunas de estas proteínas están

fosforiladas o glicosiladas, lo que podría regular la actividad del canal (Mullet y Whitsitt 1996). En plantas, se han identificado genes de esta familia que son inducidos por la deshidratación en *Pisum sp*; en *Arabidopsis thaliana* (Mullet y Whitsitt 1996) y en *Nicotiana excelsior* y *Mesembryantum crystallinum* (Yamada et al 1997a y b). Se han encontrado también proteínas semejantes en el tonoplasto (TIP, tonoplast intrinsic protein, Mullet y Whitsitt 1996, Chaumont et al 1998). Un gen cuya secuencia es homóloga a una MIP se expresa durante la senescencia (Buchanan Wollaston 1997).

#### a.2) Enzimas involucradas en la síntesis de osmoprotectores.

Varios genes inducidos por el déficit hídrico codifican enzimas de rutas metabólicas de síntesis de solutos compatibles, por ejemplo, de glicina - betaína (Bohnert et al 1995, Mullet y Whitsitt 1996).

#### a.3) Proteínas de protección de macromoléculas y membranas.

Un estrés hídrico moderado, que reduce la turgencia, produce grandes cambios en el crecimiento y el metabolismo, pero raramente causa la muerte, a menos que se prolongue mucho tiempo (Bohnert et al 1995, Mullet y Whitsitt 1996). La tolerancia a la deshidratación varía según el momento del ciclo de vida. Durante la maduración, las semillas experimentan una marcada reducción del contenido de agua sin pérdida de la viabilidad (Bartels et al 1996). Las plántulas de soja son capaces de incrementar su resistencia a la deshidratación en respuesta a la sequía (Mullet y Whitsitt 1996). Todavía no está claro por qué la mayor parte de las plantas pierden la tolerancia a la deshidratación que tenían en el estado de semillas (Mullet y Whitsitt 1996). Dicha tolerancia está correlacionada con la acumulación de azúcares y un grupo especial de proteínas denominadas *dehidrinas* (Bradford y Chandler 1992; Blackman et al 1992). Las proteínas que se acumulan en células deshidratadas son generalmente hidrofílicas y su estructura secundaria es limitada:



básicamente forman un ovillo desordenado. Las proteínas abundantes durante la embriogénesis tardía (LEA, late embryogenesis abundant proteins) que se acumulan en las semillas responden a esta descripción, y se ha propuesto que funcionan como protectoras de las macromoléculas ante la deshidratación (Mullet y Whitsitt 1996; Bartels et al 1996). Genes que codifican polipéptidos con homología con LEAs aumentan su expresión en condiciones de sequía (Ried y Walker Simmons 1993; Joshee et al 1998); bajas temperaturas (Tomashow 1998) y durante la senescencia (Weaver et al 1998). Un gen que codifica una LEA de cebada, introducido y expresado constitutivamente en arroz, confiere a éste tolerancia a la sequía y al estrés salino (Xu et al 1996).

#### a.4) Proteasas que intervienen en el recambio de proteínas.

Durante la sequía, las proteínas pueden sufrir diversas alteraciones químicas (desaminación, isomerización, oxidación), y no es sorprendente que la expresión de genes involucrados en la reparación de proteínas aumenten su expresión (Ingram y Bartels 1996). Varios genes que codifican polipéptidos homólogos de proteasas, inducidos por la sequía, han sido aislados en arveja y en *Arabidopsis thaliana* (Ingram y Bartels 1996).

#### a.5) Enzimas detoxificadoras.

Una consecuencia importante de la reducción de la fijación de CO<sub>2</sub> es que disminuye el pool de NADP<sup>+</sup>, que es el aceptor natural de los electrones durante la fase lumínica de la fotosíntesis. La consecuencia de esto es que los electrones pueden ser captados por el oxígeno, originando especies tóxicas del mismo (Ingram y Bartels 1996). En plantas estresadas, la expresión de los genes de varias enzimas antioxidantes que eliminan especies activas del oxígeno (ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa) aumenta durante el estrés (Ingram y Bartels 1996). Sin embargo, este aumento de las enzimas antioxidantes

no evita la ocurrencia de estrés oxidativo durante el estrés hídrico (Tambussi et al 2000).

#### b) Proteínas involucradas en la transducción de señales.

La fosforilación y defosforilación de proteínas por acción de las quinasas y fosforilasas constituyen importantes mecanismos de regulación de la transducción de señales en eucariotas (Ingram y Bartels 1996). En *Arabidopsis*, dos genes que codifican quinasas dependientes del calcio son inducidos por la sequía, lo que sugiere que ocurren procesos de fosforilación como respuesta a la sequía (Ingram y Bartels 1996). Este grupo de genes también incluye algunos que tienen homología con genes de proteínas involucradas en la transducción de señales y regulación génica (factores de transcripción, fosfolipasa C). El papel que pudieran desempeñar estos genes en situaciones de sequía todavía no está completamente aclarado (Ingram y Bartels 1996, Shinozaki y Yamaguchi- Shinozaki 1997).

#### 1.4) OBJETIVO GENERAL.

El objetivo general de este trabajo fue determinar el efecto de la inhibición de la degradación de los cloroplastos sobre la tolerancia a la sequía y la recuperación luego de un episodio de estrés hídrico en la soja.

Las hipótesis y objetivos específicos se indican en cada uno de los capítulos.

## CAPITULO 2.

La senescencia foliar y su influencia en la tolerancia a la sequía y la recuperación luego de un episodio de estrés hídrico.

## 2.1) Introducción.

Durante un episodio de sequía, el cierre de los estomas provoca la reducción del flujo de CO<sub>2</sub> hacia los cloroplastos con la consecuente caída de la actividad fotosintética (Begg 1980, Tardieu 1996). A medida que la senescencia foliar es acelerada por la sequía (Noodén 1988a), el desmantelamiento del cloroplasto provoca una disminución mayor y de carácter no estomático de la actividad fotosintética (Gepstein 1988, Heckathorn et al 1997). En la soja, si el episodio de estrés ocurre durante el llenado de los frutos, la aceleración de la senescencia acorta la duración de dicho período, afectando negativamente al rendimiento (De Suoza et al 1997). La degradación de los componentes del cloroplasto también compromete la capacidad fotosintética de las hojas luego de la rehidratación. Heckathorn et al (1997) estudiaron varias especies silvestres de gramíneas C<sub>4</sub>, encontrando una estrecha relación entre la capacidad fotosintética y el contenido de N foliar, y también que la mayor parte de las pérdidas de N durante la sequía están representadas por la degradación de la Rubisco y la fosfoenolpiruvato carboxilasa. La disminución de estas proteínas fotosintéticas durante la sequía causa una limitación no estomática de la fotosíntesis luego del episodio de estrés, porque la recuperación del contenido de N luego de un episodio de sequía es mas lenta que la de otros parámetros (v. g. potencial agua), produciéndose varios días después de reasumidas las condiciones hídricas adecuadas (Heckathorn et al 1997). Entre las especies estudiadas por Heckathorn et al la recuperación del contenido de N y la actividad fotosintética fue mas rápida en la especie con mayor tolerancia a la sequía (Heckathorn et al 1997). En la soja se ha encontrado que durante la sequía disminuye el contenido de N foliar (De Souza et al 1997). En un genotipo con senescencia foliar retrasada de *Vigna unguiculata* (caupí) la eficiencia del uso del agua luego de la rehidratación es mayor que en el genotipo silvestre (Gwathmey y Hall 1992).

Además de afectar la fijación de CO<sub>2</sub>, la aceleración de la senescencia foliar

durante la sequía disminuye el área foliar total fotosintetizante (Aparicio Tejo y Boyer 1983, Wolfe et al 1988, Gwathmey y Hall 1992). Asimismo, uno de los procesos más sensibles al estrés hídrico es la expansión foliar, que disminuye aunque el estrés sea moderado (Hsiao 1973, Tardieu 1996). Ambos procesos combinados (v.g. senescencia y menor expansión foliar) conducen a la disminución del área foliar fotosintetizante del canopeo y, por consiguiente, del rendimiento (Tardieu 1996). En este contexto, la aceleración de la senescencia resulta desfavorable, ya que afecta negativamente la recuperación de la actividad fotosintética una vez superado el episodio de estrés. Si la degradación de los componentes del cloroplasto no se produjera, la disminución del área foliar fotosintetizante sería menor, la pérdida de N foliar sería mínima y la recuperación de la capacidad fotosintética luego del estrés sería mas rápida. Lo anteriormente descrito es válido si la inhibición de la senescencia no afecta desfavorablemente la tolerancia al estrés hídrico de los genotipos que presentan dicha característica (v.g, el carácter *stay green*).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la retención de la integridad y componentes del cloroplasto sobre la actividad fotosintética y la tolerancia al estrés de plantas de soja sometidas a un episodio de sequía. Con este fin, se compararon dos isolíneas de soja del cultivar *Clark*. En una de ellas las hojas, semillas y frutos se vuelven amarillos a la madurez (genotipo silvestre), mientras que en la otra denominada *Gd1d2*, las hojas, semillas y frutos permanecen verdes. Estos caracteres están determinados por la combinación de 3 genes nucleares: *G*, *d1* y *d2*. El genotipo de la isolínea que senesce normalmente es *ggD1D1D2D2* y el del genotipo *stay green* es *GGd1d1d2d2* (abreviado *Gd1d2*). En *Gd1d2*, la actividad fotosintética se prolonga durante el llenado de las semillas en relación al genotipo silvestre (Guiamét et al 1990). *Gd1d2* retiene elevados niveles de los polipéptidos mas abundantes en la membrana tilacoidal, el 87% de la clorofila en relación al genotipo silvestre *Clark* (Guiamét et al 1991), y no muestra

los signos de deterioro de la membrana tilacoidal característicos de cloroplastos senescentes (Guamét y Giannibelli 1994). En el momento de la abscisión al final del ciclo, las hojas de *Gd1d2* retienen el 50 % del contenido de proteína soluble y altos niveles de Rubisco, mientras que el genotipo silvestre ha perdido el 90 % de las proteínas solubles (Guamét y Giannibelli 1996).

La hipótesis examinada fue que si la tolerancia a la sequía de ambos genotipos fuera semejante, la tasa fotosintética del mutante *stay-green Gd1d2* sería mayor que la del genotipo silvestre (*Clark*) en plantas sometidas a sequía y vueltas a regar, debido a la retención de los componentes del cloroplasto.

#### Abreviaturas Utilizadas.

DFFF: densidad de flujo fotónico fotosintético.

TF: tasa fotosintética

gs: Conductancia estomática total (superficie abaxial mas adaxial).

E: transpiración instantánea total (superficie abaxial mas adaxial).

BSA: albúmina de suero bovino.

TRIS: (Tris[hidroximetil]amino-metano).

MeSH:  $\beta$ -mercaptoetanol.

EDTA:ácido etilén-diamino tetracético.

PVPP: polivinilpolipirrolidona.

Rubisco: Ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa-oxigenasa.

*Gd1d2*: *GGd1d1d2d2*.

## 2.2) Materiales y Métodos.

### **2.2.1) Cultivo de las plantas.**

Las semillas del genotipo silvestre (*Clark*) y del mutante (*Gd1d2*) fueron puestas a germinar en cajas de Petri. A los tres días fueron trasplantadas a potes de plástico de 11 cm de diámetro conteniendo 900 g de suelo zarandeado. Las plantas fueron inoculadas con una cepa comercial de *Bradyrhizobium japonicum* y crecieron en un invernáculo con el fotoperíodo e irradiación naturales de la localidad (La Plata). La DFFF máxima fue de  $600 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  al mediodía. Para controlar las plagas (trips) las plantas fueron asperjadas con "Monocrotofos" ( $0,3 \text{ ml L}^{-1}$  agua). Luego de floración cada planta fue regada con 35 ml de solución Hoagland para evitar posibles deficiencias de nutrientes. A los 36 días de la siembra las plantas fueron trasladadas a una cámara de crecimiento bajo  $400\text{-}500 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de DFFF (proporcionados por lámparas de mercurio halogenado) y  $26 - 20 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura (día-noche). Las plantas fueron rotadas periódicamente para minimizar las diferencias en la DFFF recibida por cada una. En el momento de trasladarlas a la cámara se encontraban en el estadio R2 (plena floración, según Fehr y Caviness). La primera medición de todos los parámetros (correspondiente al día cero, cuando comenzó el tratamiento de sequía) se realizó a los 54 días de la siembra, durante el estadio R4 (comienzo del llenado de la semilla). Luego de 10 días de sequía (día 10) las plantas se encontraban en el estadio R5.

Todas las determinaciones fisiológicas y bioquímicas se efectuaron sobre la segunda hoja trifoliolada (excepto que se indique algo distinto).

### **2.2.2) Potencial agua del suelo.**

Para estimar el potencial agua del suelo se determinó la relación entre el potencial agua del suelo y el contenido de agua del mismo. Para ello se colocaron

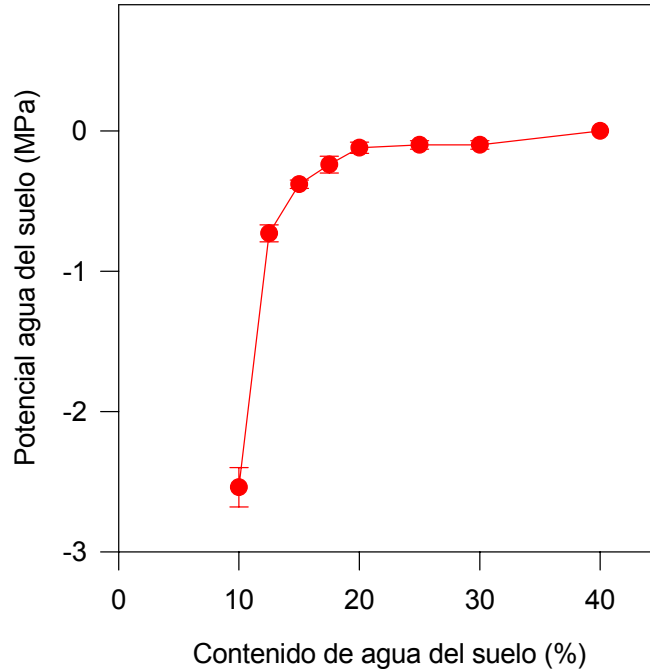


Fig. 1 - Relación entre el potencial agua del suelo (medido con un higrómetro) y el porcentaje de agua del suelo utilizado en el experimento, determinada como se describe en el párrafo anterior. Barras verticales :  $\pm$  un error estándar de la media.

100 g de suelo seco en vasos de plástico a los que se agregó una cantidad conocida de agua y se taparon con polietileno, que se aseguró con bandas elásticas. En estas condiciones se dejaron varios días para lograr una distribución uniforme del agua agregada, agitándolos suavemente para favorecer la mezcla. Se colocaron sensores de potencial agua de suelo (termocuplas WESCOR PST-55) y los vasos se aislaron nuevamente con polietileno. Los sensores se dejaron 24 h para alcanzar el equilibrio, y luego se midió el potencial agua con un higrómetro WESCOR HR 33T por el método del punto de rocío. Se realizaron al menos cinco repeticiones para cada porcentaje de agua edáfica, y a cada una de estas repeticiones correspondió una lectura del potencial agua. La figura 1 muestra los resultados obtenidos. Entre el 20 y el 40 % de contenido de agua, el potencial agua del suelo es cercano a 0, por debajo del 20 % comienza a disminuir, y la disminución se hace mas abrupta por debajo del 12 %. En el experimento se mantuvo el contenido de agua del suelo al 12 % (- 0,7 y - 0,8 MPa). La transpiración de las plantas estresadas provocó una variación diaria del potencial agua del suelo entre -0,7 y -1 MPa. Conociendo la cantidad de suelo de cada



maceta y el porcentaje de humedad que tenía en ese momento, se estimó el peso correspondiente al valor de potencial agua deseado. Una vez que las macetas alcanzaron dicho peso, todos los días se reponía el agua transpirada hasta alcanzar dicho valor. El valor de potencial agua estimado de esta manera es un valor promedio para la maceta.

### **2.2.3) Tratamiento de estrés.**

El tratamiento de estrés empezó a partir del llenado de las semillas. Se suspendió el riego hasta que el suelo alcanzó un potencial agua de - 0,7 MPa. El potencial agua promedio del suelo se mantuvo por pesada diaria de las macetas, y se estimó mediante la curva anteriormente descrita. El potencial agua del suelo en las plantas controles se mantuvo a capacidad de campo regándolas diariamente. Luego de 7 días de sequía un grupo de plantas estresadas fue regado (plantas rehidratadas) alcanzando valores de potencial agua del suelo semejante a las controles (no estresadas).

### **2.2.4) Tasa fotosintética.**

La tasa fotosintética (TF) se midió con un analizador infrarrojo de gases (IRGA) LICOR LI 6200 en el folíolo central de la segunda hoja trifoliolada. La concentración de CO<sub>2</sub> en la cámara de medición se mantuvo entre 340 - 380 ppm, la humedad relativa varió entre 55 -75%. La DFFF fue de 700  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fue proporcionada por una lámpara dicróica cuya radiación infrarroja era absorbida por un baño de agua para evitar el sobrecalentamiento de la hoja durante la medición.

### **2.2.5) Conductancia foliar y transpiración instantánea.**

La conductancia foliar total (gs) y la transpiración instantánea total (E) fueron medidas con un porómetro de estado estacionario LICOR LI 1600 bajo las mismas condiciones que la TF.

### **2.2.6) Medida del potencial agua de las hojas.**

Durante el día y luego de las mediciones de tasa fotosintética y conductancia, el potencial agua fue medido en la primera hoja trifoliolada con una bomba de Scholander.

### **2.2.7) Contenido de clorofilas.**

El contenido de clorofilas se determinó en discos de hojas de 1,4 cm de diámetro. La clorofila se extrajo de los discos utilizando N,N-Dimetilformamida como solvente de extracción, en un volumen final de 8 ml. La absorbancia del extracto a 647 y 664,5 nm se determinó en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160 A y el contenido de clorofila a, b y total se calculó de acuerdo a las ecuaciones de Inskeep & Bloom (1985).

### **2.2.8) Contenido de proteínas solubles.**

El contenido de proteínas solubles se determinó de acuerdo al método de Bradford (Bradford,1976). Discos de hoja de 1,9 cm de diámetro se homogeneizaron en un mortero con 1 ml del buffer de extracción (TRIS 50 mM, EDTA 1mM, PVPP insoluble 1%, MeSH 0,1%, pH 7,5) a 4 °C. El homogeneizado resultante fue centrifugado a 10.000 g durante 10 min a 4 °C. Se tomaron 100 µl del sobrenadante y se les agregó 5 ml del reactivo de Azul Brillante de Coomassie, se agitó con vortex y se leyó la absorbancia a 595 nm. El cálculo de la concentración de proteínas se efectuó empleando una curva de calibración preparada con el reactivo de Coomassie y varias concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma Chemical Co).

### 2.3) Resultados y Discusión.

El mutante *Gd1d2* retiene la integridad del cloroplasto, así como cantidades elevadas de clorofilas y proteínas foliares (especialmente Rubisco) hasta estadios del ciclo en los cuales el genotipo silvestre ha perdido la mayor parte de las mismas (Guiamét et al 1990, Guiamét et al 1991, Guiamét y Gianibelli 1994, Guiamét y Gianibelli 1996). Esta retención de los componentes del cloroplasto ocurre, asimismo, en condiciones de sequía. A los 10 días de iniciado el tratamiento, el contenido total de clorofila (Tabla 1) fue significativamente mayor en las hojas de *Gd1d2* que en las de *Clark* en todos los tratamientos: un 18 % en los controles; un 35 % en las estresadas y un 25 % en las rehidratadas. En *Clark*, los 10 días de estrés hídrico aceleraron ligeramente la degradación de la clorofila. En los controles (regados) de *Clark*, el contenido total de clorofila disminuyó un 20% (en relación al día 0) mientras que en las plantas estresadas de *Clark* el contenido de clorofila disminuyó un 29 % durante el mismo período. En *Gd1d2* el estrés no aceleró la degradación de la clorofila en las plantas estresadas. En las plantas rehidratadas de *Clark*, la disminución del contenido de clorofila (en relación al día 0) fue del 29%, mientras que en *Gd1d2* fue un 10 % menor en relación al momento del inicio del tratamiento.

El contenido de proteínas solubles disminuyó luego de 10 días de sequía en las plantas de *Clark* estresadas y rehidratadas un 18% y 11%, respectivamente en relación a las regadas (Tabla 2, día 10). En *Gd1d2*, el contenido de proteínas disminuyó un 15 % durante el estrés en las plantas estresadas y un 4% en las rehidratadas (Tabla 2, día 10).

El estrés hídrico modificó el potencial agua de las hojas. A los 10 días del comienzo del tratamiento de estrés hídrico, el potencial agua (Tabla 3) fue menor en las plantas estresadas en relación a los controles. No hubo diferencias significativas entre las plantas controles, estresadas y rehidratadas de *Clark*, pero

Tabla 1- Contenido de clorofila ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) de la segunda hoja trifoliolada de plantas de soja del genotipo silvestre *Clark* y del mutante *Gd1d2*, controles (regadas a capacidad de campo), estresadas, y estresadas durante 7 días y vueltas a regar (rehidratadas). Los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (5% LSD). Cl a: clorofila a; cl b: clorofila b; cl t :clorofila total (a+b).

| Tratamiento               | DIA 0  |       |        | DIA 10  |        |        |
|---------------------------|--------|-------|--------|---------|--------|--------|
|                           | Cl a   | Cl b  | Cl t   | Cl a    | Cl b   | Cl t   |
| Clark controles           | 24,3 a | 8,3 a | 32,6 a | 18,8 c  | 7,3 c  | 26,2 c |
| Clark estresadas          |        |       |        | 16,3 c  | 6,8 c  | 23,2 c |
| Clark rehidratadas        |        |       |        | 16,4 c  | 6,8 c  | 23,3 c |
| <i>Gd1d2</i> controles    | 25,1 a | 9,1 a | 34,4 a | 23,2 ab | 9,1 ab | 31,8 b |
| <i>Gd1d2</i> estresadas   |        |       |        | 26 a    | 10 a   | 35,9 a |
| <i>Gd1d2</i> rehidratadas |        |       |        | 22,1 b  | 8,8 b  | 30,9 b |

sí las hubo entre las plantas estresadas y las controles y rehidratadas de *Gd1d2* (Tabla 3). Pese a que en *Gd1d2* el potencial agua de las plantas estresadas fue menor que en *Clark*, las diferencias entre ambos genotipos no fueron significativas.

La tasa fotosintética (TF, Fig.2) en los controles de ambos genotipos se mantuvo mas o menos constante a lo largo del experimento. Durante los primeros 5 días de sequía, la tasa fotosintética disminuyó significativamente en relación a los controles tanto en las plantas estresadas de *Clark* (56% respecto al control) como de *Gd1d2* (62%). A los 7 días de tratamiento, la TF fue significativamente menor en

Tabla 2- Contenido de proteína soluble ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) de la segunda hoja trifoliolada de plantas de soja del genotipo silvestre *Clark* y del mutante *Gd1d2*, bien regadas, estresadas, y estresadas durante 7 días y vueltas a regar (rehidratadas). Los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (5 % LSD).

| Tratamiento               | Día 0 | Día 10 |
|---------------------------|-------|--------|
| <i>Clark</i> regadas      | 307 a | 300 a  |
| <i>Clark</i> estresadas   |       | 246 b  |
| <i>Clark</i> rehidratadas |       | 267 ab |
| <i>Gd1d2</i> regadas      | 310 a | 330 a  |
| <i>Gd1d2</i> estresadas   |       | 279 a  |
| <i>Gd1d2</i> rehidratadas |       | 317 a  |

las plantas estresadas de ambos genotipos en relación a los controles (72% menor en *Clark* y un 54% menor en *Gd1d2*), pero no hubo tampoco diferencias significativas entre los genotipos en un mismo tratamiento. El día 10 no hubo diferencias significativas en la TF entre las plantas estresadas de *Clark* y *Gd1d2*, ni entre las rehidratadas de ambos genotipos.

La conductancia foliar total en las plantas estresadas (gs, Fig.3) disminuyó durante los primeros 5 días de sequía en relación a los controles, tanto en *Clark* (37% menos que el control) como en *Gd1d2* (36%). El día 7 la diferencia entre plantas estresadas y controles de ambos genotipos fue significativa (43% menos en *Clark* y 44% en *Gd1d2*). El día 10 no hubo diferencias entre ninguno de los tratamientos. La transpiración instantánea (E, Fig.4) siguió un comportamiento semejante al de la gs.

Tabla 3 -Potencial agua (MPa) de la primera hoja trifoliolada de plantas de soja del genotipo silvestre *Clark* y del mutante *Gd1d2*, bien regadas, estresadas, y estresadas durante 7 días y vueltas a regar (rehidratadas). Los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (5% LSD).

| Tratamiento               | Dia 0   | Dia 10   |
|---------------------------|---------|----------|
| <i>Clark</i> regadas      | -0,52 a | -0,54 a  |
| <i>Clark</i> estresadas   |         | -0,90 ab |
| <i>Clark</i> rehidratadas |         | -0,60 a  |
| <i>Gd1d2</i> regadas      | -0,48 a | -0,50 a  |
| <i>Gd1d2</i> estresadas   |         | -1,16 b  |
| <i>Gd1d2</i> rehidratadas |         | -0,52 a  |

Si bien la tasa fotosintética en las plantas rehidratadas (Figura 2) resultó ligeramente mayor en *Clark*, no hubo diferencias significativas entre ambos genotipos. La gs fue similar en las plantas rehidratadas de ambos genotipos (Fig.3), por lo cual es probable que la menor tasa fotosintética del mutante no se debiera a limitaciones estomáticas. La recuperación de la capacidad fotosintética del mutante fue semejante a la del genotipo silvestre, pese a que en las plantas rehidratadas de *Gd1d2* el contenido de clorofila total fue significativamente mayor (Tabla 1).

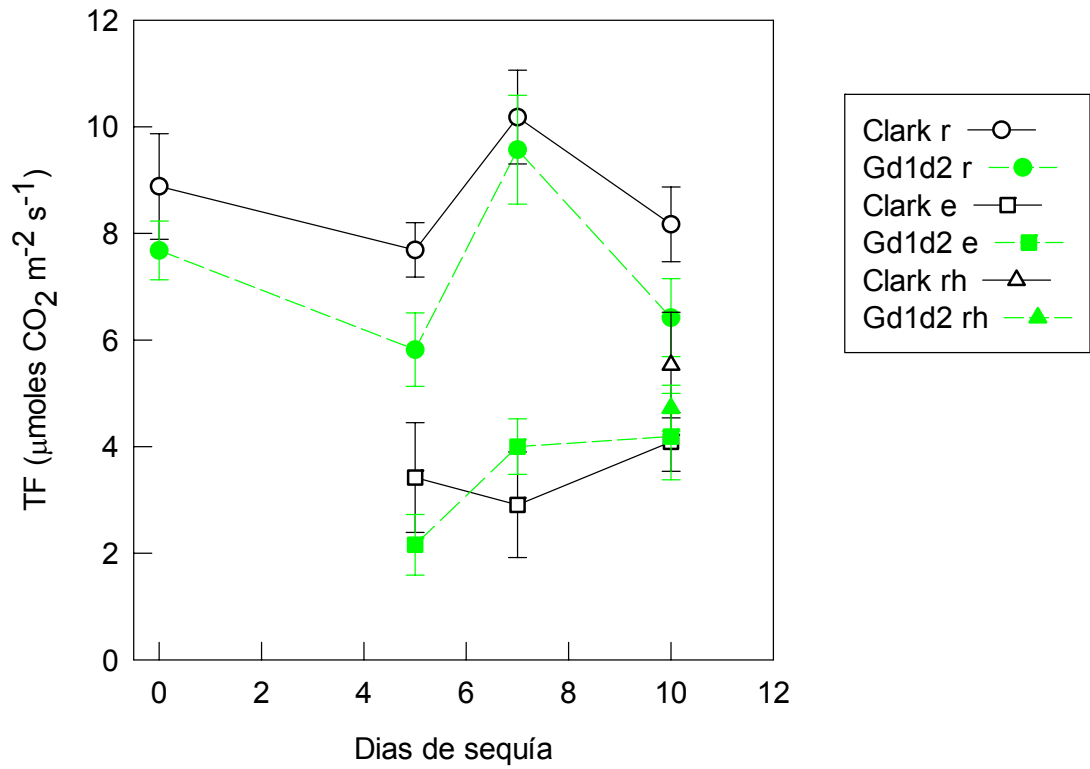


Figura 2 - Tasa fotosintética (TF) de plantas de soja del genotipo silvestre *Clark* y del mutante *Gd1d2*, bien regadas (*Clark r* y *Gd1d2 r*), estresadas (*Clark e* y *Gd1d2 e*) y estresadas durante 7 días y vueltas a regar (rehidratadas: *Clark rh* y *Gd1d2 rh*). Barras verticales :  $\pm$  un error estándar de la media.

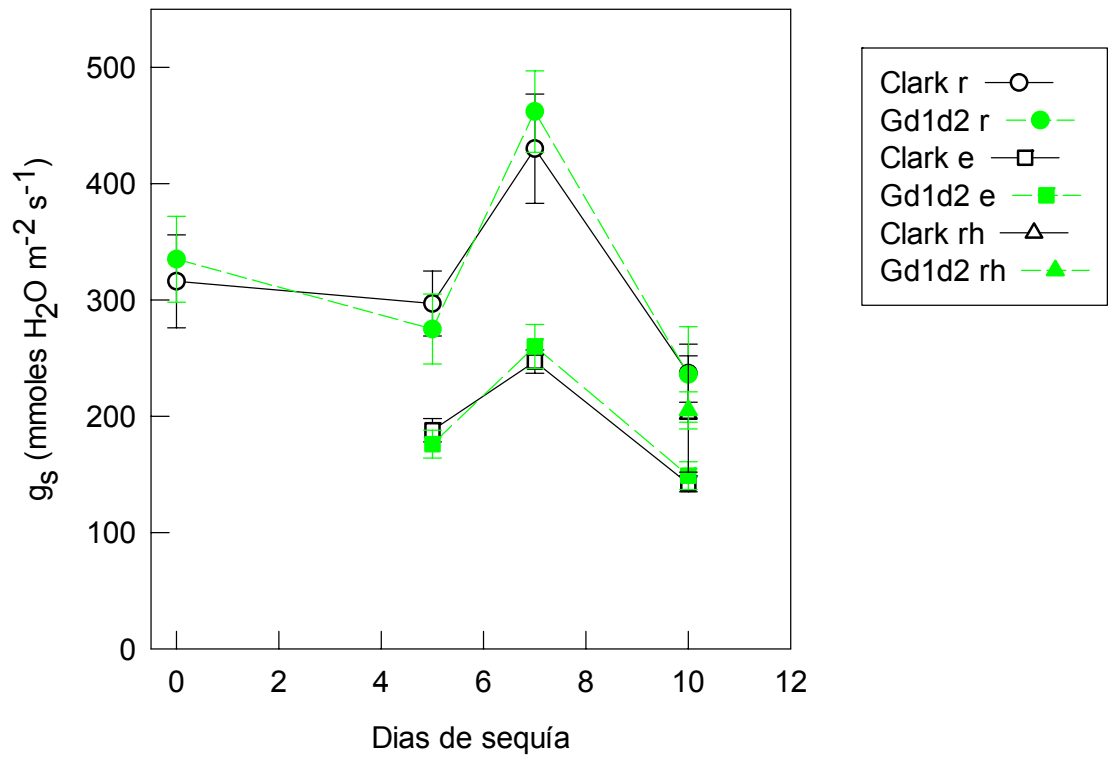


Fig 3 - Conductancia estomática total ( $g_s$ , superficie abaxial mas adaxial de la hoja) de plantas de soja del genotipo silvestre *Clark* y del mutante *Gd1d2*, bien regadas (*Clark r* y *Gd1d2 r*) estresadas, (*Clark e* y *Gd1d2 e*) y estresadas durante 7 días y vueltas a regar (rehidratadas: *Clark rh* y *Gd1d2 rh*). Barras verticales:  $\pm$  un error estándar de la media.



El período de estrés fue corto, porque aproximadamente a los 6 - 7 días de sequía, las hojas del mutante *Gd1d2* comenzaron a deshidratarse, las basales en primer lugar y continuando en forma secuencial hacia las apicales (Fig.5). Una proporción elevada de los folíolos de las plantas estresadas de *Gd1d2* se deshidrataron irreversiblemente (Fig.5 y Tabla 4), aún cuando retuvieron mayores contenidos de clorofila y proteína soluble que el genotipo silvestre. Hay que señalar que el hecho de contar únicamente los folíolos con mas del 50 % de la superficie deshidratada (Tabla 4) subestima el grado de deshidratación, ya que no se contaron hojas en las que recién comenzaba este fenómeno (v.g, con menos de la mitad de su superficie seca). No se contabilizaron tampoco los folíolos que habían abscindido. La deshidratación de las hojas del mutante no se refleja exactamente en los valores de potencial agua (tabla 3) debido a que no se midieron hojas que presentaran alguna parte seca, solamente se midieron hojas que no hubieran comenzado a secarse. Los datos muestran que la deshidratación de *Gd1d2* es progresiva, ya que el porcentaje es mayor en las plantas estresadas a los 10 días de sequía que en las rehidratadas 3 días antes, que representarían el estado de las estresadas a los 7 días de sequía. Además, las primeras hojas en experimentar la deshidratación son las basales, progresando en sentido ascendente de la misma forma que la senescencia secuencial. Las hojas del mutante *stay-green* se deshidrataron a un valor de  $\Psi_{\text{suelo}}$  superior (entre -0,8 y -1 MPa) al necesario para que ese fenómeno ocurriera en *Clark*, donde ocurre a aproximadamente -1,5 MPa (Luquez V., observación personal). Al volver a regar las plantas, el destino de los folíolos parcialmente marchitos de *Gd1d2* dependió del área de dicha zona: si estaban totalmente secos, abscindían, si la zona seca no era muy grande, permanecían en la planta, pero el sector seco no desapareció. Por lo

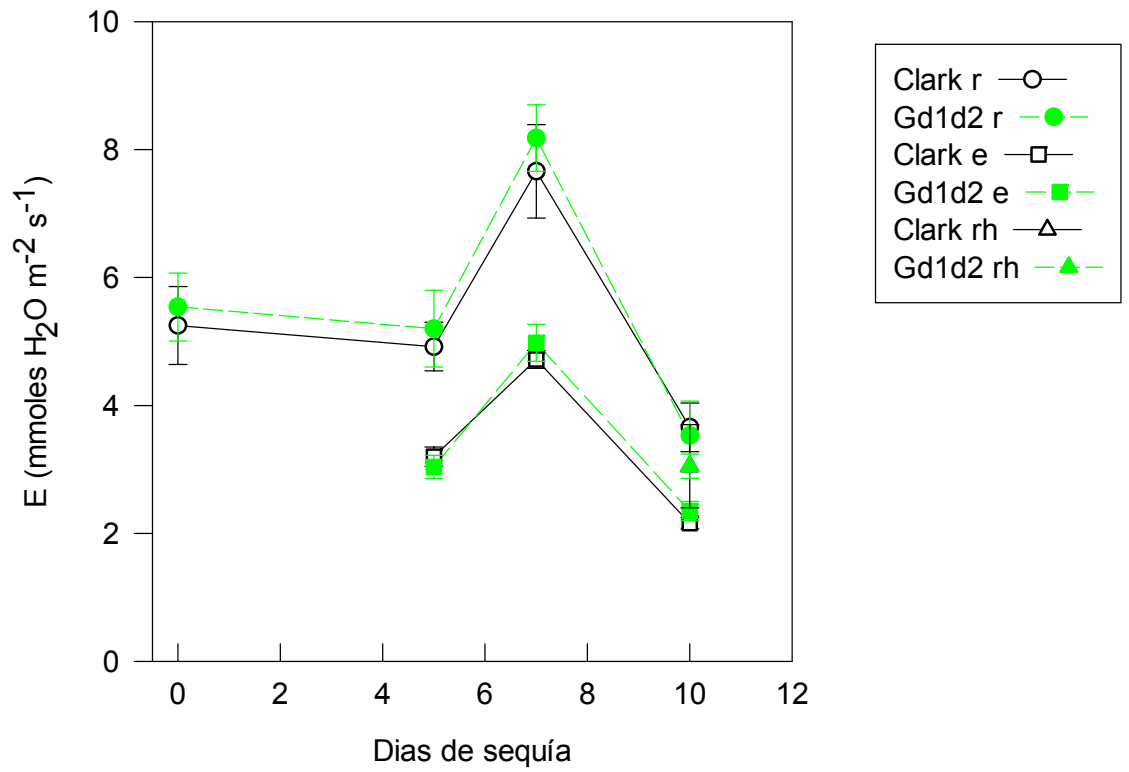


Fig. 4 - Transpiración total ( $E$ , superficie abaxial mas adaxial de la hoja) de plantas de soja del genotipo silvestre *Clark* y del mutante *Gd1d2*, bien regadas (*Clark r* y *Gd1d2 r*), estresadas (*Clark e* y *Gd1d2 e*), y estresadas durante 7 días y vueltas a regar (rehidratadas: *Clark rh* y *Gd1d2 rh*). Barras verticales:  $\pm$  un error estándar de la media.

Fig.5 - Fotografía que muestra (de izquierda a derecha): una planta de *Clark* regada, una de *Clark* estresada, de *Gd1d2* regada y de *Gd1d2* estresada. En la planta estresada de *Gd1d2*, las hojas basales están visiblemente deshidratadas, en contraste con las hojas de las plantas estresadas del genotipo silvestre *Clark*, que no presentan dicho fenotipo.

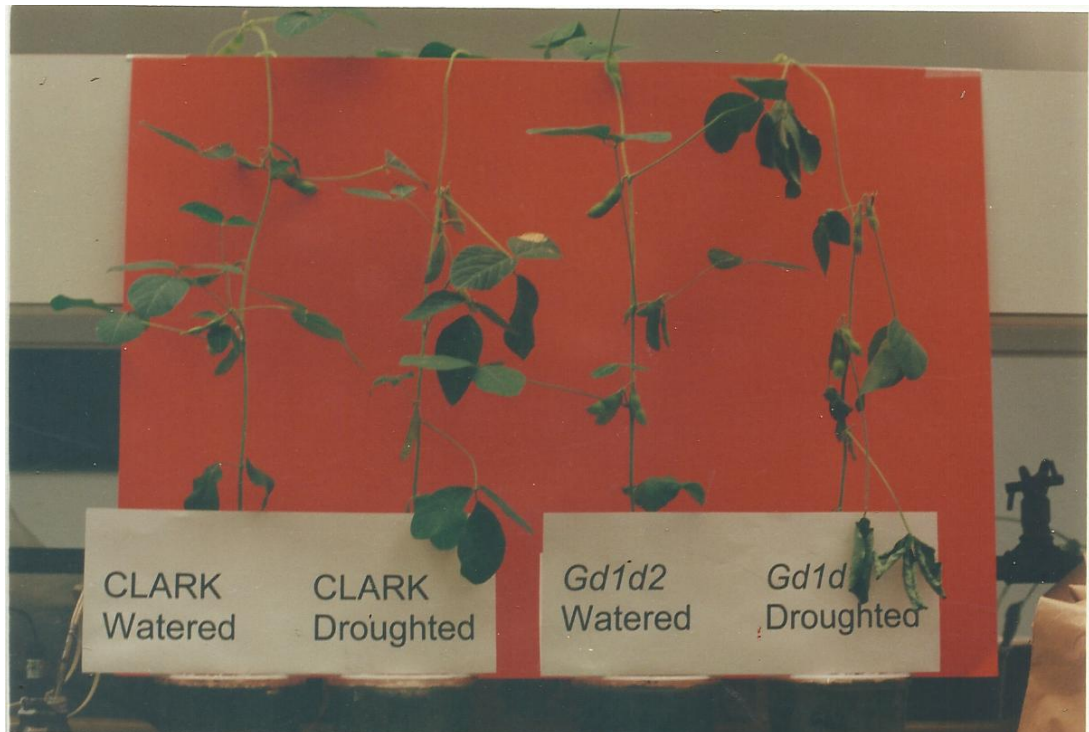


Tabla 5- Porcentaje de folíolos con más del 50% de la superficie seca (estimado visualmente) de plantas de soja del genotipo silvestre *Clark* y del mutante *Gd1d2*, bien regadas, estresadas, y estresadas durante 7 días y vueltas a regar (rehidratadas). Los valores corresponden al último día (día 10). Se contaron sólo los folíolos que permanecían en las plantas, sin tener en cuenta los que habían abscindido. Los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (5% LSD).

| Tratamiento               | Folíolos secos > 50 % (%) |
|---------------------------|---------------------------|
| <i>Clark</i> regadas      | 3,5 a                     |
| <i>Clark</i> estresadas   | 5,4 a                     |
| <i>Clark</i> rehidratadas | 3,5 a                     |
| <i>Gd1d2</i> regadas      | 1,80 a                    |
| <i>Gd1d2</i> estresadas   | 26,0 b                    |
| <i>Gd1d2</i> rehidratadas | 12,8 a                    |

tanto, el mutante *Gd1d2* es más sensible a la sequía que el genotipo silvestre. Esta mayor sensibilidad a la sequía de *Gd1d2* tiene otras consecuencias. En las plantas que senescen normalmente, el estrés hídrico acelera la senescencia foliar, provocando la reducción del área foliar fotosintetizante (Tardieu 1996). Una ventaja del retraso de la senescencia en condiciones de estrés es que dicha reducción es menor (Gwathmey et al 1992). En el caso del mutante *Gd1d2*, pese a retener la integridad del cloroplasto durante la senescencia foliar, el área foliar fotosintetizante se ve igualmente reducida por la deshidratación y posterior abscisión de las hojas, como consecuencia de su mayor sensibilidad a la sequía.

En los siguientes capítulos de la tesis, se caracterizará con mayor profundidad la respuesta del mutante ante la sequía y rehidratación (Capítulo 3), y se intentará dilucidar las causas de su mayor sensibilidad ante el estrés (Capítulo 3

y subsiguientes). Los capítulos siguientes tuvieron la finalidad de:

- a) Caracterizar la respuesta de plántulas de *Gd1d2* y el genotipo silvestre a la sequía y rehidratación (Cap.3).
- b) Determinar si *Gd1d2* es capaz de realizar ajuste osmótico en condiciones de sequía (Cap.3).
- c) Examinar la sensibilidad de *Gd1d2* a la hormona ácido abscísico (Cap.4).
- d) Determinar la relación entre la transpiración cuticular, la senescencia foliar y la resistencia a la sequía (Cap.5).
- e) Determinar cuál (o cuáles) genes causantes del fenotipo stay green del mutante son responsables de su mayor sensibilidad a la sequía (Cap.6).
- f) Establecer si las mutaciones *G*, *d1* y *d2* causan algún efecto sobre el rendimiento y sus componentes en plantas creciendo con adecuado suministro de agua, en condiciones naturales de temperatura, humedad relativa e irradiancia (Cap.7).

## CAPÍTULO 3

Caracterización de la respuesta del mutante *GGd1d1d2d2*  
a la sequía y posterior rehidratación.

### 3.1) Introducción.

Pese a que *Gd1d2* no degrada varios componentes del cloroplasto (vg. Clorofila, Rubisco) en situaciones de sequía, sus hojas experimentan una deshidratación irreversible a niveles de estrés mucho menores que los requeridos para provocar el mismo fenómeno en el genotipo silvestre. La deshidratación de las hojas del mutante *Gd1d2* ocurre también en plantas con adecuada disponibilidad hídrica al final del ciclo de vida (Guamét et al 1990). Evidentemente, el mutante *stay green Gd1d2* es mas sensible a la sequía que el genotipo silvestre (que senesce normalmente). Esto sugiere que los genes mutados tienen un efecto pleiotrópico sobre algún proceso necesario para tolerar la sequía, o bien que la degradación del cloroplasto es necesaria para tolerar la misma. Con el objeto de dilucidar la relación entre la senescencia foliar y la tolerancia a la sequía, se caracterizó con mayor profundidad la respuesta de *Gd1d2* al estrés y se plantearon varias hipótesis acerca de las posibles causas de su mayor sensibilidad a la sequía.

Una de las respuestas adaptativas al estrés por sequía es el ajuste osmótico, que consiste en la acumulación de compuestos osmóticamente activos que permiten a las células mantener la turgencia con poca disponibilidad de agua (Nilssen y Orcutt 1996). El ajuste osmótico hace que las plantas puedan continuar extrayendo agua del suelo cuando el potencial agua del mismo ha disminuido, y a los órganos jóvenes les permite mantener la turgencia para continuar creciendo (Nilsen y Orcutt 1996). El ajuste osmótico se puede producir por la acumulación de iones ( $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Na^+$ ) o ácidos orgánicos en la vacuola, ya que su concentración en el citosol interferiría con el metabolismo celular. En el citoplasma, por lo tanto, se acumulan los denominados solutos compatibles, que no interfieren con el metabolismo celular, como la prolina, glicina-betaína, etc (Nilssen y Orcutt 1996).

El cierre estomático inducido por la sequía causa una disminución de la fijación de  $CO_2$  (Begg 1980, Tardieu 1996) y, consecuentemente la disponibilidad de esqueletos carbonados y de energía para el funcionamiento de las diversas rutas

metabólicas es menor (Nilsen y Orcutt 1996). La síntesis de ácidos orgánicos o solutos compatibles podría verse, en consecuencia, limitada por la menor actividad fotosintética de las hojas. La degradación de proteínas y lípidos del cloroplasto como consecuencia de la sequía, podría proporcionar esqueletos carbonados y energía necesarios para la síntesis de solutos compatibles. La inhibición de la degradación del cloroplasto en *Gd1d2* podría limitar su capacidad de realizar el ajuste osmótico, y causar su mayor sensibilidad a la sequía. Para corroborar esta hipótesis, se midió el potencial soluto a hidratación máxima del mutante *Gd1d2* y del genotipo silvestre bajo condiciones de sequía.

Los objetivos de esta parte de mi tesis fueron:

- a) Caracterizar la respuesta del genotipo mutante *Gd1d2* a la sequía y rehidratación, siguiendo indicadores del estado hídrico de las hojas (contenido relativo y absoluto de agua, potencial agua y potencial soluto, conductancia estomática y transpiración instantánea) y la senescencia foliar (conductancia estomática, contenido de clorofila) durante un episodio de estrés, y luego de reanudarse las condiciones hídricas adecuadas.
- b) Evaluar la capacidad de ajuste osmótico de las hojas del mutante *stay-green* durante un episodio de sequía.

#### Abreviaturas utilizadas.

CA : contenido de agua.

CRA: contenido relativo de agua.

$\Psi$ : potencial agua.

$\Psi_s$ : potencial soluto.

*Gd1d2*: *GGd1d1d2d2*.

gs : conductancia estomática total (superficie abaxial mas adaxial).

E : transpiración instantánea total.



DFFF: densidad de flujo fotónico fotosintético.

### 3.2) Materiales y métodos.

#### **3.2.1) Cultivo de las plantas.**

En los experimentos siguientes se utilizaron plántulas de 3 semanas, y las mediciones se efectuaron en las hojas unifolioladas, ya que el fenómeno de desecación de las hojas de *Gd1d2* ocurre tanto en las plántulas como en las plantas en estado reproductivo. La utilización de plántulas permitió realizar un mayor número de experimentos al acortar la duración del período de crecimiento previo al tratamiento de estrés.

Las semillas de ambos genotipos (*Clark*, genotipo silvestre, y el mutante *Gd1d2*) germinaron en cajas de Petri con papel de filtro y agua destilada, en estufa a 28° C. Luego de 3 o 4 días fueron transplantadas a potes de plástico de 500 cm<sup>3</sup> con 400 g de suelo. Las plantas permanecieron en un invernáculo con irradiancia y fotoperíodo naturales hasta que comenzó la expansión de las hojas unifolioladas (7-10 días). En ese momento, fueron trasladadas a una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 10 h y 200-350  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de DFFF, proporcionados por lámparas de mercurio halogenado. La DFFF se midió con un sensor de cuantos Licor conectado a un Data Logger Licor LI 1000. Para minimizar las diferencias en la irradiancia, las plántulas fueron cambiadas de posición diariamente. La temperatura varió entre 32 y 24 °C (día-noche). Las plántulas fueron regadas a saturación hasta la imposición del tratamiento de estrés, que comenzó a las 3 semanas de la siembra.

#### **3.2.2) Tratamiento de estrés.**

El tratamiento de estrés se impuso suspendiendo el riego hasta alcanzar un potencial agua del suelo de -0,8 a -1 MPa, estimado de la misma manera como se describió en el capítulo 2. Debido a las diferencias en la cantidad de agua transpirada

por cada planta (causada por las variaciones aleatorias de la irradiancia) se agregó agua a todas las plantas estresadas hasta llegar al mismo peso de aquellas que transpiraban menos (v.g., aquellas macetas estresadas cuyo peso era mayor) y diariamente se cambiaba de posición a las macetas. De esta forma, se logró que todas las plantas se estresaran a velocidades semejantes. El suelo de las macetas tardó entre 4 y 5 días en alcanzar el potencial agua de -0,8 a -1 MPa. A partir de ese momento, el nivel de estrés se mantuvo pesando diariamente los pots y reponiendo el agua evapotranspirada.

### **3.2.3) Contenido relativo de agua (CRA).**

Todas las mediciones se efectuaron sobre las hojas unifolioladas durante el período nocturno (si no se indica lo contrario) para evitar las fluctuaciones en el estado hídrico de las hojas que ocurren a lo largo del día. Se tomaron folíolos intactos, sobre los que se determinó el peso fresco (PF), luego se colocaron en viales con el extremo del pecíolo sumergido en agua destilada y se mantuvieron toda la noche en heladera (4 - 8 °C), para determinar el peso fresco a hidratación máxima (PFH). Luego los folíolos se secaron en estufa a 80 °C durante 2 d y se determinó el peso seco (PS). El CRA se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{CRA} = (\text{PF} - \text{PS} / \text{PFH} - \text{PS}). 100$$

### **3.2.4) Contenido de agua (CA).**

Se determinó el peso fresco (PF) de un folíolo, que luego se secó en estufa a 80 °C durante 2 d para determinar el peso seco (PS).

En un experimento se discriminó entre la parte seca y la húmeda de las hojas de *Gd1d2*.

El contenido de agua se determinó de acuerdo a la fórmula:

$$\text{Contenido de agua (\%)} = 1 - \text{PS} / \text{PF} \times 100$$

### **3.2.5) Potencial agua de las hojas.**

Se midió sobre discos de las hojas unifolioladas con cámaras Wescor C52 y un higrómetro Wescor HR 33T, por el método del punto de rocío.

### **3.2.6) Potencial soluto de las hojas.**

Se determinó sobre las mismas hojas en las que previamente se había medido el potencial agua. En primer lugar, las hojas fueron llevadas a hidratación máxima de la misma manera que para el CRA, para evitar registrar erróneamente como ajuste osmótico el aumento de la concentración de solutos causada por la pérdida de agua. Luego se secó cuidadosamente el exceso de agua con papel tisú, se envolvieron las hojas con papel de aluminio y se colocaron al menos 1 h en freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las hojas se mantuvieron durante un mínimo de 30 min a temperatura ambiente para evitar que el vapor de agua del aire se condensara sobre las hojas al retirar el papel de aluminio. A continuación, el jugo celular se extrajo prensando las hojas a través de una jeringa de tuberculina de 1 ml (con aguja) con una capa de lana de vidrio de aproximadamente 0,5 mm de espesor en el extremo de la aguja, para retener los restos celulares. Con el jugo celular así obtenido se embebió un disco de papel de filtro (del mismo tamaño que el disco de hoja tomado para medir potencial agua) y el potencial soluto se midió por el método del punto de rocío con las cámaras Wescor C52 unidas al higrómetro Wescor HR 33T.

### **3.2.7) Conductancia estomática (gs) y transpiración instantánea (E).**

Se determinaron con un porómetro LICOR LI 1600, en las hojas unifolioladas, bajo una DFFF de  $1000\text{ }\mu\text{moles m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ , proporcionada por una lámpara dicróica filtrada por un baño de agua para evitar cambios en la temperatura de las hojas durante las mediciones. Las mediciones se llevaron a cabo siempre a la misma hora (1 hora después de iniciado el período lumínico).

### **3.2.8) Contenido de clorofila.**

Se determinó sobre discos de 0,55 cm de diámetro, que fueron extraídos con N,N-dimetilformamida, y calculando el contenido de clorofila de acuerdo con Inskeep y Bloom (1985).

### **3.2.9) Determinación de la apertura estomática en base a improntas epidérmicas.**

Las improntas (D'Ambrogio de Argueso 1986) de la epidermis abaxial de ambos genotipos se efectuaron colocando una fina capa de resina epoxi transparente (Poxipol), que fue retirada con una pinza luego que polimerizó (10 min). Las improntas fueron observadas con un fotomicroscopio óptico Carl Zeiss II. La apertura relativa de los estomas se determinó midiendo el ancho y el largo con una reglilla micrométrica, y calculando la relación ancho / largo : cuanto mayor es dicha relación, mas abiertos están los estomas.

### 3.3) Resultados y discusión.

La Tabla 5 muestra el contenido de clorofila a, b y total (a+b) de plantas regadas y estresadas de ambos genotipos. La sequía no aceleró significativamente la degradación de la clorofila en las plantas estresadas del genotipo silvestre en relación a los controles bien regados, donde evidentemente ya había comenzado la senescencia, pues el contenido de clorofila disminuyó en relación al día 0 (comienzo del tratamiento de sequía). No hubo degradación de la clorofila en los controles ni en las plantas estresadas de *Gd1d2*. Los resultados son semejantes a los obtenidos en plantas en el estado reproductivo (Capítulo 2), donde se puede apreciar que la sequía no acelera la degradación de la clorofila en *Gd1d2*, y sólo ligeramente en *Clark*.

En la Figura 6 B se puede observar la evolución de la deshidratación en los folíolos de *Gd1d2* a medida que se prolonga el período de estrés. Este proceso

Tabla 5 - Contenido de clorofila a (cl a); clorofila b (cl b) y clorofila total (cl t = a+b) en  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , de las hojas unifolioladas de plántulas de soja del genotipo silvestre *Clark* y del mutante *Gd1d2*, bien regadas (cont.: controles) y sometidas a sequía (estres.: estresadas). Los valores seguidos de la misma letra no difieren al 5 % (LSD).

|                     | DIA 0  |       |        | DIA 7  |        |        | DIA 9  |        |        |
|---------------------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                     | cl a   | cl b  | cl t   | Cl a   | cl b   | cl t   | cl a   | cl b   | cl t   |
| <i>Clark</i> cont.  | 27,1 b | 7,8 b | 34,9 b | 24,8 c | 7,6 c  | 32,4 c | 22,7 b | 7,1 b  | 29,8 b |
| <i>Clark</i> stres. |        |       |        | 22,6 c | 6,9 c  | 29,5 c | 21,3 b | 6,4 b  | 27,7 b |
| <i>Gd1d2</i> cont.  | 30,5 a | 9,0 a | 39,5 a | 30,3 b | 9,3 b  | 39,7 b | 31,6 a | 9,9 a  | 41,4 a |
| <i>Gd1d2</i> stres  |        |       |        | 33,9 a | 10,4 a | 44,3 a | 33,5 a | 10,5 a | 44,0 a |

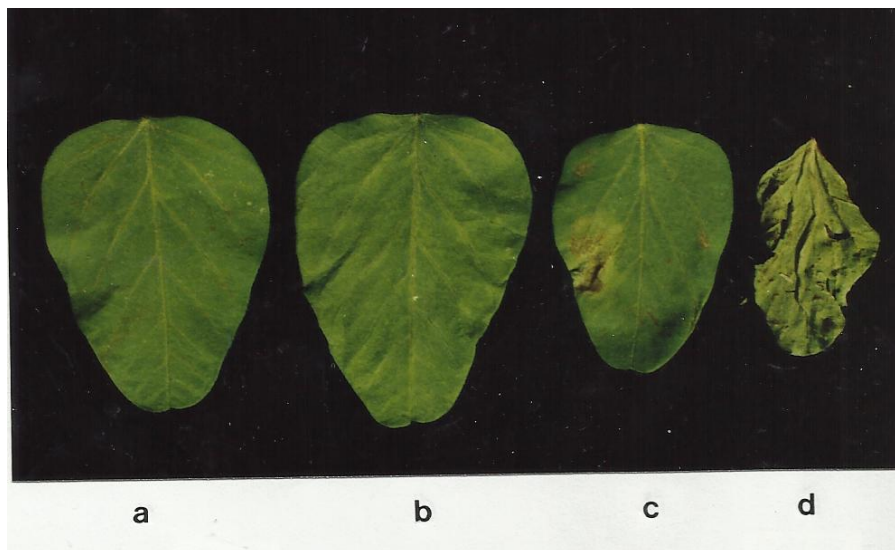
comienza en áreas pequeñas de los bordes, y estas áreas aumentan su superficie hasta finalmente abarcar toda la lámina.

En la Fig.7, se muestra la evolución del  $\Psi$  y el CRA a lo largo del tratamiento de sequía en ambos genotipos. El  $\Psi$  comenzó a declinar en las plantas estresadas de ambos genotipos a partir del cuarto día de interrupción del riego, pero mientras en *Clark* el nivel se estabilizó en los días siguientes a alrededor de -2 MPa, en *Gd1d2* la caída continuó hasta -3,1 MPa a los 7 días de sequía, donde la diferencia entre las plantas estresadas de ambos genotipos fue estadísticamente significativa. El CRA comenzó a disminuir en las plantas estresadas de *Gd1d2* a partir del tercer día, y esta declinación continuó durante los cuatro días siguientes hasta alcanzar un CRA del 50 %. En *Clark*, la declinación del CRA comenzó a partir del quinto día, y continuó,

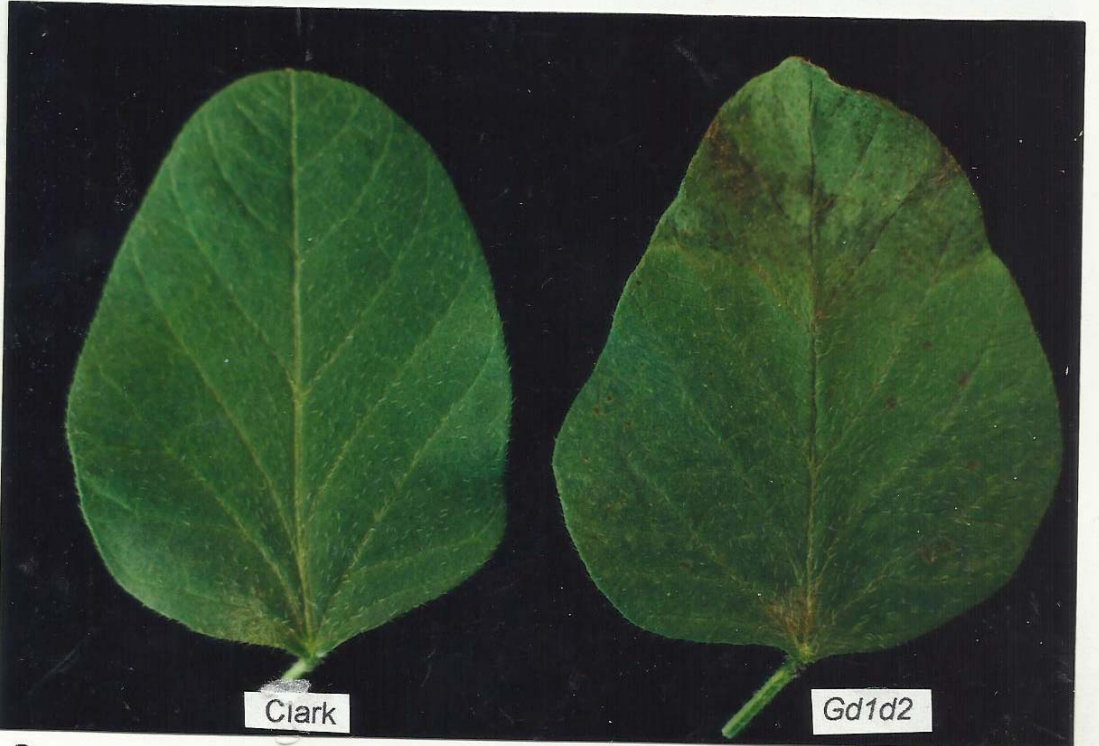
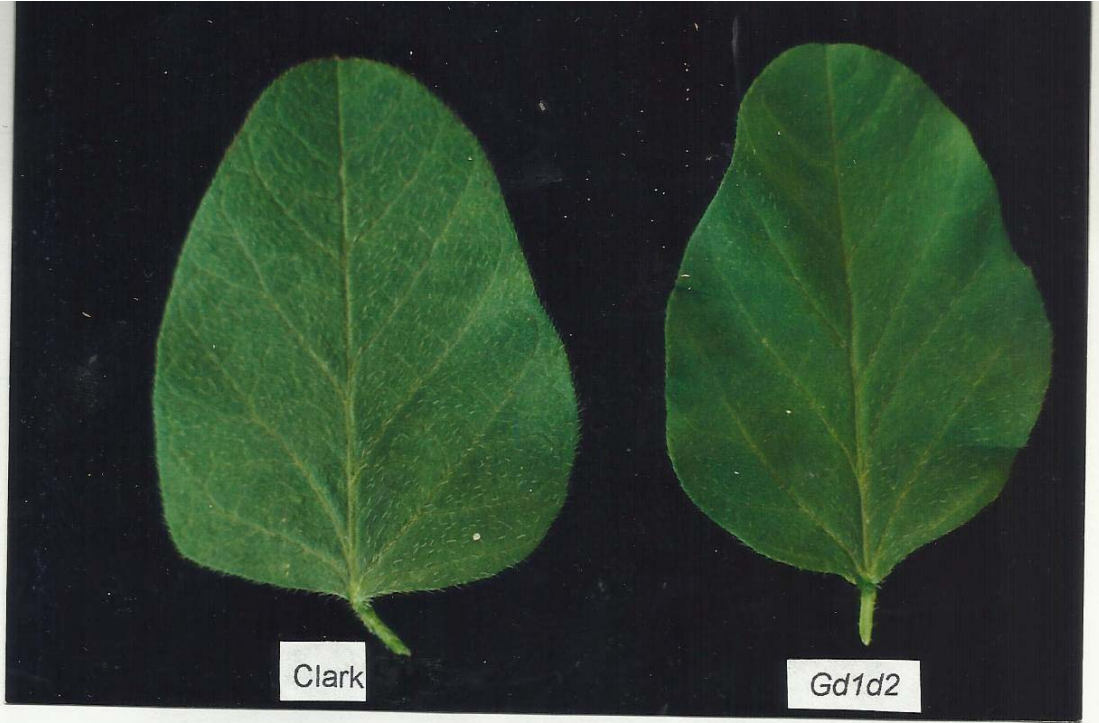
Fig. 6. A – Fotografía que muestra plantas de 3 semanas, regadas y sometidas a sequía, del genotipo silvestre cv Clark y del mutante *Gd1d2*. Se observa claramente la marcada deshidratación de las hojas unifolioladas de *Gd1d2* en comparación con el genotipo silvestre.

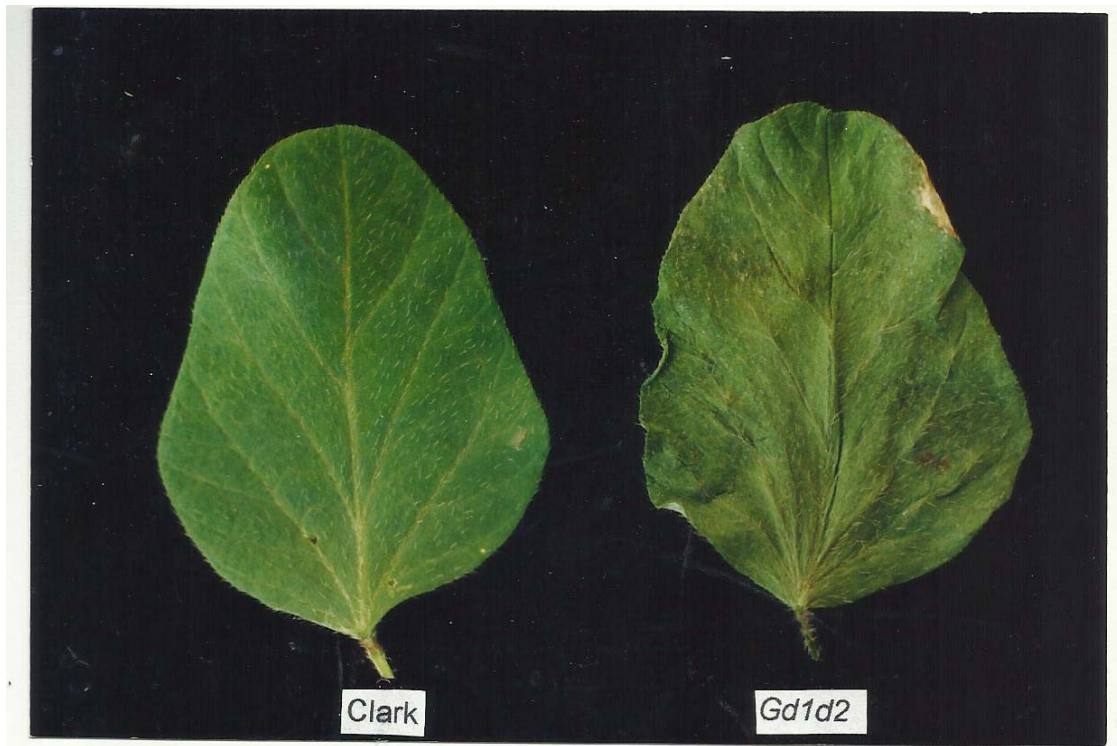


B - Fotografías de hojas unifolioladas de *Gd1d2* mostrando diversos grados de deshidratación. 1a: hoja de una planta bien regada. 1b: hoja de una planta estresada que todavía no ha comenzado a secarse. 1c: hoja parcialmente seca. 1d: hoja totalmente seca.



C - Fotografías que muestran hojas de *Clark* y *Gd1d2* a medida que transcurre el estrés.





3



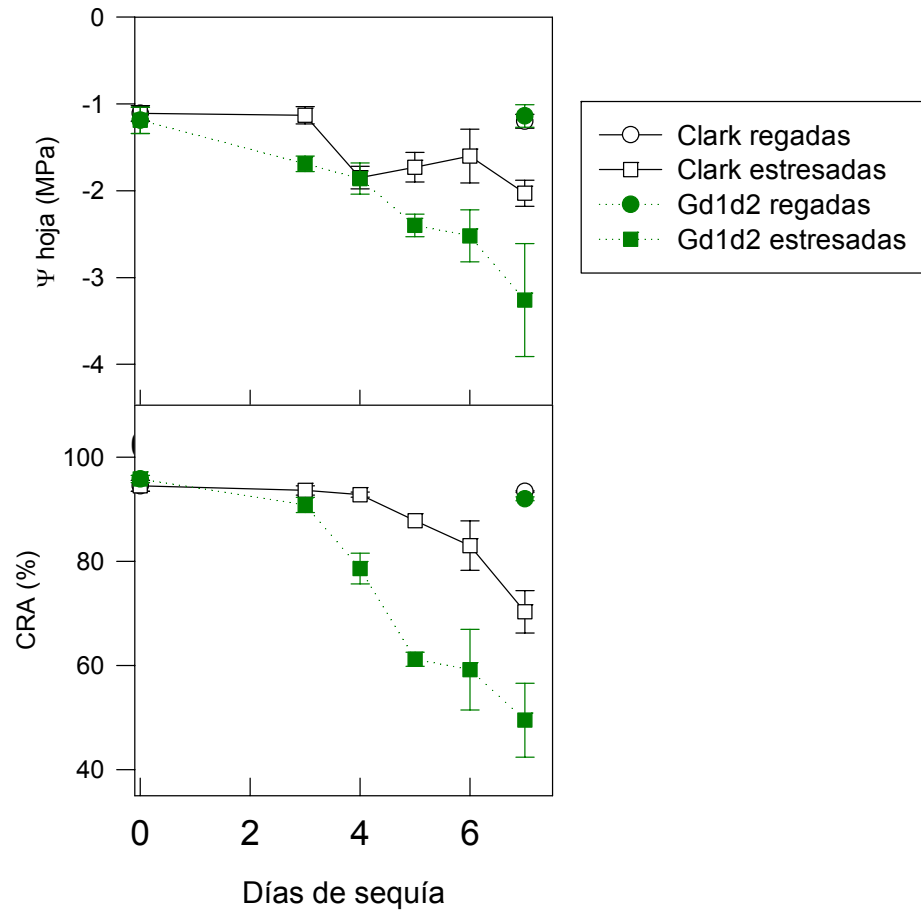


Fig. 7 - Potencial agua ( $\Psi_{\text{hoja}}$ , MPa) y contenido relativo de agua (CRA, en porcentaje) de hojas unifolioladas de plántulas de soja del cv *Clark* y del mutante *Gd1d2*, regadas (r) y sometidas a sequía (e). Barras verticales:  $\pm$  un error estándar de la media.

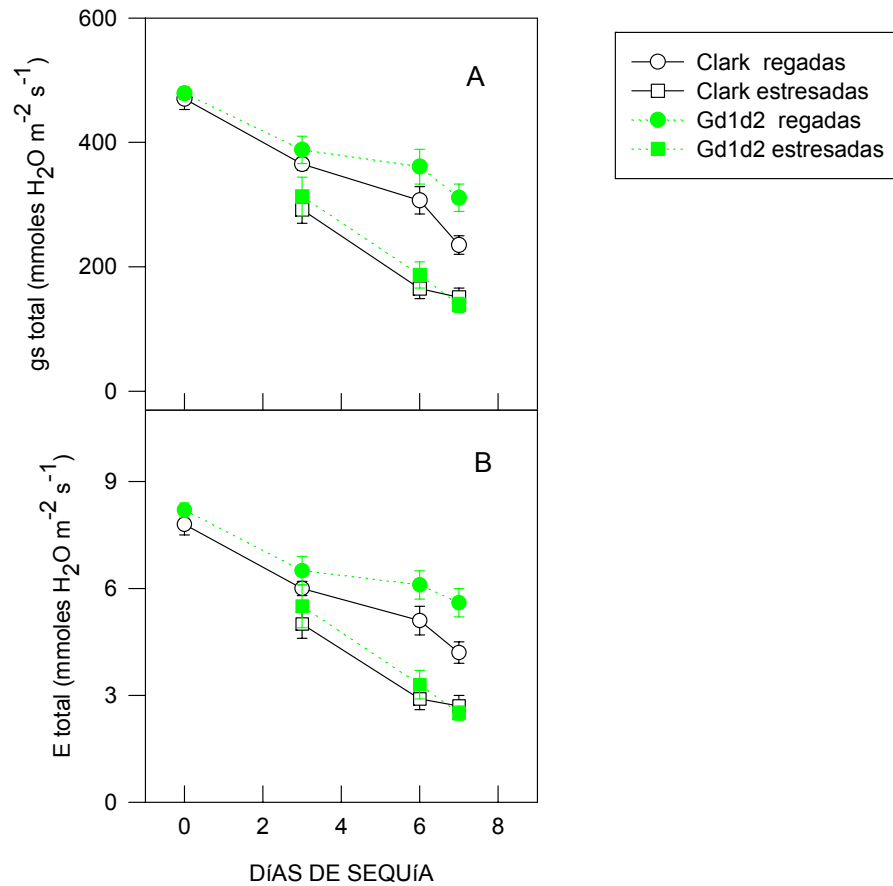


Fig. 8 - Conductancia estomática total (gs abaxial + adaxial, en mmoles H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y transpiración instantánea total (E abaxial + adaxial, en mmoles H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) de las hojas unifolioladas de plántulas de soja del cv *Clark* y del mutante *Gd1d2*, regadas y sometidas a sequía. Barras verticales:  $\pm$  un error estándar de la media.

aunque en forma mucho menos marcada que en *Gd1d2*, hasta alcanzar un 72 % a los 7 días de sequía. Las diferencias en el CRA en las plantas estresadas fueron significativas a partir del quinto día de sequía.

Tabla 6 - Potencial agua ( $\Psi$ , MPa) y contenido relativo de agua (CRA, en porcentaje) de hojas unifolioladas de plántulas de *Clark* y *Gd1d2* a un potencial suelo de -0,7 MPa. Los valores seguidos de la misma letra no difieren al nivel del 5 % (LSD).

| Genotipo     | $\Psi$ (MPa) | CRA (%) |
|--------------|--------------|---------|
| <i>Clark</i> | -1,84 a      | 77,7 a  |
| <i>Gd1d2</i> | -2,50 a      | 56,6 b  |

El mayor error estándar de la media de las plantas estresadas de *Gd1d2* los días 6 y 7 se debe a que comenzaron a secarse las hojas, y su contenido de agua consecuentemente es mas variable que en el genotipo silvestre. Se incluyeron hojas de los estadios b y c (Fig.6), respetando en la muestra la proporción en que aparecían en el total de folíolos de plantas estresadas. Los valores de  $\Psi$  son exclusivamente de las áreas no deshidratadas, en el caso de las hojas del estadio c. En la Tabla 6 se muestran los valores de potencial agua y CRA para un  $\Psi_{\text{suelo}}$  de -0,7 MPa. Con dicho nivel de estrés, el  $\Psi$  de *Gd1d2* es un 26 % menor que el del genotipo silvestre *Clark*, y el CRA un 27 % menor, indicando que las hojas estresadas de *Gd1d2* perdieron agua mas rápidamente que el genotipo silvestre. Todos estos resultados son consistentes: la declinación del estado hídrico ( $\Psi$ , CRA) de las hojas es más rápida en el mutante que en el genotipo silvestre para valores similares de  $\Psi_{\text{agua}}$  del suelo. El diferente comportamiento de ambos genotipos sugiere que, ante una situación de sequía, en *Clark* se activan mecanismos que le permiten mantener un mejor

Tabla 7 - Apertura estomática relativa (ancho / largo del estoma) de la superficie abaxial de hojas unifolioladas de plántulas de soja del genotipo silvestre *Clark* y del mutante *Gd1d2* regadas y sometidas a sequía (estresadas). Las mediciones se realizaron durante el período diurno. Los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente al nivel del 5 % (LSD).

| Tratamiento             | Día 0  | Día 7  |
|-------------------------|--------|--------|
| Clark regadas           | 0,51 a | 0,67 a |
| Clark estresadas        |        | 0,38 c |
| <i>Gd1d2</i> regadas    | 0,56 a | 0,47 b |
| <i>Gd1d2</i> estresadas |        | 0,36 c |

estado hídrico, y que dichos mecanismos no se expresan en el mutante *Gd1d2*.

La Figura 8 muestra la evolución de la conductancia estomática total (superficie abaxial mas adaxial, panel A), y de la transpiración instantánea total (panel B), a lo largo del período de sequía. Tanto *g<sub>s</sub>* como *E* declinaron en las plantas regadas de ambos genotipos. La disminución de ambos parámetros en las plantas estresadas fue semejante en magnitud en ambos genotipos, ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las plantas estresadas de *Clark* y *Gd1d2*, pero sí entre estas y los controles. Estos resultados son semejantes a los obtenidos en el capítulo 2, y muestran que la deshidratación en *Gd1d2* probablemente no esté relacionada con una mayor *g<sub>s</sub>*. Los datos de apertura estomática (Tabla 7) confirman los resultados obtenidos con el porómetro, ya que la apertura estomática medida en las improntas epidérmicas fue semejante en las plantas estresadas de *Clark* y *Gd1d2*.

El estrés hídrico provoca fenómenos de cavitación y embolismo en plantas

Tabla 8 - Contenido relativo de agua (CRA) en porcentaje, de plántulas de soja del genotipo silvestre *Clark* y del mutante *Gd1d2* regadas (R), sometidas a sequía (E) y a sequía seguida de rehidratación (Rh). Rh I: 1h 15', Rh II: 3h 30', Rh III :5 h 30' y Rh IV: 7h 20' de rehidratación . Las mediciones se realizaron durante el período diurno. Los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente al nivel del 5 % (LSD).

| Tratamiento         | CRA - Día 0 | CRA - Día 4 |
|---------------------|-------------|-------------|
| <i>Clark R</i>      | 95,1 a      | 94,5 a      |
| <i>Clark E</i>      |             | 70,6 b      |
| <i>Clark Rh I</i>   |             | 92,5 a      |
| <i>Clark Rh II</i>  |             | 94,5 a      |
| <i>Clark Rh III</i> |             | 94,4 a      |
| <i>Clark Rh IV</i>  |             | 95,9 a      |
| <i>Gd1d2 R</i>      | 95,4 a      | 94,6 a      |
| <i>Gd1d2 E</i>      |             | 59,5 c      |
| <i>Gd1d2 Rh I</i>   |             | 92,7 a      |
| <i>Gd1d2 Rh II</i>  |             | 93,5 a      |
| <i>Gd1d2 Rh III</i> |             | 94,7 a      |
| <i>Gd1d2 Rh IV</i>  |             | 94,5 a      |

Tabla 9 - Potencial agua (MPa) de plántulas de soja del genotipo silvestre *Clark* y del mutante *Gd1d2* regadas (R), sometidas a sequía (E) y a sequía seguida de rehidratación (Rh). Rh I: 1h 15', Rh II: 3h 30', Rh III :5 h 30' y Rh IV: 7h 20' de rehidratación. Las mediciones se realizaron durante el período diurno. Los valores seguidos de la misma letra no difieren al 5 % (LSD).

| Tratamiento         | Día 0   | Día 4   |
|---------------------|---------|---------|
| Clark R             | -1,38 a | -1.16 a |
| Clark E             |         | -1,95 a |
| Clark Rh I          |         | -1,63 a |
| Clark Rh II         |         | -1,45 a |
| Clark Rh III        |         | -1,34 a |
| Clark Rh IV         |         | -1,48 a |
| <i>Gd1d2</i> R      | -1.63 a | -1,32 a |
| <i>Gd1d2</i> E      |         | -2,46 b |
| <i>Gd1d2</i> Rh I   |         | -1,32 a |
| <i>Gd1d2</i> Rh II  |         | -1,42 a |
| <i>Gd1d2</i> Rh III |         | -1,44 a |
| <i>Gd1d2</i> Rh IV  |         | -1,42 a |

Tabla 10 - Contenido de agua (en porcentaje) de las hojas unifolioladas de plántulas de soja del cv *Clark* y del mutante *Gd1d2* regadas, sometidas a sequía (estresadas) y sometidas a un ciclo de sequía y rehidratación (rehidratadas). En *Gd1d2* se indican por separado la parte seca (s) e hidratada (h) de la lámina. Los valores seguidos de la misma letra no difieren al 5 % (LSD).

| Tratamiento                  | DIA 0  | DIA 7  | DIA 8  |
|------------------------------|--------|--------|--------|
| <i>Clark control</i>         | 86,9 a | 87,3 a | 88,7 a |
| <i>Clark estresadas</i>      |        | 85,2 a | 79,6 b |
| <i>Clark rehidratadas</i>    |        |        | 88,1 a |
| <i>Gd1d2 control</i>         | 88,4 a | 88,0 a | 85,8 a |
| <i>Gd1d2 estresadas(h)</i>   |        | 78,7 b | 76,9 b |
| <i>Gd1d2 estresadas(s)</i>   |        | 45,5 c | 35,5 d |
| <i>Gd1d2 rehidratadas(h)</i> |        |        | 86,7 a |
| <i>Gd1d2 rehidratadas(s)</i> |        |        | 52,0 c |

sometidas a sequía, reduciendo la conductividad hidráulica del xilema (Tyree y Sperry 1989, Tyree y Ewers 1991, Neufeld et al 1992). Esta disminución de la conductividad hidráulica puede ser revertida al restablecerse las condiciones hídricas adecuadas (Tyree y Sperry 1989). Si esta recuperación no ocurre, el crecimiento y productividad de las plantas resultan comprometidos (Tyree y Sperry 1989). En sorgo, Cruz et al (1992) encontraron que el estrés hídrico disminuía la conductividad hidráulica de las raíces, en parte debido a la mayor deposición de lignina y suberina en la endodermis e hipodermis. En este último caso, la disminución de la conductividad hidráulica no es reversible, como en el embolismo, y al reanudarse el suministro de agua la limitación

Tabla 11 - Potencial agua (MPa) de las hojas unifolioladas de plántulas de soja del cv *Clark* y de *Gd1d2* regadas, sometidas a sequía (estresadas) y a un ciclo de sequía y rehidratación (rehidratadas). En *Gd1d2* se indican por separado la parte seca (s) e hidratada (h) de la lámina. Los valores seguidos de la misma letra no difieren al 5 % (LSD).

| Tratamiento                  | DIA 0   | DIA 7   | DIA 8   |
|------------------------------|---------|---------|---------|
| <i>Clark control</i>         | -1,02 a | -1,53 a | -1,1 a  |
| <i>Clark estresadas</i>      |         | -2,49 b | -2,76 b |
| <i>Clark rehidratadas</i>    |         |         | -1,23 a |
| <i>Gd1d2 control</i>         | -0,88 a | -1,43 a | -1,22 a |
| <i>Gd1d2 estresadas(h)</i>   |         | -2,51 b | -2,73 b |
| <i>Gd1d2 estresadas(s)</i>   |         | -8,43 c | -8,47 c |
| <i>Gd1d2 rehidratadas(h)</i> |         |         | -1,31 a |
| <i>Gd1d2 rehidratadas(s)</i> |         |         | -8,35 c |

al flujo continuaría, impidiendo que el estado hídrico de las hojas se recupere a los niveles previos al estrés. Estas vinculaciones de la senescencia foliar y el estrés hídrico con variaciones en la conductividad hidráulica del xilema sugerirían que esta podría estar implicada en la determinación del fenotipo de *Gd1d2*. Si durante la sequía, la conductividad hidráulica del xilema del mutante disminuye irreversiblemente por una obstrucción permanente en el xilema (como el caso citado anteriormente Cruz et al 1992), el flujo de agua no se restablecería al reasumirse las condiciones hídricas adecuadas, y las hojas de *Gd1d2* finalmente se secarían. Se ha encontrado que la



Tabla 12 - Potencial agua ( $\Psi$ ) y potencial soluto a hidratación máxima ( $\Psi_s$ ), expresados en MPa, de las hojas unifolioladas de plántulas de soja del genotipo silvestre *Clark* y del mutante *Gd1d2*, bien regadas y sometidas a sequía (estresadas). Los valores seguidos de la misma letra no difieren al 5 % (LSD).

| Tratamiento             | $\Psi$ - Día 0 | $\Psi_s$ - Día 0 | $\Psi$ - Día 7 | $\Psi_s$ - Día 7 | $\Psi$ - Día 9 | $\Psi_s$ - Día 9 |
|-------------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| <i>Clark</i> regadas    | -1,01 a        | -1,14 a          | -0,79 a        | -1,30 a          | -0,89 a        | -1,52 a          |
| <i>Clark</i> estresadas |                |                  | -1,67 b        | -1,55 a          | -1,68 b        | -1,50 a          |
| <i>Gd1d2</i> regadas    | -0,97 a        | -1,34 a          | -0,72 a        | -1,42 a          | -1,04 a        | -1,48 a          |
| <i>Gd1d2</i> estresadas |                |                  | -1,96 b        | -1,47 a          | -1,90 b        | -1,44 a          |

conductividad hidráulica del xilema disminuye durante la senescencia foliar, y que esta disminución comienza en las hojas basales y progresa secuencialmente hacia las apicales (Neumann y Stein 1984, Neumann 1987). Sin embargo los resultados obtenidos de los experimentos de sequía seguidos de rehidratación no muestran que esto ocurra en *Gd1d2*. Se realizaron 2 ensayos sometiendo las plantas a sequía y regándolas luego a capacidad de campo. En ambos experimentos, las mediciones se efectuaron durante el día. En un caso, se las regó a los 4 días de sequía, antes de que empezaran a deshidratarse las hojas de *Gd1d2*, y se midió el CRA y el  $\Psi$  a varias horas de la rehidratación (Tablas 8 y 9). Se puede observar que a poco mas de una hora de regadas, el CRA de ambos genotipos se ha recuperado al mismo nivel, y luego de 3 h no hay diferencia con los controles (Tabla 8). En el caso del  $\Psi$  la recuperación es semejante en ambos genotipos (Tabla 9). En el otro experimento, se estresaron las plantas hasta que las hojas comenzaron a secarse, y en ese momento se las rehidrató (tablas 10 y 11). En este caso, se midieron hojas del estadio c (parcialmente secas). Se determinó el contenido absoluto de agua y el  $\Psi$  por separado en los sectores seco y todavía hidratado (húmedo) de plantas estresadas y rehidratadas de *Gd1d2*. La medición se realizó al día siguiente de volver a regarlas a capacidad de campo. La Tabla 10 muestra que el contenido de agua se recuperó en las plantas rehidratadas del genotipo silvestre al mismo nivel que los controles. En el caso de *Gd1d2*, se puede ver que el contenido de agua se recupera al nivel de los controles (87 % en la parte húmeda de las plantas rehidratadas y 86 % en los controles) en la parte todavía hidratada al momento de regar, lo que no sucede con la parte seca (52 % contra 86 % de los controles). Los resultados son semejantes en el caso del  $\Psi_{\text{hoja}}$  (Tabla 11), donde el potencial agua de la parte no deshidratada de las hojas rehidratadas fue de -1,31 MPa, y de -8,35 MPa en la parte seca, contra -1,22 MPa en los controles regados. En ambos experimentos de sequía seguida de rehidratación, el estado hídrico de las hojas del mutante y el genotipo silvestre se

recupera en forma semejante, lo cual no ocurriría si hubiera alguna obstrucción permanente en el xilema.

Para determinar si las plantas del genotipo silvestre y el mutante *Gd1d2* son capaces realizar ajuste osmótico, se midió el potencial soluto a hidratación máxima. Los resultados de la Tabla 12 muestran que tanto a los 7 como 9 días de sequía, el potencial agua de las plantas estresadas fue menor en *Gd1d2* que en el genotipo silvestre. A los 7 días de sequía el potencial soluto de *Clark* fue ligeramente menor que el de *Gd1d2* en las plantas estresadas. A los 9 d no hubo diferencias estadísticamente significativas en el potencial soluto entre las plantas estresadas y regadas de ambos genotipos, a pesar de que sí la hubo en el potencial agua. De los datos obtenidos, se puede deducir que la disminución del potencial agua de *Gd1d2* no fue un verdadero ajuste osmótico. Por el contrario, constituiría un ajuste del tipo 2, debido a la disminución de la fracción simplástica de agua, mas que a la acumulación de solutos (Nilsen y Orcutt 1996). Tampoco en el caso del genotipo silvestre hay ajuste osmótico. Esto probablemente se debe a que el ajuste osmótico es mas importante para mantener la turgencia en tejidos en crecimiento y permitir que este continúe en condiciones de estrés, como sucede en los ápices radiculares (Nilssen y Orcutt 1996, Mullet y Whittsit 1996). Las hojas que se midieron en ambos genotipos no estaban en crecimiento activo, y tal vez por eso no experimentaron ajuste osmótico.

De estos experimentos de sequía seguida de rehidratación se puede concluir que:

- a) El mutante *Gd1d2* es mas sensible a la sequía que el genotipo silvestre. La deshidratación de las hojas del mutante es irreversible a partir de que aparecen zonas secas en la lámina (Tablas 10 y 11). La deshidratación, tal como se aprecia en la Fig. 6, se hace visible en el mutante entre los 6 y 7 días de sequía.
- b) La conductancia estomática y la transpiración instantánea (Fig.8) declinan en forma semejante en *Gd1d2* y el genotipo silvestre ante una situación de sequía. Esto indica que probablemente la deshidratación de las hojas de *Gd1d2* no está relacionada con

una mayor conductancia estomática. Estos resultados, así como los de contenido de clorofila, son semejantes a los obtenidos con plantas en estado reproductivo (Capítulo 2).

c) La deshidratación de las hojas del mutante no se debe a la disminución irreversible de la conductividad hidráulica causada por una obstrucción permanente del xilema. Si esto fuera así, al volver a regar las plantas hasta capacidad de campo, el contenido de agua de las hojas que todavía no se hubieran secado (parte hidratada) no se recuperaría a niveles semejantes a los de las plantas con buen suministro de agua, tal como ocurrió en los experimentos descritos aquí (Tablas 7, 8, 9 y 10).

d) No hay diferencias en el potencial soluto a hidratación máxima entre el genotipo silvestre y *Gd1d2* (Tabla 12). Consecuentemente, la deshidratación de las hojas del mutante no se debe a que este sea incapaz de realizar ajuste osmótico.

## CAPÍTULO 4

Regulación de la apertura estomática en el mutante  
*GGd1d1d2d2* por el estrés hídrico y el ácido abscísico  
(ABA).

#### 4.1) Introducción.

Los resultados obtenidos en los capítulos precedentes indican que el mutante *Gd1d2* es más sensible al estrés hídrico que el genotipo silvestre. La principal hormona implicada en las respuestas adaptativas al estrés hídrico es el ácido abscísico (ABA) que regula la apertura estomática y la expresión de diversos genes de resistencia a la sequía (Davies y Zhang 1991; Hetherington y Quatrano 1991, Vartanian 1996; Bartels et al 1996, Shinozaki y Yamaguchi Shinozaki 1997). Los mutantes deficientes en la producción de ABA muestran un incremento de la pérdida de agua en la parte aérea cuando son sometidos a períodos de estrés hídrico (Vartanian 1996). Los resultados de los Capítulos 2 y 3 indican que la conductancia estomática al vapor de agua (gs) del mutante *Gd1d2* disminuye durante el estrés de la misma manera que la del genotipo silvestre. Sin embargo, las hojas del mutante se deshidratan, mientras que las del genotipo silvestre no lo hacen. La apertura estomática no es el único proceso regulado por el ABA, ya que esta hormona también interviene, como se indicó anteriormente, en la expresión de genes de resistencia a la sequía. Si el genotipo mutante *Gd1d2* sintetizara menos ABA, o fuera menos sensible al mismo, el cierre de los estomas observado durante el estrés podría producirse igualmente por un mecanismo hidropasivo, debido a la deshidratación de las células oclusivas causada por la excesiva pérdida de agua, lo cual, obviamente, no puede distinguirse del cierre activo con las mediciones estándar de conductancia difusiva. Se ha indicado que el ABA puede acelerar la senescencia foliar en algunas especies (Noodén 1988 c) sin embargo, la aplicación exógena de ABA no aceleró la degradación de la clorofila en el mutante *GGd1d1d2d2* (Guiamét y Gianibelli 1994). Este hecho podría indicar una menor sensibilidad de *Gd1d2* al ABA, que se traduciría en una deshidratación mas rápida debido a que no se expresan los genes de resistencia a la sequía regulados por el mismo.

Los objetivos de los experimentos descritos en este capítulo fueron:

a) Determinar si existen diferencias entre el mutante *Gd1d2* y el genotipo silvestre en la

sensibilidad del cierre estomático ante la aplicación exógena de ABA.

b) Establecer si la aplicación exógena de ABA revierte la deshidratación de las hojas del mutante *Gd1d2*.

#### Abreviaturas utilizadas.

CRA: contenido relativo de agua.

gab: conductancia estomática al vapor de agua de la superficie abaxial de la hoja.

DFFF: densidad de flujo fotónico fotosintético.

ABA: ácido abscísico.

*Gd1d2*: *GGd1d1d2d2*.

PEG: polietilenglicol 4000.

#### 4.2) Materiales y métodos.

##### **4.2.1) Cultivo de las plantas, tratamiento de estrés y aplicaciones de ácido abscísico (ABA).**

Las semillas de *Clark* y *Gd1d2* se hicieron germinar en cajas de Petri como se indicó en el cap.3, y luego fueron transplantadas a bandejas con vermiculita. Las bandejas se colocaron en una cámara de crecimiento, con condiciones de temperatura, irradiancia y fotoperíodo similares a los descritos en el Cap.3. Se realizaron 2 experimentos diferentes:

-Experimento 1: a partir de plántulas de 3 semanas se prepararon explantos cortando las plántulas inmediatamente encima del nudo cotiledonar, y volviéndolos a cortar bajo agua para evitar la formación de embolias en el xilema. Los explantos se prepararon 1 h antes de colocarlos en ABA, y se mantuvieron en oscuridad y sumergidos en agua destilada hasta ese momento. Estos explantos se colocaron en tubos conteniendo agua destilada (control) y diferentes concentraciones de ABA ( $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M;

$10^{-7}$  M, Sigma Chemical Co) justo antes del comienzo del período diurno. Las mediciones se llevaron a cabo entre 120 y 200 min después de comenzado el tratamiento con ABA, con los explantos mantenidos bajo una irradiancia de 250 - 350  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

-Experimento 2: plántulas de 15 d fueron trasladadas a potes de 1 L conteniendo 0,7 L de solución nutritiva completa (Leggett y Frere 1971), manteniéndolas en la misma cámara de crecimiento. A las 3 semanas se inició el tratamiento de estrés, que consistió en disminuir gradualmente el potencial agua de la solución nutritiva agregando polietilenglicol 4000 (PEG). Primero se llevó el potencial agua de la solución a - 0,1 MPa, luego a - 0,3 y finalmente a - 0,5 MPa, tardando 6 d en alcanzar este último valor. El potencial agua de la solución con PEG se determinó con sensores PST 55 unidos a un psicrómetro Wescor HR 33T, por el método del punto de rocío. Las aplicaciones de ABA comenzaron junto con el tratamiento de estrés. La aplicación se efectuó agregando ABA a la solución nutritiva a una concentración final de  $10^{-6}$  M. Al día siguiente de la aplicación, se midieron la  $g_s$  y E abaxiales, 7 h después del comienzo del período diurno y bajo las mismas condiciones de DFFF que en el experimento 1. En total fueron 4 tratamientos de cada genotipo:

- Controles (no estresadas) sin ABA.
- Controles (no estresadas) con ABA.
- Estresadas sin ABA.
- Estresadas con ABA.

A las plantas a las que no se suministró ABA, se les repuso el agua transpirada hasta completar 0,7 L cada 2 días. En las que se aplicó ABA, se repuso agua destilada + ABA  $10^{-6}$  M.

#### **4.2.2) Conductancia estomática ( $g_b$ ) y transpiración instantánea (E).**

La  $g_b$  y E se midieron con un porómetro LICOR LI 1600, en las hojas unifolioladas, bajo una DFFF de 1000  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionada por una lámpara



dicroica filtrada por un baño de agua, para evitar el sobrecalentamiento de las hojas. Las mediciones se efectuaron sobre la superficie abaxial. La  $g_s$  se midió en la superficie abaxial debido a que la mayor parte de los estomas se encuentran sobre dicha superficie, y la conductancia de la misma es la principal determinante de la conductancia total. Medir la conductancia de la superficie adaxial no hubiera alterado cualitativamente los valores obtenidos.

#### **4.2.3) Contenido relativo de agua (CRA).**

El CRA se midió como se indicó en el capítulo 3.

#### **4.2.4) Contenido de clorofila.**

El contenido de clorofila se determinó como se describe en el Capítulo 2.

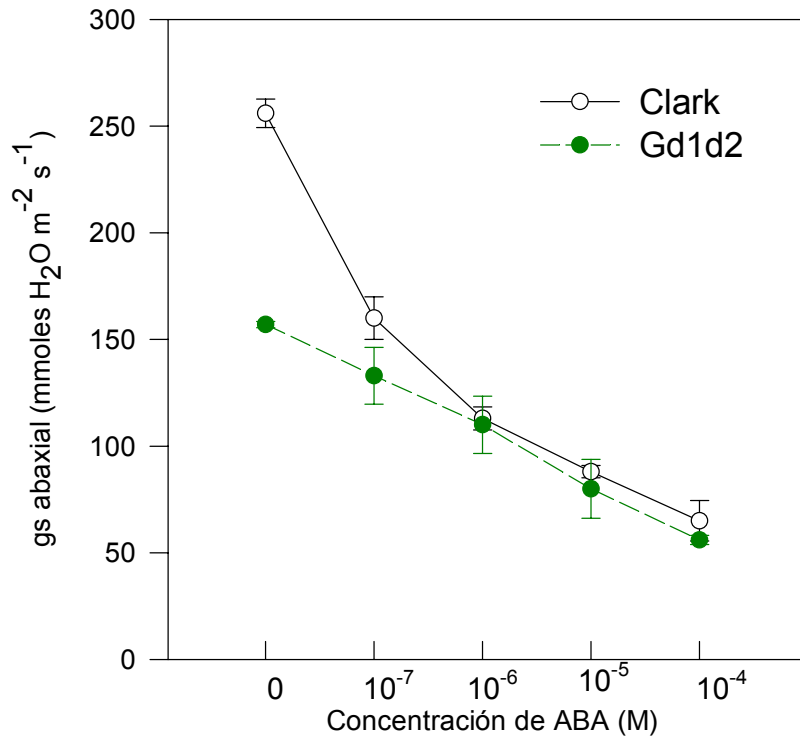


Fig. 9 - Conductancia estomática de la superficie abaxial de explantos del genotipo silvestre cv Clark y el mutante *Gd1d2* a los que se suministró diversas concentraciones de ABA por vía xilemática. Barras verticales:  $\pm$  un error estándar de la media.

#### 4.3) Resultados y discusión.

La aplicación exógena de ABA por vía xilemática redujo la *g<sub>ab</sub>* tanto en *Gd1d2* como en el genotipo silvestre (experimento 1, Fig. 9), y la reducción fue mayor con el aumento de la concentración de dicha hormona. En las plantas sumergidas en agua destilada (a las que no se aplicó ABA exógeno) y en la concentración mas baja de ABA ( $10^{-7}$  M) la *g<sub>s</sub>* fue mayor en *Clark* que en *Gd1d2* (Fig. 9), pero en los demás tratamientos hubo poca diferencia en la *g<sub>s</sub>* entre ambos.

En conclusión, los estomas de *Gd1d2* responden a la aplicación de ABA en forma semejante al genotipo silvestre, y no parece haber diferencias de sensibilidad a la hormona entre ambos.

En el experimento 2 se aplicó ABA exógeno a plantas de *Gd1d2* y *Clark* cultivadas hidropónicamente, algunas de las cuales fueron estresadas agregando PEG a la solución. La hormona se aplicó agregándola en concentración  $10^{-6}$  M a la solución nutritiva, y midiendo posteriormente la apertura estomática. La *g<sub>ab</sub>* fue menor en las plantas no estresadas a las que se les aplicó ABA que en aquellas que no fueron tratadas con dicha hormona (Fig.10 A). En las plantas no estresadas tratadas con ABA (Fig. 10 A) no hubo diferencias estadísticamente significativas entre *Clark* y *Gd1d2* en ninguna medición. En el caso de las plantas estresadas (Fig.10 B) a los 3 días de sequía hubo diferencias en la *g<sub>ab</sub>* entre las plantas tratadas o no con ABA. Pero a partir del día 6 no hubo diferencias en la *g<sub>ab</sub>* de *Clark* y *Gd1d2* estresadas tratadas con y sin ABA, debido probablemente a que los estomas estaban completamente cerrados en los controles (sin ABA) por el aumento del contenido endógeno de ABA causado por la sequía.

Con respecto a la transpiración instantánea abaxial (E, Fig.11), el comportamiento de *Gd1d2* y el genotipo silvestre fue semejante al de la *g<sub>ab</sub>*.

La aplicación exógena de ABA no aceleró la degradación de las clorofilas en las plantas de *Clark* con adecuado suministro hídrico (Tabla 13). El estrés hídrico

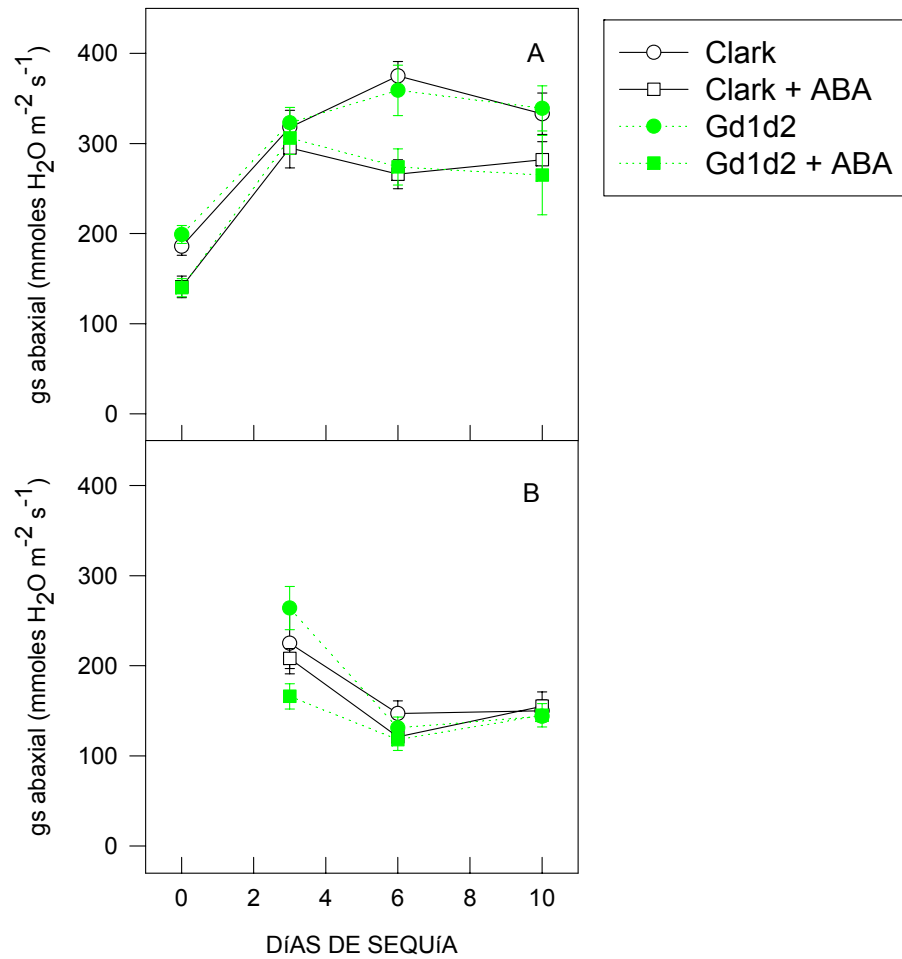


Fig. 10 - Conductancia estomática al vapor de agua de la superficie abaxial de hojas unifolioladas de plántulas de soja del genotipo silvestre *Clark* y del mutante *Gd1d2*, no estresadas (A) y sometidas a sequía (B), a algunas de las cuales se les aplicó ABA  $10^{-6}$  M. Barras verticales:  $\pm$  un error estándar de la media.

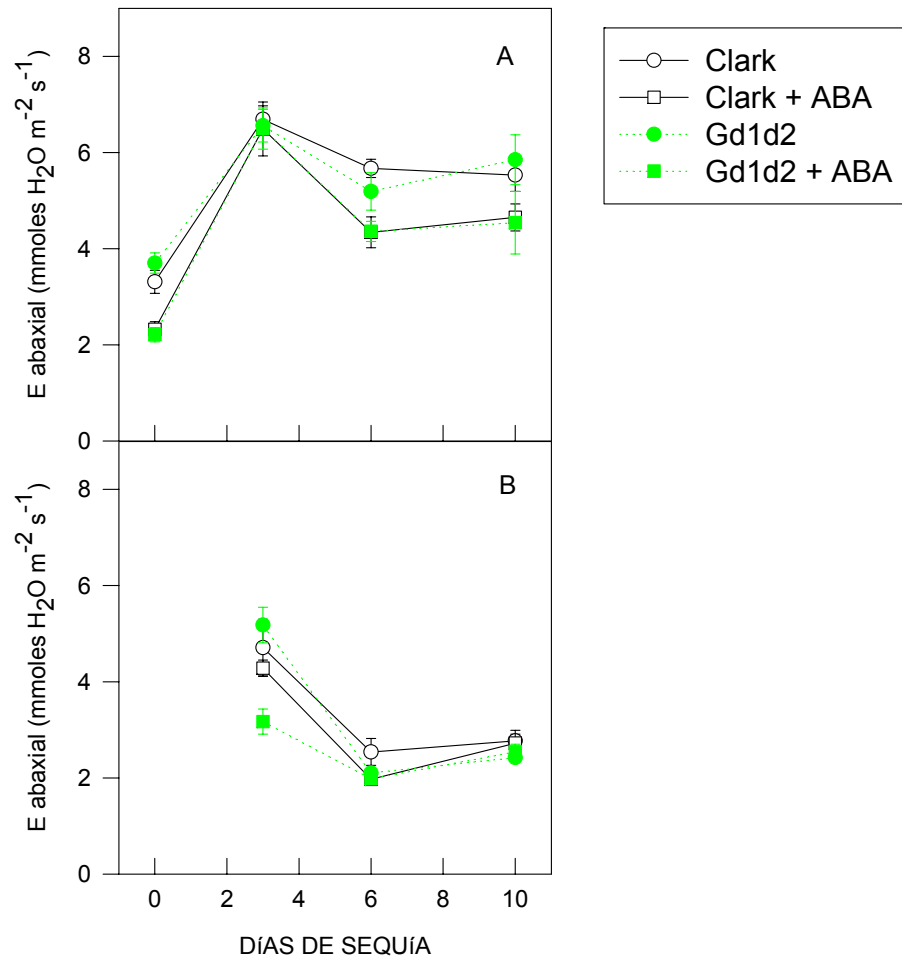


Fig.11 - Transpiración instantánea ( $E$ ) de la superficie abaxial de hojas unifolioladas de plántulas de soja del genotipo silvestre *Clark* y del mutante *Gd1d2*, no estresadas (A) y sometidas a sequía (B), a algunas de las cuales se aplicó ABA  $10^{-6}$  M. Barras verticales:  $\pm$  un error estándar de la media.

Tabla 13 - Contenido de clorofila a (cl a), clorofila b (cl b) y clorofila total (a+b, cl t), en microgramos por cm<sup>2</sup>, de plántulas de soja del cv *Clark* y el mutante *Gd1d2*, no estresadas (controles) y sometidas a sequía, a algunas de las cuales se aplicó ácido abscísico 10<sup>-6</sup> M (ABA). Los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (5 % LSD).

| Genotipo     | Tratamiento | ABA | Cl a - Día 0 | Cl b - Día 0 | Cl t - Día 0 | Cl a - Día 9 | Cl b - Día 9 | Cl t - Día 9 |
|--------------|-------------|-----|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>Clark</i> | Control     | No  | 34,1 a       | 10,5 a       | 44,5 a       | 35,8 a       | 11,5 a       | 47,4 ab      |
|              |             | Si  | 33,1 a       | 10,5 a       | 43,6 a       | 37,2 a       | 11,8 a       | 49,0 a       |
| <i>Clark</i> | Estresadas  | No  |              |              |              | 30,7 b       | 9,9 b        | 40,6 c       |
|              |             | Si  |              |              |              | 29,4 b       | 10,0 b       | 39,3 c       |
| <i>Gd1d2</i> | Control     | No  | 34,1 a       | 11,0 a       | 45,1 a       | 37,6 a       | 12,8 a       | 50,4 b       |
|              |             | Si  | 35,0 a       | 11,6 b       | 46,7 a       | 35,3 a       | 11,6 a       | 46,9 ab      |
| <i>Gd1d2</i> | Estresadas  | No  |              |              |              | 36,1 a       | 12,4 a       | 48,5 ab      |
|              |             | Si  |              |              |              | 33,9 a       | 11,7 a       | 45,6 ab      |

Tabla 14 - Contenido relativo de agua (CRA) de plántulas de soja del cv *Clark* y el mutante *Gd1d2*, controles y estresadas, a algunas de las cuales se aplicó ácido abscísico  $10^{-6}$  M (ABA). Los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (5 % LSD).

| Genotipos    | Tratamientos | ABA | CRA (%) |         |         |
|--------------|--------------|-----|---------|---------|---------|
|              |              |     | DIA 0   | DIA 6   | DIA 9   |
| <i>Clark</i> | Control      | No  | 96,1 a  | 96,2 a  | 96,6 ab |
|              |              | Si  | 96,6 a  | 96,0 a  | 96,8 a  |
| <i>Clark</i> | Estresada    | No  |         | 93,0 a  | 91,0 ab |
|              |              | Si  |         | 93,0 a  | 89,6 b  |
| <i>Gd1d2</i> | Control      | No  | 94,9 a  | 94,8 a  | 95,3 ab |
|              |              | Si  | 96,6 a  | 95,5 a  | 96,4 ab |
| <i>Gd1d2</i> | Estresada    | No  |         | 88,2 ab | 81,2 c  |
|              |              | Si  |         | 83,0 b  | 80,2 c  |

aceleró la degradación de clorofila en las plantas estresadas de Clark en la misma medida, sin que hubiera diferencias estadísticamente significativas entre las plantas tratadas o no con ABA. En *Gd1d2*, ni la aplicación de ABA ni el estrés hídrico provocaron una degradación significativa de las clorofilas. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente, donde el ABA no revirtió el fenotipo *stay green* de *Gd1d2* (Guamét y Gianibelli 1994).

El contenido relativo de agua (CRA, Tabla 14) no difirió significativamente entre las plantas regadas de ambos genotipos, con o sin ABA. En cuanto a las plantas estresadas, el CRA de las plantas de *Clark* fue mayor que el de las de *Gd1d2*, tanto en aquellas tratadas con ABA como en las que no lo fueron. El día 6, el CRA de las plantas estresadas de Clark sin ABA fue un 5 % mayor que en *Gd1d2*, y un 11 % el día 9 (tabla 14). El CRA de las plantas estresadas de Clark tratadas con ABA fue un

10 % mayor que *Gd1d2*, tanto el día 6 como el 9. No hubo diferencias estadísticamente significativas en el CRA entre plantas estresadas del mismo genotipo a las que se aplicó ABA y aquellas que no recibieron la hormona. En otros experimentos realizados en macetas con tierra (Cap.3) las diferencias en el CRA de Clark y *Gd1d2* estresadas fueron mayores que las obtenidas aquí en el mismo período de tiempo (7-9 d). Pero esto se debió a que en el experimento hidropónico el potencial agua de la solución fue un poco mayor que el alcanzado en los experimentos con suelo. Pese a esto, es indudable que el ABA ingresó a las hojas, ya que afectó la conductancia estomática (Fig.10).

Sobre la base de los resultados obtenidos, se puede concluir que los estomas del mutante responden al ABA de forma semejante al genotipo silvestre (objetivo a).

Con respecto a la reversión del fenotipo de *Gd1d2* (esto es, la deshidratación de las hojas ante una situación de estrés, objetivo b) por el ABA, es evidente que la aplicación exógena de esta hormona no impidió la deshidratación de las hojas de *Gd1d2*. No se puede decir que *Gd1d2* es insensible al ABA, ya que sus estomas responden a esta hormona en forma semejante al genotipo silvestre (Fig. 9, 10 y 11). Dado que la aplicación exógena de ABA no revierte el fenotipo *stay green* de *Gd1d2* (Guiamét y Gianibelli 1994), se puede especular que los genes *G*, *d1* y *d2* operan una vía de tolerancia al estrés independiente del ABA. Para dilucidar este punto, habría que estudiar la expresión en *Gd1d2* de los genes que responden al estrés y al ABA (Bartels et al 1996, Shinozaki y Yamaguchi Shinozaki 1997).



## CAPÍTULO 5.

### Interrelación entre la senescencia foliar y la transpiración cuticular.

### 5.1) Introducción.

De acuerdo a los resultados obtenidos previamente (Capítulos 2 y 3) la causa de la deshidratación de las hojas de *Gd1d2* no es una mayor apertura estomática en condiciones de sequía. Asimismo, no parece haber diferencias en la sensibilidad al ABA entre el mutante *Gd1d2* y el genotipo silvestre (Cap. 4). Sin embargo, existe otro componente de la resistencia total a la transpiración que depende de la planta, y es la resistencia cuticular (Nobel 1992). La cutícula está compuesta por una matriz de cutina y suberina, en la cual se encuentran embebidas ceras que continúan como una capa amorfa hacia la superficie externa de la planta (Post Beittenmiller 1996). Las ceras están compuestas de una mezcla de diferentes lípidos: ácidos grasos de cadena larga (mayor a 18 carbonos), hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, triterpenos, esteroides y flavonoides (Post Beittenmiller 1996). Lo que hace a la cutícula impermeable al agua es la presencia de ceras; sin embargo, la permeabilidad no es homogénea, y va a depender de la estructura que adopten las ceras. En los sectores de la cutícula donde las ceras tienen una estructura cristalina, las moléculas de agua no pueden difundir, pero donde las ceras se depositan en forma irregular y amorfa, la permeabilidad de la cutícula al agua es mayor (Kerstiens 1996). La permeabilidad al agua va a depender también de la composición de las ceras, ya que la forma de las estructuras cristalinas depende de los ácidos grasos que las constituyen (Post Beittenmiller 1996). Existe variabilidad en la estructura y composición de las ceras y estas diferencias pueden tener lugar entre órganos de una misma planta (Araus et al 1991) o entre partes de un mismo órgano, como las superficies abaxial y adaxial de las hojas (Post Beittenmiller 1996). En algunas especies, una capa de ceras epicuticulares de estructura cristalina pueden cubrir la capa amorfa externa de la cutícula, brindando un aspecto grisáceo a la superficie foliar (Post Beittenmiller 1996). La presencia de ceras epicuticulares aumenta la reflectancia de las hojas, disminuyendo la absorción de energía y, consecuentemente, la temperatura foliar, por lo que se ha propuesto que constituyen una característica adaptativa a situaciones de sequía (Johnson et al 1983,

Febrero et al 1998). Cuando los estomas están abiertos, la transpiración cuticular representa sólo entre el 5 y 10 % de la pérdida total de agua de una hoja, pero en condiciones de sequía, cuando los estomas están cerrados, estas pérdidas pueden volverse significativas para el balance hídrico de las hojas (Araus et al 1991). Se ha encontrado que, cuando la hojas se deshidratan, la conductancia cuticular al vapor de agua disminuye, y consecuentemente, disminuye la transpiración cuticular (Boyer et al 1997). Existe variabilidad genética en la magnitud de la transpiración cuticular (Bengston et al 1978; O'Toole et al 1979; Jenks et al 1994), y esta característica se ha utilizado como predictor de la resistencia a la sequía (Kerstiens 1996). Dado que la composición de ceras de un órgano también puede variar con la ontogenia (Post Beittenmiller 1996), la permeabilidad de la cutícula podría variar en el curso de la senescencia foliar. Si la transpiración cuticular de *Gd1d2* fuera mayor en condiciones de estrés que la del genotipo silvestre, aunque sus estomas se cerraran, sus hojas sufrirían una mayor pérdida de agua, y esto conduciría finalmente a la deshidratación de sus hojas. Debido a que la deshidratación de las hojas de *Gd1d2* ocurre al final del ciclo de vida en plantas con adecuado suministro hídrico, también se realizaron experimentos donde se midió la transpiración cuticular en plantas de soja al estado reproductivo. Para comprobar si existe una relación entre la senescencia foliar y la transpiración cuticular se utilizó *Impatiens holstii* debido a que sus hojas están desprovistas de estomas en la superficie adaxial, con lo que se puede descartar totalmente cualquier efecto sobre la pérdida de agua de los estomas.

El objetivo de este trabajo fue determinar si hay modificaciones de la transpiración cuticular durante la senescencia foliar, y si existen diferencias en la transpiración cuticular del genotipo silvestre y del mutante *Gd1d2* de soja bajo condiciones de sequía.

### Abreviaturas utilizadas.

Tsm: transpiración superficial mínima.

Tc: transpiración cuticular.

ppm: partes por millón.

## 5.2) Materiales y métodos.

### **5.2.1) Cultivo de las plantas y tratamiento de estrés en soja en estado vegetativo.**

El cultivo de las plantas y el tratamiento de estrés se efectuaron en la forma descrita en el Capítulo 3.

### **5.2.2) Cultivo de las plantas y tratamiento de estrés en soja en estado reproductivo.**

Las semillas de *Clark* y *Gd1d2* se germinaron en cajas de Petri con papel tisú y agua destilada, en estufa durante 3 días. Luego se transplantaron a macetas con 720 g de tierra, y se colocaron en un invernáculo. A las dos semanas fueron trasladadas a una cámara de crecimiento, con un fotoperíodo de 10 horas y una irradiancia de 250-300  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , proporcionada por lámparas de mercurio halogenado. La temperatura varió entre 28 - 22 °C (día- noche). Periódicamente, las plantas fueron fertilizadas con un fertilizante comercial (N-P-K) y asperjadas con acefato 75 % para el control de trips, y el fungicida benomil:metil-1-butilcarbomoil-2-bencimidazol carbamato para el control de enfermedades fúngicas. Las mediciones comenzaron 66 días después de la siembra, en el estadio R5, y se llevaron a cabo sobre la segunda hoja trifoliolada.

### **5.2.3) Contenido relativo de agua (CRA).**

El contenido relativo de agua (CRA) se determinó de la misma forma que en el Capítulo 3.

#### **5.2.4) Medida de la conductancia estomática.**

Las mediciones se llevaron a cabo sobre la segunda hoja trifoliolada de las plantas en estado reproductivo, de la forma descrita en el Capítulo 3.

#### **5.2.5) Cultivo de las plantas de *Impatiens holstii*.**

Las plantas de *Impatiens holstii* Engl. et Warb (Familia Balsaminaceae) se obtuvieron enraizando estacas previamente tratadas durante 24 horas con el fitoregulador ácido naftalén acético (0,1 ppm), las estacas se transplantaron a macetas de 0,5 kg con tierra, y se colocaron en un invernáculo. Diez días antes de comenzar las mediciones se trasladaron a una cámara de crecimiento bajo condiciones de irradiancia y temperatura semejantes a las descritas para la soja. Cuando se realizaron las mediciones las plantas estaban en floración.

#### **5.2.6) Medida de la transpiración superficial mínima (Tsm) en soja.**

La Tsm se midió en plántulas y en plantas en estado reproductivo. En el caso de las plántulas, las mediciones se efectuaron durante la noche sobre hojas unifolioladas cortadas de ambos genotipos (*Clark* y *Gd1d2*). En las plantas en estado reproductivo, las mediciones se realizaron sobre un folíolo de la segunda hoja trifoliolada, en las mismas condiciones que para las plántulas. Se descartaron todas las hojas que presentaban algún tipo de daño mecánico, y las hojas de *Gd1d2* que hubieran comenzado a secarse. Se cortaron las láminas con un segmento de pecíolo, que fue sellado con lanolina. Las hojas se colocaron sobre un soporte de papel de aluminio, y las pesadas se realizaron sobre el conjunto papel de aluminio + hoja sellada. Las hojas se colocaron con la superficie abaxial (inferior) hacia el papel de aluminio, y la adaxial (superior) hacia arriba. Las hojas se mantuvieron durante 45 minutos en un recipiente hermético con una atmósfera de 2000 ppm de CO<sub>2</sub> y en oscuridad, con el objeto de inducir el cierre estomático. Las hojas se pesaron en una

balanza analítica (Pi, peso inicial). Durante la pesada, la irradiancia fue de  $5 \mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Luego las hojas se dejaron durante 2 hs en el recipiente con 2000 ppm de  $\text{CO}_2$  en oscuridad, y se las volvió a pesar (Pf, peso final). Finalmente, se midió el área foliar (AF) de cada hoja con un medidor de área foliar Licor LI 3000. Se asume que la pérdida de agua a través de los estomas en estas condiciones representa una parte mínima de la pérdida total de agua de la hoja, que se produce fundamentalmente a través de la cutícula. La transpiración en estas condiciones se denomina transpiración superficial mínima (Tsm, Kerstiens 1996 a y b) en lugar de transpiración cuticular, ya que no es posible descartar totalmente la contribución de los estomas.

La Tsm se calculó con la siguiente fórmula:

$$T_{sm} = (P_f - P_i) / 2AF \cdot 2hs = \mu\text{g H}_2\text{O cm}^{-2} \text{ h}^{-1} \quad (1)$$

donde el área foliar (AF) se multiplicó por 2, debido a que se midió la Tsm de ambas superficies (abaxial y adaxial) al mismo tiempo.

En algunos casos, el conjunto hoja + papel de aluminio fue pesado a intervalos de 15 minutos para determinar si la disminución de peso era lineal durante las 2 hs de medición.

Se realizaron improntas de resina epoxi, en forma similar a la descrita en el capítulo 3, para determinar si los estomas fueron efectivamente cerrados por el tratamiento (oscuridad mas elevada concentración de  $\text{CO}_2$ ). Se encontró que los estomas de todos los genotipos y tratamientos estaban cerrados en el mismo grado.

### **5.2.7) Medida de la transpiración cuticular ( $T_c$ ) en *Impatiens holstii*.**

El objetivo de este experimento fue comprobar si existe una relación entre la senescencia foliar y la transpiración cuticular. Para esto, se utilizó *Impatiens holstii* debido a que sus hojas sólo tienen estomas en la cara abaxial, mientras que la adaxial está desprovista de ellos (Fig. 18). Al medir la transpiración de la superficie adaxial de

las hojas de *Impatiens holstii*, la pérdida de agua es exclusivamente a través de la cutícula, y se evita cualquier efecto residual de los estomas sobre la pérdida de agua, que no se puede descartar en la soja por ser sus hojas anfiestomáticas.

Las hojas de *Impatiens holstii* se clasificaron visualmente de acuerdo al contenido de clorofila (v.g. el mismo grado de senescencia), sobre una hoja se midió la Tc y de otra en el mismo grado de senescencia se tomó un disco para medir el contenido de clorofila.

Para efectuar las mediciones de Tc, la superficie abaxial y el pecíolo de una hoja fueron sellados con vaselina, luego la hoja fue apoyada sobre una pieza de papel de aluminio con la superficie adaxial hacia arriba, de este modo la superficie con estomas quedó sellada y pegada al papel de aluminio. El conjunto hoja + papel de aluminio fue pesado a intervalos de 15 minutos para asegurar que la tasa transpiratoria fuera lineal. Se mantuvieron en el laboratorio a una irradiancia de 50  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El área foliar se calculó de la misma manera indicada para la soja. La fórmula utilizada para calcular la Tc fue:

$$T_c = (P_f - P_i) / AF \cdot 2hs = \mu\text{g H}_2\text{O cm}^{-2} \text{h}^{-1} \quad (2)$$

#### **5.2.8) Microscopía electrónica de barrido de hojas de soja.**

Las hojas fueron congeladas con nitrógeno líquido e inmediatamente liofilizadas hasta su desecación total. Luego fueron metalizadas y observadas a 3500X en un microscopio electrónico de barrido.

#### **5.2.9) Preparación y observación de hojas de *Impatiens* por microscopía óptica.**

Las hojas de *Impatiens* se fijaron en FAA, se diafanizaron con el método del dizeo de Stritmatter, se tiñeron con safranina y se montaron en gelatina – glicerina (D'Ambrogio de Argueso 1986). Los preparados se observaron en un microscopio óptico, y las imágenes se capturaron con un programa para procesar imágenes (iPhoto

Express).

### 5.3) Resultados y discusión.

La figura 12 muestra que la Tsm fue semejante en las plántulas regadas de *Clark* y *Gd1d2* a lo largo del experimento, y las diferencias entre ambas no fueron estadísticamente significativas en ninguna de las mediciones. En las plántulas de *Clark*, la Tsm disminuyó en las plantas estresadas, y a partir del día 5 las diferencias entre las plántulas regadas y estresadas fueron estadísticamente significativas. En las plántulas estresadas de *Gd1d2*, la disminución de la Tsm fue menor que en el genotipo silvestre, y las diferencias entre las plantas estresadas y regadas de *Gd1d2* fueron estadísticamente significativas sólo el día 7. En las plántulas estresadas de ambos genotipos, a los 3 días de sequía no hubo diferencias significativas, pero a partir del quinto día, la Tsm fue siempre mayor en *Gd1d2*, y los días 7 y 10 las diferencias en Tsm entre las plantas estresadas de ambos genotipos fueron estadísticamente significativas (LSD 5%). Justamente, es a los 6-7 d de sequía cuando comienzan a secarse las hojas del mutante, y también se hacen significativas las diferencias en el contenido de agua (Cap. 3). La disminución del contenido de agua y la mayor Tsm coinciden con el comienzo de la desecación de las hojas de *Gd1d2*. Se puede concluir que *Gd1d2* reduce su Tsm ante una situación de estrés en mucho menor grado que el genotipo silvestre, lo cual causa una mayor pérdida de agua que conduce finalmente a la desecación de sus hojas. Esto sugiere un vínculo entre el carácter *stay-green*, la sensibilidad a la sequía y la Tsm. Dado que las hojas de *Gd1d2* se secan al final del ciclo, aunque las plantas estén bien regadas, surgió el interrogante de si esa respuesta de la Tsm ocurría también en plantas en estado reproductivo durante un episodio de sequía, y durante la senescencia monocárpica normal en plantas bien regadas. Para contestar este interrogante, se midió la Tsm en



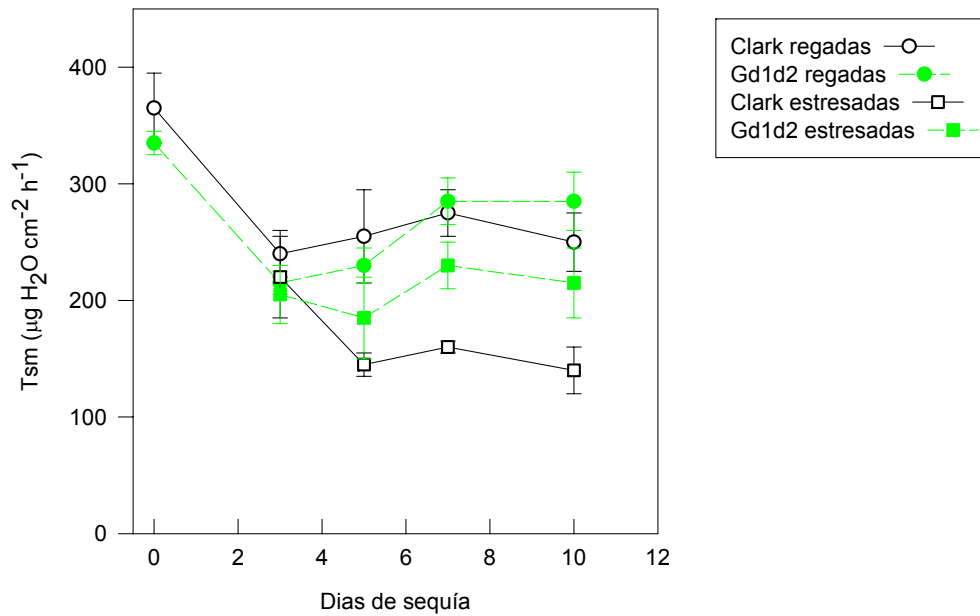


Figura 12 - Transpiración superficial mínima ( $\mu\text{g H}_2\text{O cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) de las hojas unifolioladas de plántulas de soja del cv *Clark* y del mutante *Gd1d2*, regadas y sometidas a sequía. Las hojas se mantuvieron en oscuridad y en una atmósfera con 2000 ppm de  $\text{CO}_2$  durante las mediciones. Las barras verticales representan un error estándar de la media.

Tabla 15 - Contenido de clorofila total y transpiración superficial mínima (Tsm), de la segunda hoja trifoliolada de plantas de soja del genotipo silvestre *Clark* y el mutante *Gd1d2*, regadas y sometidas a sequía durante el llenado de los granos. Los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (5% LSD).

| Fecha  | Genotipo                | Clorofila ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) | Tsm ( $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) |
|--------|-------------------------|-------------------------------------|---|
| Día 0  | Clark controles         | 48,1 a                              | 306 a                                       |
|        | <i>Gd1d2</i> controles  | 54,5 a                              | 277 a                                       |
| Día 8  | Clark controles         | 39,4 b                              | 267 a                                       |
|        | Clark estresadas        | 44,6 ab                             | 127 c                                       |
|        | <i>Gd1d2</i> controles  | 50,8 a                              | 325 a                                       |
|        | <i>Gd1d2</i> estresadas | 53,1 a                              | 212 b                                       |
| Día 16 | Clark controles         | 25,9 b                              | 249 b                                       |
|        | <i>Gd1d2</i> controles  | 51,7 a                              | 358 a                                       |

plantas de soja en estado reproductivo regadas y sometidas a sequía, y en plantas regadas durante la senescencia monocárpica. En los resultados del mismo (Tabla 15), se puede observar que el estrés hídrico no aceleró la degradación de la clorofila en *Gd1d2*, en coincidencia con los resultados obtenidos anteriormente (Cap. 2 y 3). En las plantas estresadas de *Clark* durante el período reproductivo, la Tsm disminuyó un 52 % en relación a los controles luego de 7 días de sequía (Tabla 15), mientras que en *Gd1d2* la disminución fue del 35 % en el mismo período. La Tsm de las plantas estresadas de *Clark* fue un 30 % menor que la de *Gd1d2*, y la diferencia fue estadísticamente significativa. La gs y E (Fig. 13) de las plantas en estado reproductivo fueron semejantes a los resultados obtenidos en el Cap. 2.

Se realizó una medición mas, a los 82 ds de siembra (día 16, Tabla 15),

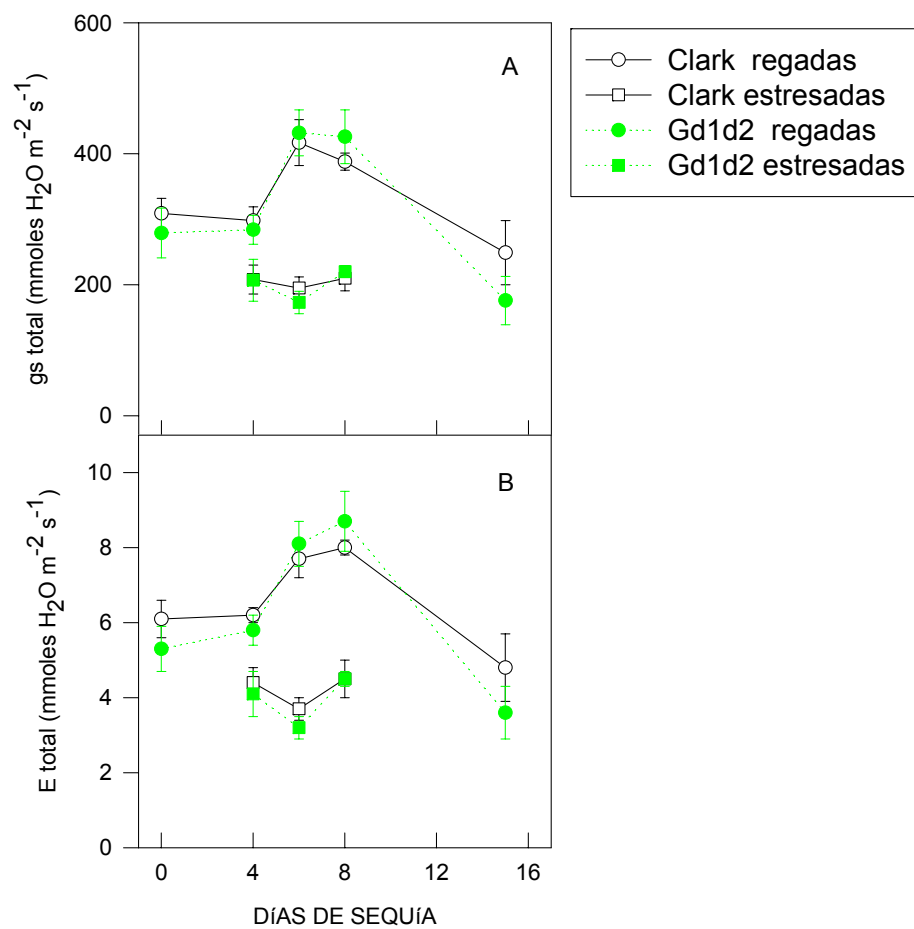


Fig 13 - Conductancia estomática total (gs) y transpiración instantánea total (E) de la segunda hoja trifoliolada de plantas de soja del cv *Clark* y del mutante *Gd1d2*, regadas y sometidas a sequía. Las barras verticales representan un error estándar de la media.

Fig. 14 - Fotografías de las epidermis abaxial (A, con estomas) y la adaxial (B, sin estomas) de hojas de *Impatiens holstii*.

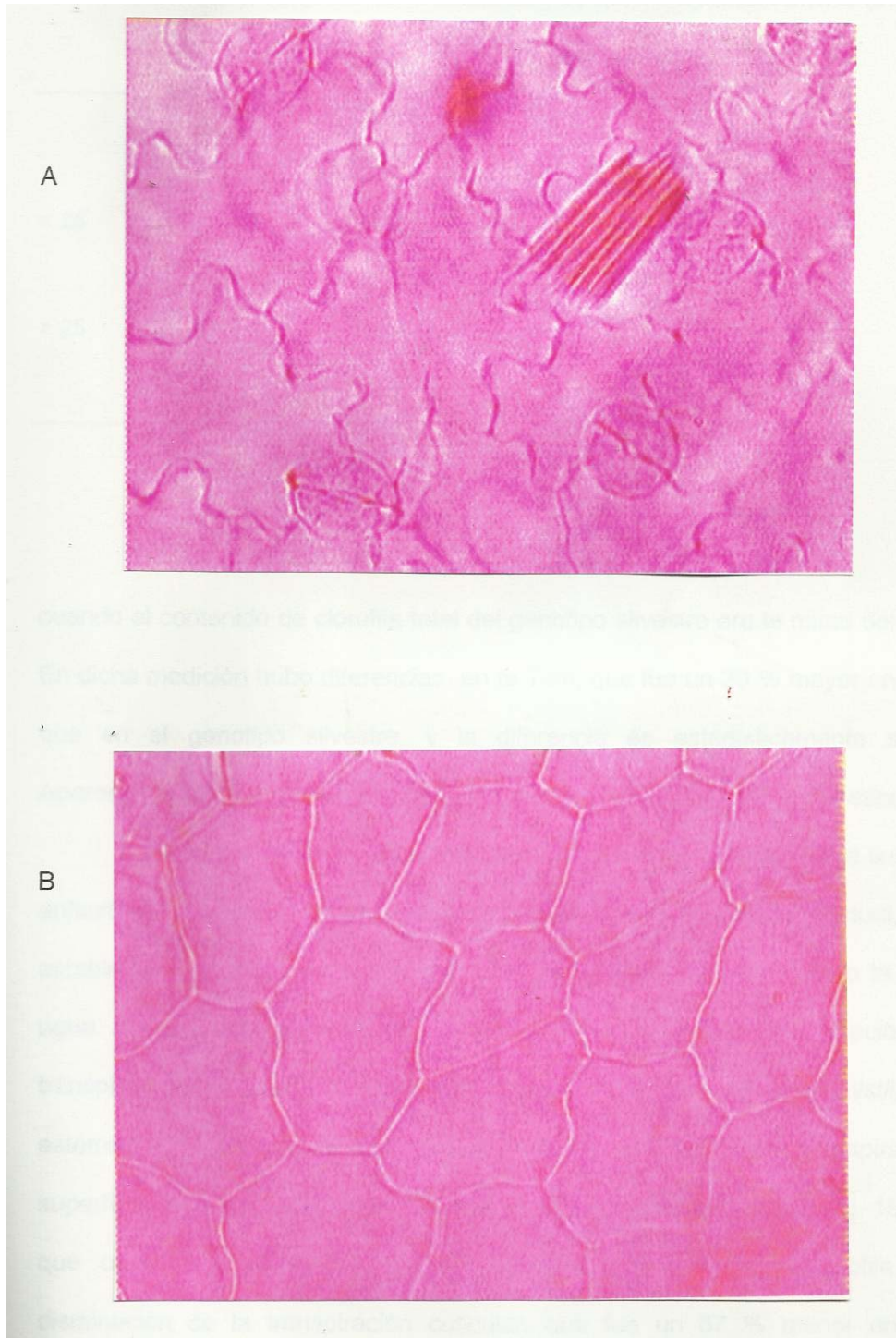


Tabla 16 - Contenido de clorofila total (Cl t) y Transpiración cuticular (Tc) de hojas de plantas de *Impatiens holstii* regadas, con diferente contenido de clorofila. Se discriminó entre aquellas hojas con más de 25 mg cm<sup>-2</sup> de clorofila total (> 25) y con menos de esa cantidad (< 25). Valores del mismo día seguidos de la misma letra no difieren significativamente (5% LSD).

|      | Cl t (µg cm <sup>-2</sup> ) | Tc (µg H <sub>2</sub> O cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> ) |
|------|-----------------------------|--|
| < 25 | 9,11 a                      | 161,25 a   |
| > 25 | 34,18 b                     | 303,33 b   |

cuando el contenido de clorofila total del genotipo silvestre era la mitad del de *Gd1d2*. En dicha medición hubo diferencias en la Tsm, que fue un 30 % mayor en el mutante que en el genotipo silvestre, y la diferencia es estadísticamente significativa. Aparentemente, esto confirmaría que la Tsm se modifica durante la senescencia foliar.

Un inconveniente de utilizar soja como material de trabajo es que sus hojas son anfiestomáticas, y es imposible descartar algún efecto estomático residual, y es difícil establecer que lo que se mide como Tsm se deba exclusivamente a la pérdida de agua a través de la cutícula. Para determinar si existe una relación entre la transpiración cuticular y la senescencia foliar, se utilizó *Impatiens holstii*, que tiene estomas sólo en la superficie abaxial (Fig. 14), midiéndose la transpiración de la superficie carente de estomas (adaxial). Los resultados (Tabla 16 y Fig. 15) muestran que coincidentemente con la disminución del contenido de clorofila, hay una disminución de la transpiración cuticular, que fue un 67 % menor en las hojas senescentes. Estos resultados apoyan la idea de que la transpiración cuticular se

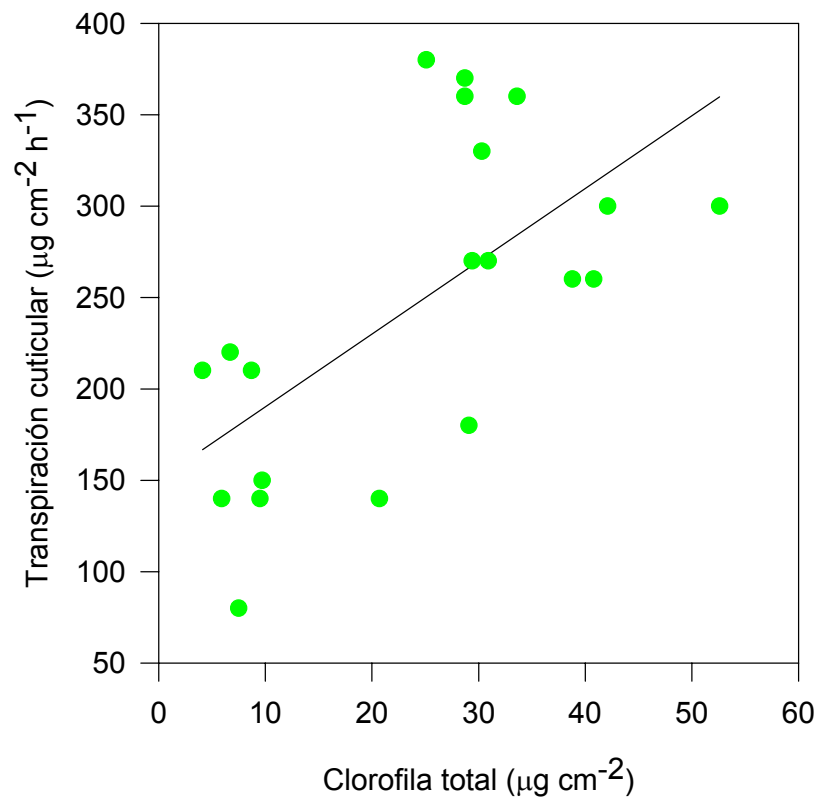
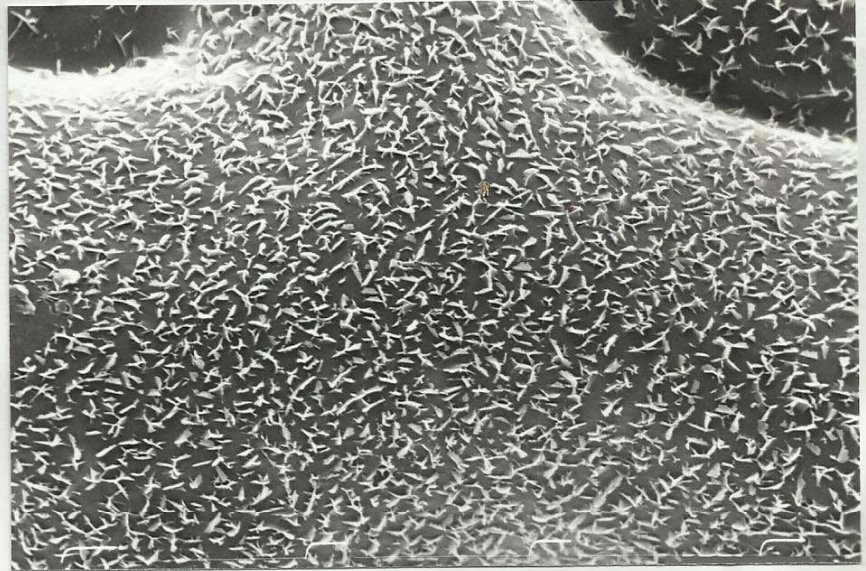


Fig. 15 - Relación entre el contenido de clorofila y la transpiración cuticular (Tc) de hojas de plantas regadas de *Impatiens holstii*.

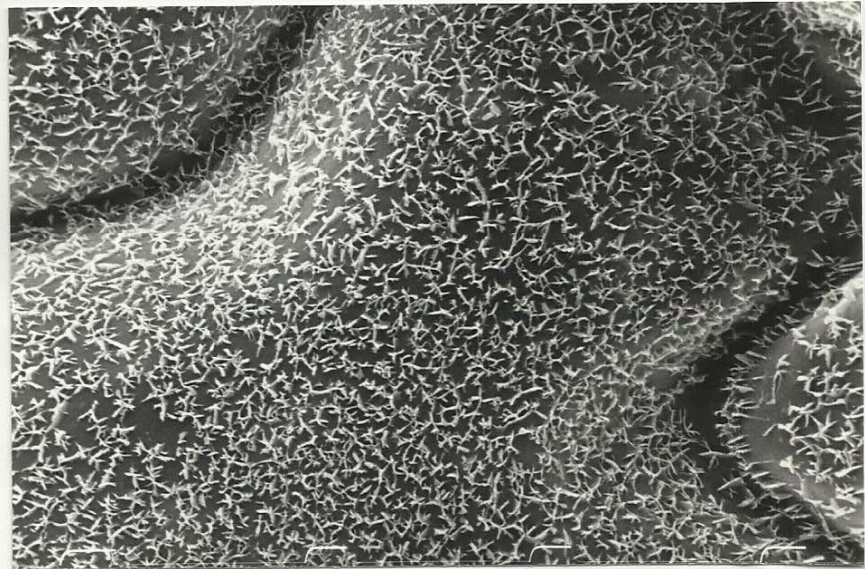
Fig. 16 - Fotografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) de la epidermis abaxial y adaxial de las hojas unifolioladas de plántulas de soja del cv *Clark* y del mutante *Gd1d2*, regadas y sometidas a sequía. Aumento 3500 x.

Clark regada,  
superficie abaxial



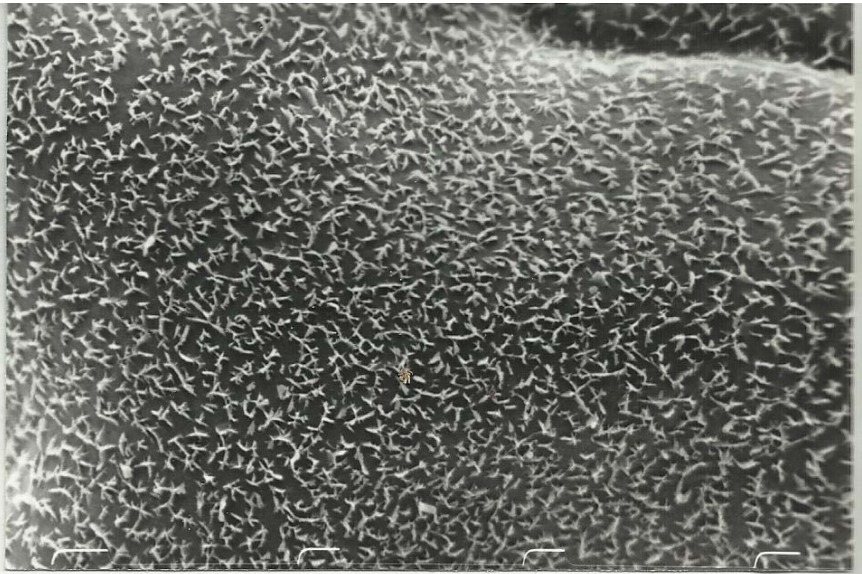
10  $\mu\text{m}$

Clark regada,  
superficie adaxial



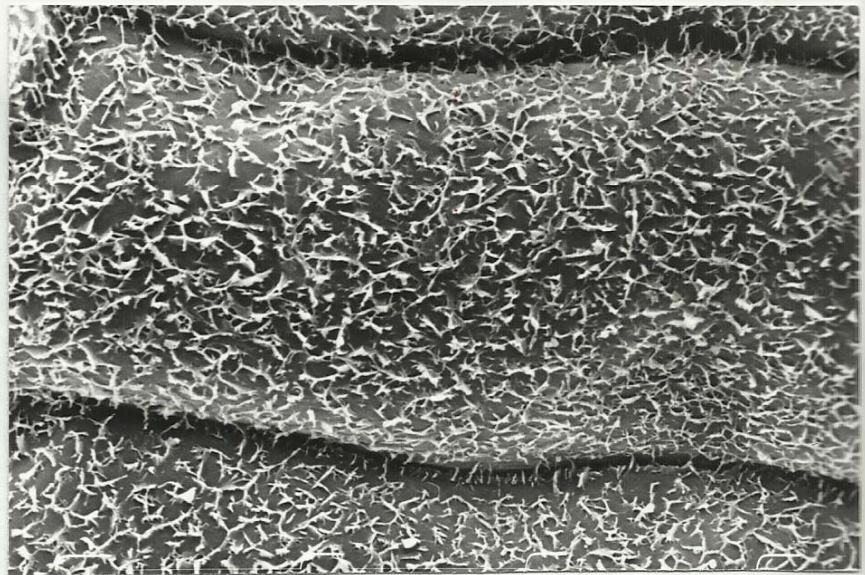
10  $\mu\text{m}$

Clark estresada,  
superficie abaxial



10  $\mu$ m

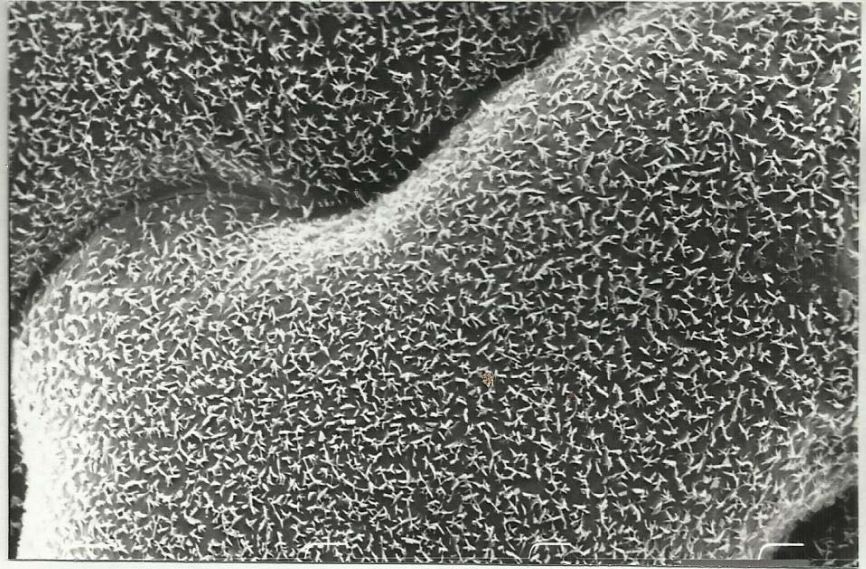
Clark estresada,  
superficie adaxial



10  $\mu$ m

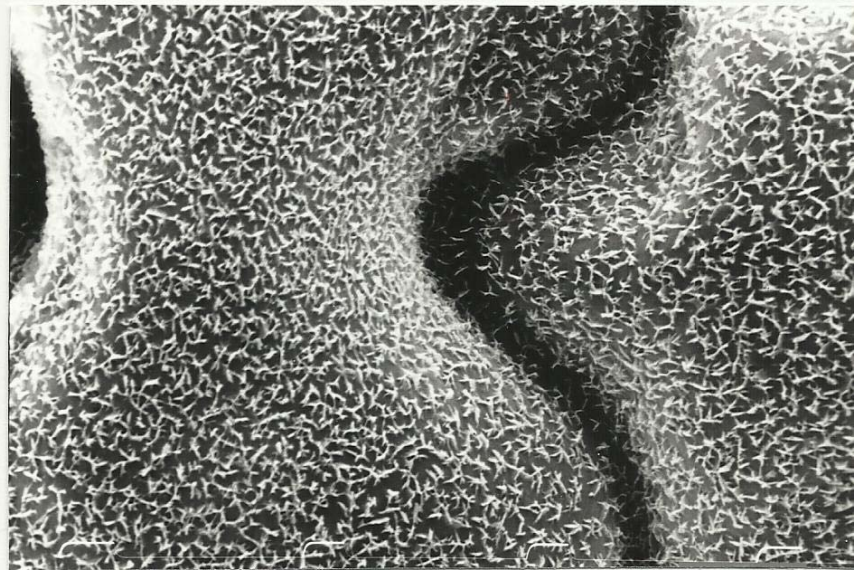


*Gd1d2* regada,  
superficie abaxial.



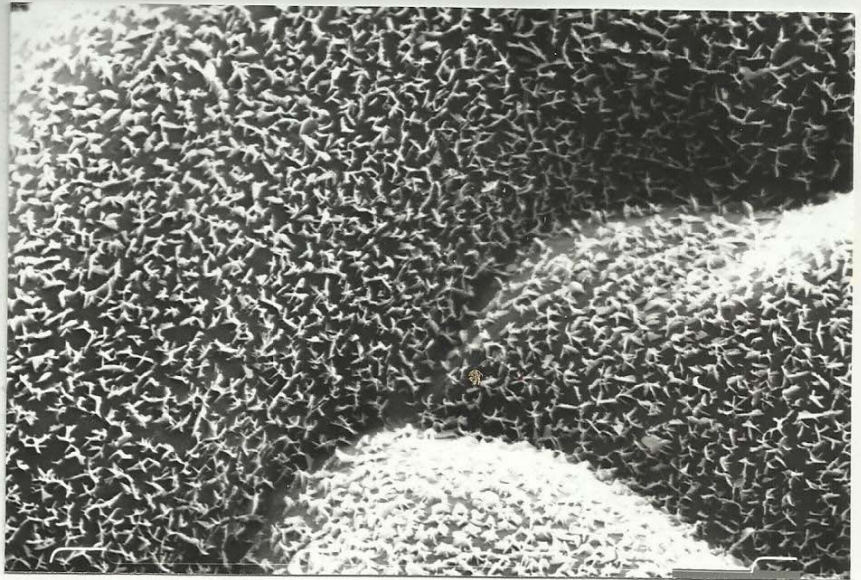
10  $\mu\text{m}$

*Gd1d2* regada,  
superficie adaxial



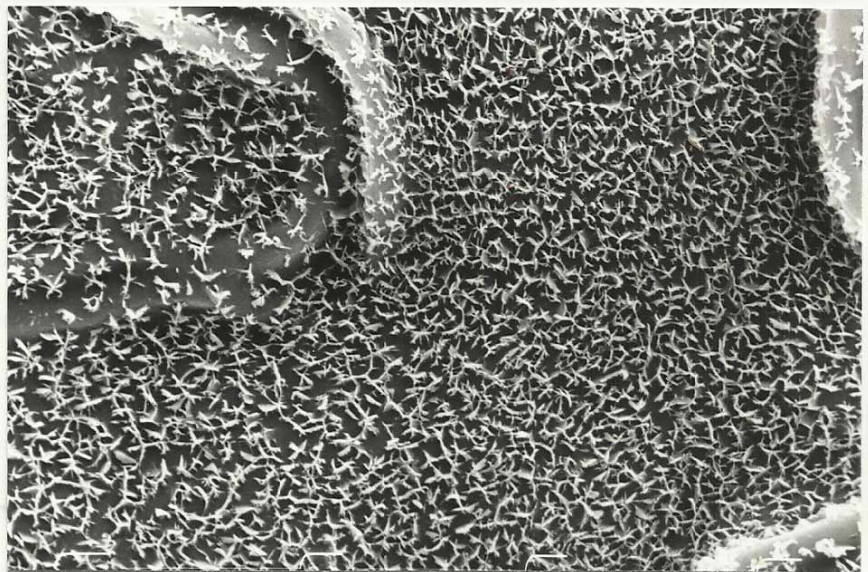
10  $\mu\text{m}$

*Gd1d2* estresada,  
superficie abaxial



10  $\mu\text{m}$

*Gd1d2* estresada,  
superficie adaxial



10  $\mu\text{m}$

modifica durante la senescencia, y que esto no es un fenómeno limitado a las plantas de soja.

Una de las posibles causas de las diferencias en la Tsm es la diferente deposición de ceras epicuticulares en las hojas (Kerstiens 1996 a y b). Para comprobar si existe alguna diferencia en la deposición y morfología de las ceras epicuticulares entre el genotipo silvestre y el mutante *Gd1d2* de soja, se examinaron por microscopía electrónica de barrido (MEB, Fig. 16) las hojas de ambos genotipos. Las fotografías muestran que la morfología de las ceras epicuticulares es semejante en ambos genotipos, formando una capa amorfa sobre las venas principales, y formando pequeños cristales en los sectores más alejados de estas. Los cristales se forman debido a un incremento local de la deposición de ceras, lo cual puede ocurrir como respuesta a diversos estímulos ambientales (Post Beittenmeiller 1996). Comparando la densidad de cristales en las plantas controles y estresadas luego de 7 días de sequía (Fig. 16), se observa que hay un ligero incremento de la densidad de cristales en las plantas estresadas, que podría deberse a una mayor deposición de ceras. Este incremento de la densidad cristalina ocurre tanto en el mutante como en el genotipo silvestre, por lo que aparentemente la causa de la mayor Tsm de *Gd1d2* no está relacionada con diferencias en la síntesis de ceras epicuticulares. Existe una fuerte evidencia experimental que indica que la máxima restricción al paso de agua en la cutícula se encuentra en la capa mas externa, denominada “piel limitante”, lo cual explicaría la falta de correlación que usualmente se encuentra entre la permeabilidad cuticular y el espesor de toda la cutícula (Kerstiens 1996). En los sectores donde las ceras epicuticulares adoptan una estructura cristalina, el agua no puede difundir, pero esto puede suceder en los sectores donde las ceras tienen una estructura amorfa, y las moléculas pueden atravesar la cutícula a través de los intersticios que se forman debido al movimiento de las moléculas lipídicas (Kerstiens 1996). De aquí que el principal factor que afecta la permeabilidad a nivel de la “piel limitante” sea la arquitectura molecular (vg, composición de ceras) mas que el espesor de la cutícula

(Kerstiens 1996). La composición de ceras epicuticulares puede variar entre los diferentes órganos de una misma planta, en un mismo órgano con la ontogenia e incluso entre la superficie abaxial y adaxial de la misma hoja (Post Beittenmeiller 1996). En el caso de *Clark* y *Gd1d2*, no hay diferencias en la deposición de ceras epicuticulares, pero la composición de ceras podría ser diferente, y consecuentemente la permeabilidad de la cutícula al agua.

Queda pendiente determinar la naturaleza de la vinculación entre la conductancia cuticular y la senescencia foliar. Los compuestos precursores de las ceras epicuticulares son principalmente ácidos grasos sintetizados en los plástidos y que luego son elongados en el retículo endoplasmático (Post Beittenmeiller 1996). Las mutaciones causantes del fenotipo *stay green* de *Gd1d2* podrían tener algún efecto pleitrópico sobre el metabolismo de los ácidos grasos, afectando la composición o el traslado de los mismos, y causando una diferencia en la composición de las ceras cuticulares de ambos genotipos. Esta diferencia de composición se traduciría en una diferente permeabilidad de las cutículas al agua, que explicaría la mayor Tsm del mutante. Al no poder ajustar la conductancia cuticular, el mutante *stay green* experimentaría una mayor pérdida de agua y finalmente la desecación de las hojas.

## CAPÍTULO 6.

Identificación de las mutaciones determinantes de la  
suceptibilidad al estrés hídrico en el mutante *Gd1d2*.

## 6.1) Introducción.

El mutante *Gd1d2* difiere del genotipo silvestre cv *Clark* en que retiene la integridad del cloroplasto y la clorofila en las hojas, la cubierta seminal, el fruto y el embrión, durante la senescencia foliar y la maduración de los frutos (Guamét et al 1990). Este fenotipo es causado por la combinación de mutaciones en 3 genes nucleares. Una de estas mutaciones (*G*) es dominante y las otras (*d1* y *d2*) son homocigotas recesivas (Guamét et al 1990, Guamét y Gianibelli 1994 y 1996). En el cv *Clark*, existen isolíneas con diferentes combinaciones de las mutaciones *G*, *d1* y *d2*. Estos genes (*G*, *d1* y *d2*) alteran la degradación de la clorofila en diferentes órganos, tal como se detalla en la Tabla 17. Para que la clorofila no se degrade en las hojas, es necesaria la presencia de los alelos *d1* y *d2* al estado homocigota recesivo, pero no de la mutación *G*, que solamente impide la degradación de la clorofila de la cubierta seminal (Tabla 18). Por lo tanto, sólo los genotipos *ggd1d1d2d2* (*d1d2*) y *GGd1d1d2d2* (*Gd1d2*) manifiestan el carácter *stay green* en las hojas, carpelos y embriones (Guamét et al 1990). La combinación de los genes *d1* y *d2* al estado homocigota recesivo inhibe la degradación de la clorofila y proteínas tilacoidales, mantiene la integridad de la membrana tilacoidal del cloroplasto (Guamét et al 1991, Guamét y Gianibelli 1994), y provocan la retención del 50 % de la proteína soluble foliar al momento de la abscisión, cuando el genotipo silvestre ha perdido el 90 % de la misma (Guamét y Gianibelli 1996). Los alelos silvestres de las mutaciones *d1* y *d2* deben controlar un proceso central del síndrome de senescencia (Guamét y Gianibelli 1996). Dado que hay genes cuya expresión aumenta tanto durante la senescencia como en situaciones de estrés (Buchanan Wollaston 1997), es probable que las mutaciones *G*, *d1* y *d2* determinen conjuntamente la mayor sensibilidad del mutante *Gd1d2* a la sequía, o que este sea un efecto secundario de una de las mutaciones. En esta sección de mi tesis estudié el comportamiento frente a la sequía de isolíneas del cv *Clark* con diferentes combinaciones de las mutaciones *G*, *d1* y *d2*. El objetivo de este trabajo fue determinar cuáles genes (o combinación de estos) provocan la

deshidratación prematura e irreversible de las hojas de *Gd1d2* ante una situación de sequía.

#### Abreviaturas utilizadas.

CA : contenido porcentual de agua.

CRA: contenido relativo de agua.

DFFF: densidad de flujo fotónico fotosintético.

### 6.2) Materiales y métodos.

#### **6.2.1) Cultivo de las plantas y tratamiento de estrés.**

El cultivo de las plantas y el tratamiento de estrés se llevaron a cabo de la misma manera que en el Capítulo 3.

Las características de la senescencia foliar que son alteradas por las mutaciones *G*, *d1* y *d2*, se detallan en la Tabla 17. Los genotipos utilizados presentan las siguientes combinaciones de genes (Guiamét et al 1990):

- genotipo silvestre (*Clark*) : *ggD1D1D2D2*.
- *Gd1d2*: *GGd1d1d2d2*.
- *Gd1*: *GGd1d1D2D2*.
- *Gd2*: *GGD1D1d2d2*.
- *d1d2*: *ggd1d1d2d2*.
- *d1*: *ggd1d1D2D2*.
- *d2* : *ggD1D1d2d2*.

#### **6.2.2) Contenido relativo de agua (CRA).**

El contenido relativo de agua (CRA) se determinó de la misma manera que en el Capítulo 3.

### 6.3) Resultados y discusión.

Los mutantes *stay green* fueron afectados por la sequía en forma diferente a los demás genotipos. Luego de 7 días de sequía, en las plantas estresadas hubo una disminución del CRA (Tabla 18) en relación a las plantas regadas en todos los genotipos, pero las diferencias entre las plantas estresadas de los distintos genotipos no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, a los 10 días de sequía hubo una marcada diferencia entre las plantas estresadas de aquellos genotipos donde están combinados los genes *d1* y *d2* (*Gd1d2* y *d1d2*) y los demás genotipos estudiados. El CRA en las plantas estresadas fue del 52 % en *Gd1d2* y del 53 % en *d1d2*, comparado con alrededor del 70 % para los demás genotipos estudiados. Es notable que hasta los 7 días de sequía, la disminución del CRA fue semejante en todos los genotipos, pero entre los 7 y 10 días la caída del CRA se aceleró en los genotipos *stay green Gd1d2* y *d1d2*, mientras que el CRA se mantuvo estable en los demás genotipos (Tabla 18). Justamente, es alrededor de los 6 - 7 días de sequía cuando las hojas de ambos mutantes *stay green* (Tabla 18) comenzaron a secarse en forma irreversible.

Analizando la evolución del CRA se puede concluir que para que se produzca la deshidratación rápida e irreversible de los folíolos durante un episodio de sequía, es necesaria la presencia combinada de los genes *d1* y *d2* al estado homocigota recesivo. Estos genes, en la misma combinación, provocan la inhibición de un amplio espectro del síndrome de senescencia (Guiamét et al 1990, Guiamét y Gianibelli 1994 y 1996). Este hecho sugiere una estrecha vinculación entre la sensibilidad a la sequía y el carácter *stay green*. La vinculación de la senescencia y la tolerancia a la sequía aún no está clara, ya que la función que podrían desempeñar los genes de resistencia a la sequía durante la senescencia normal no resulta obvia (Buchanan Wollaston 1997). Se ha encontrado que durante la senescencia foliar



Tabla 17- Características fenotípicas de las isólinas de soja con diferentes combinaciones de las mutaciones *G*, *d1* y *d2*. El fenotipo de las hojas (degradación o retención de la clorofila) se refiere a la senescencia secuencial de las hojas inferiores y la senescencia monocárpica. Genotipo silvestre: cv Clark.

| Símbolo      | Genotipo   | Fenotipo expresado durante la senescencia y maduración de los frutos. |             |             |             |
|--------------|------------|---|-------------|-------------|-------------|
|              |            | Hojas   | Frutos      | Tegumentos  | Embriones   |
| Clark        | ggD1D1D2D2 | Degradación   | Degradación | Degradación | Degradación |
| <i>Gd1d2</i> | GGd1d1d2d2 | Retención   | Retención   | Retención   | Retención   |
| <i>d1d2</i>  | ggd1d1d2d2 | Retención   | Retención   | Retención   | Retención   |
| <i>Gd1</i>   | GGd1D1D2D2 | Degradación   | Degradación | Retención   | Degradación |
| <i>Gd2</i>   | GGD1D1d2d2 | Degradación   | Degradación | Retención   | Degradación |
| <i>d1</i>    | ggd1d1D2D2 | Degradación   | Degradación | Degradación | Degradación |
| <i>d2</i>    | ggD1D1d2d2 | Degradación   | Degradación | Degradación | Degradación |

disminuye la conductividad hidráulica del xilema y, consecuentemente, el flujo de agua hacia las hojas (Neumann y Stein 1984, Neumann 1987), por lo que estas podrían experimentar una situación de estrés hídrico durante la senescencia. No se ha probado la sensibilidad a la sequía de otros mutantes *stay green* distintos de *Gd1d2* y *d1d2*. Para dilucidar la interrelación entre la sequía y la senescencia, es necesaria una mejor comprensión de la regulación genética, tanto de la senescencia foliar como de las respuestas al estrés hídrico.

Tabla 18 - Contenido relativo de agua (CRA, en porcentaje) de las hojas unifolioladas de plántulas del cultivar *Clark* con diferentes combinaciones de los genes *d1*, *d2* y *G*, regadas a capacidad de campo o sometidas a sequía durante 10 días. Para la misma fecha los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (5 % LSD). Genotipo silvestre : cv Clark. ND: no determinado.

| Genotipo                | Día 0  | Día 7  | Día 10 |
|-------------------------|--------|--------|--------|
| <i>Clark regadas</i>    | 94,3 a | 95,4 a | 94,3 a |
| <i>Clark estresadas</i> |        | 74,5 b | 77,7 b |
| <i>Gd1d2 regadas</i>    | 95,8 a | 94,8 a | 95,2 a |
| <i>Gd1d2 estresadas</i> |        | 77,5 b | 52,4 c |
| <i>d1d2 regadas</i>     | 94,3 a | 94,9 a | 95,3 a |
| <i>d1d2 estresadas</i>  |        | 73,4 b | 53,3 c |
| <i>Gd1 regadas</i>      | 94,2 a | 95,5 a | 96,1 a |
| <i>Gd1 estresadas</i>   |        | 71,1 b | 71,1 b |
| <i>Gd2 regadas</i>      | 95,2 a | ND     | 94,5 a |
| <i>Gd2 estresadas</i>   |        | ND     | 74,3 b |
| <i>d1 regadas</i>       | 95,3 a | 94,5 a | 94,4 a |
| <i>d1 estresadas</i>    |        | 77,9 b | 68,2 b |
| <i>d2 regadas</i>       | 95,0 a | 95,5 a | 94,3 a |
| <i>d2 estresadas</i>    |        | 73,4 b | 71,8 b |

## Capítulo 7

Influencia de la sensibilidad al estrés hídrico del mutante

*Gd1d2* sobre el rendimiento y sus componentes.

### 7.1) Introducción.

En la soja, como en otras especies de cultivo, la duración del período de llenado de las semillas es uno de los factores que afecta el rendimiento (Wolfe et al 1988, Gwathmey et al 1992 a, Gwathmey y Hall 1992, Gwathmey et al 1992 b, Frederick y Hesketh 1994, De Souza et al 1997). La prolongación del período de llenado requiere el mantenimiento de un canopeo fotosintéticamente activo. Hay varios casos donde se ha hallado una estrecha relación entre la duración del área foliar y el rendimiento (Aparicio Tejo y Boyer 1983, Wolfe et al 1988, Gwathmey et al 1992 b). Es por esta razón que se han seleccionado genotipos con mayor duración del área foliar para tratar de incrementar el rendimiento en diversos cultivos (Gwathmey et al 1992 b).

En el mutante *Gd1d2* se encuentra inhibido un amplio espectro de los fenómenos que constituyen el síndrome de senescencia foliar (Guiamét et al 1990, Guiamét et al 1991, Guiamét y Gianibelli 1994, Guiamét y Gianibelli 1996). En los capítulos previos de esta tesis, se demostró que la combinación de los genes *d1* y *d2* al estado homocigota recesivo provocan que dicho genotipo sea mas sensible al estrés hídrico. Incluso en plantas de *Gd1d2* con adecuado suministro hídrico, al final del ciclo de vida, las hojas se deshidratan aún cuando permanecen verdes, en contraste con el genotipo silvestre *Clark* en el cual las hojas abscinden amarillas y con un considerable grado de hidratación (Guiamét et al 1990). Esto indicaría que el genotipo *stay green* podría sufrir estrés hídrico durante el llenado, aún cuando el suministro de agua fuera adecuado. y esta sensibilidad al estrés podría afectar su rendimiento en condiciones naturales.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del genotipo mutante *GGd1d1d2d2* de soja del cv Clark sobre el rendimiento y sus componentes. Las plantas fueron cultivadas en macetas a la intemperie (esto es, bajo condiciones naturales de temperatura, humedad relativa e irradiación) con un suministro adecuado de agua en el suelo.

### Abreviaturas utilizadas.

*Gd1d2*: *GGd1d1d2d2*.

DFFF: densidad de flujo fotónico fotosintético.

DDF: días desde la floración.

## 7.2) Materiales y métodos.

### **7.2.1) Cultivo de las plantas.**

Las plantas del genotipo silvestre del cv *Clark* y del genotipo *Gd1d2* fueron cultivadas a la intemperie en macetas de 5 L con tierra tamizada, en la ciudad de La Plata. Durante la estación de crecimiento 1990-1991 la fecha de siembra fue el 22 de diciembre, con 8 repeticiones por tratamiento. En 1993-1994, las fechas de siembra fueron el 23 de noviembre, el 13 de diciembre, y el 8 de enero, con 5-10 repeticiones por tratamiento. Las semillas fueron inoculadas, previamente a la siembra, con una cepa comercial de *Bradyrhizobium japonicum*. Las macetas fueron regadas dos veces al día y abonadas regularmente con un fertilizante N-P-K 15-15-15.

### **7.2.2) Medida del intercambio gaseoso.**

La fotosíntesis neta se midió con un analizador infrarrojo de gases (IRGA) LICOR LI 6200 a 26- 28 °C y 1800 -2000  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de DFFF. La conductancia estomática se midió con un porómetro de estado estacionario LICOR LI 1600.

### **7.2.3) Medida del peso seco.**

El peso seco se determinó de la misma forma descrita en el Capítulo 3.

### 7.3) Resultados y discusión.

El desarrollo fenológico fue similar en el genotipo silvestre *Clark* y en el mutante *Gd1d2* (los datos no se muestran aquí), coincidiendo con observaciones previas de que los genes causantes del fenotipo *stay green* no tienen efecto sobre las fechas de floración y maduración de los frutos (Guiamét et al 1990).

El rendimiento en número y peso de semillas por planta de *Gd1d2* fue consistentemente mas bajo (12-14%) que el del genotipo silvestre cv *Clark* durante las estaciones de crecimiento 90-91 y 91-92 (Tabla 19). La merma del rendimiento se debió a que el mutante *stay green* produjo un menor número de nudos por planta (21-24 %), de nudos con fruto (22 %), de frutos (18-21 %) y de semillas (18 %). El pequeño incremento en el tamaño de las semillas no fue suficiente para compensar el menor número de éstas por planta en *Gd1d2*.

Los experimentos de 1990-91 y 1991-92 sugieren que el desarrollo de nudos (sitios potenciales para la iniciación de frutos) puede limitar el rendimiento en el genotipo *stay green*. En soja, el número final de nudos es fuertemente influido por el fotoperíodo (Guiamét y Nakayama 1984) y, por lo tanto, el tamaño de la planta y el número de nudos cambia sustancialmente con la fecha de siembra. En la latitud donde se desarrolló el experimento, las siembras previas a mediados de diciembre permiten un mayor crecimiento vegetativo, con lo cual las plantas pueden producir un mayor número de nudos y un mayor rendimiento. En 1993-94, *Clark* y *Gd1d2* se plantaron en fechas similares a los experimentos previos (13 de diciembre y 8 de enero) y en una fecha mas temprana (23 de

Tabla 19 - Rendimiento y sus componentes de plantas de soja del genotipo silvestre del cv *Clark* y del mutante *stay green Gd1d2*, creciendo en macetas a la intemperie en la ciudad de La Plata, durante las temporadas 1990-91 y 1991-92. Los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (5% LSD).

|                                 | 1990-91      |              | 1991-92      |              |
|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                                 | <i>Clark</i> | <i>Gd1d2</i> | <i>Clark</i> | <i>Gd1d2</i> |
| Nudos por planta                | 47,8 a       | 36,2 b       | 42,7 a       | 33,9 a       |
| Nudos con fruto                 | 37,7 a       | 29,3 b       | 33,9 a       | 26,3 b       |
| Frutos por planta               | 69 a         | 56,7 b       | 55,9 a       | 44,3 b       |
| Semillas por planta             | 179 a        | 146 b        | 142 a        | 116 b        |
| Peso por semilla (mg)           | 172 a        | 184 b        | 164 a        | 174 b        |
| Peso de semillas por planta (g) | 30,7 a       | 26,9 b       | 23,6 a       | 20,4 b       |

noviembre) correspondiente a la siembra de variedades de ciclo mas largo. El número de nudos, nudos con frutos, frutos y semillas fueron menores en *Gd1d2* que en el genotipo silvestre en todas las fechas de siembra (Tabla 20). Pese a que no hubo interacciones significativas entre la fecha de siembra y el genotipo, el número de nudos, nudos con fruto, semillas y peso de semillas por planta en *Gd1d2* disminuyó proporcionalmente mas en la fecha de siembra de noviembre, comparada con las plantas sembradas en diciembre y enero. Por lo tanto, el efecto detrimental del genotipo *stay green* es mas manifiesto en condiciones que permiten a las plantas del genotipo silvestre producir mas nudos y frutos por planta (v.g siembra temprana).

El interés en los mutantes *stay green* como *Gd1d2* se basa en la idea de que una degradación mas lenta del aparato fotosintético puede extender la

Tabla 20 - Rendimiento y sus componentes de plantas de soja del genotipo silvestre del cv *Clark* y del mutante *stay green Gd1d2*, creciendo en macetas a la intemperie en la ciudad de La Plata, sembrados en diferentes fechas durante la temporada 1993-94. Los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (5% LSD).

| Fecha de Siembra                | 23- 11-93    |              | 13-12-93     |              | 8-1-94       |              |
|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                                 | <i>Clark</i> | <i>Gd1d2</i> | <i>Clark</i> | <i>Gd1d2</i> | <i>Clark</i> | <i>Gd1d2</i> |
| Nudos por planta                | 45,0 a       | 40,7 ab      | 37,4 b       | 33,0 b       | 27,8 c       | 23,6 c       |
| Frutos por planta               | 47,3 a       | 38,0 b       | 41,0 b       | 38,4 b       | 43,6 ab      | 28,0 d       |
| Semillas por planta             | 116,7 a      | 103,0 b      | 105,7 ab     | 93,0 c       | 102,3 b      | 94,2 b       |
| Peso de semillas por planta (g) | 18,6 a       | 15,5 b       | 17,4 a       | 15,1 bc      | 16,4 ab      | 14,8 b       |
| Peso por semilla (mg)           | 149 a        | 165 bc       | 174 c        | 162 b        | 163 b        | 159 b        |

capacidad fotosintética del canopeo y permitir que los cultivos acumulen mas materia seca durante el llenado para producir un mayor rendimiento. *Gd1d2* inhibe la degradación de la clorofila, proteínas tilacoidales y Rubisco durante la senescencia (Guamét et al 1991, Guamét y Gianibelli 1994, Guamét y Gianibelli 1996) y en experimentos llevados a cabo en cámara de crecimiento, prolonga la actividad fotosintética de las hojas (Guamét et al 1990). Sin embargo, pese a la preservación de los componentes del cloroplasto, la tasa fotosintética de las hojas de *Gd1d2* en condiciones semejantes a las naturales (v.g, plantas creciendo en macetas a la intemperie) fue semejante a la del genotipo silvestre (Tabla 21). Las tasa fotosintéticas de *Clark* y *Gd1d2* fueron muy similares al inicio del llenado (19 DDF), antes de que la senescencia haya comenzado, y a mitad del llenado (31



Tabla 21 - Tasa fotosintética (TF), conductancia estomática (gs) y concentración interna de CO<sub>2</sub> (Ci/Ce) de plantas de soja del genotipo silvestre del cv *Clark* y del mutante *stay green Gd1d2*, creciendo en macetas a la intemperie en la ciudad de La Plata, sembrados durante la temporada 1990-91. Los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (5% LSD). DDF: días desde la floración. Ci: concentración intercelular de CO<sub>2</sub>. Ce: concentración externa de CO<sub>2</sub>.

|   | 19 DDF       |              | 31 DDF       |              |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|
|   | <i>Clark</i> | <i>Gd1d2</i> | <i>Clark</i> | <i>Gd1d2</i> |
| TF ( $\mu\text{moles CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) | 24,0 a       | 26,0 a       | 20,6 a       | 15,3 a       |
| gs ( $\text{mmoles H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )    | ND           | ND           | 432 a        | 205,2 b      |
| Ci/Ce (ppm)   | ND           | ND           | 0,74 a       | 0,64 b       |

DDF) cuando las hojas de *Clark* han perdido el 20 % de su clorofila y proteína soluble, incluyendo Rubisco (Guiamét y Gianibelli 1996). A mitad del llenado, la conductancia estomática fue un 50 % menor en el mutante que en el genotipo silvestre y, consecuentemente, la concentración interna de CO<sub>2</sub> fue también menor en *Gd1d2* (Tabla 21).

Mediciones subsiguientes de la conductancia estomática al mediodía o media mañana (Tabla 22) muestran que la gs de *Gd1d2* es menor que la del genotipo silvestre, incluso en condiciones de adecuado suministro hídrico. En estas condiciones, la conductancia estomática de *Gd1d2* fue solamente un 30 a 57 % de los valores registrados en el cv *Clark*. Por lo tanto, en condiciones

Tabla 22- Conductancia estomática (gs) de la quinta y séptima hoja trifoliolada de plantas de soja del genotipo silvestre del cv *Clark* y del mutante *stay green Gd1d2*, creciendo en macetas a la intemperie en la ciudad de La Plata, sembrados durante la temporada 1990-91. Las mediciones se efectuaron a media mañana (9 a 9,30 h) y al mediodía (12 a 12,30 h). Los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente (5 % LSD).

|                      | Media mañana |              | Mediodía     |              |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                      | <i>Clark</i> | <i>Gd1d2</i> | <i>Clark</i> | <i>Gd1d2</i> |
| 5 <sup>ta</sup> hoja | 348 a        | 164 b        | 344 a        | 104 b        |
| 7 <sup>ma</sup> hoja | 409 a        | 232 a        | 432 a        | 205 b        |

ambientales normales la menor conductancia estomática del mutante *stay green* es una importante limitación de la fotosíntesis que puede impedir que este genotipo realice su potencial de mantener una actividad fotosintética prolongada durante el llenado.

Durante la senescencia normal de plantas con adecuado suministro hídrico, las hojas de *Gd1d2* experimentan una marcada deshidratación antes de la abscisión, similar a la que ocurre en condiciones de sequía en plantas más jóvenes. Esto indicaría que esta mutación afecta las relaciones hídricas en el mutante, al punto que la conductancia estomática limita la fijación de CO<sub>2</sub>, aun con un suministro de agua adecuado. El efecto adverso de la mutación se notaría menos en plantas cultivadas en cámaras de crecimiento, debido a que la irradiancia es menor y la humedad relativa mayor que en condiciones naturales. Esto explicaría por qué el rendimiento de plantas cultivadas en cámaras fue semejante entre *Clark* y *Gd1d2* (Guiamét et al 1990), mientras que en plantas creciendo a la intemperie el rendimiento fue menor en el mutante.

La disminución de la gs durante el llenado en el mutante refuerza la idea de que la disminución de la apertura estomática es un síntoma de su mayor sensibilidad al estrés. Esto coincide con los resultados obtenidos en capítulos previos (2 y 3), donde la gs del mutante disminuye ante el estrés de manera semejante al genotipo silvestre, pese a lo cual las hojas de *Gd1d2* se deshidratan irreversiblemente y las de *Clark* no. Estos resultados indican que las mutaciones *G*, *d1* y *d2* afectan tanto la senescencia como la tolerancia al estrés, y que estos efectos se manifiestan incluso durante la senescencia de plantas con adecuado suministro hídrico.

## Capítulo 8.

### Discusión General y conclusiones.

### 8.1) Discusión.

La sequía acelera la senescencia de las hojas, reduciendo así el área fotosintetizante (Tardieu 1996). En algunos cultivos (v.g maíz) la disminución del rendimiento en granos provocada por la sequía se correlaciona estrechamente con el acortamiento de la duración del área foliar fotosintéticamente activa (Wolfe et al 1988). Además, el dismantelamiento del cloroplasto y, especialmente la degradación de la Rubisco, pueden comprometer severamente la recuperación de la actividad fotosintética luego de superada la sequía (Heckathorn et al 1996). Dependiendo de la intensidad y duración del estrés, la senescencia y abscisión combinadas pueden defoliar casi completamente un cultivo como la soja, acortando el período de llenado de las semillas y reduciendo drásticamente el rendimiento (Tardieu 1996). Para determinar el impacto de la senescencia foliar sobre la actividad fotosintética durante el estrés, se estudió el comportamiento del mutante *stay green Gd1d2* frente a un episodio de estrés hídrico. Durante la senescencia normal de las hojas, *Gd1d2* mantiene la integridad del cloroplasto y retiene parte de la Rubisco en comparación con el genotipo silvestre que senesce normalmente (Guamét y Gianibelli 1994 y 1996). La hipótesis originalmente planteada conjeturaba que el estrés hídrico aceleraría la degradación del cloroplasto en el genotipo silvestre *Clark*, y que este hecho comprometería la recuperación de la actividad fotosintética de las hojas luego de superada la sequía. El mutante, al retener la integridad del cloroplasto, experimentaría una recuperación de la capacidad fotosintética mas rápida que la del genotipo silvestre, una vez reanudado el suministro de agua. Sin embargo la recuperación de la fijación de CO<sub>2</sub> luego de un período de sequía fue semejante en plantas al estado reproductivo de ambos genotipos (Cap. 2). Por el contrario, el mutante *Gd1d2* resultó ser mas sensible a la sequía que el genotipo silvestre, ya que sus hojas comenzaron a deshidratarse irreversiblemente a valores de potencial agua del suelo mayores que los necesarios para provocar dicho fenómeno en *Clark* (-0,7 - 0,8 MPa para *Gd1d2* y -1,3 - 1,5 MPa para *Clark*). La desecación de las hojas inducida

por la sequía en *Gd1d2* ocurre primero en las hojas viejas, y luego sigue hacia las hojas superiores más jóvenes. La mayor sensibilidad del mutante *stay green* a la sequía obligó a plantear nuevos objetivos para la tesis, centrados en la caracterización del fenómeno (esto es, la mayor sensibilidad a la sequía del mutante) y en dilucidar sus posibles causas. Si se observan los resultados del Cap. 3, se aprecia que el contenido de agua (expresado como CRA) disminuye en forma más marcada en el mutante *Gd1d2* que en el genotipo silvestre, a medida que progresa la sequía. Asimismo, el  $\Psi_{\text{hoja}}$  en el mutante disminuye más rápidamente que el del genotipo silvestre. Este comportamiento evidencia claramente la mayor sensibilidad de *Gd1d2* al estrés hídrico, y es coherente con el hecho de que las hojas del mutante se deshidraten con valores de potencial agua del suelo mayores que los necesarios para que esto mismo ocurra con el genotipo silvestre.

La medición del potencial soluto a hidratación máxima de las hojas (Cap.3) muestra que la disminución del potencial agua del mutante *Gd1d2*, se debe a la deshidratación y no a la acumulación de solutos (vg, ajuste osmótico), que por otra parte tampoco ocurre en el genotipo silvestre. Esto indicaría que la causa de la deshidratación de las células del mutante no es su incapacidad de realizar un ajuste osmótico.

Una posible causa de la mayor sensibilidad de *Gd1d2* al estrés hídrico es que el comportamiento de los estomas de ambos genotipos sea diferente, resultando en una mayor pérdida de agua del mutante. Sin embargo, ante el estrés hídrico la conductancia difusiva al vapor de H<sub>2</sub>O (gs, Fig. 3 y 8) disminuye en ambos genotipos en forma semejante, al igual que la apertura estomática medida con el microscopio óptico en improntas de la epidermis (Cap. 3). Tampoco hubo diferencias en la gs entre ambos genotipos ante la aplicación exógena de ácido abscísico (ABA) (Cap. 4). Incluso en algunos casos la disminución de gs durante el período de estrés fue mayor en *Gd1d2*. Por lo tanto, la deshidratación de las hojas del mutante no puede ser atribuida en principio a una mayor apertura estomática, o a falta de sensibilidad al ABA

de los estomas de *Gd1d2*.

Los experimentos de sequía seguidos de rehidratación (Cap. 3) en los que se reanudó el riego antes de que las hojas del mutante se secaran, muestran que el CRA se recupera en forma semejante en las plantas rehidratadas de ambos genotipos. Evidentemente, no hay una obstrucción permanente del xilema en las plantas estresadas de *Gd1d2*, ya que si esto fuera así, ni el contenido de agua ni el potencial agua de la parte hidratada de la hoja del mutante volverían a niveles semejantes a las plantas no estresadas. En cuanto a la posibilidad de que se produzca embolia del xilema como consecuencia del estrés (Tyree y Sperry 1989), si ocurriera es evidentemente revertida por la rehidratación, ya que se recupera el estado hídrico de la parte hidratada. Se ha sugerido que la disminución de la conductancia estomática en condiciones de sequía está acoplada con la disminución de la conductividad hidráulica del xilema, como un mecanismo de protección para evitar alcanzar el umbral crítico de cavitación (Meinzer y Grantz 1990). En *Gd1d2* la gs disminuye en forma semejante al genotipo silvestre durante la sequía, pero las hojas del mutante *stay green* se deshidratan y las de *Clark* no. Es más probable que las hojas del mutante se deshidraten porque pierden más agua, y no porque disminuye el flujo de agua a través del xilema, en comparación con el genotipo silvestre.

La gs de *Gd1d2* disminuye ante la sequía y el ABA, pero un porómetro en realidad mide la transpiración (o conductancia) tanto de los estomas como de la cutícula, sin discriminar la contribución relativa de ambas vías. En plantas bien regadas y con los estomas abiertos, la transpiración cuticular es insignificante (5 – 10 % de la pérdida de agua) comparada con la pérdida que ocurre a través de los estomas (Nobel 1992). La transpiración cuticular se vuelve más importante cuando los estomas están cerrados, como es en el caso de la sequía. El contenido de ceras epicuticulares y la transpiración cuticular se han utilizado extensamente como indicadores para la selección de cultivares tolerantes a la sequía en diversas gramíneas como el trigo pan (Johnson et al 1983), trigo duro (Araus et al 1991),

cebada (Febrero et al 1998), arroz (O'Toole et al 1979) y avena (Bengston et al 1978). Se realizaron experimentos donde se midió la transpiración cuticular aunque, debido a que la soja tiene estomas en ambas superficies, denominamos a la transpiración en esas circunstancias (oscuridad y elevado contenido de CO<sub>2</sub>, en las que los estomas probablemente están completamente cerrados) transpiración superficial mínima (Tsm), reservando el término transpiración cuticular para las superficies foliares carentes de estomas (Kerstiens 1996 a y b). Si observamos la Tsm en plántulas en ambos genotipos a medida que progresa la sequía (Cap. 5), vemos que disminuye notablemente en el genotipo silvestre y casi no lo hace en *Gd1d2*. En este experimento, sólo se midieron hojas de *Gd1d2* que no hubieran comenzado todavía a secarse. Comparando el comportamiento de la Tsm y los indicadores del estado hídrico (CRA, potencial agua), se puede ver que la desecación de las hojas de *Gd1d2* coincide con el mantenimiento de una mayor Tsm. Aparentemente el genotipo silvestre reduce la Tsm como respuesta a la sequía, mientras que el mutante no lo hace.

Las hojas de *Gd1d2* se deshidratan al final del ciclo ontogénico, incluso en plantas con adecuado suministro hídrico, contrastando con el genotipo silvestre del cv *Clark* donde abscinden frescas (Guamét et al 1990). Los resultados del Cap. 5, muestran que en plantas bien regadas al estado reproductivo, la Tsm disminuye durante la senescencia monocárpica en el genotipo silvestre, pero no en *Gd1d2*.

Se pueden plantear diferentes hipótesis para explicar la mayor Tsm de *Gd1d2*. Una de las posibles causas de esta diferencia es que el contenido de ceras epicuticulares difiera en ambos genotipos. Un mayor contenido de ceras epicuticulares trae como consecuencia, además, un aumento de la reflectancia de las diferentes partes de la planta, (Johnson et al 1983, Febrero et al 1998), reduciendo la temperatura foliar y, consecuentemente, la transpiración (Johnson et al 1983). La composición y grado de deposición de las ceras puede variar de acuerdo al órgano y la ontogenia (Post Beittenmiller 1996). Para observar si existen diferencias morfológicas en las ceras epicuticulares entre ambos genotipos, se realizaron



observaciones con microscopía electrónica de barrido (MEB) de hojas unifoliladas de plantas regadas y sometidas a sequía de *Clark* y *Gd1d2* (cap.5). La morfología de las ceras epicuticulares es muy semejante en ambos genotipos, por lo que la mayor sensibilidad al estrés de *Gd1d2* probablemente no se debe a diferencias en la deposición de ceras epicuticulares.

Los resultados obtenidos sugieren la existencia de una vinculación entre la senescencia foliar y la transpiración cuticular. En *Impatiens holstii*, la transpiración cuticular disminuye durante la senescencia foliar. Los resultados con *Impatiens* son importantes, ya que carece de estomas en la cara adaxial, por lo cual los resultados están libres de cualquier interferencia estomática residual. La naturaleza de la vinculación entre la senescencia foliar y la Tsm (o Tc) es por ahora una cuestión motivo de especulación. El grado de impermeabilización de la cutícula depende de la deposición de ceras, que varían en su composición con el órgano y la ontogenia (Post Beitenmiller 1996). Es posible especular que la composición de ceras y, consecuentemente, la transpiración cuticular se modificaran durante la senescencia, y este hecho fuera afectado pleitrópicamente por las mutaciones que causan el carácter *stay green*.

Indudablemente, existe una vinculación entre el carácter *stay green* y la sensibilidad a la sequía o, con mayor propiedad, entre la senescencia foliar y la resistencia al estrés. Durante los últimos años se han clonado numerosos genes que aumentan o disminuyen su expresión en respuesta al estrés hídrico y durante la senescencia, pero el conocimiento de la regulación genética de ambos procesos es todavía fragmentario (Buchanan Wollaston 1997, Ingram y Bartels 1996), por lo que resulta sumamente difícil deducir cuales son las vías en común entre ambos fenómenos. La existencia de estas vías comunes se infiere de la existencia de genes que aumentan su expresión, tanto durante la senescencia como el estrés hídrico (Buchanan Wollaston 1997). Además, los resultados encontrados en esta tesis muestran que las mismas mutaciones que inhiben la senescencia foliar reducen la

tolerancia al estrés, lo cual constituye otra evidencia de la existencia de una vía regulatoria en común entre ambos procesos. Entre los genes expresados durante la senescencia se encuentra un gen que codifica una proteína semejante a una LEA (Weaver et al 1998). Las LEA (late embryogenesis abundant proteins) se acumulan en las semillas, y se les ha atribuido la función de estabilizar las estructuras celulares durante la desecación (Ingram y Bartels 1996). Otros genes que modifican su expresión en respuesta al estrés son los de las acuaporinas, que regulan el transporte de agua a través de la membrana celular (MIP, membrane intrinsic protein) y el tonoplasto (TIP, tonoplast intrinsic protein), y estas proteínas pueden ser reguladas por fosforilación reversible (Steudle y Henzler 1995, Mullet y Whitsitt 1996). Se ha clonado un gen que se expresa durante la senescencia, cuya secuencia es homóloga a una MIP (Buchanan Wollaston 1997). Dado que la combinación de los genes *G*, *d1* y *d2* inhiben un amplio espectro del síndrome de senescencia foliar (Noodén y Guiamét 1996) es posible que alguno, o los tres, codifiquen factores transcripcionales que regulen la expresión de genes involucrados en la degradación de proteínas, lípidos, pigmentos y en la tolerancia al estrés. Es posible que dentro de los genes cuya expresión es inhibida en *Gd1d2*, se encuentren algunos de resistencia a la sequía como los citados anteriormente, provocando la mayor sensibilidad al estrés del mutante *Gd1d2*. Para dilucidar este punto, se deberá estudiar la expresión de los genes de resistencia a la sequía en *Gd1d2*, como primer paso para intentar comprender la interrelación genética entre el estrés hídrico y la senescencia foliar.

Si la resistencia al estrés y la senescencia comparten vías de regulación en común, como indican los resultados obtenidos con *Gd1d2*, la comprensión de esta interrelación resulta de gran interés desde el punto de vista del mejoramiento genético. En general, se acepta que el retraso de la senescencia foliar, al prolongar el período de llenado de las semillas, puede aumentar el rendimiento (Thomas y Smart 1993, Tardieu 1996). Sin embargo, modificar genéticamente a una planta para que retrase la senescencia puede conducir a prolongar la actividad fotosintética a costa de disminuir

la resistencia al estrés. Esto es lo que sucede aparentemente con *Gd1d2*, donde las relaciones hídricas afectan el rendimiento aún en plantas que crecen en condiciones naturales con adecuado suministro hídrico (Capítulo 7). Si bien el mutante *Gd1d2* mantiene la integridad de su maquinaria fotosintética durante la senescencia (Guiamét et al 1990 y 1991, Guiamét y Gianibelli 1994 y 1996) este hecho no se traduce en el mantenimiento de la actividad fotosintética cuando crece en condiciones naturales. La limitación de la actividad fotosintética en condiciones naturales se debe probablemente a la menor conductancia estomática del mutante en relación al genotipo silvestre (Cap.7). El hecho de que la conductancia estomática durante el llenado de *Gd1d2* sea menor que la del genotipo silvestre, aún con buena disponibilidad hídrica, es otra evidencia que las mutaciones que causan el fenotipo *stay green* tienen un efecto negativo sobre las relaciones hídricas del mutante. El conocimiento de la interrelación genética entre la senescencia foliar y la resistencia al estrés será necesario para una manipulación genética exitosa en el futuro, que permita retrasar la senescencia y aumentar a la vez la resistencia a la sequía del cultivo.

## **8.2) Conclusiones y perspectivas.**

El resultado mas importante en esta tesis es que la combinación de genes que causan el fenotipo *stay green* en soja provocan también una mayor sensibilidad a la sequía. Esta vinculación entre la senescencia y la tolerancia a la sequía no ha sido encontrada en otros mutantes *stay green*. Los datos obtenidos sugieren que los genes *d1* y *d2* se encuentran en un punto de una cadena de transducción de señales donde convergen la senescencia foliar y algunas respuestas al estrés hídrico. En esta tesis se realizó una extensa caracterización fisiológica del comportamiento del mutante *Gd1d2* ante la sequía. Queda pendiente determinar cuáles genes de resistencia a la sequía son controlados por *G*, *d1* y *d2* como un primer paso para dilucidar la interrelación genética entre la senescencia foliar y las respuestas de las plantas al estrés hídrico.

## Referencias

- Abeles FB, Morgan P, Saltveit M (1992) Ethylene in plant biology. 2<sup>nd</sup> Ed. Academic Press, San Diego, California.
- Andersson B, Aro EM (1997) Proteolytic activities and proteases of plant chloroplasts. *Physiol Plantarum* 100: 780-793.
- Aparicio Tejo P, Boyer J (1983). Significance of accelerated leaf senescence at low water potentials in maize. *Crop Sci* 23:1198-1202.
- Araus JL, Febrero A, Vendrell P (1991) Epidermal conductance in different parts of durum wheat grown under mediterranean conditions : the role of epicuticular waxes and stomata. *Plant Cell & Environm* 14: 545-558.
- Bachmann A, Fernández López J, Ginsburg S, Thomas H, Bouwkamp J, Solomos T, Matile P (1994) Stay green genotypes of *Phaseolus vulgaris* L.:chloroplast proteins and chlorophyll catabolites during foliar senescence. *New Phytol* 126: 593-600.
- Baldocchi DD, Verma SB, Rosenberg NJ (1983) Microclimate in the soybean canopy. *Agric Meteor* 28:321-337.
- Bartels D, Furini A, Ingram J, Salamini F (1996) Responses of plants to dehydration stress: a molecular analysis. *Plant Growth Regul* 20:111-118.
- Becker W, Apel K (1993) Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence. *Planta* 189:74- 79.
- Beers E (1997) Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death and Differentiation* 4:649-661.
- Begg, JE (1980) Morphological adaptations of leaves to water stress. In *Adaptation of plants to water and high temperature stress*. Ed: Turner, NC, Kramer PS. Wiley NY. pp 33-42.
- Beltrano J, Montaldi E, Bártoli C, Carbone A (1997) Emission of water stress ethylene in wheat (*Triticum aestivum* L.) ears: effects of rewatering. *Plant Growth Regul* 21: 121-126.
- Bengston C, Larsson S, Liljenberg C (1978) Effects of water stress on cuticular transpiration rate and amount and composition of epicuticular wax in seedlings of six oat varieties. *Physiol Plant* 44:319-324.

- Bernard RL, Weiss MG (1973) Qualitative genetics. In Soybean:improvement, production and uses. Caldwell et al ( Eds). American Society of Agronomy, Madison, WI. pp 117-154.
- Blackman S, Obendorf R, Leopold C (1992) Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. *Plant Physiol* 100:225-230.
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* 7: 1099-1111.
- Boyer J, Wong S, Farquhar G (1997) CO<sub>2</sub> and water vapor exchange across leaf cuticle at various water potentials. *Plant Physiol* 114:185-191.
- Bradford KJ, Chandler P (1992) Expression of dehydrin like proteins in embryos and seedlings of *Zizania palustris* and *Oryza sativa* during dehydration. *Plant Physiol* 99: 488-494.
- Bradford KJ, Hsiao TC (1982) Physiological adaptations to moderate water stress. In *Encyclopedia of Plant Physiol.* vol 12 B: *Plant Ecology II: Water relations and carbon assimilation.* Eds. O.L.Lange; P.S.Nobel; C.B.Osmond; H. Ziegler. Springer Verlag.
- Buchanan Wollaston V (1997) The molecular biology of leaf senescence. *J Exp Bot* 48: 181-199.
- Buchanan Wollaston V, Ainsworth C (1997) Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Molec Biol* 33: 821-834.
- Chaumont F, Barrieu F, Herman E, Chrispeels M (1998) Characterization of a maize tonoplast aquaporin expressed in zones of cell division and elongation. *Plant Physiol* 117: 1143-1152.
- Chrispeels M, Maurel C (1994) Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells? *Plant Physiol* 105: 9-13.
- Cook M, Adam Z (1997) Purification and characterization of an arginyl peptidase from the chloroplast stroma of pea seedlings. *Plant Physiol Biochem* 35: 163-168.
- Crafts Brandner S, Klein R, Klein P, Holzer R, Feller U (1996) Coordination of protein and mRNA abundances of the Clp protease subunits during senescence of *Phaseolus vulgaris* leaves. *Planta* 200: 312-318.

- Crowell DN, John M, Russell D, Amasino R (1992) Characterization of a stress induced, developmentally regulated gene family from soybean. *Plant Mol Biol* 18:459-466.
- Cruz RT, Jordan W, Drew MC (1992) Structural changes and associated reduction of hydraulic conductance in roots of *Sorghum bicolor* L following exposure to water deficit. *Plant Physiol* 99:203-212.
- D'Ambrogio de Argueso A (1986) Manual de técnicas de histología vegetal. Ed Hemisferio Sur.
- Davies WJ, Zhang J (1991) Root signal and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Ann Rev Plant Physiol & Plant Molec Biol* 42: 55-76.
- De Souza PI, Egli D, Bruening W (1997) Water stress during seed filling and leaf senescence in soybean. *Agron J* 89: 807-812.
- Drake R, John I, Farrell A, Cooper W, Schuch W, Grierson D (1996) Isolation and analysis of cDNAs encoding cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Molec Biol* 30: 755-767.
- Dodd Y, Stikic R, Davies W (1996) Chemical regulation of gas exchange and growth of plants in drying soil in the field. *J Exp Bot* 47:1475-1490.
- Fan L, Zheng S, Wang X (1997) Antisense suppression of phospholipase D  $\alpha$  retards abscisic acid and ethylene promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves. *The Plant Cell* 9: 2183-2196.
- Febrero A, Fernández S, Molina-Cano J, Araus JL (1998) Yield, carbon isotope discrimination, canopy reflectance and cuticular conductance of barley isolines of differing glaucosness. *J Exp Bot* 326: 1575-1581.
- Fehr W, Caviness C (1971) Variation in soybean development. Special Report 80, Cooperative Extension Iowa State.
- Feller U, Fischer A (1994) Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Rev Plant Sciences* 13: 241-273.
- Frederick J, Hesketh J (1994) Genetic improvement in soybean: physiological attributes. In *Genetic improvement of field crops*. Ed Gustavo Slafer . Marcel Dekker Inc, NY. Pp 237-285.
- Gan S, Amasino R M (1997) Making sense of senescence. *Plant Physiol* 113:313-319.

- Gepstein S (1988). Photosynthesis. In Noodén, L.D. & Leopold, A.C (Eds.) :Senescence and ageing in plants. Academic Press. pp 85-104.
- Graham FA, Leaver CJ, Smith SM (1992) Induction of malate synthase gene expression in senescent and detached organs of cucumber. *The Plant Cell* 4:349-357.
- Greenberg JT (1997) Programmed cell death in plant pathogen interactions. *Annu Rev Plant Physiol & Plant Molec Biol* 48:595-45.
- Guiamét JJ, Nakayama F (1984) Varietal responses of soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.) to long days during reproductive growth. *Japan J Crop Sci* 53:299-306.
- Guiamét JJ, Teeri J, Noodén LD (1990) Effects of nuclear and cytoplasmic genes altering chlorophyll loss on gas exchange during monocarpic senescence in soybean. *Plant Cell Physiol* 31: 1123-1130.
- Guiamét JJ, Schwartz E, Pichersky E , Noodén LD (1991) Characterization of cytoplasmic and nuclear mutations affecting chlorophyll and chlorophyll binding proteins during senescence in soybean. *Plant Physiol* 96: 227-231.
- Guiamét JJ, Gianibelli MC (1994) Inhibition of the degradation of chloroplast membranes during senescence in nuclear *stay green* mutants of soybean. *Physiol Plantarum* 91: 395-402.
- Guiamét JJ, Gianibelli MC (1996) Nuclear and cytoplasmic *stay green* mutations of soybean alter the loss of leaf soluble proteins during senescence. *Physiol Plantarum* 96: 655-661.
- Guiamét JJ, Pichersky E, Noodén LD (1999) Mass exodus from senescing soybean chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 40: 986-992.
- Gwathmey CO; Hall AE (1992) Adaptation to midseason drought of cowpea genotypes with contrasting senescence traits. *Crop Sci* 32: 773-778.
- Gwathmey CO, Hall AE, Madore MA (1992a) Adaptive attributes of cowpea genotypes with delayed monocarpic leaf senescence. *Crop Sci* 32: 765-772.
- Gwathmey CO, Hall AE, Madore MA (1992b) Pod removal effects on cowpea genotypes contrasting in monocarpic senescence traits. *Crop Sci* 32: 1003-1009.
- Gut H, Matile P (1988) Apparent induction of key enzymes of the glyoxylic acid cycle in senescent barley leaves. *Planta* 176:548-550.

- Heckathorn SA; De Lucia E, Zielinske R (1997) The contribution of drought related decreases in foliar nitrogen concentration to decreases in photosynthetic capacity during and after drought in prairie grasses. *Physiol Plantarum* 101:173-182.
- Hetherington A, Quatrano R (1991) Mechanisms of action of abscisic acid at the cellular level. *New Phytol* 119:9-32.
- Hsiao TC (1973) Plant responses to water stress. *Ann Rev Plant Physiol* 24:519-570.
- Inskeep W, Bloom P (1985) Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N dimethylformamide and 80 % acetone. *Plant Physiol* 77: 483-485.
- Ingram J; Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Ann Review Plant Physiol Plant Molec Biol* 47: 377-403.
- Jenks MA, Tuttle H, Eigenbrode SD, Feldmann K (1995) Leaf epicuticular waxes of the *Eceriferum* mutants in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 108:369-377.
- Jiang C, Rodermel S, Shibles R (1993) Photosynthesis, Rubisco activity and amount, and their regulation by transcription in senescing soybean leaves. *Plant Physiol* 101:105-112.
- John I, Hackett R, Cooper W, Drake R, Farrell A, Grierson D (1997) Cloning and characterization of tomato leaf senescence related cDNAs. *Plant Molec Biol* 33: 641-651.
- Johnson DA, Richards RA, Turner N (1983) Yield, water relations, gas exchange, and surface reflectance of near isogenic wheat lines differing in glaucousness. *Crop Sci* 23:318-325.
- Jones HG, Sutherland R (1991) Stomatal control of xylem embolism. *Plant Cell & Environm* 14,607-612.
- Joshee N, Kisaka H, Kitagawa Y (1998) Isolation and characterization of a water stress specific genome gene, pws1 18, from rice. *Plant Cell Physiol* 39: 64-72.
- Kamachi K, Yamaya T, Hayakawa T, Mae T, Ojima K (1992) Changes in cytosolic glutamine synthetase polypeptide and its mRNA in a leaf blade of rice plants during natural senescence. *Plant Physiol* 98:1323-1329.
- Katsuhara M (1997) Apoptosis like cell death in barley roots under salt stress. *Plant Cell Physiol* 38:1091-1093.



- Kerstiens G (1996) Diffusion of water vapour and gases across cuticles and through stomatal pores presumed closed. In *Plant cuticles: an integrated functional approach*. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK. pp 121-134.
- Kim YS, Choi D, Lee MM, Lee SH, Kim WT (1998) Biotic and abiotic stress related expression of 1- aminocyclopropane - 1 carboxylate oxidase gene family in *Nicotiana glutinosa* L. *Plant Cell Physiol* 39: 565-573.
- Landolt R, Matile P (1990) Glyoxisome-like microbodies in senescent spinach leaves. *Plant Sci* 72:159-163.
- Layzell D (1990) N<sub>2</sub> fixation, NO<sub>3</sub><sup>2-</sup> reduction and NH<sub>4</sub> assimilation. In: *Plant Physiology, biochemistry and molecular biology*. Dennis D y Turpin D (Eds). Longman Scientific & Technical, NY. pp 389-406.
- Leggett J, Frere M (1971) Growth and nutrient uptake by soybean plants in nutrients solution of graded concentration. *Plant Physiol* 48: 457-460.
- Matile P, Schellenberg M, Peisker C (1992) Production and release of a chlorophyll catabolite in isolated senescent chloroplasts. *Planta* 187:230-235.
- Matile P, Hortensteiner S, Thomas H (1999) Chlorophyll degradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 67-95.
- Meinzer FC, Grantz DA (1990) Stomatal and hydraulic conductance in growing sugarcane: stomatal adjustment to water transport capacity. *Plant Cell & Environment* 13:383-388.
- Meinzer FC, Grantz DA (1991) Coordination of stomatal, hydraulic and canopy boundary layer properties: Do stomata balance conductances by measuring transpiration? *Physiol Plantarum* 83:324-329.
- Morgan P, Drew M (1997) Ethylene and plant responses to stress. *Physiol. Plantarum* 100:620-630.
- Mullet J, Whitsitt M (1996) Plant cellular responses to water deficit. *Plant Growth Regul* 20:119-124.
- Munns R, Sharp R (1993) Involvement of abscisic acid in controlling plant growth in soils of low water potential. *Aust J Plant Physiol* 20: 425-437.
- Neufeld HS, Grantz DA, Meinzer F C, Goldstein G, Crisosto GM, Crisosto C (1992) Genotypic variability in vulnerability of leaf xylem to cavitation in water stressed and well irrigated sugarcane. *Plant Physiol* 100:1020-1028.

- Neumann PM, Stein Z (1984) Relative rate of delivery of xylem solutes to shoot tissues: possible relationship to sequential leaf senescence. *Physiol Plant* 62:390-397.
- Neumann PM (1987) Sequential leaf senescence and correlatively controlled increases in xylem flow resistance. *Plant Physiol* 83:941-944.
- Newcomb W (1990) Plastid structure and development. In: *Plant Physiology, biochemistry and molecular biology*. Dennis D y Turpin D (Eds). Longman Scientific & Technical, NY.
- Nilsen E, Orcutt D (1996) *Physiology of Plants under stress. Abiotic factors*. John Wiley & Sons, NY.
- Nobel P (1992) *Physicochemical and environmental plant physiology*. Academic Press, San Diego, California.
- Noodén LD, Benner JL (1984) Translocation of photosynthate from soybean leaves to the pods during senescence. *Biochem Physiol Pflanzen* 179:269-275.
- Noodén LD, Letham DS (1986) Cytokinin control of monocarpic senescence in soybean. *Plant Growth Substances* 1985.
- Noodén LD (1988 a ) The phenomena of senescence and ageing. In Noodén, L.D. & Leopold, A.C (Eds.) :*Senescence and ageing in plants*. Academic Press. pp 34-36.
- Noodén LD (1988 b ) Whole plant senescence . In Noodén, L.D. & Leopold, A.C (Eds.) : *Senescence and ageing in plants*. Academic Press.
- Noodén L, Guiamét JJ (1989) Regulation of assimilation and senescence by the fruit in monocarpic plants. *Physiol Plantarum* 77: 267-274.
- Noodén LD, Singh S, Letham DS (1990) Correlation of sap cytofinin levels with monocarpic senescence in soybean. *Plant Physiol* 93: 33-39.
- Noodén LD, Letham DS (1993) Cytokinin metabolism and signalling in the soybean plant. *Aust J Plant Physiol* 20: 639-653.
- Noodén LD, Guiamét JJ (1996) Genetic control of senescence and ageing in plants. In *Handbook of the biology of ageing*. Fourth Edition. Academic Press.
- Noodén LD, Guiamét JJ, John I (1997) Senescence mechanisms. *Physiol Plantarum* 101:746-753.

- Oh SA, Park JH, Lee GI, Paek KH, Park SK, Nam H G (1997) Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J* 12: 527-535.
- Oh SA, Lee SY, Chung IK, Lee CH, Nam H G (1997) A senescence associated gene of *Arabidopsis thaliana* is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Molec Biol* 30:739-754.
- O'Toole JC, Cruz RT, Seiber JN (1979) Epicuticular wax and cuticular resistance in rice. *Physiol Plantarum* 47:239-244.
- Passioura JB (1982) Water in the plant soil atmosphere continuum. In *Encyclopedia of Plant Physiol. vol 12 B: Plant Ecology II: Water relations and carbon assimilation*. Eds. O.L.Lange; P.S.Nobel; C.B.Osmond; H. Ziegler. Springer Verlag.
- Peoples MB, Dalling MJ (1988) The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation. In Noodén, L.D. & Leopold, A.C (Eds.) :*Senescence and ageing in plants*. Academic Press. pp 85-104.
- Pistelli L, Perata P, Alpi A (1992) Effect of leaf senescence on glyoxylate cycle enzyme activity. *Aust J Plant Physiol* 19: 723- 729.
- Pistelli L, Nieri B, Smith S, Alpi A, De Bellis L (1996) Glyoxylate cycle enzyme activities are induced in senescent pumpkin fruits. *Plant Sci* 119: 23-29.
- Post Beittenmiller D (1996) Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Ann Review Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:405-430.
- Ried J, Walker Simmons M (1993) Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation tolerant seedlings of wheat. *Plant Physiol* 102: 125-131.
- Robinson C, Klosgen RB (1994) Targeting of proteins into and across the thylakoid membrane - a multitude of mechanisms. *Plant Molec Biol* 26:15-24.
- Scholander PF, Hammel ED, Bradstreet EA, Hemmingsen (1965). Sap pressure in vascular plants. *Science* 148:339-346.
- Shaheen Akhtar M, Goldschmidt E; John I, Rodoni S, Matile P, Grierson D (1999) Altered patterns of senescence and ripening in *gf*, a stay green mutant of tomato. *J Exp Bot* 50: 1115-1122.
- Shinozaki K, Yamaguchi Shinozaki K (1997) Gene expression and signal transduction in water stress response. *Plant Physiol* 115:327-334.

- Smart C (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytol* 126: 419-448.
- Steudle E, Henzler T (1995) Water channels in plants: do basic concepts of water transport change? *J Exp Botany* 46: 1067-1076.
- Stoddart JL, Thomas H (1982) Leaf senescence. In: *Encyclopedia of Plant Physiol.* Vol 14 A. Eds D Boulter & B.Parthier. Springer Verlag. pp 592-636.
- Sugiura M (1992) The chloroplast genome. *Plant Molec Biol* 19:149-168.
- Tambussi E, Bartoli C, Beltrano J, Guiamét JJ, Araus J (2000) Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol Plantarum* 108: 398-404.
- Tardieu F (1996) Drought perception by plants. Do cells of droughted plants experience water stress? *Plant Growth Regulation* 20:93-104.
- Teramoto H, Momotani E, Takeba G, Tsuji H (1996) Isolation and characterization of cDNAs for cytokinin repressed genes. *Plant Growth Regul* 18:59-70.
- Thomas H (1982) Leaf senescence in a non yellowing mutant of *Festuca pratensis*. 2. Proteolytic degradation of thylakoid and stroma polypeptides. *Planta* 154:219-223.
- Thomas H, Ougham H, Emyr Davies TG (1992) Leaf senescence in a non yellowing mutant of *Festuca pratensis*. Transcripts and translation products. *J Plant Physiol* 139: 403-412.
- Thomas H, Smart C (1993) Crops that stay green. *Ann Appl Biol* 123: 193-219.
- Thomas H (1997) Chlorophyll: a symptom and a regulator of plastid development. *New Phytol* 136: 163-181.
- Thomashow M (1998) Role of cold responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol* 118: 1-7.
- Tyree MT, Sperry J (1989) Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. An Review *Plant Physiol Plant Molec Biol* 40;19-38.
- Tyree MT, Ewers FW (1991) The hydraulic architecture of trees and other woody plants. *New Phytol* 119:345-360.
- Vartanian N (1996) Mutants as tools to understand cellular and molecular drought tolerance mechanisms. *Plant Growth Regul* 20:125-134.

- Wolfe DW, Henderson DW, Hsiao TC, Alvino A (1988) Interactive water and nitrogen effects on senescence of maize : 1. Leaf area duration, nitrogen distribution and yield. *Agron J* 80: 859-864.
- Weaver L, Gan S, Quirino B, Amasino R (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molec Biol* 37: 455 - 469.
- Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho T, Wu R (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol* 110:249-257.
- Yamada S, Nelson D, Ley E, Marquez S, Bohnert H (1997) The expression of an aquaporin promoter from *Mesembryanthemum crystallinum* in tobacco. *Plant Cell Physiol* 38:1326-1332.
- Yamada S, Komori T, Myers P, Kuwata S, Kubo T, Imaseki H (1997) Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant Cell Physiol* 38: 1226-1231.
- Yen CH, Yang CH (1998) Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants. *Plant Cell Physiol* 39: 922-927.