

AIMAR, DARIO CESAR
Estudios fisiologico



2013

72686

72686

MFN:
Chisif:
T. 030

72686

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Estudios fisiológicos y genéticos de la tolerancia a
estrés hídrico en *Panicum virgatum* L.

Ing. Agr. Darío César Aimar



CREER..CREAR..CRECER

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Río Cuarto, Córdoba, Argentina

2013

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estudios fisiológicos y genéticos de la tolerancia a
estrés hídrico en *Panicum virgatum* L.

Por

Ing. Agr. Darío César Aimar


Directora: Dra. Guillermina I. Abdala

Co-Directora: Dra. María Lía Molas

Río Cuarto, Córdoba, Argentina

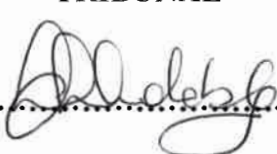
26 de noviembre de 2013

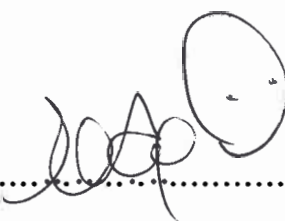
TESISTA


.....

TRIBUNAL


.....


.....


.....

Dedicatoria

A mi compañera de vida, Griselda, que me acompaño en todo momento y especialmente por su apoyo sobre todo en la etapa final.

A mi familia, mi mama Diana, mis hermanos Gustavo y Damián y a mi papa Eduardo que fue y es mi ejemplo de vida.

A mi otra familia Adela, Omar, Carina, Micol, Agustín y Walter.

Agradecimientos

A la Facultad de Agronomía (UNLPam) y Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales (UNRC) por proveer el espacio, los recursos y el equipamiento con el que se realizaron los experimentos. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por el apoyo financiero a través de la beca doctoral.

A las autoridades de la Facultad de Agronomía, Decano Dr. Gustavo D. Fernández y Vice Decana Lic. Ana Urioste por su apoyo, el cual fue fundamental para la culminación de mi trabajo de tesis.

Un especial agradecimiento a mis directoras de tesis Guillermina y Lía, por su apoyo y sus aportes en mi formación académica y personal.

A los miembros de la comisión y jurados de esta tesis.

A mis compañeros de la Facultad de Agronomía con los que compartí buenos momentos y especialmente a los que aportaron desinteresadamente un poco de su tiempo para la concreción de mi tesis, en especial a Mario, Luciano, Daniel, Alberto, Olga, Carlos. Y a mis compañeros de Hidrología, por su apoyo y paciencia Jorge y Sergio.

A toda la gente del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico – Químicas y Naturales (UNRC), especialmente a Andrea, Sergio, Ana, Oscar. Y a Maximiliano, Cristian, Paula y Diego por hacerme el aguante.

A Marisol, Lucrecia, Laura, Bárbara y Javier del Laboratorio de Biocatálisis de la Facultad de Exactas y Naturales de la UNLPam, por proveer parte del equipamiento con el que se realizaron algunas determinaciones.

A mi cuñado Walter y a Cintia que me albergaron y me aguantaron en mi estadía en Río Cuarto.

Muchas, muchísimas gracias a todos.

Resumen

Las proyecciones sobre los efectos del cambio climático indican que la superficie de tierra afectada por sequías se incrementará, siendo la escasez de agua uno de los factores más limitantes para los cultivos agrícolas y la producción de forraje en regiones áridas y semiáridas. *Panicum virgatum* (pasto varilla) es una especie forrajera perenne, importante como fuente de biomasa celulósica para la producción de bioenergía. El uso comercial de esta especie está limitado por su lenta y dificultosa implantación, problema que se acentúa por baja humedad edáfica al momento de siembra. El objetivo del presente trabajo fue analizar la respuesta a estrés hídrico y rehidratación en estadios tempranos del crecimiento de *P. virgatum* a fin de comprender mejor las bases de su tolerancia a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico y molecular. En ensayos de germinación en condiciones de estrés hídrico (-0,5 Mpa) se evaluaron 9 cultivares, y se seleccionaron 2 cvs. de comportamiento contrastante, cv. Kanlow como tolerante y cv. Greenville como susceptible. Plantas jóvenes (55 días desde la siembra) de ambos cultivares se sometieron a estrés hídrico (60 % CRA) y rehidratación, y se evaluaron parámetros de crecimiento, actividad de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), contenidos de hormonas participantes en estrés ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) y genes asociados a estas hormonas y a estrés hídrico (*RAB18*, *DREB2*, *RD22*, *PR2*). El estrés hídrico no afectó el crecimiento del cv. Kanlow, mientras que el cv. Greenville fue afectado negativamente ($p < 0.05$). La actividad de los complejos SOD y CAT en ambos cvs. aumentó bajo estrés hídrico y continuó aumentando en rehidratación, observándose incrementos superiores en Kanlow ($p < 0.05$), lo cual demuestra la participación de ambos sistemas antioxidantes en la respuesta a estrés y en la rehidratación. En cuanto a contenidos hormonales, un incremento significativo en el contenido de ABA ocurrió en ambos cvs. durante el tratamiento de estrés (11 y 4,5 veces en el cv. tolerante y sensible respectivamente). Este aumento se correlacionó con incrementos significativos en ambos cvs. en la expresión del transcripto *RAB18* (dependiente de ABA), demostrando que este gen es buen indicador de los contenidos endógenos de ABA en *P. virgatum*. Asimismo, los altos contenidos de ABA se correspondieron con una disminución en los niveles endógenos de SA en el cv. Greenville, lo cual nos llevó a programar ensayos de aplicación exógena de SA y de evaluación de su efecto sobre las variables antes mencionadas. El crecimiento fue severamente afectado por la aplicación de SA en el cv. sensible Greenville, a diferencia del cv. Kanlow que no fue afectado. Del mismo modo, SA exógeno redujo el contenido de ABA durante el estrés en 50 % ($p < 0.05$) respecto a las plantas no tratadas en ambos cvs., evidenciando una interacción antagonista entre ABA/SA durante el estrés. Este hecho se vio reflejado en la expresión del gen *RAB18*, confirmando nuevamente que es un buen indicador de los niveles de ABA en *P. virgatum*. El gen *PR2* dependiente de SA, se expresó solo en el cv. tolerante Kanlow en respuesta a SA exógeno tanto en el control como en rehidratación, siendo este un punto interesante a profundizar en futuros estudios de tolerancia a estrés hídrico en *P. virgatum*. Finalmente, el presente trabajo ha identificado material genético de buen comportamiento en condiciones de estrés hídrico y mediante su estudio aporta nuevos conocimientos sobre las bases de la tolerancia a estrés en *P. virgatum*, cultivo energético con importantes perspectivas para regiones semiáridas.

Abstract

Climate change projections indicate that the land affected by drought would increase, and water deficiency would limit the production of agricultural crops and forage in arid and semiarid regions even more. *Panicum virgatum* L. (Switchgrass) is a perennial forage grass, important as a lignocellulose source for bioenergy. Commercial use of this species is limited by its slow and difficult establishment, which gets worse by low soil moisture at planting. The aim of this study was to analyze the response of *P. virgatum* to water stress and rehydration in early stages of growth in order to better understand the basis of their tolerance at morphological, physiological, biochemical and molecular level. Nine cultivars were evaluated during germination under water stress (-0.5 MPa) and two cvs. of contrasting behavior were selected, cv. Kanlow as tolerant and cv. Greenville as susceptible. Young plants (55 days after sowing) of both cultivars were subjected to water stress (60 % RWC) and rehydration, and the following parameters were evaluated: growth, activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), stress hormones abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) and genes associated with water stress (*RAB18*, *DREB2*, *RD22*, *PR2*). Water stress did not affect growth of cv. Kanlow, while cv. Greenville was negatively affected ($p < 0.05$). The activity of SOD and CAT increased in both cultivars -in cv. Kanlow in major extent- under water stress and rehydration ($p < 0.05$), indicating their involvement in such responses. In terms of stress hormones, a significant increase in ABA occurred in both cultivars under stress (11 and 4.5 times in the cultivars tolerant and sensitive, respectively). This increase correlates with high expression of the ABA-dependent gene *RAB18* in both cultivars, emerging as a good indicator of ABA content in *P. virgatum*. As well, high ABA content correlated with a low SA level in cultivar Greenville, which led us to evaluate exogenous SA application. The growth was severely affected by exogenous SA in cv. Greenville while cv. Kanlow that was not affected. Similarly, SA application reduced the content of endogenous ABA during stress by 50% ($p < 0.05$) in both cultivars, suggesting an antagonistic interaction between ABA/SA under water deficit. The decrease in ABA also reduced the expression of *RAB18*, validating this gene as a good indicator of ABA levels in Switchgrass. On the other hand, the expression of the SA-dependent gene *PR2* was noticeable just in cultivar Kanlow after exogenous SA application, being a further interesting point in future studies of water stress tolerance in *P. virgatum*. Finally, this study identified genetic material with good performance under water stress and its study provides new knowledge on the basis of stress tolerance in *P. virgatum*, an energy crop with significant prospects for semiarid regions.

Índice	Página
Introducción	1
<i>El estrés hídrico dispara respuestas a varios niveles.</i>	7
<i>Acido abscísico (ABA)</i>	7
<i>Acido salicílico (SA)</i>	8
<i>Acido Jasmónico (JA)</i>	9
<i>ABA, SA, JA y sus vías de entrecruzamiento (cross talk).</i>	9
<i>Actividad antioxidante</i>	10
<i>Expresión diferencial de genes en condiciones de estrés hídrico.</i>	11
Objetivo general	13
Hipótesis y objetivos específicos.	13
Materiales y métodos	16
<i>Ensayo de germinación.</i>	17
<i>Ensayo de tolerancia a estrés hídrico.</i>	18
<i>Ensayo de recuperación.</i>	19
<i>Determinación de la densidad estomática</i>	20
<i>Ensayo de pre-tratamiento con SA, estrés hídrico y rehidratación.</i>	20
<i>Ensayo de recuperación y aplicación exógena de SA.</i>	21
<i>Determinación del contenido relativo de agua (CRA).</i>	22
<i>Cuantificación de hormonas.</i>	22
<i>Determinación de actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT).</i>	24
<i>Determinación de expresión génica.</i>	25
<i>PCR semicuantitativa de los genes de interés contra transcripción de genes house-keeping.</i>	27

Resultados

<i>Germinación y crecimiento de planta juvenil en condiciones de estrés hídrico.</i>	32
<i>Comportamiento frente a estrés hídrico y rehidratación en un cultivar sensible (i.e. Greenville) y un cultivar tolerante (i.e. Kanlow).</i>	35
<i>Crecimiento.</i>	35
<i>Hormonas relacionadas a estrés hídrico.</i>	40
<i>Actividad enzimática SOD y CAT.</i>	43
<i>Expresión de los genes marcadores de estrés hídrico.</i>	45
<i>Expresión del gen dependiente de ABA: RAB18.</i>	45
<i>Expresión del gen dependiente de ABA: RD22.</i>	46
<i>Expresión del gen independiente de ABA: DREB2A.</i>	46
<i>Expresión del gen dependiente de SA: PR2.</i>	47
<i>Contenido de hormonas asociadas a estrés hídrico y al pretratamiento con SA: entrecruzamiento en las vías de señalización de ABA, SA, JA.</i>	48
<i>Crecimiento.</i>	48
<i>Densidad estomática</i>	52
<i>Pre-tratamiento con SA exógeno y contenido endógeno de hormonas relacionadas a estrés hídrico.</i>	53
<i>Efecto del pre-tratamiento con SA exógeno sobre la actividad de las enzimas SOD y CAT en estrés hídrico y rehidratación.</i>	58
<i>Efecto del pre-tratamiento con SA exógeno sobre la expresión de los genes dependientes e independiente de ABA y dependiente de SA en estrés hídrico y rehidratación.</i>	62
<i>Expresión del gen dependiente de ABA: RAB18.</i>	62
<i>Expresión del gen dependiente de ABA: RD22.</i>	63
<i>Expresión del gen independiente de ABA: DREB2A.</i>	65
<i>Expresión del gen dependiente de SA: PR2.</i>	66

Discusión

<i>Germinación y crecimiento temprano en condiciones de estrés hídrico.</i>	69
<i>Comportamiento frente a estrés hídrico y rehidratación en un cultivar sensible (i.e. Greenville) y un cultivar tolerante (i.e. Kanlow).</i>	70

<i>Crecimiento.</i>	70
<i>Contenido de hormonas asociadas a estrés hídrico.</i>	71
<i>Actividad de enzimas SOD y CAT en condiciones de estrés hídrico.</i>	73
<i>Expresión de genes marcadores de estrés hídrico.</i>	75
<i>Aplicación exógena de SA y su efecto en la respuesta a estrés hídrico y rehidratación en el cultivar sensible (i.e. Greenville) y el cultivar tolerante (i.e. Kanlow).</i>	78
<i>Crecimiento y estado hídrico.</i>	78
<i>Contenido de hormonas asociadas a estrés hídrico y al pretratamiento con SA: entrecruzamiento en las vías de señalización de ABA, SA, JA..</i>	80
<i>Interacción ABA-SA</i>	80
<i>Interacción SA-JA</i>	82
<i>Efecto del pre-tratamiento con SA exógeno sobre la actividad de las enzimas SOD y CAT en estrés hídrico y rehidratación.</i>	83
<i>Efecto del pre-tratamiento con SA exógeno sobre la expresión de los genes dependientes e independiente de ABA y dependiente de SA en estrés hídrico y rehidratación.</i>	84
<i>Integración de los parámetros evaluados en relación a estrés hídrico y recuperación.</i>	85
Conclusiones	88
Perspectivas futuras	92
Bibliografía	93

Lista de abreviaturas

A: Alamo

ABA: ácido abscísico

AP: altura de planta

APX: ascorbato peroxidasa

B: Blackwell

C: Caddo

CAT: catalaza

CR: Cave in Rock

CRA: contenido relativo de agua

DIVMS: digestibilidad in vitro de la materia seca

DMTU: dimethyltiourea

DO: densidad óptica

DPI: diphenyleneiodonium

DREB2a: Dehydration-responsive element (DRE)-Binding proteína2a

ET: etileno

FS II: fotosistema II

G: Greenville

HPLC: cromatógrafo líquido de alta presión

JA: ácido jasmónico

JIPS: proteínas inducidas por JA

K: Kanlow

LR: longitud de raíz

LSD: mínima diferencia significativa

MPa: mega pascal

MRM: Monitoreo de Reacción Múltiple

NBT: nitro blue tetrazolium

P: Pathfinder

PB: proteína bruta

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEG: polietilenglicol

PF: peso fresco

PFA: peso fresco aéreo

PFR: peso fresco de raíz

Pmol: pico mol

PR2: endo-beta-1,3-glucanasas

PS: peso seco

PSP: peso seco de plántula entera

PT: peso turgente

RAB18: deshidrina de respuesta a ABA

RAPD: random amplified polymorphic DNA

RD22: nutrient reservoir

RFLP: restriction fragment length polymorphism

ROS: especies reactivas del oxígeno

S: Summer

SA: ácido salicílico

SOD: superóxido dismutasa

STR: Short Tandem Repeats

T: Traiblazer

VG: velocidad de germinación

*Estudios fisiológicos y
genéticos de la tolerancia al
estrés hídrico en Panicum
virgatum L.*

INTRODUCCIÓN

Introducción

El cambio climático en el presente siglo impactará en numerosos aspectos del mundo humano y natural, y el efecto más importante ocurrirá sin duda en la agricultura (Leakey, 2009). Se ha propuesto que los efectos del cambio climático incrementarán las sequías, que es quizás el factor más importante de estrés ambiental que afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas.

El déficit hídrico del suelo puede ser crónico, en las regiones climáticas con baja disponibilidad de agua, o azaroso e impredecible debido a los cambios en las condiciones climáticas durante el período de crecimiento de las plantas (Rosegrant y Cline, 2003), siendo uno de los factores más limitantes para los cultivos agrícolas y la producción de forraje en las regiones semiáridas y áridas.

Panicum virgatum (pasto varilla, switchgrass) es una especie forrajera perenne de clima subtropical, originaria de las praderas de los Estados Unidos (Moser y Vogel, 1995). En los últimos años, esta especie fue estudiada como fuente de biomasa celulósica para la producción de bioenergía (Fig. 1), principalmente como bioetanol (Bouton, 2007; Schemer et al., 2008), que es una de las fuentes energéticas alternativas más utilizada en el mundo (Patrouilleau et al., 2006). El fuerte debate instalado, entre la producción de alimentos y la generación de biocombustibles impone, el desarrollo de cultivos alternativos capaces de suplir la provisión de material para biocombustibles, con un efecto mínimo sobre la alimentación de una población mundial creciente. En este sentido, *P. virgatum* conjuga gran productividad de biomasa con reducidos costos de producción y alta eficiencia energética para la producción de bioetanol. Además produce 540% más energía renovable que la energía no renovable consumida (Schemer et al., 2008), no interviene en la alimentación humana en forma directa por lo que la incidencia de su cultivo sobre los precios de granos y sus derivados es nulo (Leibtag, 2007; Perlack et al., 2005).

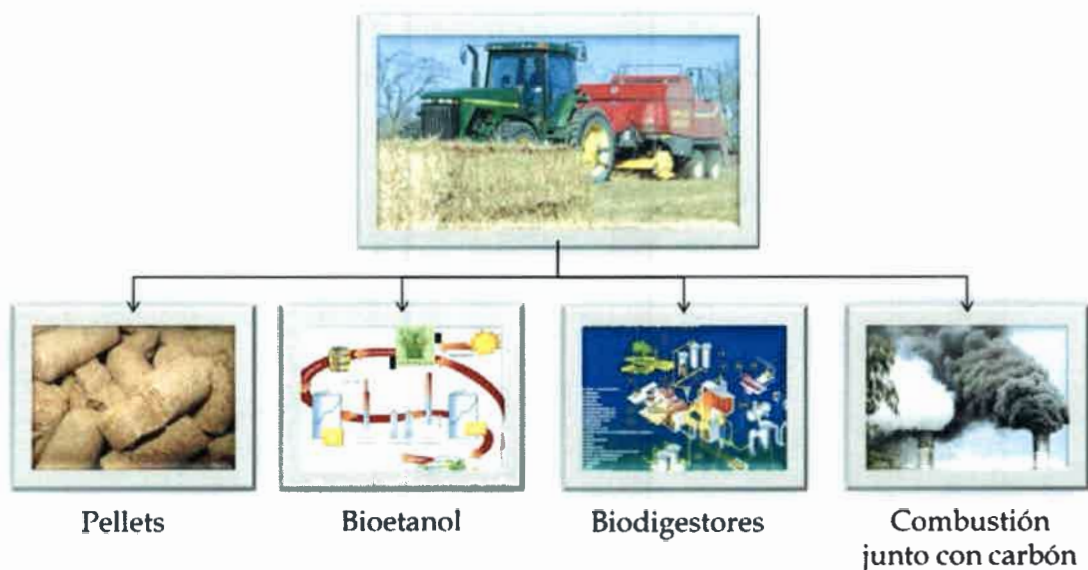


Fig. 1. Posibles usos de la biomasa de *P. virgatum* para la generación de bioenergía.

Además de su uso como fuente de biomasa, el pasto varilla posee alto valor en el control de la erosión. Presenta un canopeo denso y un extenso sistema radical (Fig. 2) que le confiere una alta eficiencia en la utilización de nutrientes y agua edáfica, adaptándose muy bien a climas semiáridos (Parrish y Fike, 2005).



Fig. 2. Fotografía mostrando el sistema radical de *P. virgatum*.
(<http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/897129>)

Estas características así como el carácter perenne de la especie reducen los costos de producción posicionándola como cultivo de bajo impacto ambiental en zonas marginales que no soportan el laboreo anual (McLaughlin y Kszos, 2005). A pesar de las ventajas comparativas descritas, el uso comercial de esta especie es limitado por su lenta y dificultosa implantación (Aiken y Springuer 1995; Evers y Butler, 2000; Hintz et al., 1998; Teel et al., 2003). Los principales factores que condicionan su establecimiento son la condición climática al momento de la implantación y las prácticas de manejo. Las siembras de fines de primavera y principios de verano a menudo fracasan, tanto en el

hemisferio norte como en nuestro país, por condiciones de escasa humedad edáfica (Petruzzi, comunicación personal; Smart y Moser, 1997). La germinación de las semillas, el tiempo de emergencia y la subsiguiente formación de raíces adventicias, críticas para la supervivencia, dependen de un adecuado contenido hídrico en el suelo (Hu y Nelson, 1985; Newman y Moser, 1988a; b).

El período de plántula es la etapa más crítica y vulnerable del crecimiento y desarrollo de los pastos. La duración e intensidad del estrés hídrico son críticos para la supervivencia de las plantas forrajeras (Bahrani et al., 2010).

En este contexto, la identificación de material genético de *P. virgatum* con tolerancia a estrés hídrico durante el crecimiento temprano es crucial si se pretende difundir su uso comercial y expandir el área cultivada.

La especie fue introducida en la Región Semiárida Pampeana (Fig. 3) por la UNLPam y el INTA (Covas, 1982; Stritzler et al., 1996) y se encuentra actualmente en estudio (Ferri et al., 1997; Petruzzi et al., 2005; 2010).



Fig. 3. Colección de diferentes cultivares de *P. virgatum* en la EE-INTA Guillermo Covas, Anguil (La Pampa).

El valor agronómico de *P. virgatum* tiene su fundamento, entre otras cosas, en el alto nivel de productividad (Tabla 1); en la Región Pampeana Semiárida es capaz de producir entre 11 y 15 tn de MS y responde muy bien a la fertilización nitrogenada pudiendo duplicar la producción (Petruzzi et al., 2010), lo que se corresponde con los resultados obtenidos por otros autores en ambientes diferentes (Mc Laughlin y Kszos, 2005; Sharma et al., 2003). Su valor nutritivo (Tabla 2), desde la etapa de brotación

(salida del invierno) cuando las temperaturas se incrementan y hasta fines del otoño, es suficiente para lograr ganancias de peso de 800 gr. diarios por animal, empleando una carga de 3 novillos de 300 kg de peso vivo (Stritzler, 2008).

Tabla 1. Acumulación de biomasa (tn MS ha⁻¹) de *P. virgatum* (cv. Álamo) en diferentes momentos e intervalos de corte, con y sin fertilización nitrogenada. Los valores representan la media ± desvío estándar (Petruzzi et al., 2010)

FECHA DE CORTE		Biomasa, (tn MS /ha)		
Fertilizado				
1° Corte	Rebrote	1° Corte	Rebrote	Total
Noviembre	Abril	6.8 ± 0.3	17.5 ± 4.3	24.3 ± 4.5
Diciembre	Abril	9.6 ± 3.8	12.3 ± 1.0	21.9 ± 3.2
Febrero	Abril	11.8 ± 1.3	5.8 ± 1.4	17.6 ± 1.3
Noviembre	Julio	6.9 ± 1.5	18.7 ± 2.5	25.6 ± 4
Diciembre	Julio	8.4 ± 2.0	11.5 ± 2.8	19.9 ± 1.7
Febrero	Julio	13.6 ± 2.9	5.8 ± 1.1	19.4 ± 1.9
Abril		20.9 ± 2.3		20.9 ± 2.3
Julio		22.3 ± 5.3		22.3 ± 5.3
No Fertilizado				
Noviembre	Abril	3.8 ± 0.3	11.1 ± 2.9	14.9 ± 2.8
Diciembre	Abril	6.9 ± 1.6	6.9 ± 0.5	13.7 ± 1.6
Febrero	Abril	13.5 ± 1.3	2.4 ± 0.3	15.8 ± 1.5
Noviembre	Julio	3.6 ± 0.9	7.6 ± 1.3	11.2 ± 1.5
Diciembre	Julio	7.2 ± 0.8	7.1 ± 0.9	14.3 ± 1.1
Febrero	Julio	7.9 ± 1.6	3.1 ± 0.7	11.0 ± 1.1
Abril		15.7 ± 5.6		15.7 ± 5.6
Julio		13.1 ± 0.5		13.1 ± 0.5

Tabla 2. Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS; en %) y concentración de proteína bruta (PB; en %) de *P. virgatum* en la Región Semiárida Central.

	DIVMS (%)	PB (%)
Primavera	68.3	11.2
Verano	64.0	8.5
Otoño	62.1	9.8
Invierno	36.5	2.6

Además, la naturaleza perenne del cultivo reduce la intensidad de manejo, el consumo de energía y de agroquímicos, lo que disminuye el costo de producción comparado con especies anuales (Hohenstein y Wright, 1994).

La producción extensiva de *P. virgatum* en zonas marginales se ubica en suelos pobres y sujetos a condiciones ambientales adversas, donde la baja disponibilidad de agua es una situación frecuente. En Argentina, se han hecho esfuerzos para introducir esta forrajera a los suelos de baja producción de las regiones semiáridas, que representan el 25% de la superficie cultivable del país (Van Dam et al., 2009) (Fig. 4).

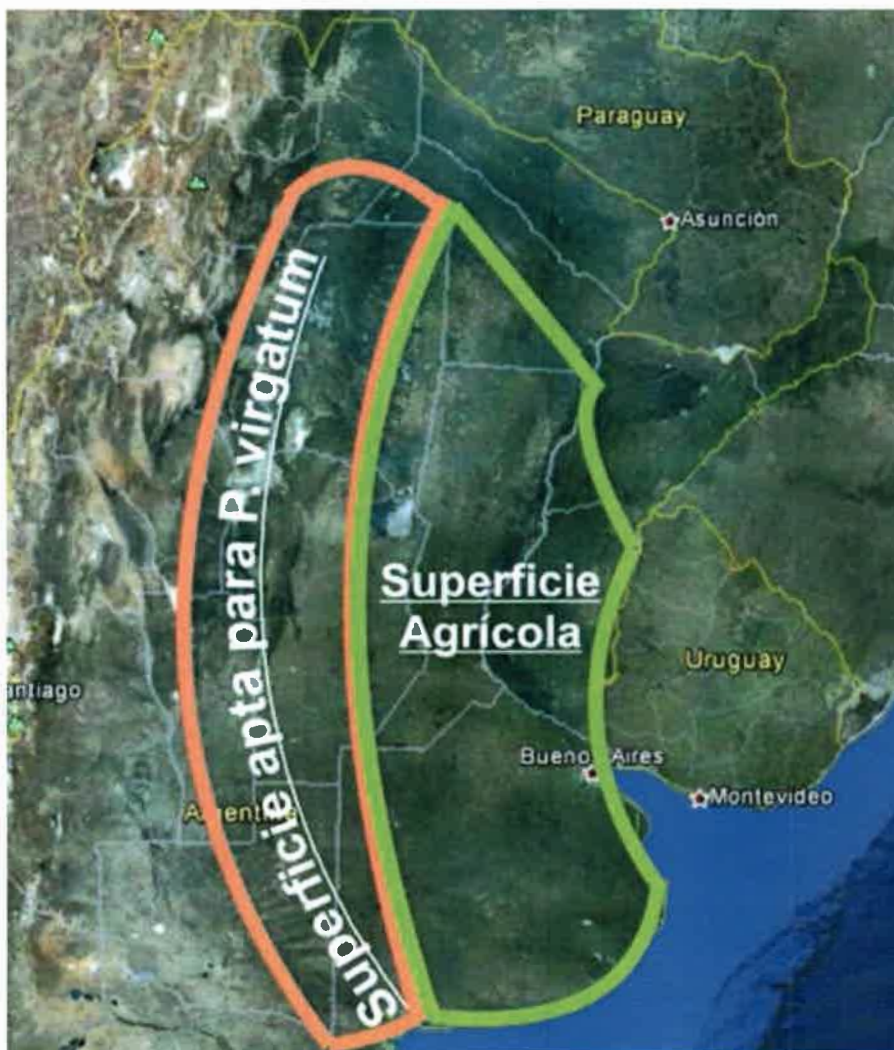


Fig. 4. Superficie apta para la producción de *P. virgatum* en la República Argentina.

En su centro de origen, *P. virgatum* se adapta a un amplio rango de ambientes y su versatilidad se debe a la alta variabilidad genotípica –consecuentemente fenotípica– observada dentro de la especie (Fig. 5). Las poblaciones de *P. virgatum* crecen naturalmente desde Centro América hasta el sur de Canadá, y desde la costa este de Estados Unidos hasta el lejano oeste (Hitchcock, 1935).



Fig. 5. Variabilidad fenotípica de *P. virgatum*.
Esta especie es usada además como planta ornamental.

Porter (1966) agrupó las diferentes poblaciones de *P. virgatum* en dos categorías amplias basadas en su ubicación en el terreno: genotipos nativos de “tierras bajas” (asociados a zonas más húmedas e inundables, en general de alto porte y tallos gruesos), y nativos de “tierras altas” (asociados con fenotipos de bajo porte, tallos finos y de mayor resistencia a la sequía). Esta amplia distribución geográfica es acompañada de una gran adaptabilidad a diversas condiciones edáficas. Barney et al. (2009) evaluaron la germinación, el establecimiento, el rendimiento y la capacidad de reproducción de cuatro ecotipos, dos de tierras altas y dos de tierras bajas, en diversos niveles de disponibilidad de humedad del suelo. La capacidad del pasto varilla para germinar, establecerse y florecer en condiciones de baja humedad e inundación, especialmente en los ecotipos de tierras bajas, puede aumentar la gama de ambientes adecuados para el

cultivo y puede servir como línea de base para nuevos estudios ecológicos y de mejoramiento genético.

El estrés hídrico dispara respuestas a varios niveles

La respuesta a la baja disponibilidad hídrica involucra cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, aún desconocidos en su gran mayoría (Sarath et al., 2007), tales como la inhibición del crecimiento (Bahrani et al., 2010), la acumulación de solutos orgánicos compatibles (DaCosta y Huang, 2009; Sánchez-Díaz et al. 2008), cambios en los contenidos endógenos de hormonas (Dobra et al., 2010; Huang et al., 2008; Perales et al., 2005; Seki et al., 2007), modificación en la expresión de genes sensibles a estrés (Huang et al., 2008; Xiong y Yang, 2003; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005), entre otros. Algunas de estas respuestas están disparadas directamente por cambios en el estado hídrico de los tejidos mientras que otras son provocadas por las hormonas vegetales (Chaves et al. 2003). En este sentido, el ácido abscísico (ABA), el ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) están involucrados en una compleja red de señales de transducción que coordina el crecimiento y desarrollo con las respuestas de las plantas al ambiente (Agrawal et al., 2002; Jiang y Zhang, 2002; Fujita et al., 2006; Szalai et al., 2010).

El rol del ABA, SA y JA como señales primarias en la regulación de la defensa de las plantas ha sido bien estudiado (Bari y Jones, 2009; Pieterse et al., 2009). Estas hormonas generan una red de señales de transducción que conduce a una cascada de eventos responsables de la adaptación fisiológica de las plantas al estrés.

Ácido abscísico

ABA es una hormona conocida por su papel regulador en la integración de la adversidad del medio ambiente con los programas de desarrollo de las plantas (Chow y McCourt, 2004; Christmann et al., 2005). Afecta a una amplia variedad de procesos en las diferentes etapas del desarrollo y en la adquisición de la tolerancia al estrés hídrico

(Finkelstein et al., 2002; Barrero et al., 2005; De Smet et al., 2006; Liang et al., 2007). La acción de ABA es uno de los temas más estudiados en respuesta a estrés abiótico (Hirayama y Shinozaki, 2007; Wasilewska et al., 2008). Un aumento en el contenido de ABA en respuesta a estrés hídrico puede derivarse de un incremento en la biosíntesis y/o una disminución en la degradación (Cutler y Krochko, 1999; Zeevaart, 1999). En plántulas de *Arabidopsis thaliana*, Huang et al. (2008) mostró que la sequía mejora la biosíntesis y el catabolismo, resultando en un incremento de ABA y sus catabolitos. Además del bien establecido modelo en *Arabidopsis*, los incrementos en los niveles endógenos de ABA en condiciones de estrés hídrico también han sido informados en gramíneas de interés, tales como maíz (Xin et al., 1997) y trigo (Iqbal et al., 2010; Raziuddin et al., 2010) entre otras.

Ácido salicílico

SA es un regulador endógeno de crecimiento implicado en una amplia gama de respuestas fisiológicas y metabólicas en las plantas (Hayat et al., 2010). Durante los últimos años, SA ha sido intensamente estudiado como una molécula señal que regula respuestas de defensa local y sistémica contra patógenos (estrés biótico). En la actualidad, se ha informado que este compuesto juega también un papel en las respuestas de las plantas a estreses abióticos, tales como sequía, altas y bajas temperaturas, metales pesados y estrés osmótico (Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011; Shi y Zhu, 2008; Munné-Bosch y Peñuelas, 2003; Molina et al., 2002; Nemeth et al., 2002; Koch et al., 2000; Janda et al., 1999; Rao y Davis, 1999;).

Resultados recientes muestran que la mayoría de los estreses abióticos alteran los contenidos endógenos de SA, lo cual también apunta a su participación en la señalización del estrés (Horváth et al., 2007). Por ejemplo, los niveles endógenos de SA se incrementaron en raíces de plantas de cebada bajo estrés hídrico (Bandurska y Stroinski, 2005).

La aplicación exógena de SA mejora el desempeño de las plantas bajo estrés hídrico, según lo informado por varios autores; una mejor tolerancia a sequía y acumulación de

materia seca se observaron en plantas de trigo provenientes de granos embebidos en una solución de ácido acetil salicílico (Hamada y Al-Hakimi, 2001; Hamada, 1998).

Ácido jasmónico

JA y sus derivados constituyen una familia de oxilipinas bioactivas que regulan el desarrollo de las plantas y las respuestas a los estímulos del medio ambiente (Devoto y Turner, 2003; Turner et al., 2002).

La participación de JA en respuesta a estrés abiótico, como sequía y salinidad, se ha informado en varias especies. Por ejemplo, el tratamiento de cebada con sorbitol o manitol (solutos compatibles para simular el estrés hídrico) mostró incrementos en el contenido endógeno de JA, seguida de la síntesis de proteínas inducidas por JA (JIPS; Lehmann et al., 1995). Además, el estrés hídrico, aumentó el contenido endógeno de JA en células de raíz de maíz (Xin et al., 1997). Pedranzani et al. (2007) mostraron en estudios realizados en ambientes contrastantes, diferentes contenidos basales de JA y diferentes patrones de respuesta a estrés hídrico en dos poblaciones de *Pinus pinaster* Ait.

ABA, SA, JA y sus vías de entrecruzamiento (cross talk)

Para sobrevivir a diversos estreses, las plantas han desarrollado mecanismos complejos para percibir las señales externas, permitiendo una respuesta óptima al medio ambiente. ABA, SA, JA y etileno (ET) regulan respuestas de protección de los vegetales a los estreses abióticos y bióticos a través de acciones sinérgicas y antagónicas, que se conocen como entrecruzamiento en la señalización (Fujita et al., 2006). Por otra parte, la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) se ha propuesto como un proceso fundamental que es compartido entre las respuestas a estreses abióticos y bióticos (Torres et al., 2005; Apel y Hirt, 2004).

ABA ha sido involucrado ampliamente en las respuestas a numerosos estreses abióticos (sequía, salinidad, bajas temperaturas), y por otro lado, SA, JA y etileno (ET)

juegan un papel clave en las respuestas a estrés biótico en la infección por patógenos. En muchos casos ABA actúa como regulador negativo de la resistencia a las enfermedades (Narusaka et al., 2004). Se ha reportado que el tratamiento con ABA suprime la inducción de la respuesta sistémica adquirida (SAR) en *Arabidopsis*. El uso de diversos mutantes en combinación con productos químicos que inhiben o estimulan SA reveló que ABA suprime la inducción de SAR inhibiendo vía arriba (upstream) y abajo (downstream) SA, independientemente de la vía de señalización mediada por JA / ET. Esta información sugiere fuertemente que puede ocurrir una interferencia antagónica en múltiples pasos de la señalización de SA en la inducción de SAR y la señalización mediada por ABA de respuesta a estreses ambientales (Yasuda et al., 2008). Esta interacción antagónica, entre la señalización del estrés abiótico mediada por ABA y la resistencia a enfermedades, sugiere que las plantas desarrollan estrategias produciendo simultáneamente proteínas involucradas en el estrés abiótico y la resistencia a enfermedades (Anderson et al., 2004).

Las interacciones entre SA y JA son complejas y existe mucha bibliografía que demuestra que las mismas pueden ser en ambos sentidos (positivas o negativas), pero en general la relación predominante es la antagónica.

Actividad antioxidante

El estrés producido por la sequía inhibe la habilidad fotosintética de los tejidos debido a un desbalance entre la captura y la utilización de la luz (Foyer y Doctor, 2000). La disminución en la actividad del fotosistema II (FS II) desequilibra la generación y la utilización de electrones, resultando en cambios del rendimiento cuántico. Estos cambios en la fotoquímica de los cloroplastos de las hojas de plantas estresadas generan especies reactivas de oxígeno (O_2^- , H_2O_2 , OH^{\cdot}) los cuales son potencialmente peligrosos bajo condiciones de estrés hídrico (Peltzer et al., 2002). Los mecanismos de detoxificación de estas especies reactivas de oxígeno existen en todas las plantas y pueden ser designados como de naturaleza enzimática (superóxido dismutasa –SOD– catalasa –CAT– y peroxidasa– POD–, entre otros) y de naturaleza no enzimática (glutatión, ascorbato, tocoferoles, carotenoides, etc). El grado de actividad de las

enzimas antioxidantes y el incremento de la cantidad de antioxidantes en sequía es extremadamente variable entre especies y entre cultivares dentro de una misma especie, sin embargo elevadas cantidades de estas enzimas han sido propuestas como un posible mecanismo de resistencia a diferentes estreses (Casano et al., 2001; Aono et al., 1991; Rabinowitch y Fridovich, 1983). El incremento de la producción de ROS y la actividad de los complejos antioxidantes están bien documentados en varias especies bajo condiciones de estrés (Al-Ghamdi, 2009; Yang et al., 2009; El-Tayab, 2005; Pastori y Foyer et al., 2002; Pastori et al., 2000; Arisi et al., 1998,).

Expresión diferencial de genes en condiciones de estrés hídrico

En los últimos años se ha profundizado la investigación sobre la expresión de genes de respuesta a diversos estreses. Huang et al. (2008) utilizando la técnica de micro arreglos de ADN mostró que en *Arabidopsis thaliana* al menos la expresión de 2000 genes fue modificada por un estrés hídrico progresivo. En concreto, 1310 de 1969 genes regulados por sequía (67%) fueron a su vez regulados de manera significativa por ABA y/o análogos de ABA. Numerosos genes regulados por sequía y ABA han demostrado previamente ser inducidos o reprimidos por tratamiento con ABA u otros estreses, como frío y alta salinidad, y alrededor de un tercio (659 de 1969) de los genes regulados por sequía no estaban regulados de manera significativa por ABA o compuestos análogos de ABA, demostrando que si bien ABA tiene un rol fundamental en las respuestas a sequía existe una gran cantidad de genes independientes a esta hormona y un importante número de genes que responden a cambios en los niveles de otras hormonas.

Actualmente numerosos proyectos de secuenciación de genomas en diferentes especies se han concretado o están en marcha, por lo tanto se está en condiciones de obtener información genómica masiva sobre una gran variedad de especies. Esta información nos permitirá llevar a cabo estudios comparativos de genes relacionados con una vía específica o un proceso específico (Jiang y Guo, 2010).

El creciente interés por *P. virgatum* ha impulsado su estudio a nivel molecular. Los primeros marcadores moleculares (Restriction fragment length polymorphism -RFLP- y random amplified polymorphic DNA -RAPD-) se desarrollaron a fin de evaluar la

variabilidad del germoplasma existente (Missaoui et al., 2006; Huang et al., 2003). La secuenciación de los transcriptos (Expressed Sequence Tags –EST-) así como el estudio de la función de estos genes se encuentra en marcha (Okada et al., 2010; Tobias et al., 2005; 2006).

La homología de las secuencias de *P. virgatum* con otras especies indica que el 79% de 7810 “clusters” de genes son similares a otros genes, y el 61% de las secuencias son tentativamente identificadas por su función. Un total de 334 “clusters” de genes conteniendo Short Tandem Repeats (STR) tienen potencialidad de ser desarrollados como microsatélites (Tobias et al., 2005).

Actualmente se encuentran depositadas en GenBank ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest?term=panicum virgatum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest?term=panicum%20virgatum)) 720590 secuencias de mRNA generadas a partir de hojas, tallos, corona y callos de *P. virgatum*.

La amplia variabilidad genotípica existente en *P. virgatum*, sugiere que la búsqueda de material genético con tolerancia a déficit hídrico durante la germinación y el desarrollo temprano es muy promisorio. Explorando esta variabilidad se espera comprender las diferencias, entre los cultivares tolerantes y susceptibles, en cuanto a su comportamiento hormonal y de transcriptos con el propósito de comenzar a vislumbrar las bases moleculares involucradas en las respuestas a estrés hídrico en esta especie.

*Estudios fisiológicos y
genéticos de la tolerancia al
estrés hídrico en Panicum
virgatum L.*

**OBJETIVO GENERAL
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS
ESPECÍFICOS**

Objetivo general

Aportar conocimientos sobre la respuesta a estrés hídrico en estadios tempranos del crecimiento de *P. virgatum* para comprender mejor las bases de su tolerancia.

Hipótesis y objetivos específicos

Con el propósito de comprender la respuesta a estrés hídrico en *P. virgatum*, se evaluarán rasgos fisiológicos y moleculares determinantes de la tolerancia a estrés hídrico, lo cual involucra las siguientes hipótesis de trabajo:

Hipótesis 1: “Existen diferencias entre cultivares de *P. virgatum* respecto de sus niveles de tolerancia a estrés hídrico en la etapa de germinación y desarrollo temprano”. El primer objetivo específico consistió en identificar cultivares de *P. virgatum* con el mejor comportamiento germinativo y desarrollo temprano en condiciones de estrés hídrico.

Hipótesis 2: “Durante la respuesta de *P. virgatum* a estrés hídrico y rehidratación se producen cambios en el crecimiento y en el contenido endógeno de algunas hormonas que cumplen un rol importante en los mecanismos de tolerancia a estrés hídrico”. Para probar esta hipótesis se planteó como segundo objetivo específico estudiar (1) variables de crecimiento y (2) la producción endógena de hormonas asociadas a estrés: ABA, SA y JA de plantas sometidas a estrés hídrico vs. el control, utilizando los cultivares de comportamiento contrastantes identificados en el objetivo 1, por un lado el cv. Kanlow identificado como tolerante y por el otro el cv. Greenville identificado como sensible.

Hipotesis 3: “Los cvs. Kanlow y Greenville pueden presentar en la respuesta a estrés hídrico y rehidratación diferencias en la actividad del sistema de enzimas antioxidantes que cumplen un rol importante en los mecanismos de tolerancia a estrés hídrico”. El tercer objetivo específico fue evaluar la actividad del sistema de las

enzimas antioxidantes SOD y CAT en cultivares contrastantes en su comportamiento a estrés hídrico y rehidratación.

Hipótesis 4: “Durante la respuesta de *P. virgatum* a estrés hídrico y rehidratación existen cambios en el patrón de expresión de genes que desempeñan un rol importante en los mecanismos de tolerancia a estrés hídrico”. Para probar esta hipótesis, se planteó como cuarto objetivo específico estudiar la expresión de genes de respuesta a estrés hídrico dependientes e independientes de ABA y dependientes de SA en los cvs. Kanlow y Greenville sometidos a estrés hídrico y rehidratación vs. condiciones control.

Hipótesis 5: El pre tratamiento con SA exógeno afecta (positiva y/o negativamente) los niveles de ABA y JA endógenos, variables morfo fisiológicas de crecimiento, actividad antioxidante, y expresión de genes relacionados a estrés hídrico. Los objetivos específicos planteados para corroborar esta hipótesis fueron:

Quinto, evaluar el efecto de la aplicación exógena de SA sobre (1) las variables de crecimiento y (2) la producción endógena de hormonas asociadas a estrés: ABA, SA y JA en plantas jóvenes sometidas a estrés hídrico y posterior rehidratación, utilizando los cultivares de comportamiento contrastantes seleccionados.

Sexto, evaluar el efecto de la aplicación exógena de SA sobre la actividad del sistema de enzimas antioxidantes en cultivares contrastantes en su comportamiento a estrés hídrico y rehidratación.

Séptimo, evaluar el efecto de la aplicación exógena de SA sobre la transcripción de genes de respuesta a estrés hídrico dependientes e independientes de ABA y dependiente de SA de plantas crecidas bajo estrés hídrico, sin restricción hídrica y posterior rehidratación en los cvs. seleccionados anteriormente.

El octavo objetivo específico es integrar los niveles de información analizados en los objetivos anteriores (crecimiento, hormonas, enzimas antioxidantes, expresión genética) para comprender mejor las bases de la tolerancia al estrés hídrico en esta especie.

*Estudios fisiológicos y
genéticos de la tolerancia al
estrés hídrico en Panicum
virgatum L.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y métodos

Se realizaron 5 ensayos en cámara de crecimiento (germinación, tolerancia a estrés hídrico, recuperación, estrés hídrico (+ SA) y rehidratación (+SA)), durante el periodo 2009-2012 en el invernáculo del Campo de Enseñanza de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa (36°46`S – 64°16`W).

Ensayo de germinación

La capacidad germinativa se evaluó en 9 cultivares de *P. virgatum*, Alamo y Kanlow pertenecientes a ecotipos de tierras bajas, Blackwell, Caddo, Greenville, Pathfinder, Summer, Traiblazer pertenecientes al grupo de ecotipos de tierras altas y Cave in Rock como representante de ecotipos intermedios. Semillas provenientes de la colección de la EEA INTA Guillermo Covas (Anguil, La Pampa), se colocaron a germinar en recipientes transparentes de 8 cm de diámetro x 6 cm de alto, conteniendo un soporte de perlita estéril embebida con solución Hoagland al 25% (control, sin restricción hídrica) y Polietilenglicol 6000 (PEG, tratamiento de estrés hídrico) con Ψ_0 (potencial osmótico) de -0.5 MPa. En cada recipiente se sembraron 25 semillas y se colocaron en cámara de crecimiento programada con 16 h de luz ($100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) a 28 °C, y 8 h de oscuridad a 20 °C. El recuento de germinación se llevó a cabo cada 48 h y coincidentemente se renovó la solución con PEG. El experimento se prolongó por 24 días, momento en el cual las plántulas alcanzaron la altura del recipiente y 2 hojas en promedio. Al finalizar se midió altura de planta (AP), longitud de raíz (LR), peso fresco aéreo (PFA), peso fresco de raíz (PFR), peso seco de plántula entera (PSP) y velocidad de germinación (VG). Los valores de cada variable se refirieron al control y se expresaron en porcentaje con el objetivo de eliminar efectos del genotipo, permitiendo así que los resultados dependieran solamente del tratamiento. Por ejemplo:

$$\frac{\text{L.R. Kanlow sequía}}{\text{L.R. Kanlow control}} \times 100 = \%$$

Para determinar el umbral de Ψ_0 capaz de discriminar aquellos cultivares de mejor comportamiento germinativo bajo estrés hídrico, se realizaron ensayos preliminares con diferentes Ψ_0 , i.e. -1 MPa, -0.7 MPa, -0.5 MPa y -0.3 MPa, (Burlyn et al., 1973).

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 4 réplicas. Los datos se analizaron por ANOVA y LSD para la comparación de medias, utilizándose el software InfoStat (2008). Y para identificar las variables de crecimiento temprano de las plántulas que se correlacionaban mejor con el PG se realizó un análisis de correlación de Pearson.

Ensayo de tolerancia a estrés hídrico

Dos cultivares de comportamientos extremos se compararon en cuanto a su tolerancia a estrés hídrico moderado y progresivo, el cv. Kanlow perteneciente al grupo de mejor comportamiento germinativo y el cv. Greenville perteneciente al grupo de peor comportamiento. El ensayo se efectuó en macetas de 220 cm³ rellenas con sustrato suelo (1/3 suelo, 2/3 arena) en las cuales se sembraron 5 semillas por maceta (Fig. 6). Las macetas se colocaron en cámara de crecimiento programada con 16 h de luz (300 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) a 29 °C, y 8 h de oscuridad a 20 °C. Luego de producida la emergencia se ralearon dejando una planta por maceta. El estrés hídrico se proporcionó mediante suspensión del riego a los 55 días de la siembra. Durante el período de suspensión del riego se midió la resistencia estomática con porómetro Delta T para determinar el momento óptimo de cosecha. La medición se realizó dentro de la cámara de crecimiento manteniendo las condiciones de temperatura y luminosidad constantes. La lectura se tomó sobre la cara abaxial de la última hoja desarrollada, hasta estabilización de la lectura o tiempo máximo de 1 min. El tratamiento se finalizó cuando se observó un aumento importante y consistente de la resistencia estomática con síntomas visuales de acartuchamiento.



Fig. 6. Macetas en cámara de crecimiento

En cada tratamiento se midió la altura de planta y el número de hojas expandidas. Posteriormente parte del material vegetal se recolectó y se colocó en nitrógeno líquido para su almacenamiento y posterior determinación de actividad enzimática de SOD y CAT y estudios de expresión génica; la parte restante del material vegetal se liofilizó para las determinaciones del contenido endógeno de ABA, SA y JA.

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 4 réplicas; cada réplica estuvo compuesta por un conjunto de 6 plantas. Los datos se analizaron por ANOVA y LSD para la comparación de medias, utilizándose el software InfoStat (2008).

Ensayo de recuperación

Para evaluar la recuperación a las 12 y 24 h posteriores a la rehidratación las macetas se regaron. En cada tratamiento se midió la altura de planta y el número de hojas. Posteriormente parte del material vegetal se recolectó y se colocó en nitrógeno líquido para su almacenamiento y posterior determinación de actividad enzimática de SOD y CAT y estudios de expresión génica; la parte restante se liofilizó para cuantificar el contenido endógeno de ABA, SA y JA.

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 4 réplicas; cada réplica estuvo compuesta por un conjunto de 6 plantas. Los datos se analizaron por ANOVA y LSD para la comparación de medias, utilizándose el software InfoStat (2008).

Determinación de la densidad estomática

Para determinar la densidad estomática en las hojas de ambos cultivares se tomaron impresiones epidérmicas en la parte media de la cara abaxial de la última hoja desarrollada, la técnica consistió en la aplicación de barniz de uñas incoloro el cual se dejó secar durante 2 o 3 min. para luego remover la capa y montarla sobre un porta objeto, fijando la impresión con glicerina/gelatina al 50%. Se observaron cuatro campos por muestras en un microscopio (Leica ICC50 HD) con el objetivo 40X. Se calculó el área con un portaobjeto micrómetro y se determinó la densidad estomática por mm^2 .

Para el análisis estadístico se analizaron 4 réplicas; en cada réplica se observaron 4 campos. Los datos se analizaron por ANOVA y LSD para la comparación de medias, utilizándose el software InfoStat (2008).

Ensayo de tolerancia a estrés hídrico y aplicación exógena de SA

Los cultivares Kanlow y Greenville se compararon en cuanto a su tolerancia al estrés hídrico moderado y progresivo y al efecto de la aplicación exógena de SA sobre dicha respuesta. El ensayo se efectuó en macetas de 220 cm^3 rellenas con sustrato suelo (2/3 suelo, 1/3 arena) en las cuales se sembraron 5 semillas en cada una, luego de producida la emergencia se ralearon dejando una planta por maceta. Las macetas se colocaron en cámara de crecimiento programada con 16 h de luz ($300 \mu\text{E} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) a $29 \text{ }^\circ\text{C}$, y 8 h de oscuridad a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. El estrés hídrico se proporcionó mediante suspensión del riego a los 55 días de la siembra. El tratamiento se finalizó cuando se observó síntomas visuales de acartuchamiento en ambos cultivares a los 11 días de la suspensión del riego (Fig. 6). La aplicación exógena de 1 mM de SA (Noreen y Ashraf, 2008; Wasem et al., 2006; Khan

et al., 2003; Vigliocco et al., 2002; Pancheva et al., 1996) se proporcionó regando a capacidad de campo dos veces por día, durante tres días, previo al inicio del tratamiento de estrés hídrico con la solución de SA según Vigliocco et al. (2002) de manera de asegurarse que al inicio y durante el estrés la planta ha recibido el estímulo de SA. Así, los tratamientos para ambos cultivares fueron los siguientes: control (riego), riego + SA, sequía, sequía + SA.

Al momento de la cosecha y para cada tratamiento se midió el contenido relativo de agua (CRA) a fin de caracterizar el estado hídrico, la altura de planta, el número de hojas, y se tomaron muestras de impresiones de la epidermis de cada cv. para analizar la densidad estomática. Posteriormente parte del material vegetal se recolectó y se colocó en nitrógeno líquido para su almacenamiento y posterior determinación de actividad enzimática de SOD y CAT y estudios de expresión génica; la parte restante del material vegetal se liofilizó para cuantificar el contenido endógeno ABA, SA y JA.

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 4 réplicas; cada réplica estuvo compuesta por un conjunto de 5 plantas. Los datos se analizaron por ANOVA y LSD para la comparación de medias, utilizándose el software InfoStat (2008). InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Ensayo de recuperación y aplicación exógena de SA

Para evaluar la recuperación a las 12 y 24 h posteriores a la rehidratación las macetas se regaron con agua destilada quedando determinados los siguientes tratamientos: rehidratación 12 h, rehidratación 12 h + SA, rehidratación 24 h, rehidratación 24 h + SA. Al momento de la cosecha en cada tratamiento se midió el contenido relativo de agua (CRA) a fin de caracterizar el estado hídrico, la altura de planta, el número de hojas y se tomaron muestras de impresiones de la epidermis de cada cultivar para analizar la densidad estomática.

Posteriormente parte del material vegetal se recolectó y se colocó en nitrógeno líquido para su almacenamiento y posterior determinación de actividad enzimática de

SOD y CAT y estudios de expresión génica; la parte restante del material vegetal se liofilizó para cuantificar el contenido endógeno ABA, SA y JA.

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 4 réplicas; cada réplica estuvo compuesta por un conjunto de 5 plantas. Los datos se analizaron por ANOVA y LSD para la comparación de medias, utilizándose el software InfoStat (2008).

Determinación del contenido relativo de agua (CRA)

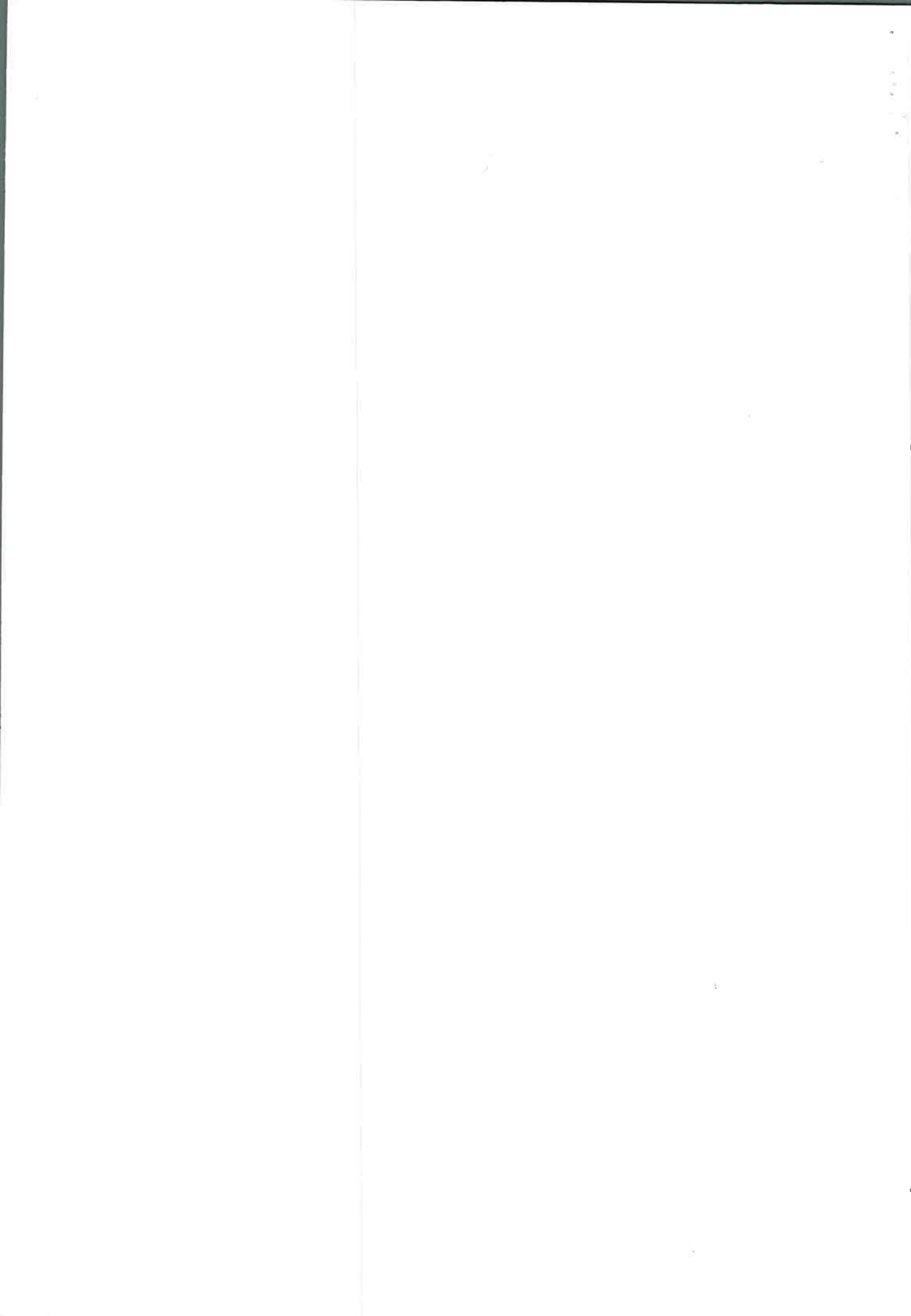
Para evaluar el estado hídrico de cada tratamiento se determinó el CRA; se tomaron muestras de hojas de una planta por réplica y se pesó inmediatamente para determinar peso fresco (PF), cada muestra se colocó a flotar en agua destilada en cajas de Petri, y en oscuridad durante 24 h. Posteriormente cada muestra se sacó del agua y se secó superficialmente con papel secante determinándose a continuación el peso turgente (PT), llevando inmediatamente a secar en estufa a 85° C hasta peso constante. Una vez estabilizado el peso, cada muestra se pesó para determinar el peso seco (PS). El cálculo del CRA se efectuó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CRA} = \frac{(\text{PF} - \text{PS}) \times 100}{(\text{PT} - \text{PS})}$$

PF: peso fresco; PS: peso seco; PT: peso turgente

Cuantificación de hormonas

La extracción y purificación de ABA, JA y SA se realizó de acuerdo al protocolo de Durgbanshi et al. (2005). Las muestras liofilizadas se trituraron en mortero con nitrógeno líquido, tomándose una alícuota de 0,2 g y se homogeneizó con 5 ml de agua destilada desionizada. El homogenato se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml y se agregó 50 ng de los estándares deuterados correspondientes a ABA, SA y JA. Se agitó con ultraturax durante 15 seg y se centrifugó por 15 min a 5000 RPM. Se colectó el



sobrenadante en tubos Falcon de 50 ml y se ajustó el pH a 2,8-3 con CH₃COOH al 15 %.

Al sobrenadante acidificado se le agregó 5 ml de éter etílico, se agitó en Vórtex durante 30 seg y se centrifugó 1 min a 5000 RPM. La fase orgánica se separó con pipeta Pasteur y se colocó en un balón de 10 ml. La fase acuosa se descartó. El procedimiento se repitió 2 veces (doble partición). Posteriormente se llevo a sequedad en evaporador rotativo a temperatura de 33-34 °C.

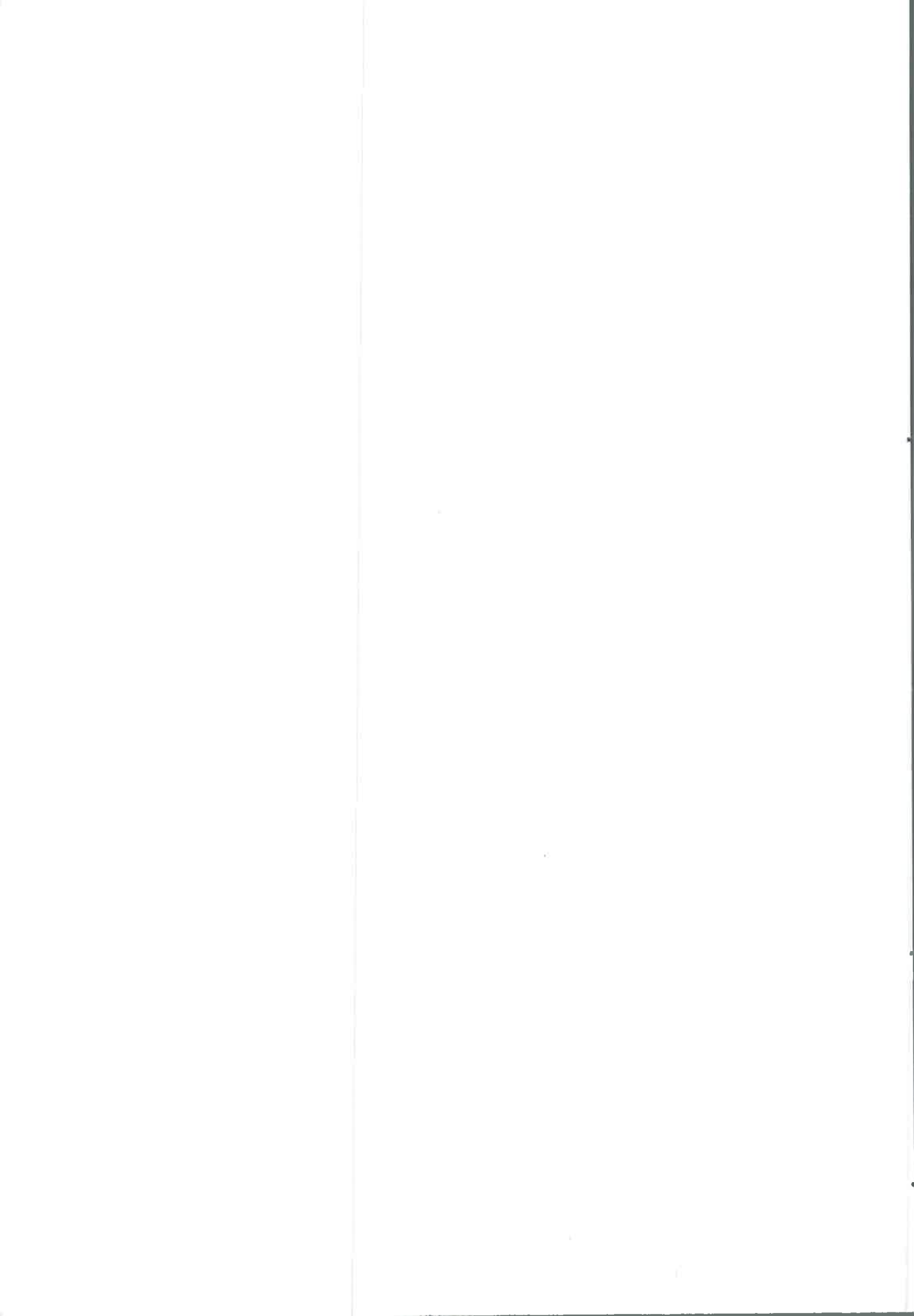
El extracto seco se resuspendió en 750 µl de metanol 100 % repitiéndose la operación 2 veces. La muestra resuspendida se cargó en cartucho con filtro de celulosa acoplado a cámara de vacío Supelco y el filtrado se recolectó en Eppendorf de 2 ml. Luego, se evaporaron a sequedad en concentrador centrífugo Speed-Vac a temperatura media de 35-38 °C. Cada muestra se redisolvió en 50 µl metanol 100 % (solvente de alta pureza, grado HPLC), y se pasó a un vial con inserto de vidrio.

Se inyectaron 10 µl en un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, EE.UU) empleando un gradiente de incremento lineal de 40 al 80 % de MeOH/H₂O/AcH (0.2 %) en un tiempo de 25 min por corrida. Se utilizó una columna de fase reversa C18 de 100 mm x 2.1 mm 3-m. con un flujo de corrida de 0.2 ml min⁻¹.

El HPLC se acopló a un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo (Quattro Ultima, Micromass, Manchester, Reino Unido). La fuente de ionización fue "electrospray negativo" (ESI-) y el modo de detección MRM (Monitoreo de Reacción Múltiple) utilizando las siguientes transiciones y tiempos cromatográficos: ABA 263>153; 269>159 y 9,4 min Rt, SA 137>93; 141>97 y 5,6 min Rt, JA 209>59; 215>59 y 14,2 min Rt.

La concentración de las hormonas se determinó mediante las respectivas curvas de calibración con ajuste lineal expresándose los resultados en pmol x g de PS de material vegetal⁻¹.

Para el análisis estadístico se utilizaron 3 réplicas; cada réplica estuvo compuesta por un conjunto de 6 plantas. Los datos se analizaron por ANOVA y LSD para la comparación de medias, utilizándose el software InfoStat (2008).



Determinación de actividad enzimática SOD y CAT

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) fueron determinadas para 50 mg de tejido fresco.

Determinación de la actividad SOD

La actividad de SOD se calculó según Beauchamp y Fridovich (1971); la técnica se fundamenta en que la luz UV influye sobre la riboflavina, la cual excita y pierde un electrón reduciendo al oxígeno a ión superóxido. El ión superóxido pierde a su vez un electrón, con participación de metionina como catalizador de la oxidación del ión O^{2-} , y reduce el nitro blue tetrazolium (NBT) a blue formazán. En presencia de SOD el incremento de color del NBT, disminuye porque la enzima dismuta el ión superóxido. La actividad SOD se midió teniendo en cuenta su capacidad para inhibir la reducción fotoquímica del NBT.

Las determinaciones se realizaron por espectrofotometría y la reacción se llevó a cabo con el agregado de riboflavina cada 30 seg, se incubó bajo luz UV durante 9 min y se registró la densidad óptica (DO) a 560 nm con espectrofotómetro UV-Visible (Ocean Optics CHEM 2000).

La actividad enzimática se calculó en base a la siguiente fórmula.

$$\text{Actividad SOD} = \frac{DOc}{DOm} - 1$$

DOc = densidad óptica del control

DOm = densidad óptica de la muestra

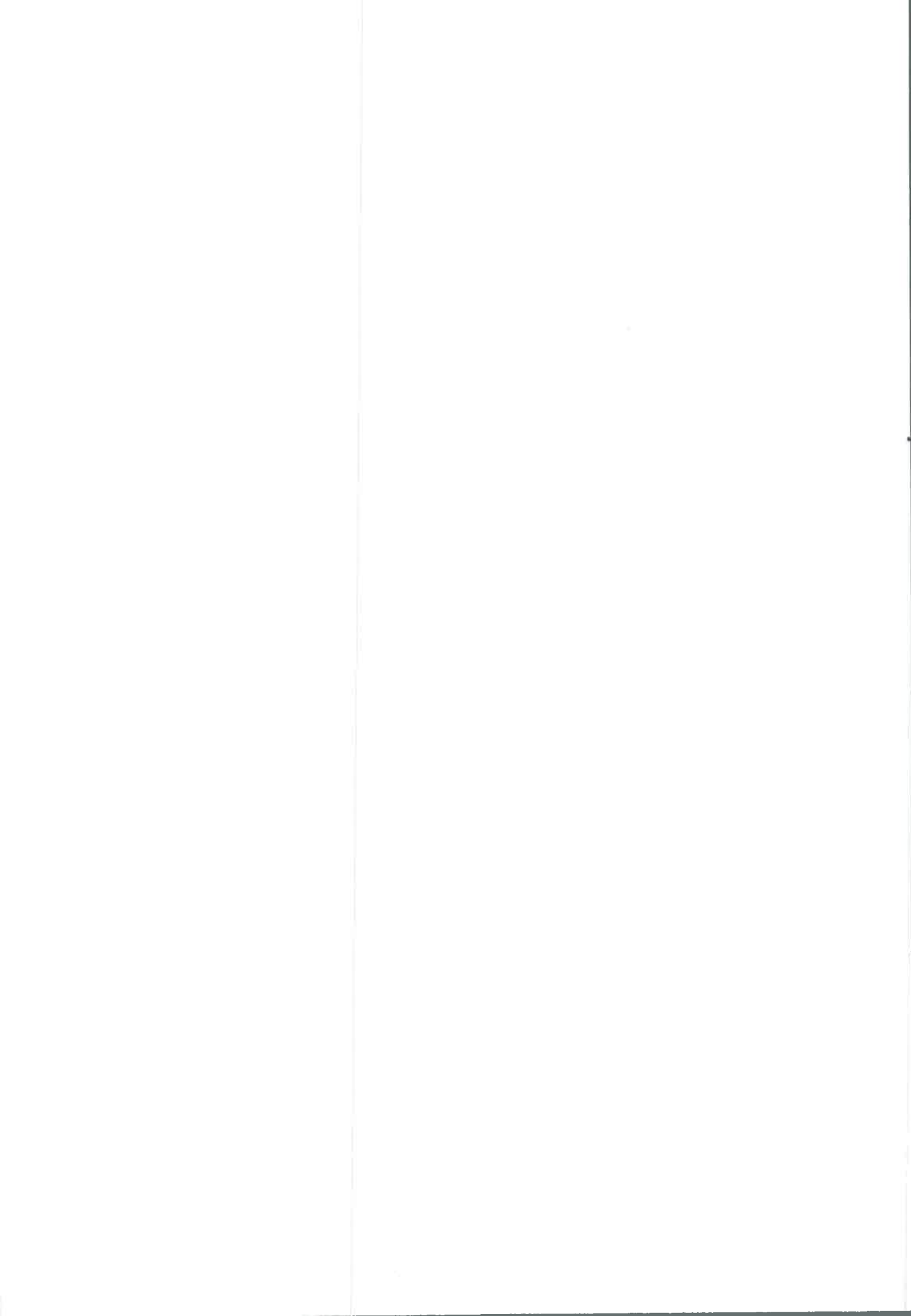
Esta información se utilizó para calcular las unidades SOD en cada muestra, en base a la siguiente fórmula.

$$U \text{ SOD} = \frac{\text{Act SOD}}{P} = U \text{ SOD (mg de proteína)}^{-1}$$

Act SOD = actividad SOD

P = contenido de proteína de la muestra

U SOD = unidades SOD



Una unidad SOD se define como la cantidad de enzima que causa el 50 % de inhibición de la reducción fotoquímica del NBT.

Determinación de la actividad CAT

La actividad CAT se realizó según Gallego et al. (1996); esta técnica se basa en la disminución de la densidad óptica a 240 nm en la mezcla de reacción, atribuida al sustrato. Las lecturas se registraron durante 60 seg.

Para el cálculo de CAT específica, se tiene en cuenta el coeficiente de extinción molar del peróxido: $43,6 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}$.

$$\text{CAT} = \left(\frac{\text{DO}}{43,6 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}} \right) \times 1000/P$$

CAT = Unidades CAT/mg de proteína

P = contenido de proteína de la muestra

DO = densidad óptica

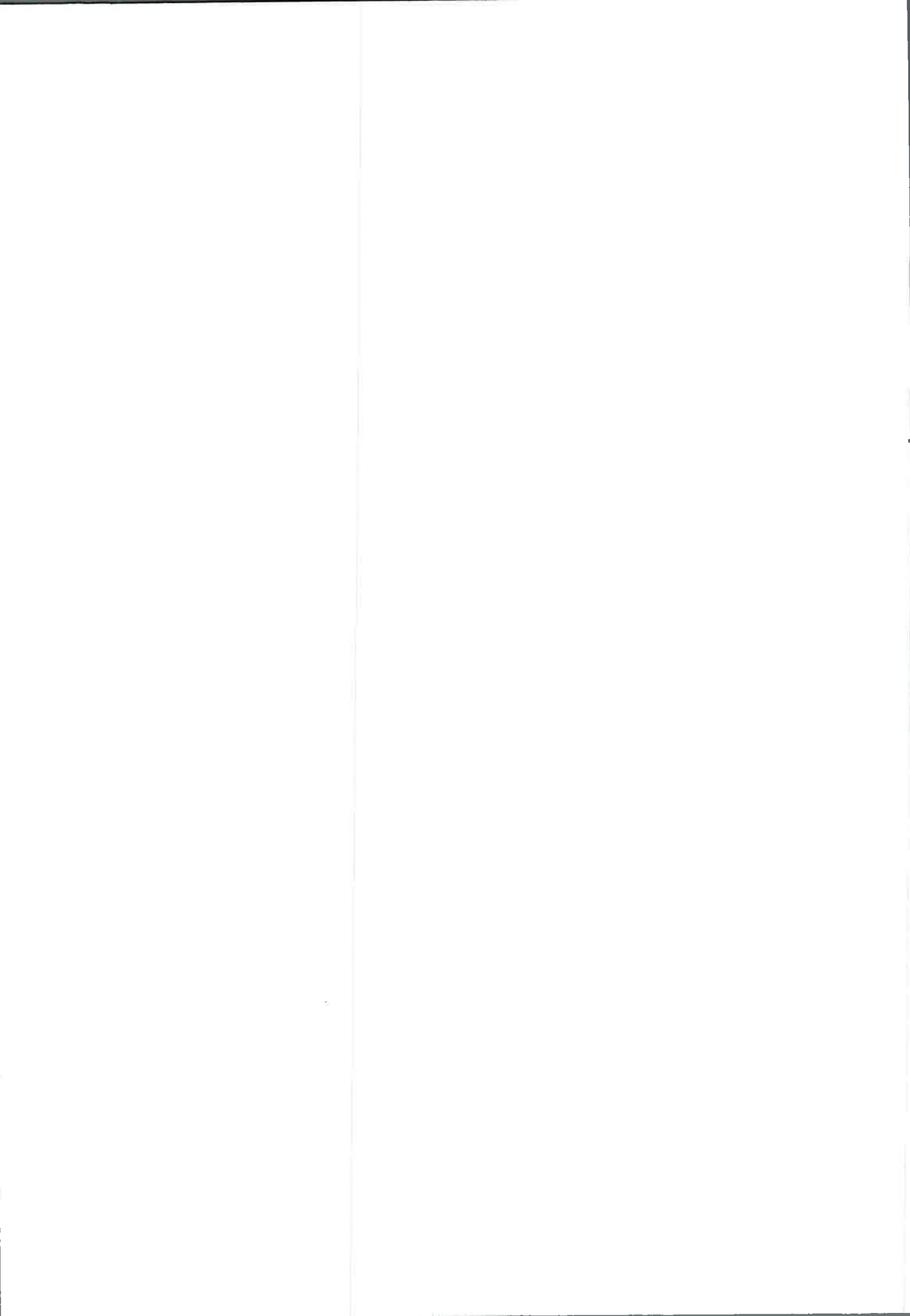
1 unidad CAT descompone $1 \mu\text{mol}$ de H_2O_2 por min a 25°C y pH 7.0.

El contenido de proteínas en las muestras se determinó según Bradford (1976), utilizando Coomassie G-250, que tiñe de tonalidad azul la proteína, cuya intensidad se determinó a 595 nm. La curva patrón se realizó con albúmina bovina sérica.

Para el análisis estadístico de ambas enzimas se utilizaron 3 réplicas; cada réplica estuvo compuesta por un conjunto de 6 plantas. Los datos se analizaron por ANOVA y LSD para la comparación de medias, utilizándose el software InfoStat (2008).

Determinación de expresión génica

Del material vegetal conservado en nitrógeno líquido se tomó una porción y se trituró en mortero homogenizándose en $600 \mu\text{l}$ de Trizol. El homogenato se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se agregó $100 \mu\text{l}$ de cloroformo, se tapó y agitó vigorosamente 15 seg. Posteriormente, se incubó a T° ambiente durante 3 min centrifugándose por 15



min a 12000 RPM en frío. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se agregaron 250 µl de isopropanol. Se mezcló por inversión y se incubó 10 min a -20 °C. Se centrifugó por 10 min a 12000 RPM en frío (formándose un pellet de ARN). El sobrenadante se descartó y el pellet se lavó con 500 µl de etanol 75%. Se agitó y centrifugó por 5 min a 7500 RPM en frío. Nuevamente se descartó el sobrenadante y el pellet se secó al aire, luego se disolvió en 60 µl de agua DEPC y se incubó 10 min a 60° C.

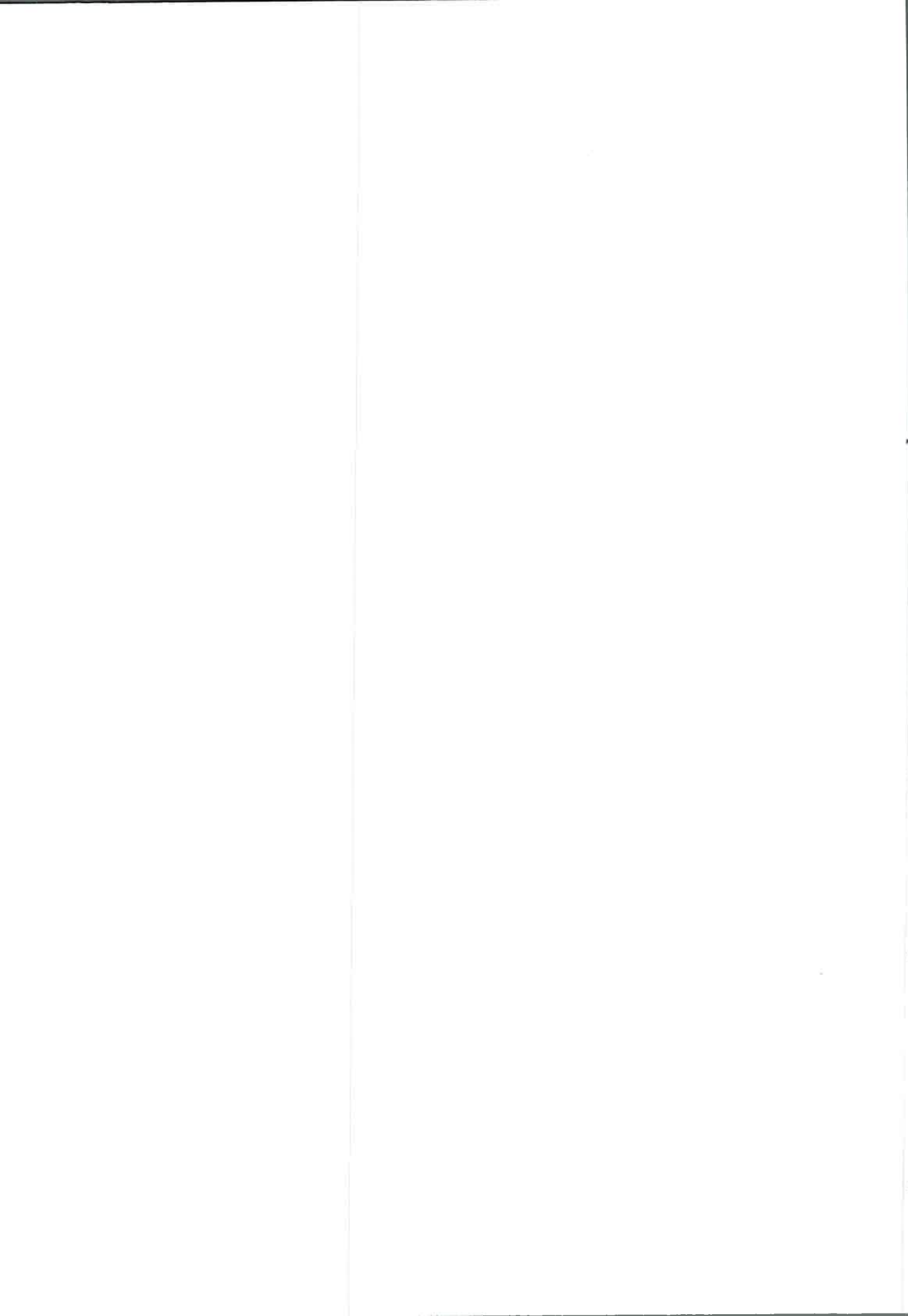
Una alícuota de 4 µl se diluyó en 400 µl de agua DEPC para cuantificar en espectrofotómetro UV-Visible (Ocean Optics CHEM 2000). La relación entre las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm en todos los casos arrojaron valores entre 1.6 y 1.8.

De cada muestra se tomó 1 µg de ARN para su pasaje a cDNA, mezclándose con MIX (5.575 µl. por tubo) y llevando a un volumen final de 20 µl con H₂O DEPC. Como “primer” se utilizó oligo dT y la enzima transcriptasa reversa marca Promeega M1701. El protocolo utilizado fue el indicado por el proveedor.

En las muestras de ADNc se buscó la expresión de genes de respuesta a estrés hídrico dependientes e independientes ABA, y genes dependiente SA que se seleccionaron mediante un relevamiento bibliográfico donde se trató de encontrar genes de probada participación en la respuesta inducida por estas hormonas en especies vegetales de relación cercana con *P. virgatum*. En caso de no encontrarse esta relación, se utilizó como referencia lo propuesto para *Arabidopsis*.

Como control se seleccionó el *EF-1-alpha* (factor de elongación) ya que fue el que mejor funcionó en las condiciones probadas, y se evaluó la expresión de los siguientes genes involucrados en la respuesta a déficit hídrico: *RAB18*, *RD22* (nutrient reservoir) y *RD22* (DRE Binding factor 1) ABA dependientes, *DREB2A* (Dehydration-responsive element (DRE)-Binding proteína2A) y *DREB1A* (DREB-like protein), siendo su expresión independiente de ABA, *PR-1* (peroxidasa), *PR2* (endo-beta-1,3-glucanasas) y *PR-5* (osmotina) dependientes de SA .

Los primers utilizados (Tabla 3) para buscar la expresión diferencial de genes fueron diseñados con la herramienta Primer3 (Steve Rozen y Helen J. Skaletsky (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S,



Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386).

PCR semicuantitativa de los genes de interés contra transcripción de genes *house-keeping*

El cDNA resultante representa, tanto las transcripciones de genes utilizados como control, como de los genes de interés. La reacción de retrotranscripción se amplificó en un par de series de PCR - una serie es para amplificar el gen control y la otra es para el cDNA de interés específico. El número de ciclos debió ser determinado empíricamente para encontrar el rango lineal de amplificación. Se realizaron PCR con distintos ciclos de amplificación, debido a que la amplificación por PCR, aunque en teoría logarítmica, no es así en el número de alta o baja de los ciclos de amplificación. La amplificación logarítmica o exponencial por lo general sólo se produce durante los ciclos de media, y esto depende de la concentración de molde inicial. Por lo tanto, la comparación sólo puede hacerse durante esta fase. Después de la PCR, el mismo volumen de productos de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Se obtuvieron imágenes de productos PCR los que se analizaron mediante la comparación con el software J Image. La expresión de los genes de interés se normalizó contra la expresión de genes *house-keeping* (elongation factor-1) de cada muestra (Fig. 7).

Tabla 3. Diseño de los diferentes primers utilizados en el estudio de expresión génica.

Secuencia	Primer
AGGACTTCTTCTCGCCCTTG	nutrient reservoir (<i>RD22</i>) RIGHT PRIMER
ACCGTCCAGTTCACCAACAC	nutrient reservoir (<i>RD22</i>) LEFT PRIMER
GTCCCAGCTCATGTCGTTG	DREB-like protein (<i>DREB1A</i>) RIGHT PRIMER
GGAGGAGGAGGAGGAGGAC	DREB-like protein (<i>DREB1A</i>) LEFT PRIMER
GGGGACCAACAGAACAAGAA	DRE binding factor 1 (<i>RD22</i>) RIGHT PRIMER
GCAAGTACCCGTCCTACGAG	DRE binding factor 1 (<i>RD22</i>) LEFT PRIMER
AGAAGGGCATCATGGACAAG	RAB 18 RIGHT PRIMER
TCACACTGCACACACAGGTG	RAB 18 LEFT PRIMER
GTGCCTTCACAGTGCTTGAA	Dreb 2 A RIGHT PRIMER
TCTTGCAGCAACAACCTCTG	Dreb 2 A LEFT PRIMER
ATCATGGATGGCTGGAAGAG	Actin 2 PV Kanlow RIGHT PRIMER
TTGCATATGTCGCGCTAGAC	Actin 2 PV Kanlow LEFT PRIMER
TGAGATCCTTCACAGCAACG	EF-1-alpha RIGHT PRIMER
CCAAGAGGCCTTCAGACAAG	EF-1-alpha LEFT PRIMER
CCCGCCGAGTTGAAGATG	<i>PR5</i> RIGHT PRIMER
TGAAGGTGCTGGTCTGGTC	<i>PR5</i> LEFT PRIMER
GGCTGTCGGGGAAGTAGAC	<i>PR2</i> RIGHT PRIMER
ACAATGGCGAGGCAACAAG	<i>PR2</i> LEFT PRIMER

Para el análisis estadístico se realizó una doble estandarización, cada muestra se estandarizó con su control (EF-1-alpha) y luego se realizó el cociente con el tratamiento control. Se utilizaron 3 réplicas; cada réplica estuvo compuesta por un conjunto de 6 plantas. Los datos se analizaron por ANOVA y LSD para la comparación de medias, utilizándose el software InfoStat (2008). InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Para la amplificación de los segmentos de ADNc se utilizó el termociclador MJ-Research modelo PTC 100 y los programas fueron de 26-31-33-35 ciclos de 95 °C 1min, 55 °C 30 seg, y 72 °C 1 min para cada gen en particular.

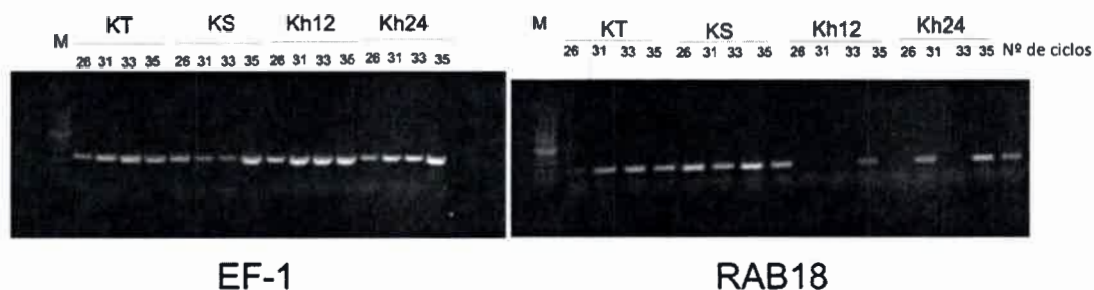


Fig. 7. Imágenes de geles de agarosa mostrando la expresión del gen control (factor de elongación EF-1) y la expresión del gen de interés (*RAB18*) en el cv. Kanlow. KT: Kanlow control, KS: Kanlow sequía, Kh12: Kanlow rehidratación 12 h. y Kh24: Kanlow rehidratación 24 h.

*Estudios fisiológicos y
genéticos de la tolerancia al
estrés hídrico en Panicum
virgatum L.*

RESULTADOS

Resultados

Para una mejor comprensión de la sección resultados y discusión, a continuación se presenta un diagrama con la estructura y organización de los objetivos planteados (Fig. 8).

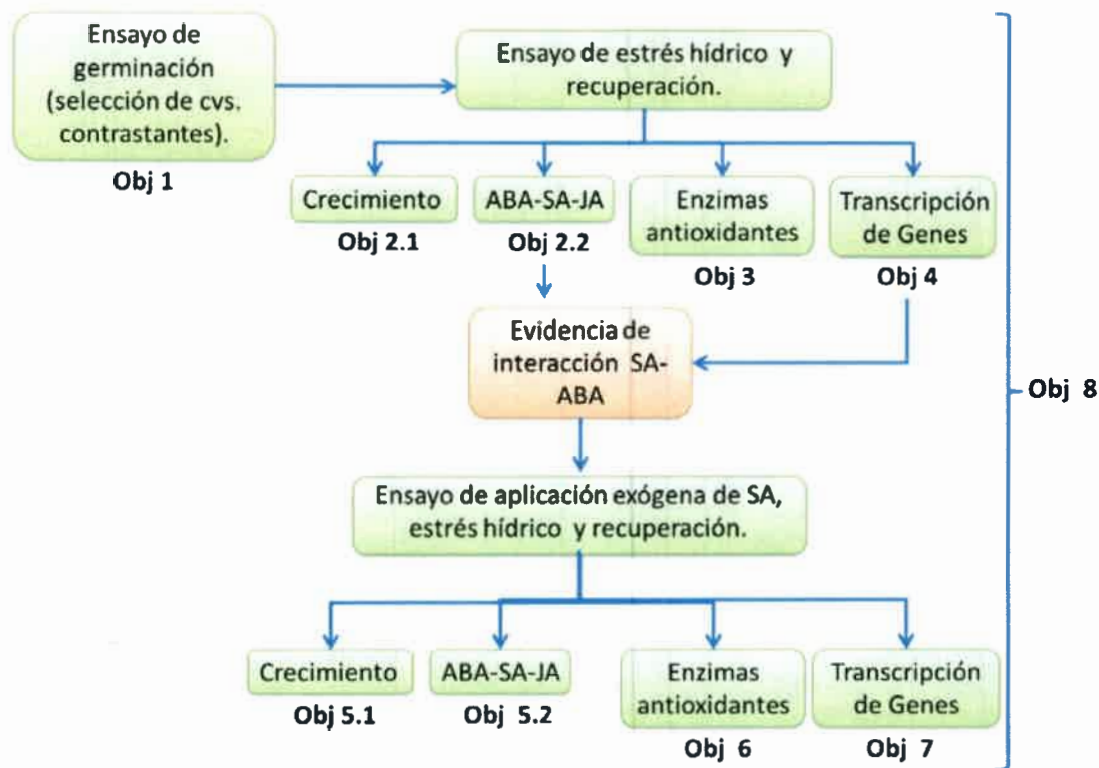


Fig. 8. Estructura y organización de los objetivos planteados

El orden en la numeración de los objetivos detallada en el diagrama se mantiene en el tratamiento de los resultados como de la discusión. A continuación se presenta una descripción breve del trabajo. Se realizó un ensayo de germinación en estrés hídrico y se seleccionaron dos cultivares contrastantes en cuanto a germinación y crecimiento temprano (**Obj 1**), posteriormente dichos cultivares se utilizaron en un ensayo de estrés hídrico y recuperación en el cual se evaluó crecimiento (**Obj 2.1**), hormonas relacionadas a estrés hídrico (**Obj 2.2**), actividad de la enzimas antioxidantes SOD y CAT (**Obj 3**), y expresión de genes de respuesta a estrés hídrico dependientes e independientes de ABA, y dependientes de SA (**Obj 4**). Debido a una posible interacción SA y ABA se realizó un ensayo de aplicación exógena de SA con el propósito de estudiar el efecto sobre el crecimiento (**Obj 5.1**), las concentraciones endógenas de ABA, SA y JA (**Obj 5.2**), la actividad SOD y CAT (**Obj 6**), y la

expresión de genes de respuesta a estrés hídrico dependientes e independientes de ABA, y dependientes de SA (Obj 7).

1. Germinación y crecimiento de plántula en condiciones de estrés hídrico

A partir de los resultados se pudo establecer dos grupos de cultivares de *P. virgatum* de comportamientos contrastantes; por un lado, el grupo compuesto por los cvs. Greenville, Blackwell y Pathfinder que presentaron bajos valores de poder germinativo (PG), dentro del cual se destaca el cv. Greenville con el más bajo PG. Por otro lado, el grupo compuesto por los cultivares Caddo, Summer, Alamo y Kanlow que presentaron los PG más altos, destacándose el cv. Kanlow con 75 % (Fig. 9).

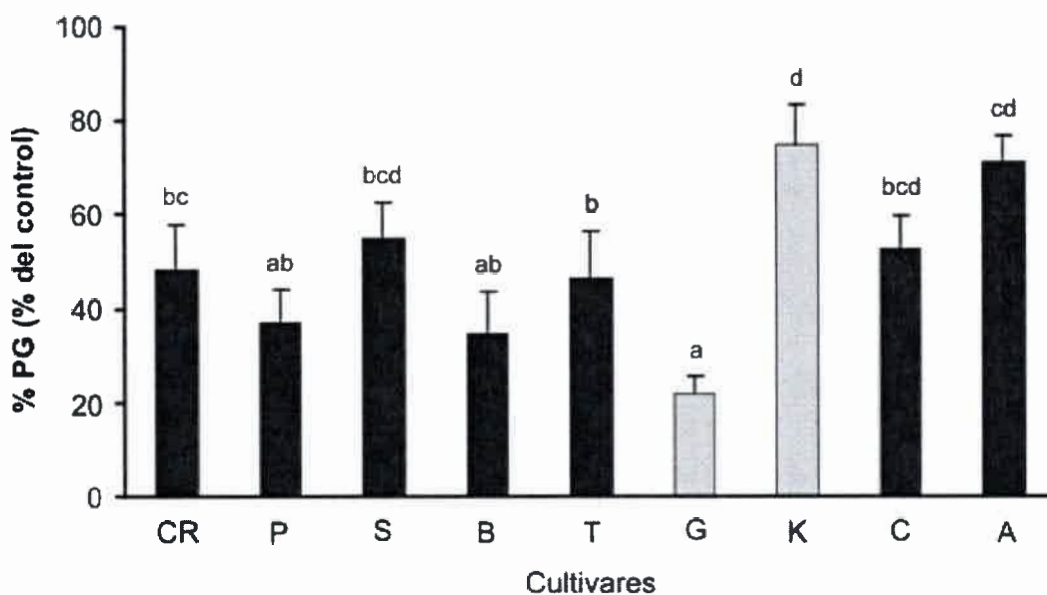


Fig. 9. Porcentaje de germinación de nueve cultivares de *P. virgatum*: Cave in Rock (CR), Pathfinder (P), Summer (S), Blackwell (B), Traiblazer (T), Greenville (G), Kanlow (K), Caddo (C), Alamo (A). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=4, p<0,05).

El PG se asoció con las variables AP, LR y PFA (0.82, 0.78 y 0.69, respectivamente, Tabla 4).

Tabla 4. Correlación entre las variables de crecimiento temprano y el poder germinativo.

	Altura de planta	Longitud de raíz	Peso fresco aéreo	Porcentaje de germinación
Altura de planta	1			
Longitud de raíz	0.80	1		
Peso fresco aéreo	0.96	0.81	1	
Porcentaje de germinación	0.82	0.69	0.78	1

En general, el grupo con mayor % de germinación (cvs. Caddo, Summer, Alamo y Kanlow) mostró valores altos de AP, LR y PFA (Fig. 10, 11 y 12), destacándose el cv. Kallow con el valor más alto para las tres variables. Por el contrario, el grupo con menor % germinación (cvs. Greenville, Blackwell y Pathfinder) presentaron en general valores bajos en dichas variables (Fig. 10, 11 y 12). En base a estos resultados se identificaron cultivares con comportamientos contrastantes en cuanto a germinación y crecimiento temprano de planta juvenil en condiciones de déficit hídrico. El cv. Grenville perteneciente al grupo de cultivares más sensibles en cuanto a germinación y crecimiento en condiciones de estrés hídrico y el cv. Kanlow como tolerante.

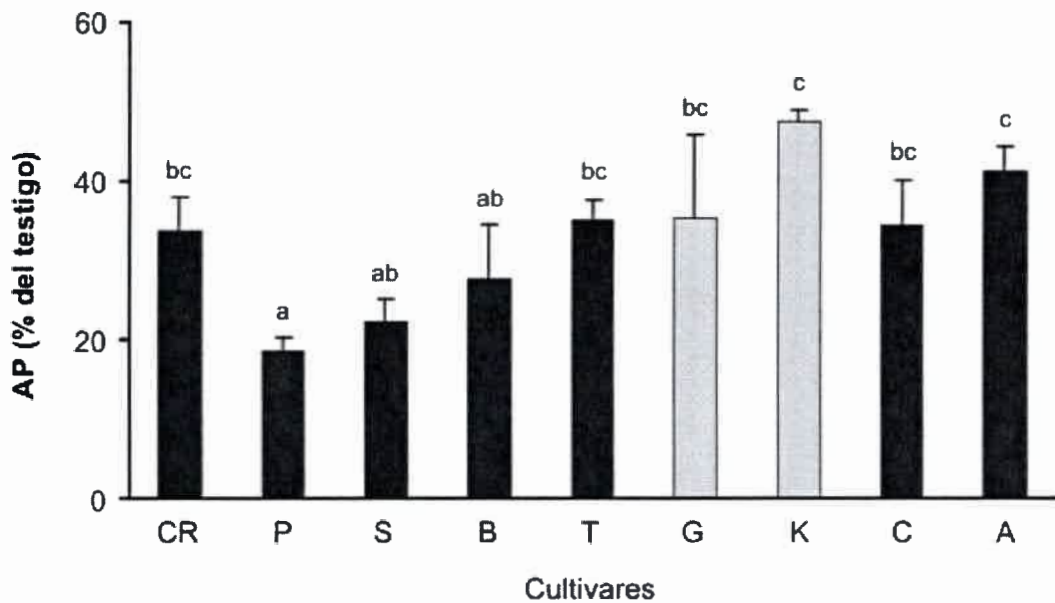


Fig. 10. Altura de planta (AP) de nueve cultivares de *P. virgatum*: Cave in Rock (CR), Pathfinder (P), Summer (S), Blackwell (B), Traiblazer (T), Greenville (G), Kanlow (K), Caddo (C), Alamo (A). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=4, p<0,05).

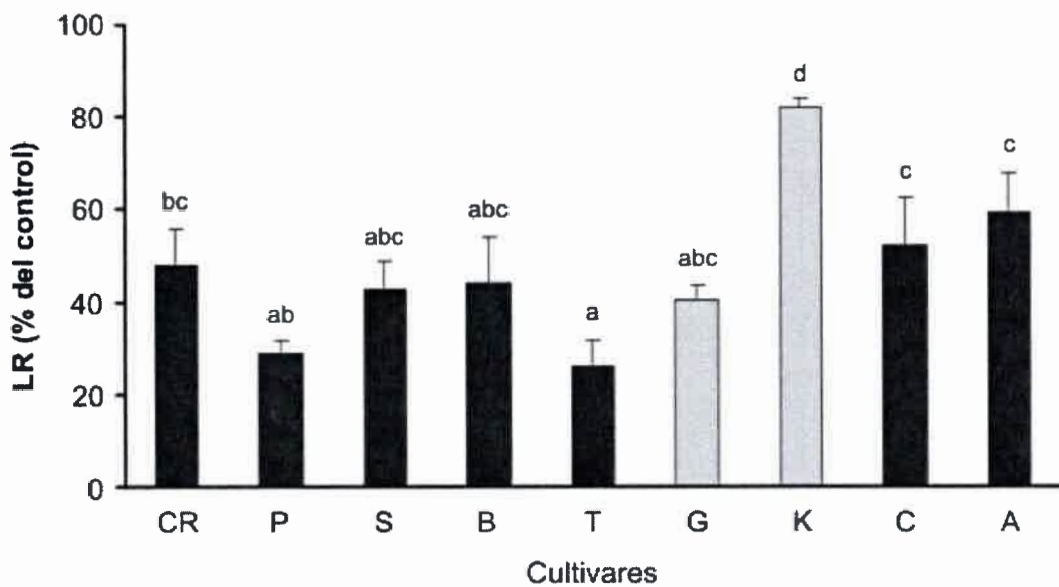


Fig. 11. Longitud de raíz (LR) de nueve cultivares de *P. virgatum*: Cave in Rock (CR), Pathfinder (P), Summer (S), Blackwell (B), Traiblazer (T), Greenville (G), Kanlow (K), Caddo (C), Alamo (A). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=4, p<0,05).

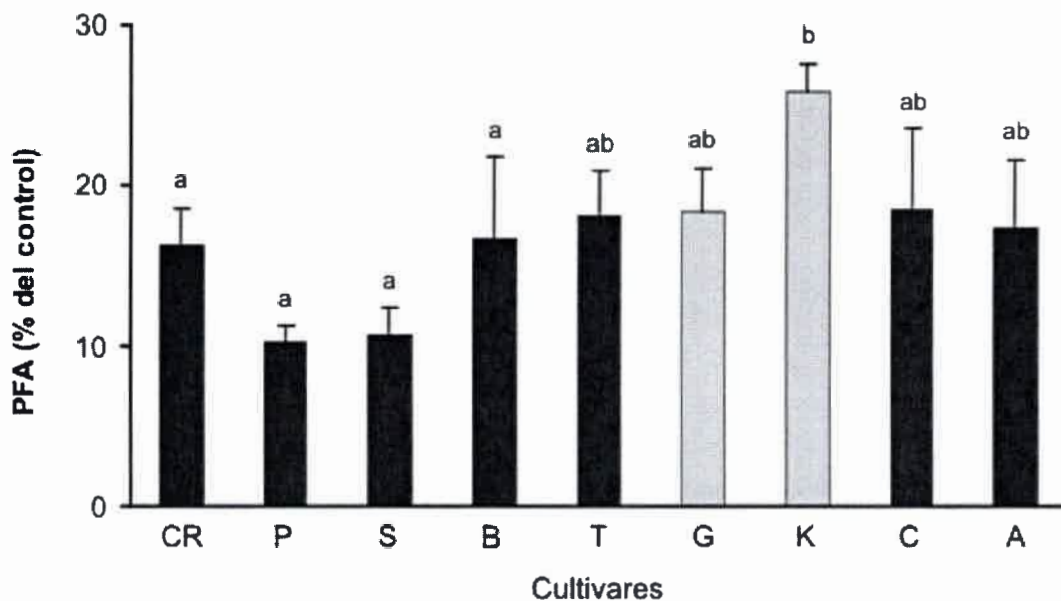


Fig. 12. Peso fresco aéreo (PFA) de nueve cultivares de *P. virgatum*: Cave in Rock (CR), Pathfinder (P), Summer (S), Blackwell (B), Traiblazer (T), Greenville (G), Kanlow (K), Caddo (C), Alamo (A). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=4, p<0,05).

2. Comportamiento frente a estrés hídrico y rehidratación del cv. Kanlow tolerante y del cv. Greenville sensible

2.1 Crecimiento

El tratamiento de estrés hídrico finalizó cuando se observó un aumento importante y consistente de la resistencia estomática con síntomas visuales de acartuchamiento (Fig. 13). Lo cual se produjo a 5 días para el cv. Greenville. Mientras que, en el cv. Kanlow no fue posible realizar la medición de la resistencia estomática debido a que las lecturas del porómetro eran muy altas e inestables y poco consistentes tanto en el control como en los tratamientos. Debido a ello, la finalización del tratamiento para el cv. Kanlow fue a los 6 días, cuando se observaron los mismos síntomas visuales que en el cv. Greenville.

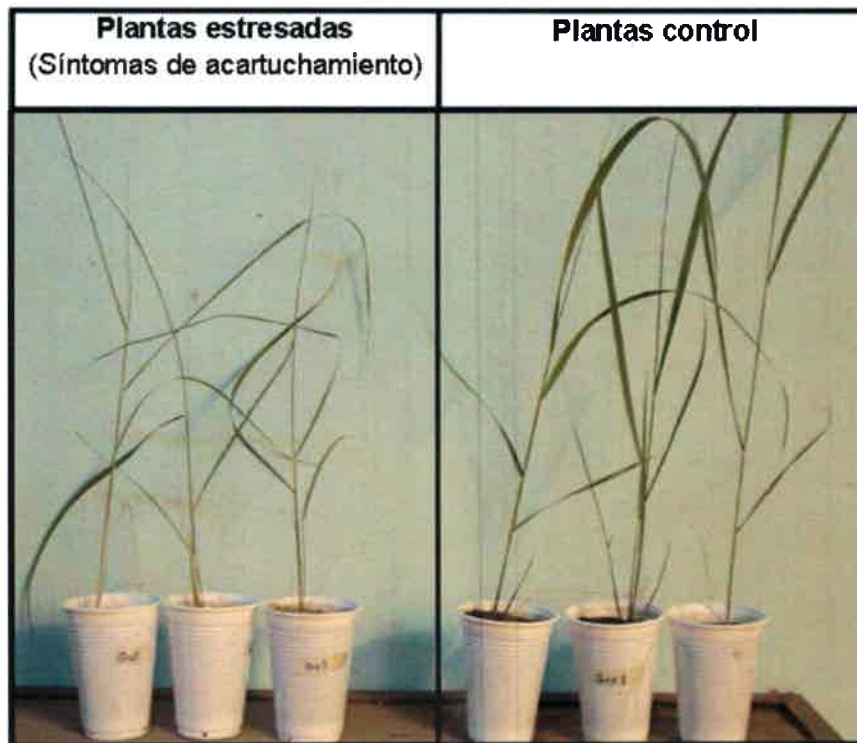


Fig. 13. Síntomas visuales de acartuchamiento de las hojas al momento de la cosecha.

La altura de planta en el cv. Kanlow no se modificó ($p > 0,05$) con ninguno de los tratamientos de estrés hídrico, rehidratación 12 y 24 h (Fig. 14, 15 y 16), mientras que el cv. Greenville disminuyó ($p > 0,05$) la altura de planta en estrés hídrico (Fig. 14), y la rehidratación de 24 h causó una recuperación ($p > 0,05$) en la misma (Fig. 16).

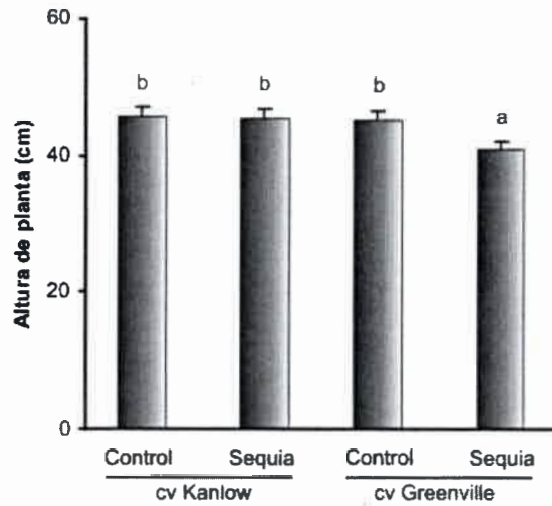


Fig. 14. Altura de planta de los cvs. Kanlow y Greenville sometidos a estrés hídrico (sequía). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=24, p<0,05).

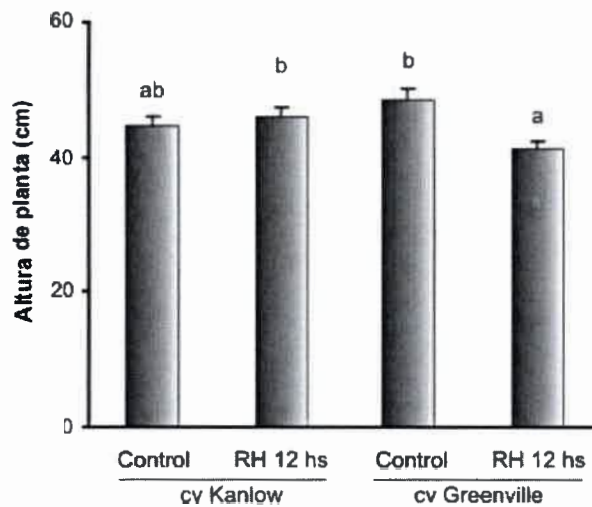


Fig. 15. Altura de planta de los cvs. Kanlow y Greenville luego del tratamiento de 12 h de rehidratación (RH 12 h). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=24, p<0,05).

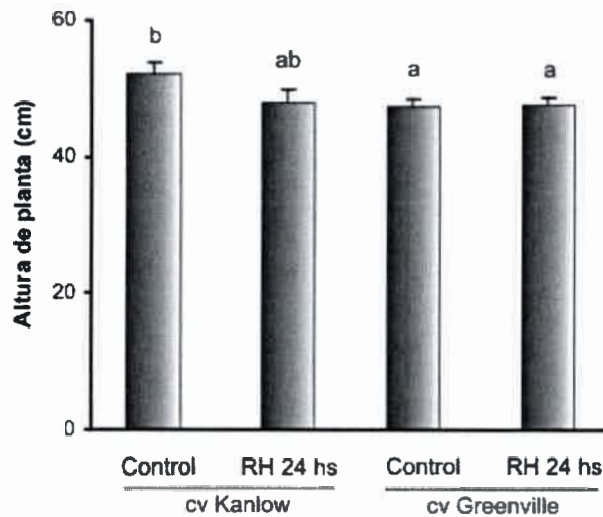


Fig. 16. Altura de planta de los cvs. Kanlow y Greenville luego del tratamiento de 24 h de rehidratación (RH 24 h). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=24, p<0,05).

El número de hojas en el tratamiento de estrés hídrico en el cv. Kanlow no mostró diferencias ($p > 0,05$) con respecto al control. Mientras que, en el cv. Greenville el estrés hídrico causó una disminución ($p > 0,05$) manteniendo dicha diferencia a las 24 h de rehidratación (Fig. 17, 18 y 19).

Estos resultados indican que el cv. Kanlow presenta un mejor comportamiento en las condiciones de deficiencia hídrica evaluadas en este ensayo.

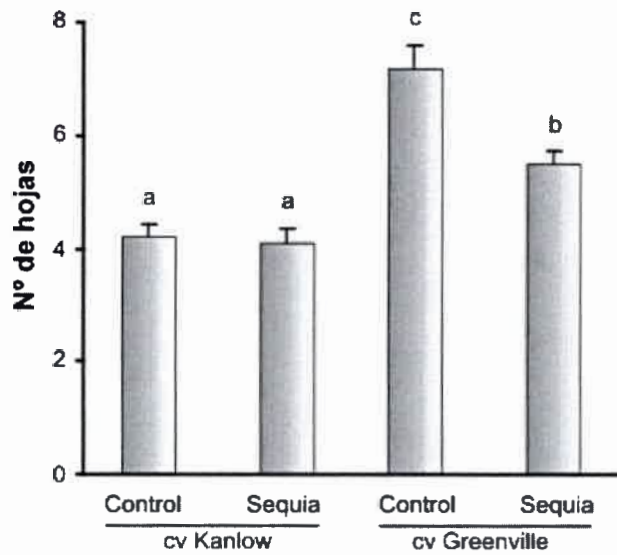


Fig. 17. Número de hojas de los cvs. Kanlow y Greenville sometidos a estrés hídrico (sequía). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=24, p<0,05).

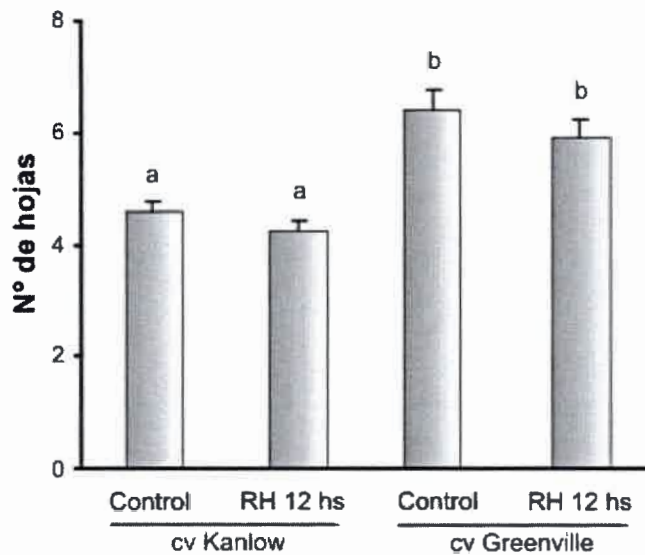


Fig. 18. Número de hojas de los cvs. Kanlow y Greenville luego del tratamiento de 12 h de rehidratación (RH 12 h). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=24, p<0,05).

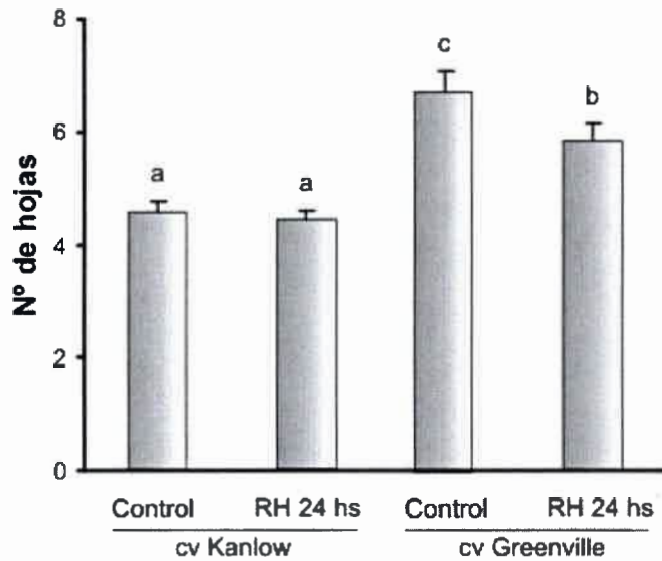


Fig. 19. Número de hojas de los cvs. Kanlow y Greenville luego del tratamiento de 24 h de rehidratación (RH 24 h). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=24, p<0,05).

2.2 Hormonas relacionadas a estrés hídrico

En hojas de ambos cultivares los niveles endógenos de ABA se modificaron diferencialmente a causa del estrés hídrico y rehidratación por 12 y 24 h. Como se observa en la Fig. 20, los niveles de ABA en el cv. Kanlow aumentaron significativamente en estrés hídrico (11 veces) y retornaron al valor del control luego de 12 y 24 h de rehidratación. Mientras que en Greenville el incremento de ABA durante el estrés hídrico fue de 4.5 veces con respecto al control. Estos valores disminuyeron significativamente en el tratamiento de 12 h de rehidratación (1.5 veces) para finalmente igualar los niveles del control a las 24 h de rehidratación.

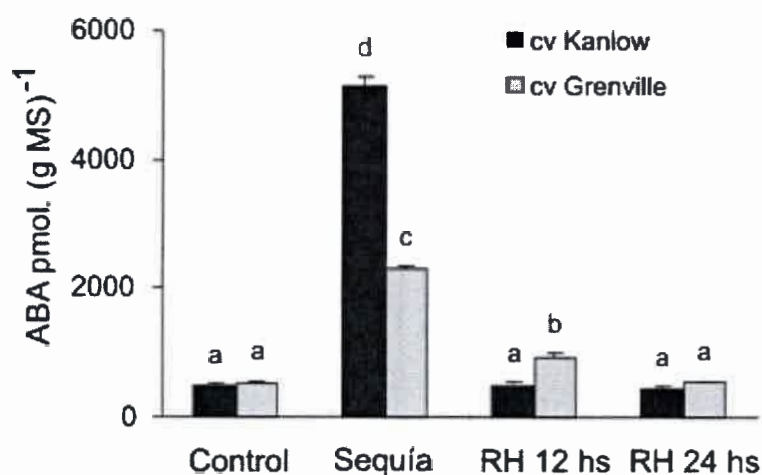


Fig. 20. Contenido endógeno de ABA en hojas de *P. virgatum* bajo estrés hídrico, 12 y 24 h de rehidratación. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05).

En cuanto al nivel de SA la respuesta de ambos cultivares también resultó diferente (Fig. 21). El nivel basal de SA fue significativamente mayor en el cv. Kanlow. En este cultivar no se observaron diferencias significativas entre el control y el tratamiento de estrés hídrico. No obstante presentó una disminución significativa con respecto al control a las 12 y 24 h de rehidratación. Mientras que, en el cv. Grenville se produjo una disminución de SA cuando fue sometido a estrés hídrico y un incremento a las 24 h de rehidratación.

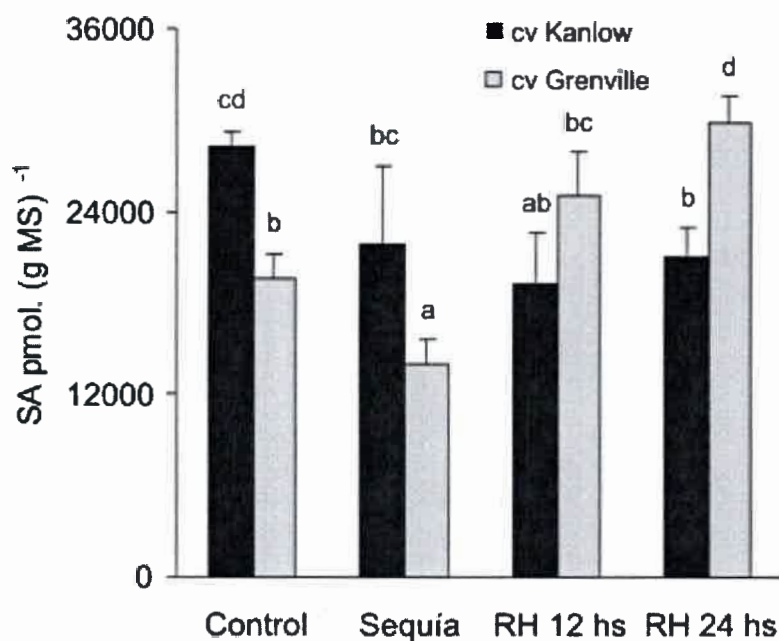


Fig. 21. Contenido endógeno de SA en hojas de *P. virgatum* bajo estrés hídrico, 12 y 24 h de rehidratación. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05).

El contenido endógeno de JA en los controles fue más alto en el cv. Kanlow, el cual mostró una disminución significativa a las 12 h de rehidratación. En Greenville los niveles de JA no fueron afectados por el estrés hídrico, incrementándose solo a las 24 h de rehidratación (Fig. 22).

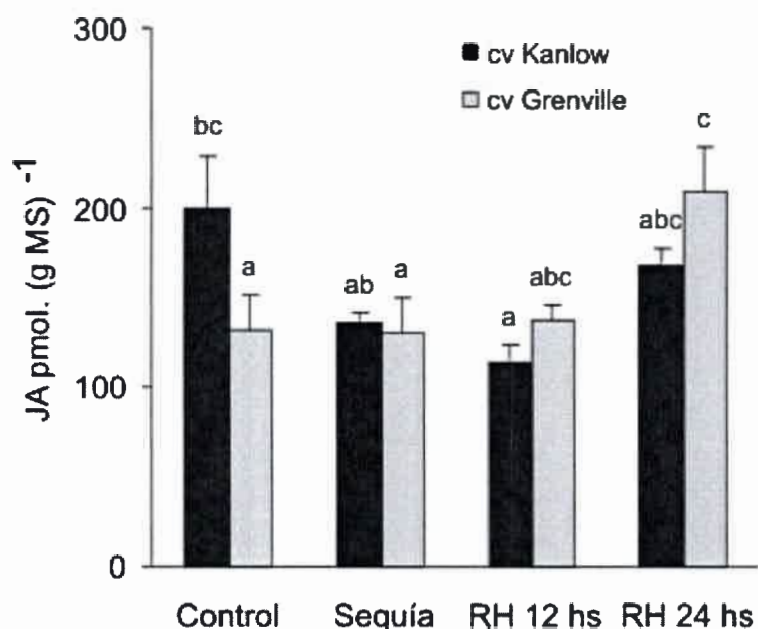


Fig. 22. Contenido endógeno de JA en hojas de *P. virgatum* bajo estrés hídrico, 12 y 24 h de rehidratación. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05).

3. Actividad enzimática SOD y CAT

La actividad SOD en el cv. Kanlow se incrementó con el estrés hídrico y continuó aumentando a las 12 y 24 h de rehidratación. En el cv. Grenville la actividad SOD también incrementó bajo estrés hídrico manteniendo el mismo nivel a las 12 h de rehidratación, luego mostró un nuevo incremento a las 24 h de rehidratación. El aumento de la actividad SOD a las 12 y 24 h fue superior en el cv. Kanlow (Fig. 23).

Del mismo modo la actividad CAT en el cv. Kanlow incrementó significativamente bajo estrés hídrico, 12 y 24 h de rehidratación. En el cv. Grenville la actividad CAT incrementó significativamente por el estrés hídrico, alcanzando mayor actividad a las 12 y 24 h de la rehidratación. Dichos incrementos, al igual que en SOD, fueron superiores en cv. Kanlow (Fig. 24).

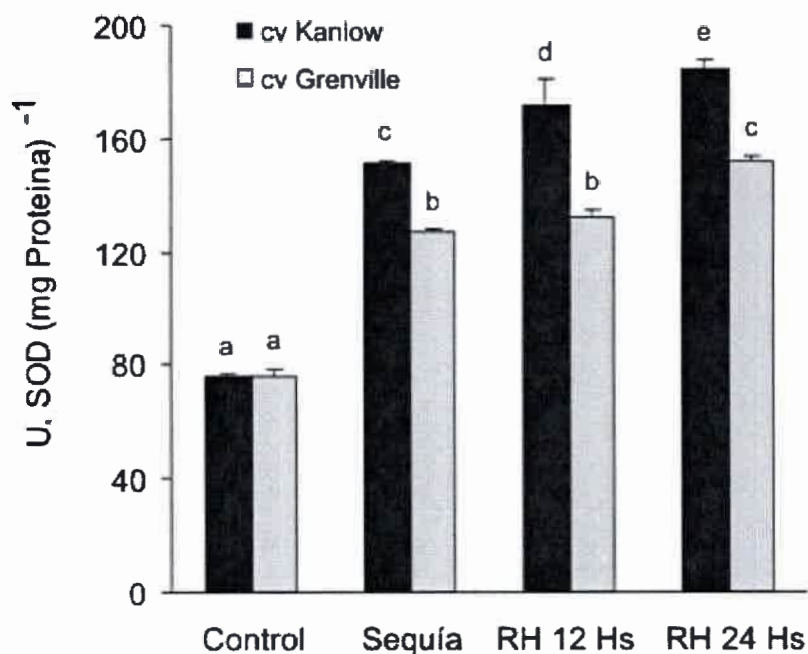


Fig. 23. Actividad SOD en hojas de *P. virgatum* bajo estrés hídrico, 12 y 24 h de rehidratación. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05).

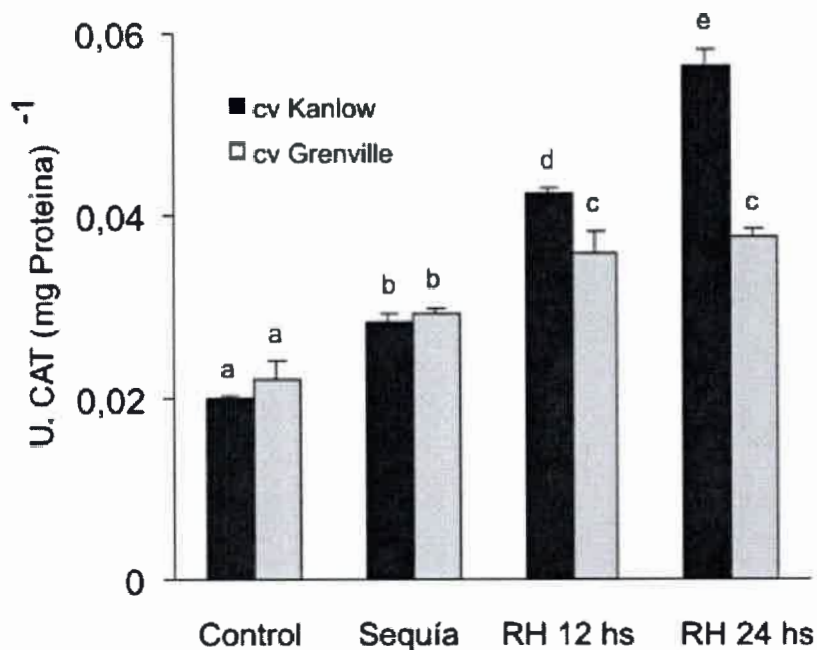


Fig. 24. Actividad CAT en hojas de *P. virgatum* bajo estrés hídrico, 12 y 24 h de rehidratación. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05).

4. Expresión de los genes marcadores de estrés hídrico

La expresión de genes implicados en el estrés se evaluó midiendo la abundancia relativa de genes dependientes de ABA (*RAB18* y *RD22*) e independiente (*DREB2A*) y dependientes de SA (*PR2*).

Expresión del gen dependiente de ABA: RAB18

En el cv. Kanlow el estrés hídrico causó un incremento significativo en la expresión de *RAB18* (3 veces), mientras que a las 12 h de rehidratación se produjo la desaparición total del transcripto. A las 24 h el nivel de expresión fue significativamente mayor al del control y menor que al del tratamiento de estrés. En cambio, el tratamiento de estrés hídrico no causó un incremento significativo en la expresión del gen *RAB18* en el cv. Greenville y se observó a las 12 h de rehidratación una total desaparición de transcriptos, al igual que en el cv. Kanlow, retornando al nivel normal de expresión a las 24 h de rehidratación (Fig. 25).

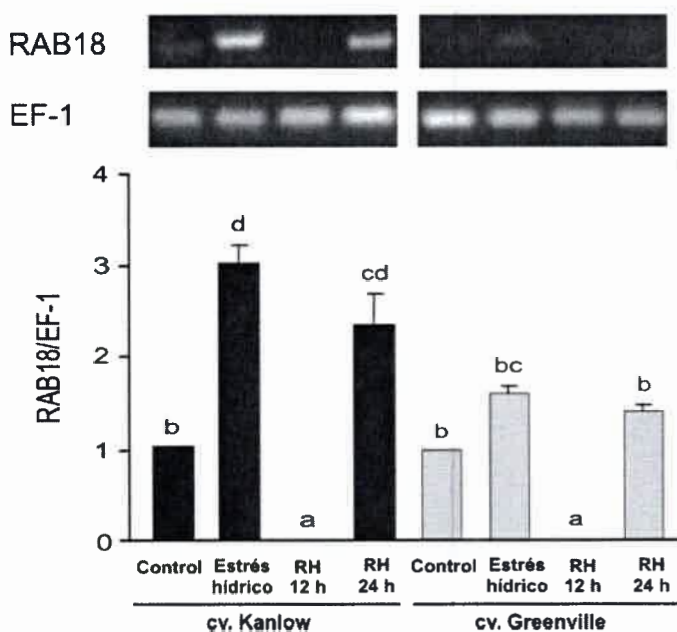


Fig. 25. Abundancia relativa de transcritos del gen *RAB18* en hojas *P. virgatum* bajo estrés hídrico, 12 (RH 12 h) y 24 (RH 24 h) h de rehidratación. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($n=3$, $p<0,05$).

Expresión del gen dependiente de ABA: *RD22*

La expresión del gen *RD22* mostró un aumento significativo después de 24 h. de rehidratación en el cv. Kanlow, sin embargo, el cv. Greenville no mostró diferencias significativas durante el estrés y la recuperación. (Fig. 26).

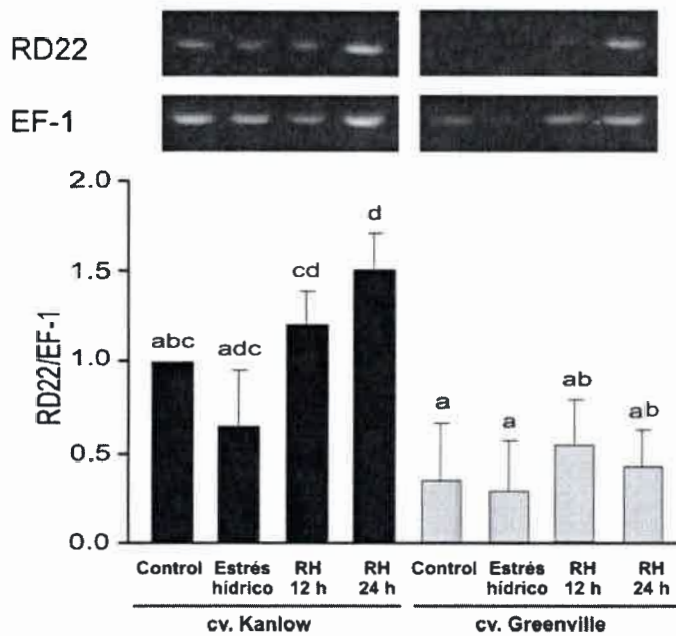


Fig. 26. Abundancia relativa de transcritos del gen *RD22* en hojas *P. virgatum* bajo estrés hídrico, 12 (RH 12 h) y 24 (RH 24 h) h de rehidratación. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($n=3$, $p<0,05$).

Expresión del gen independiente de ABA: *DREB2A*

En el cv. Kanlow el estrés hídrico causó una disminución significativa en el nivel de expresión de *DREB2A* (5 veces) mientras que a 12 y 24 h de rehidratación no se produjeron cambios en la expresión con respecto al control. En el cv. Greenville el estrés hídrico produjo una disminución significativa (4 veces), recuperando luego el nivel de expresión del control a las 12 y 24 h de rehidratación (Fig. 27).

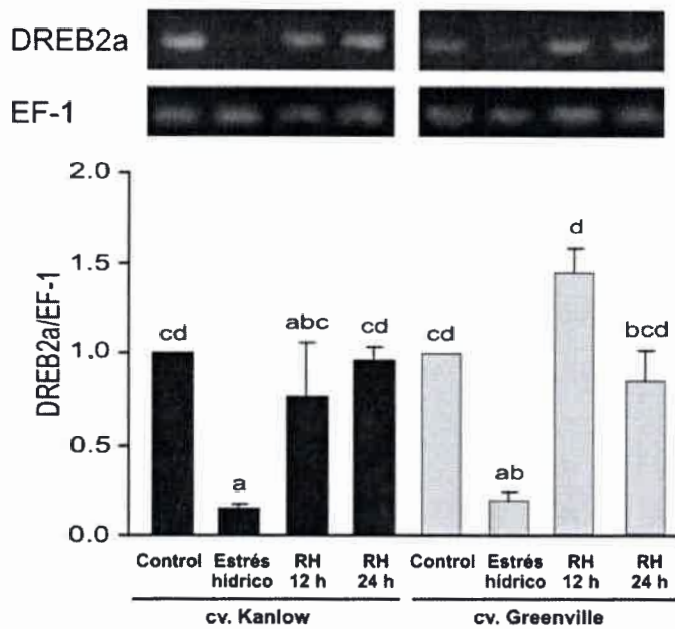


Fig. 27. Abundancia relativa de transcritos del gen *DREB2A* en hojas *P. virgatum* bajo estrés hídrico, 12 (RH 12 h) y 24 (RH 24 h) h de rehidratación. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05).

Expresión del gen dependiente de SA: PR2

La expresión del transcripto *PR2* dependiente de SA, sólo se observó a las 24 h de la rehidratación en dos de las tres replicas analizadas en el cv. Kanlow, mientras que en el cv. Greenville no se observó en ninguno de los tratamientos (Fig. 28).

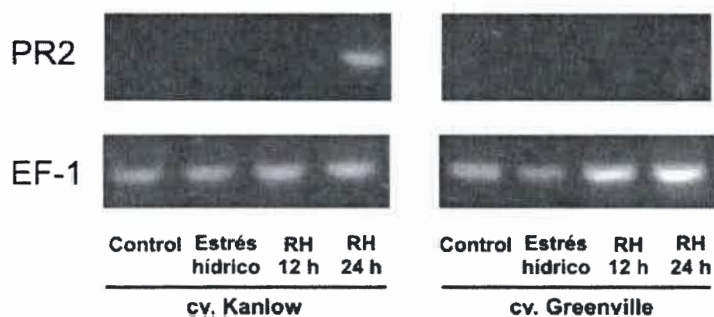


Fig. 28. Abundancia relativa de transcritos del gen *PR2* en hojas *P. virgatum* bajo estrés hídrico, 12 (RH 12 h) y 24 (RH 24 h) h de rehidratación.

5. Aplicación exógena de SA y su efecto en la respuesta a estrés hídrico y rehidratación en un cultivar tolerante Kanlow y en el cultivar sensible Greenville

5.1 Crecimiento

Luego de la aplicación del estrés hídrico, al momento de la cosecha, los cvs. presentaron síntomas visuales de acartuchamiento (Fig. 29).

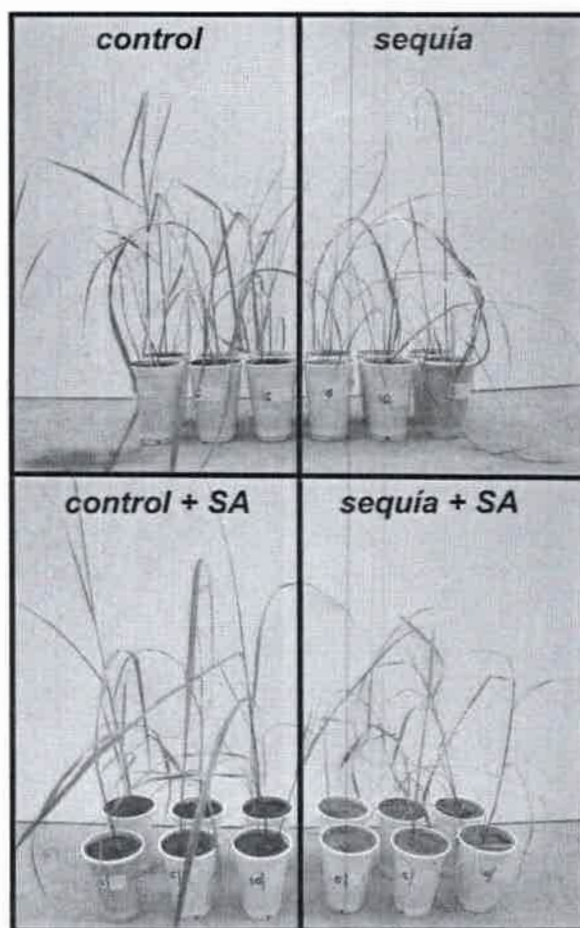


Fig. 29. Síntomas visuales de acartuchamiento de las hojas al momento de la cosecha.

El cv. Kanlow mostró una reducción significativa en el CRA en estrés hídrico, tanto en las plantas sin pre-tratamiento como en las pre-tratadas con SA, alcanzando los valores del control a las 12 horas de rehidratación (Fig. 30).

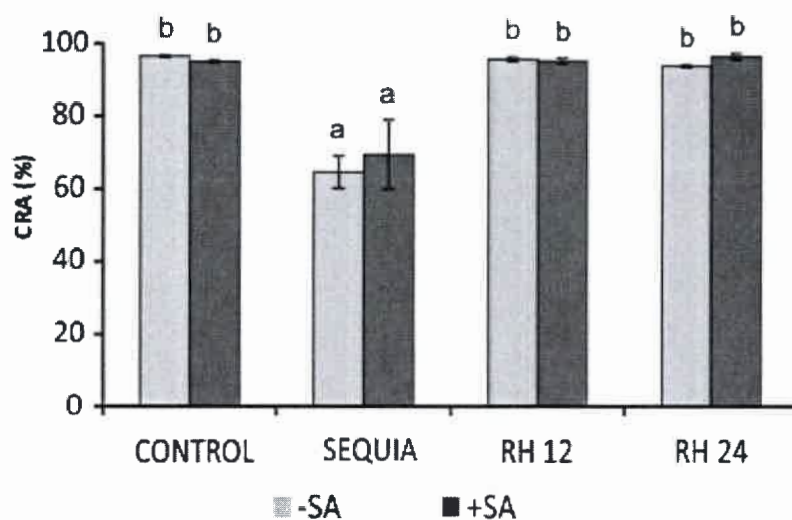


Fig. 30. Contenido relativo de agua en el cv. Kanlow: sin pre-tratamiento con SA y pre-tratadas con SA, bajo estrés hídrico, 12 (RH 12) y 24 (RH 24) h de rehidratación. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=4, p<0,05).

En el cv. Greenville, el estrés hídrico disminuyó significativamente el CRA en las plantas sin pre-tratamiento, al igual que en el pre-tratamiento con SA, donde la disminución fue de un 20% mayor con respecto a las plantas sin pre-tratamiento (Fig. 31).

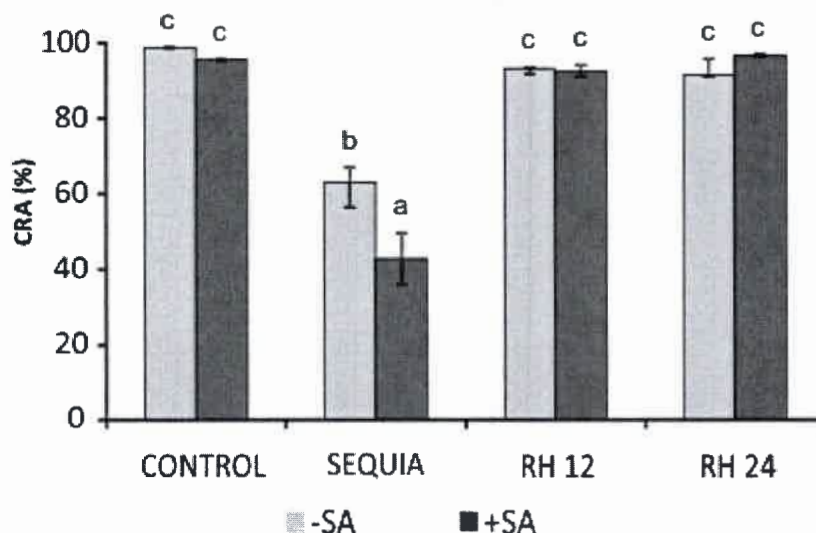


Fig. 31. Contenido relativo de agua en el cv. Greenville: sin pre-tratamiento con SA y pre-tratadas con SA, bajo estrés hídrico, 12 (RH 12) y 24 (RH 24) h de rehidratación. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=4, p<0,05).

En el cv. Kanlow el estrés hídrico no produjo diferencias en la altura de planta con respecto al control, sin embargo una disminución significativa ocurrió a las 12 y 24 h de rehidratación. El pre-tratamiento con SA no afectó la altura de planta tanto en las plantas control como en los tratamientos de estrés hídrico, rehidratación 12 y 24 h (Fig. 32). En el cv. Greenville el estrés hídrico redujo significativamente la altura de planta con respecto al control, manteniendo dicha diferencia a las 12 y 24 h de rehidratación (Fig. 33). El pre-tratamiento con SA produjo una disminución en este parámetro en el control bien regado y esa diferencia se mantuvo en todos los tratamientos.

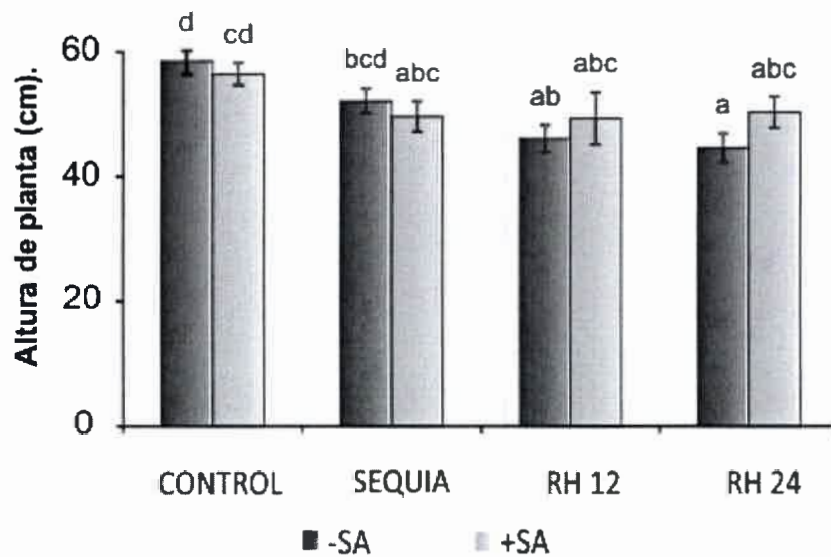


Fig. 32. Altura de planta en el cv. Kanlow: sin pre-tratamiento con SA y pre-tratadas con SA, bajo estrés hídrico, 12 (RH 12) y 24 (RH 24) h de rehidratación. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=16, p<0,05).

Con respecto al número de hojas el estrés hídrico disminuyó significativamente este parámetro en el cv. Kanlow recuperando los valores del control a las 12 y 24 h de rehidratación; mientras que en el pre-tratamiento con SA el estrés hídrico también ocasionó una disminución en el número de hojas que se mantuvo hasta las 12 h de rehidratación, alcanzando los niveles del control a las 24 h de rehidratación (Fig. 34).

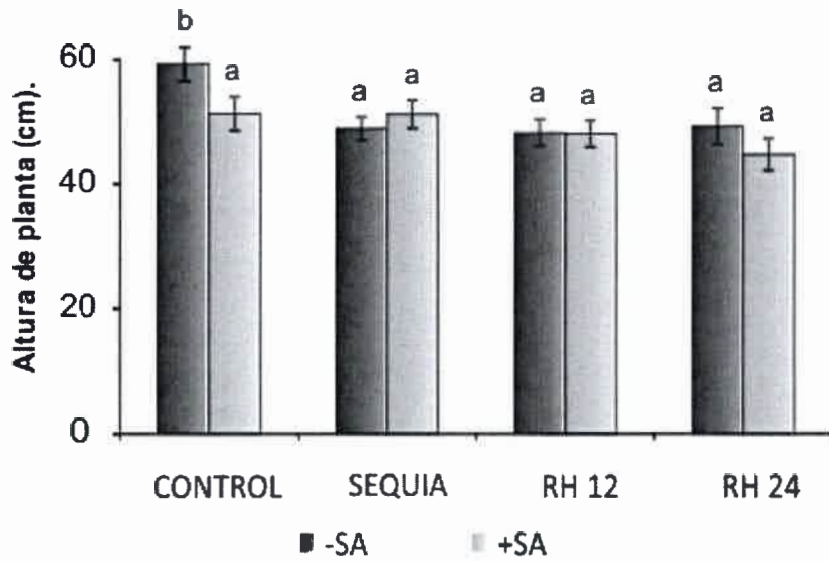


Fig. 33. Altura de planta en el cv. Greenville: sin pre-tratamiento con SA y pre-tratadas con SA, bajo estrés hídrico, 12 (RH 12) y 24 (RH 24) h de rehidratación. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=16, p<0,05).

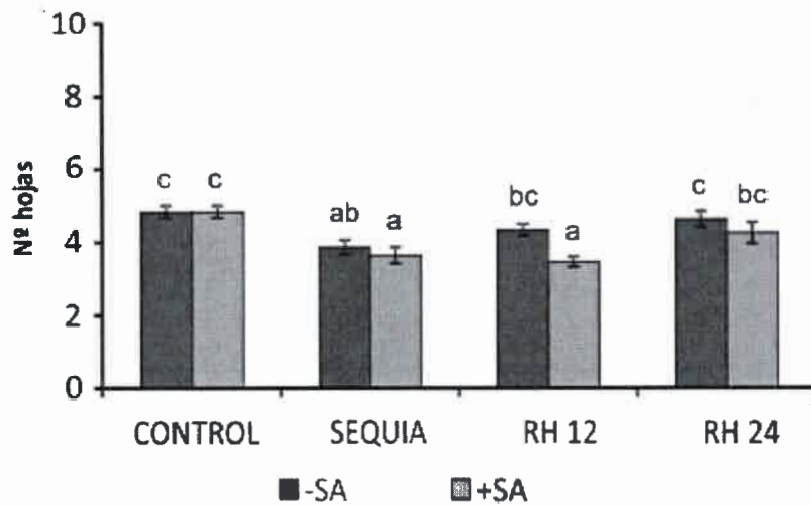


Fig. 34. Número de hojas en el cv. Kanlow: sin pre-tratamiento con SA y pre-tratadas con SA, bajo estrés hídrico, 12 (RH 12) y 24 (RH 24) h de rehidratación. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=16, p<0,05).

En Greenville, el estrés hídrico disminuyó notoriamente el número de hojas, siendo aún dicha reducción más importante a las 12 h de rehidratación, y recuperando los valores del tratamiento de sequía a las 24 h de rehidratación, aunque sin alcanzar a recuperar los valores del control bien regado. En las plantas pre-tratadas con SA la tendencia fue similar aunque de mayor magnitud ($p < 0,05$). Más aún, el pre-tratamiento con SA redujo el número de hojas con respecto a las plantas sin pre-tratamiento en condiciones control (Fig. 35).

Estos resultados indican que en el cv. sensible Greenville el pre-tratamiento con SA afecta negativamente las variables de crecimiento y contenido hídrico, mientras que en el tolerante Kanlow parece no tener efecto sobre las mismas, en las condiciones de deficiencia hídrica evaluadas en este ensayo.

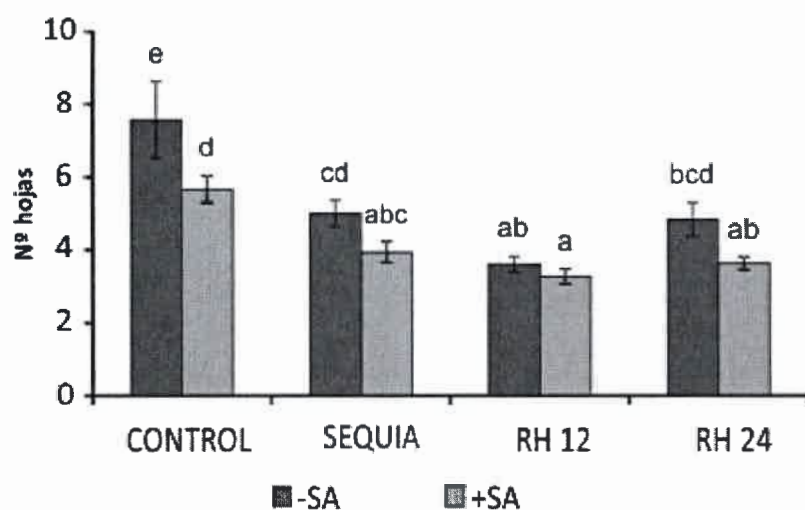


Fig. 35. Número de hojas en el cv. Greenville: sin pre-tratamiento con SA y pre-tratadas con SA, bajo estrés hídrico, 12 (RH 12) y 24 (RH 24) h de rehidratación. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($n=16$, $p < 0,05$).

Densidad estomática

El cv. tolerante Kanlow presenta mayor números de estomas por mm^2 que el cv. sensible Greenville (Fig. 36).

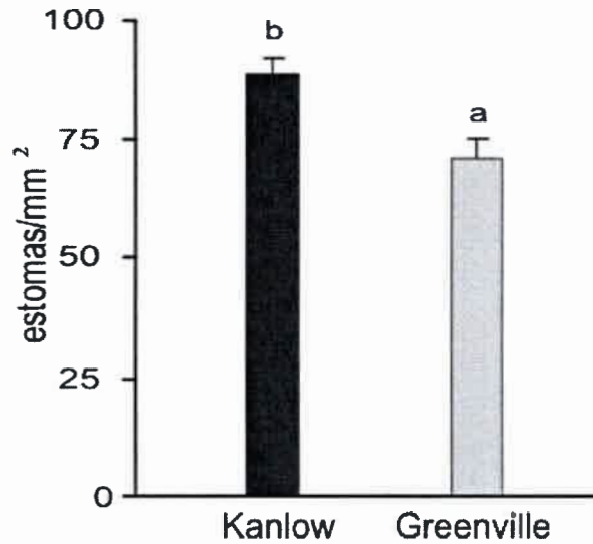


Fig. 36. Densidad estomática en hojas de *P. virgatum*. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=4, p<0,05).

5.2 Contenido de hormonas asociadas a estrés hídrico y al pre-tratamiento con SA: entrecruzamiento en las vías de señalización de ABA, SA, JA.

En el cv. Kanlow el estrés hídrico incrementó el contenido endógeno de ABA; este incremento fue 38 veces superior con respecto al control bien regado, retornando a los niveles del control a las 12 y 24 h de rehidratación. En plantas pre-tratadas con SA también hubo un incremento significativo de ABA respecto a su control en estrés hídrico, pero en este caso fue sólo de 3 veces, para luego alcanzar los niveles del control a las 12 y 24 h de rehidratación (Fig. 37).

El agregado exógeno de SA incrementó el nivel endógeno de ABA en las plantas control (6 veces) y a las 24 h de rehidratación (3,5 veces) con respecto a las plantas sin pre-tratamiento, y produjo una disminución significativa del nivel endógeno de ABA (0,5 veces) en estrés hídrico respecto a las plantas sin pre-tratamiento con SA (Fig. 37).

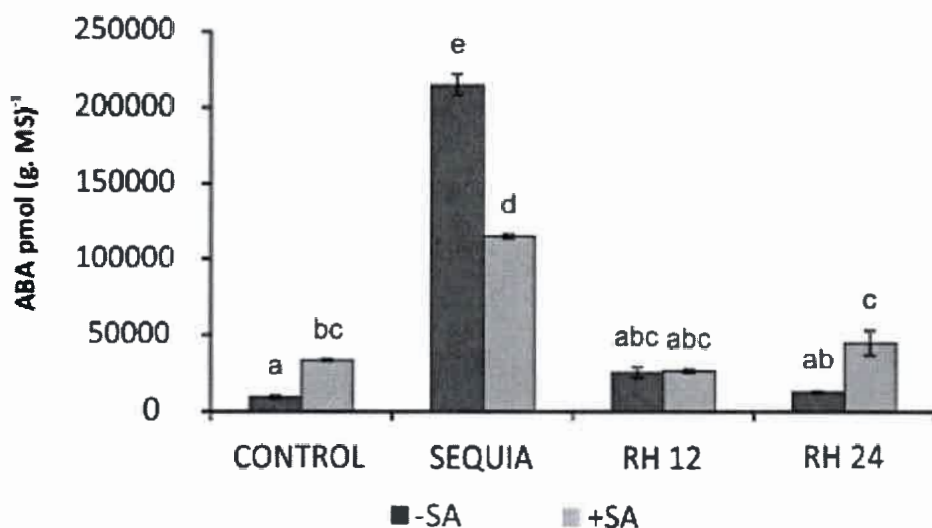


Fig. 37. Contenido endógeno de ABA en hojas de *P. virgatum* cv. Kanlow bajo estrés hídrico, 12 y 24 h de rehidratación pre-tratado con SA, y sin pre-tratamiento con SA (control). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05).

En el cv. Greenville el estrés hídrico incrementó el nivel de ABA (13 veces) con respecto al control bien regado; estos valores disminuyeron significativamente en el tratamiento de 12 h de rehidratación (4.5 veces) para finalmente igualar los niveles del control a las 24 h de rehidratación. El pre-tratamiento con SA en estrés hídrico causó un incremento significativo (7,5 veces) con respecto a su control, recuperando los niveles del mismo a las 12 y 24 h de rehidratación (Fig. 38).

El agregado exógeno de SA incrementó el nivel de ABA con respecto a las plantas bien regadas a las 24 h de rehidratación. Una disminución significativa (0,5 veces) en estrés hídrico de las plantas tratadas con SA respecto a su control fue observada (Fig. 38).

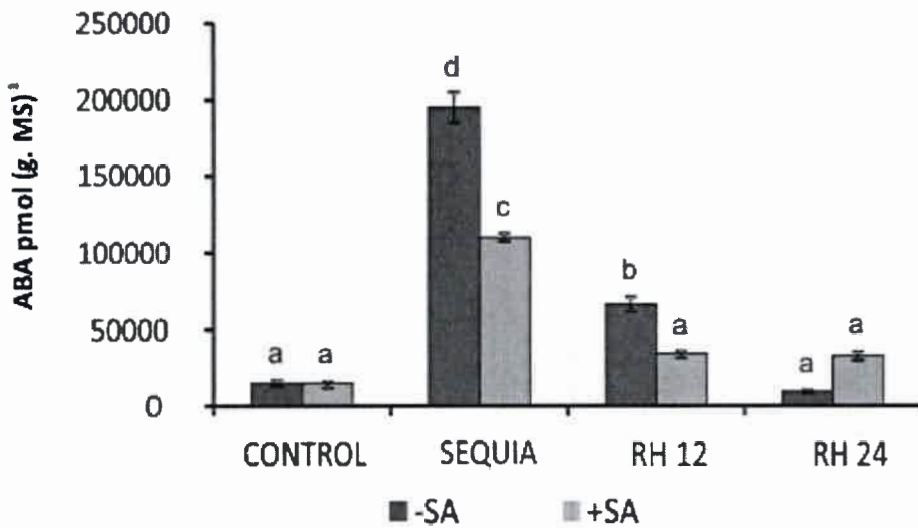


Fig. 38. Contenido endógeno de ABA en hojas de *P. virgatum* cv. Greenville bajo estrés hídrico, 12 y 24 h de rehidratación pre-tratado con SA, y sin pre-tratamiento con SA (control). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($n=3$, $p<0,05$).

En el cv. Kanlow, ninguno de los tratamientos (estrés hídrico, rehidratación 12 y 24 h) causó cambios significativos en SA tanto en plantas pre-tratadas con SA como en plantas sin pre-tratamiento (Fig. 39).

El pre-tratamiento con SA incrementó en el nivel de SA a las 24 h de rehidratación respecto a las plantas sin aplicación exógena. Si bien no se observan diferencias significativas en SA endógeno en los controles bien regados, en el tratamiento de estrés hídrico y a las 12 h de rehidratación se evidencia una tendencia que muestra mayor nivel endógeno de SA en las plantas pre-tratadas con SA (Fig. 39).

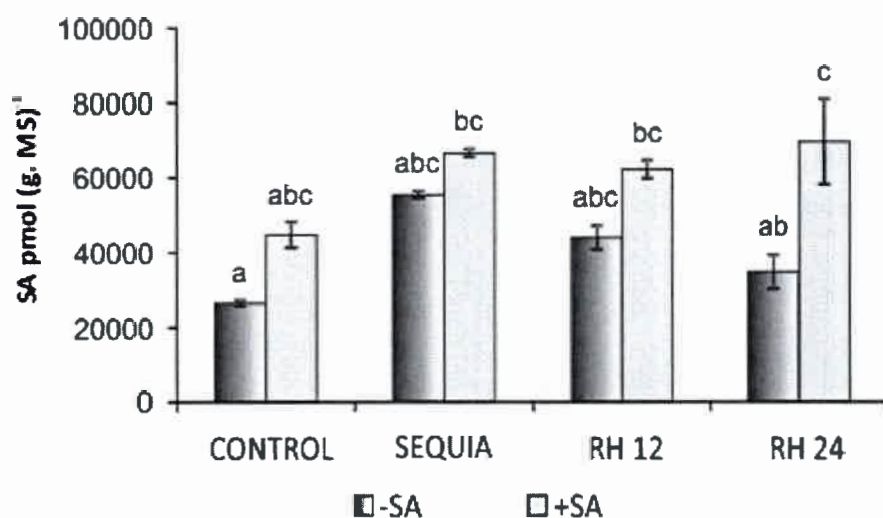


Fig. 39. Contenido endógeno de SA en hojas de *P. virgatum* cv. Kanlow bajo estrés hídrico, 12 y 24 h de rehidratación pre-tratado con SA, y sin pre-tratamiento con SA (control). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05).

En el cv. Greenville, ninguno de los tratamientos causó cambios en el nivel endógeno de SA en plantas sin pre-tratamiento con SA. En las plantas pre-tratadas con SA el estrés hídrico incrementó el nivel endógeno de SA recuperando los niveles del control a las 12 y 24 horas de rehidratación (Fig. 40).

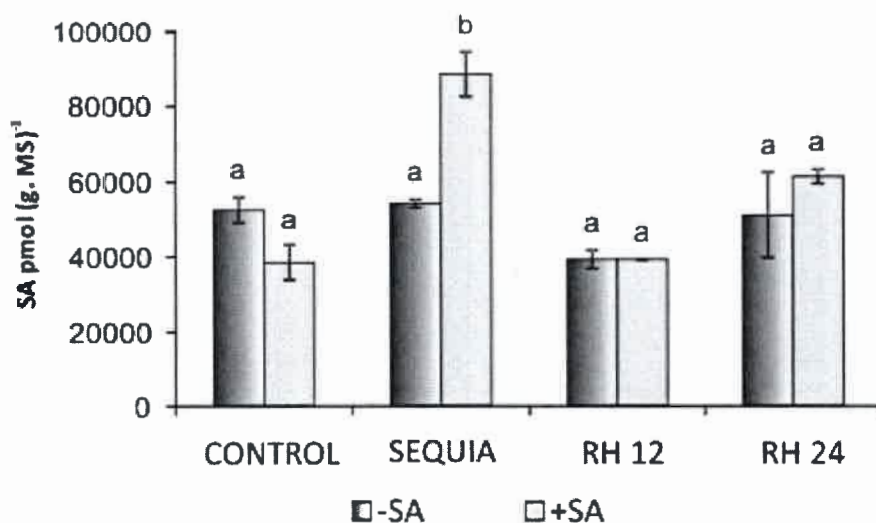


Fig. 40. Contenido endógeno de SA en hojas de *P. virgatum* cv. Greenville bajo estrés hídrico, 12 y 24 h de rehidratación pre-tratado con SA, y sin pre-tratamiento con SA (control). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05).

En el cv. Kanlow el estrés hídrico incrementó 2 veces el nivel endógeno de JA respecto al control bien regado, disminuyendo a las 12 h de rehidratación donde aún el nivel de JA continuó siendo más alto que el control, alcanzando los niveles del mismo a las 24 h de rehidratación (Fig. 41).

En las plantas con aplicación exógena de SA tanto el estrés hídrico como las 12 y 24 h de rehidratación no produjeron cambios en JA endógeno, produciéndose una disminución a las 24 h de rehidratación con respecto a su control bien regado. Frente al estrés hídrico las plantas tratadas con SA mostraron un menor nivel endógeno de JA que las plantas sin aplicación exógena de SA (Fig. 41).

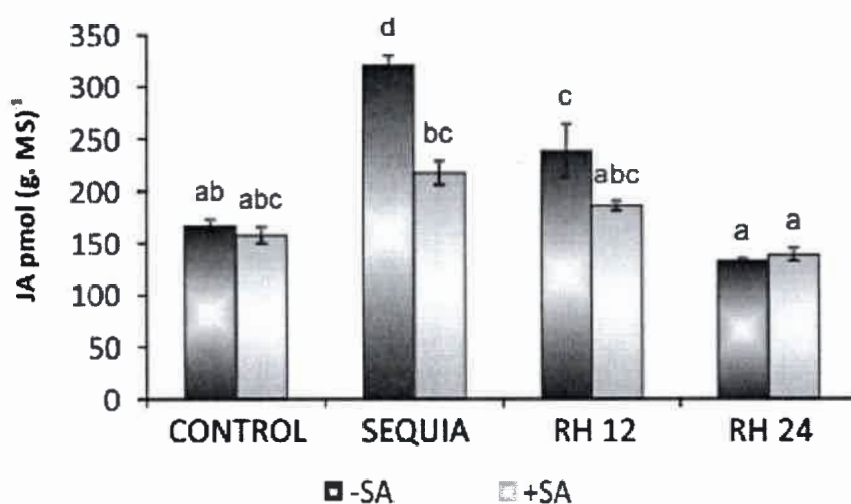


Fig. 41. Contenido endógeno de JA en hojas de *P. virgatum* cv. Kanlow bajo estrés hídrico, 12 y 24 h de rehidratación pre-tratado con SA, y sin pre-tratamiento con SA (control). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($n=3$, $p<0,05$).

En el cv. Greenville ninguno de los tratamientos (estrés hídrico, rehidratación 12 y 24 h) produjo cambios en el nivel endógeno de JA en las plantas sin pre-tratamiento con SA. Mientras que en las plantas con aplicación exógena de SA se observó una disminución significativa a las 12 h de rehidratación con respecto al control bien regado (Fig. 42).

El pre-tratamiento con SA exógeno incrementó significativamente el nivel endógeno de JA en las plantas bien regadas respecto a las plantas sin aplicación exógena (Fig. 42).

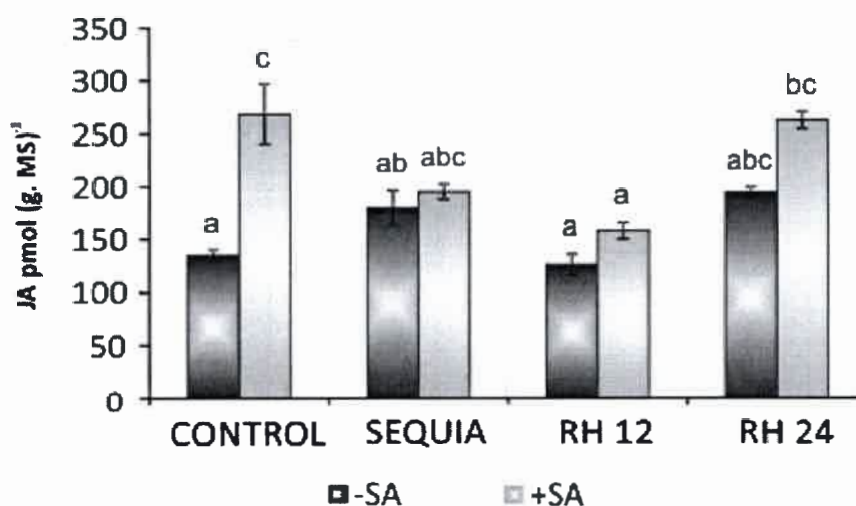


Fig. 42. Contenido endógeno de JA en hojas de *P. virgatum* cv. Greenville bajo estrés hídrico, 12 y 24 h de rehidratación pre-tratado con SA, y sin pre-tratamiento con SA (control). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05).

6. Efecto del pre-tratamiento con SA exógeno sobre la actividad de las enzimas SOD y CAT en estrés hídrico y rehidratación

En el cv. Kanlow el estrés hídrico causó un incremento significativo en la actividad de la SOD y dicha actividad continuó incrementando a las 12 y 24 h de rehidratación. El pre-tratamiento con SA aumentó la actividad de la enzima en todos los tratamientos (Fig. 43).

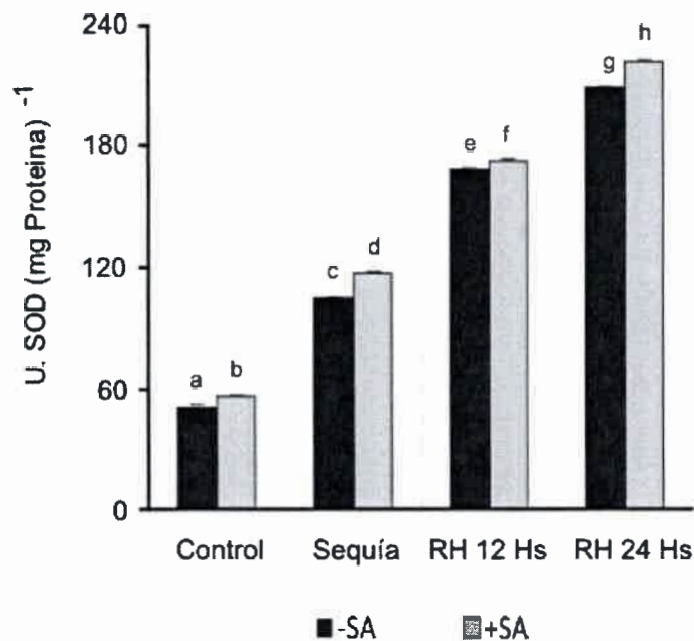


Fig. 43. Actividad SOD en hojas de *P. virgatum* cv. Kanlow bajo estrés hídrico, 12 y 24 h de rehidratación pre-tratadas con SA, y sin pre-tratamiento con SA (control). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05).

En el cv. Greenville el estrés hídrico también incrementó la actividad de SOD, la cual siguió incrementando a las 12 y 24 h de rehidratación. Mientras que el pre-tratamiento con SA no modificó la actividad de la enzima con respecto a las plantas sin pre-tratamiento (Fig. 44).

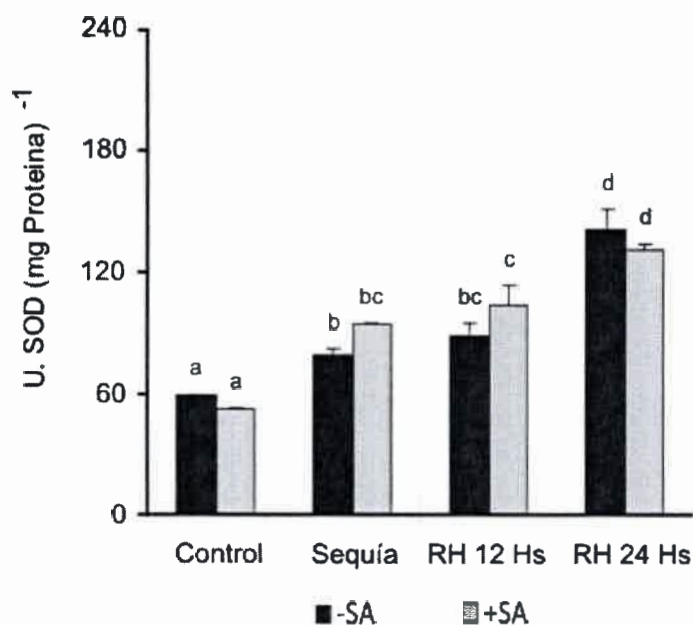


Fig. 44. Actividad SOD en hojas de *P. virgatum* cv. Greenville bajo estrés hídrico, 12 y 24 h de rehidratación pre-tratadas con SA, y sin pre-tratamiento con SA (control). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05).

En cuanto a CAT, el estrés hídrico incrementó su actividad tanto en el cv. tolerante como en el sensible, y dicha actividad continuó con la misma tendencia a las 12 y 24 h de rehidratación en ambos cvs. (Fig. 45 y 46). En el cv. Kanlow el pre-tratamiento con SA aumentó la actividad de la enzima en rehidratación con respecto a las plantas sin pre-tratamiento, mientras que en el cv. Greenville el SA exógeno no modificó la actividad de la enzima con respecto a las plantas sin pre-tratamiento (Fig. 45 y 46).

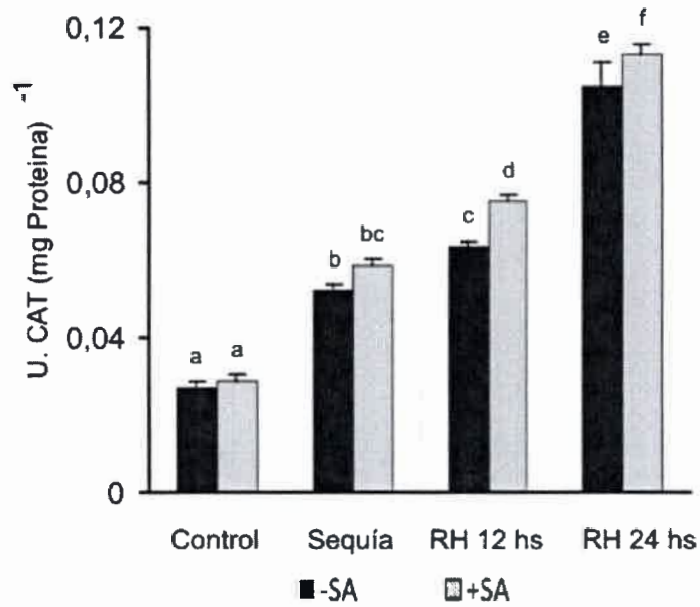


Fig. 45. Actividad CAT en hojas de *P. virgatum* cv. Kanlow bajo estrés hídrico, 12 y 24 h de rehidratación pre-tratadas con SA, y sin pre-tratamiento con SA (control). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05).

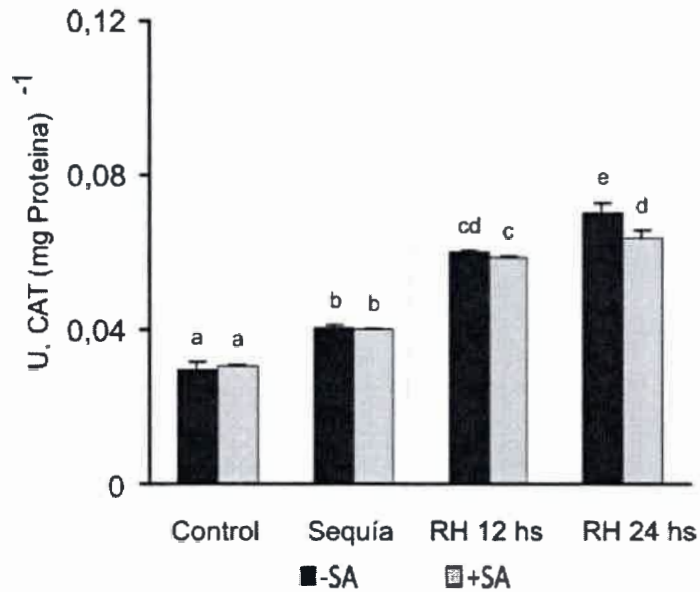


Fig. 46. Actividad CAT en hojas de *P. virgatum* cv. Greenville bajo estrés hídrico, 12 y 24 h de rehidratación pre-tratadas con SA, y sin pre-tratamiento con SA (control). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05).

7. Efecto del pre-tratamiento con SA exógeno sobre la expresión de los genes dependientes e independiente de ABA y dependiente de SA en estrés hídrico y rehidratación

Expresión del gen dependiente de ABA: RAB18

En el cv. Kanlow el estrés hídrico incrementó la expresión de *RAB18* (1.3 veces), mientras que a las 24 h de rehidratación recuperó el nivel de expresión del control. En las plantas pre-tratadas con SA el estrés hídrico causó un incremento significativo en la expresión del gen *RAB18* con respecto a las plantas bien regadas y pre-tratadas con SA, alcanzando el nivel de expresión del control a las 12 y 24 h de rehidratación. (Fig. 47).

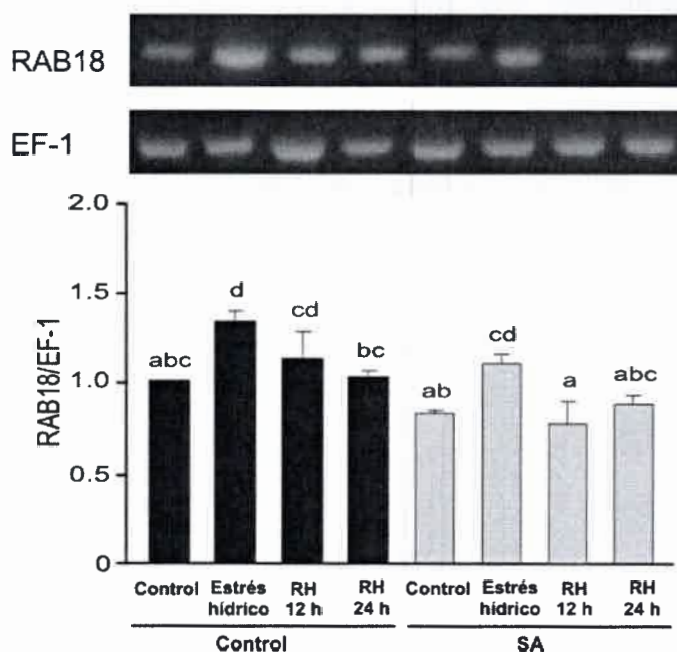


Fig. 47. Abundancia relativa de transcritos del gen *RAB18* en hojas *P. virgatum* cv. Kanlow bajo estrés hídrico, 12 y 24 h de rehidratación pre-tratado con SA (SA) y sin pre-tratamiento con SA (control). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($n=3$, $p<0,05$).

El cv. sensible Greenville bajo estrés hídrico también incrementó en el nivel de expresión de *RAB18* con respecto al control, recuperando los niveles del mismo a las 12 y 24 h de rehidratación. Por otro lado, en las plantas pre-tratadas con SA no se

observaron diferencias significativas en el nivel de expresión de *RAB18* en ninguno de los tratamientos (Fig. 48).

Una tendencia que muestra menor nivel de transcripción se evidencia en las plantas pre-tratadas con SA en ambos cvs., siendo este efecto mayor aún en el cv. sensible Greenville.

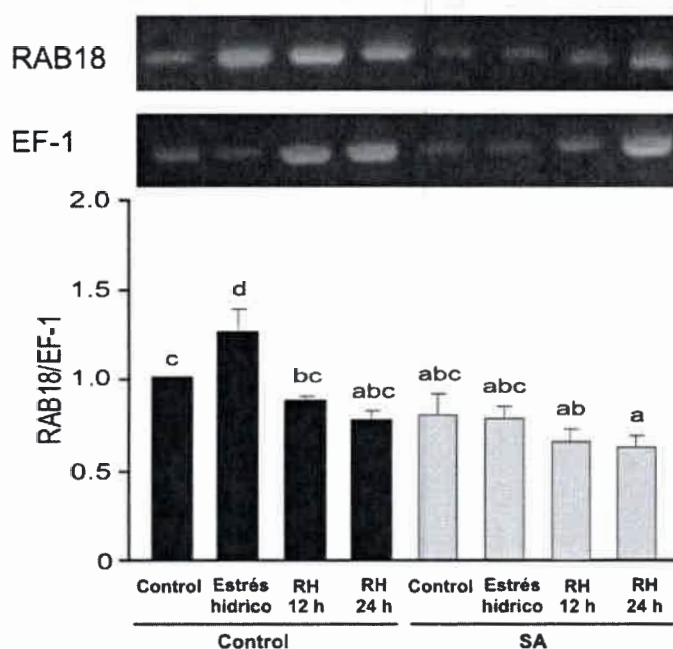


Fig. 48. Abundancia relativa de transcriptos del gen *RAB18* en hojas *P. virgatum* cv. Greenville bajo estrés hídrico, 12 y 24 h de rehidratación pre-tratado con SA (SA) y sin pre-tratamiento con SA (control). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($n=3$, $p<0,05$).

Expresión del gen dependiente de ABA: RD22

En el cv. Kanlow la expresión del gen *RD22* no arrojó diferencias significativas en ninguno de los tratamientos, observándose que la aplicación exógena de SA causó una disminución significativa solo en las plantas bien regadas y pre-tratadas con SA respecto al control sin aplicación exógena de SA (Fig. 49).

En el cv. sensible Greenville la expresión del gen *RD22* no causó diferencias significativas en ninguno de los tratamientos (Fig. 50).