



Facultad de Agronomía
Universidad Nacional de La Pampa

**ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y GENÉTICOS DE LA INTERACCIÓN ABA / SA
EN RESPUESTA A ESTRÉS HÍDRICO EN *Panicum virgatum* L.**

Lic. Cecilia Sanchez

Trabajo de tesis para optar el título de

**MAGISTER EN PRODUCCION AGROPECUARIA EN REGIONES
SEMIARIDAS**

**FACULTAD DE AGRONOMIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA**

Santa Rosa- La Pampa



Facultad de Agronomía
Universidad Nacional de La Pampa

**ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y GENÉTICOS DE LA INTERACCIÓN ABA / SA
EN RESPUESTA A ESTRÉS HÍDRICO EN *Panicum virgatum* L.**

Lic. Cecilia Sánchez

DIRECTOR: Dra. María Lía MOLAS

CO-DIRECTOR: Dr. Mario CALAFAT

Integrantes del Comité de Tesis:

- **Dra. Andrea Mariela ANDRADE**
- **Dr. Aníbal Oscar PRINA**
- **Dr. Javier Darío BRECCIA**



Facultad de Agronomía
Universidad Nacional de La Pampa

**ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y GENÉTICOS DE LA INTERACCIÓN ABA / SA
EN RESPUESTA A ESTRÉS HÍDRICO EN *Panicum virgatum* L.**

Lic. Cecilia Sánchez

Aprobado por:

- **Dra. Andrea Mariela ANDRADE**
- **Dr. Aníbal Oscar PRINA**
- **Dr. Javier Darío BRECCIA**

INDICE

Página

Introducción	1
<i>Panicum virgatum</i> : Caracterización	2
Respuesta a Estrés Hídrico	9
ABA y su participación en la respuesta a estrés abiótico y biótico	11
SA y su participación en la respuesta a estrés biótico y abiótico	13
Interacción entre ABA y SA: sinergismo y antagonismo	15
Materiales y Métodos	18
1. Ensayo de Tolerancia a estrés Hídrico, Recuperación y pre tratamiento con ABA	19
1.1 Ensayo de estrés hídrico y recuperación	19
1.2 Ensayo y pre tratamiento con ABA	20
1.3 Determinación del Contenido Relativo de Agua (CRA)	21
2. Determinación de Expresión Génica	22
2.1 Selección de los genes y primers	22
2.2 Extracción de RNAm y síntesis de DNAc	23
2.3 Cuantificación de los genes de interés	24
Resultados	25
1. Contenido Relativo Agua (CRA), altura de planta y número de hojas	26
1.1 CRA	26
1.2 Numero de hojas	28
1.3 Altura de Planta	29
2. Expresión de genes de respuesta a estrés hídrico independientes de ABA, dependientes de ABA y dependientes de SA.	31
2.1 Expresión de genes dependientes de ABA: RAB18 y RD22	31
2.2 Expresión del gen independiente de ABA: DREB2A.	33
2.3 Expresión de los genes dependientes de SA: PR2 y PR5	34

<i>Discusión</i>	36
1. <i>Comportamiento de los cultivares Kanlow y Greenville frente a estrés hídrico: CRA, altura de planta y número de hojas.</i>	37
2. <i>Expresión de genes marcadores de estrés hídrico</i>	40
2.1 <i>RAB18 y RD22</i>	41
2.2 <i>DREB2a</i>	44
2.3 <i>PR-2 y PR-5</i>	46
<i>Conclusiones</i>	51
<i>Bibliografía</i>	54
<i>Apéndice</i>	68

Resumen

Panicum virgatum (pasto varilla, switchgrass) es una especie perenne de clima subtropical, originaria de las praderas de Estados Unidos que fue introducida en la Región Pampeana Semiárida por investigadores de la UNLPam y del INTA y se encuentra actualmente bajo estudio. El valor agronómico de *P. virgatum* tiene su fundamento en el alto nivel de productividad en parcelas de experimentación comparada con otras especies evaluadas localmente que, asociado a la naturaleza perenne del cultivo, reduce la intensidad de manejo. El denso canopeo y extenso sistema radical -de alta eficiencia en la utilización de nutrientes y agua del suelo- la convierte en una especie adaptada a climas semiáridos. Estas características posicionan a *P. virgatum* como cultivo de bajo impacto ambiental en zonas marginales incapaces de soportar el laboreo anual. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han profundizado en la respuesta a estrés hídrico a nivel hormonal y genético en *P. virgatum*, e indican que las hormonas de estrés Acido Abscisico -ABA- y Acido Salicilico -SA-, están participando y sugieren que el rol de ambas hormonas podría ser antagónico. Este trabajo profundiza en el estudio de la interacción ABA/SA mediante el análisis de la transcripción de genes de respuesta estrés cuya expresión es dependiente de ABA y SA, y actúan como indicadores de activación de la respuesta desencadenada por estas hormonas. Plantas jóvenes (55 días desde la siembra) de ambos cultivares se sometieron a estrés hídrico (60 % de Contenido Relativo de Agua -CRA) y rehidratación. Se realizó un pre tratamiento con ABA exógeno 100 μ M mediante riego previo al inicio del tratamiento de estrés. El ensayo se realizó en macetas con sustrato suelo (1/3 suelo, 2/3 arena) y se condujo en cámara de crecimiento programada con 16 h de luz (300 μ E. m².s⁻¹) a 29 °C, y 8 hs de oscuridad a 20 °C. En plantas de 55 días (estado V5) se proporcionó estrés hídrico mediante suspensión del riego. Se evaluó la recuperación de las plantas a las 24 hs posteriores a la rehidratación, para ello las macetas se regaron a capacidad de campo con agua destilada. El material vegetal se colectó en nitrógeno líquido, se procedió a la extracción con ARN total y se sintetizó ADN complementario (ADNc) de las muestras. Sobre este material se analizó la expresión de genes de respuesta a estrés hídrico (DREB2a), dependientes de ABA (RAB 18, RD22), y dependientes de SA (PR-2 y PR-5). Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis horizontal en gel de agarosa (1%) y las imágenes se analizaron con el software J Image. Los resultados se analizaron mediante ANOVA y test

LSD (n=3). RAB18 se comportó como un buen indicador de estrés hídrico dependiente de ABA, lo que valida su rol de gen reportero de estrés en *Panicum virgatum* en las condiciones del ensayo. Por el contrario, RD22 no mostró correspondencia con las situaciones de estrés hídrico, y demostró no ser apropiado como indicador de estrés hídrico, a pesar de ser ampliamente usado en otras especies. Por su parte, DREB2a no manifestó un comportamiento consistente, por lo cual requiere de un análisis más profundo en futuros ensayos. En cuanto a PR-2 (dependiente de SA), su expresión incrementó significativamente frente a estrés en plantas del cv. Kanlow, pero no en aquellas del cv. Greenville. Sin embargo, el pre-tratamiento con ABA exógeno en el cv. Kanlow inhibió su expresión bajo estrés hídrico. El gen PR5, por su parte, incrementó su expresión en ambos cultivares durante el estrés, sin embargo cuando las plantas fueron pre-tratadas con ABA exógeno, no se detectó la presencia de transcritos. Así, PR2 y PR5 en conjunto reprimen su expresión en plantas pre tratadas con ABA, sugiriendo que la vía de respuesta activada por SA, reportada por la expresión de los genes PR, estaría silenciada ante la presencia de altos niveles de ABA. Estos resultados son novedosos en cuanto no se ha investigado a la fecha la participación de SA en respuestas a estrés hídrico en *Panicum virgatum*. Finalmente, el presente trabajo aporta nuevos conocimientos sobre la tolerancia a estrés en *P. virgatum*, cultivo energético con importantes perspectivas para regiones semiáridas.

Palabras clave: *Panicum virgatum* L., ABA, SA, expresión génica, estrés hídrico

Abstract

P. virgatum (switchgrass) is a perennial grass native to the US prairies that was introduced in the Semi-arid Pampean Region by researchers from UNLPam, and INTA and is currently under study. The agronomic value of *P. virgatum* is based on the high level of productivity in experimental plots compared to other locally evaluated species, which, combined with the perennial nature of the crop, reduces the intensity of management. The dense canopy and extensive radical system - high efficiency in the use of nutrients and soil water - makes it a species adapted to semi-arid climates. These features locate *P. virgatum* as a low environmental impact crop in marginal areas that are unable to withstand annual tillage.

Previous studies conducted in our laboratory have deepened the response to water stress at the hormonal and genetic levels in *Panicum virgatum*, and indicate that the stress hormones Abscisic Acid (ABA) and Salicylic Acid (SA) participate in water stress response and suggest that the role of both hormones could be antagonistic. This current work investigates the study of the ABA / SA interaction by analyzing the transcription of stress response genes, whose expression is dependent on ABA and SA and act as hormone-dependent reporters. Young plants (55 days from sowing) of both cultivars were subjected to water stress (60% Relative Water Content -CRA) and rehydration. A pre-treatment with 100 μ M exogenous ABA was performed by irrigation prior to the start of the stress treatment. The assay was performed in pots with soil substrate (1/3 soil, 2/3 sand) and was conducted in a growth chamber programmed with 16 h of light (300 μ E.m².s⁻¹) at 29 ° C, and 8 Hrs of darkness at 20 ° C. Water stress was provided by suspending irrigation. Once stress was reached, pots were re watered at field capacity and plant recovery was evaluated 24 h after rehydration. The plant material was collected in liquid nitrogen, total RNA extraction was performed and complementary DNA (cDNA) from the samples was synthesized. Expression of water stress response genes (DREB2a), ABA-dependent (RAB 18, RD22), and SA-dependent (PR-2 and PR-5) were analyzed on this material. The amplification products were subjected to agarose gel electrophoresis (1%) and the images analyzed with the J Image software. The results were analyzed using ANOVA and LSD test (n = 3). *RAB18*, was as a good indicator of ABA-dependent water stress, which validates its role as a stress reporters in *Panicum virgatum* under evaluated conditions. On the other hand, expression of *RD22* did not correlate with water stress situations, suggesting that it is not a proper reporter, even though these genes are widely used in other species. Results of *DREB2a* gene expression were not conclusive and require deeper future studies. Regarding SA-dependent PR-2, its expression increased significantly against stress in cv. Kanlow, but not in cv. Greenville. However, pre-treatment with exogenous ABA in cv. Kanlow inhibited its expression under water stress. *PR5*, on the other hand, increased its expression in both cultivars during stress, however when plants were pretreated with exogenous ABA, the presence of transcripts was not detected, suggesting that the SA-activated response pathway would be silenced when ABA is present. These are original results due to SA has not been reported before in an abiotic response to water stress in *Panicum virgatum*. Finally, the present work provides new

knowledge on stress tolerance in *P. virgatum*, an energy crop with important prospects for semiarid regions.

Keywords: *Panicum virgatum* L., ABA, SA, gene expression, water stress

INTRODUCCION

***Panicum Virgatum* – CARACTERIZACIÓN:**

Panicum virgatum (Swichgrass), comúnmente llamado “Pasto varilla”, es un pasto muy versátil, que se utiliza para la conservación de suelos y agua, la producción ganadera y la producción de biomasa para su conversión en energía. Es originaria de América del Norte, y su área de distribución se encuentra al este del meridiano 100 th, que va desde el sur de Canadá hasta el norte de México (Figura 1; Casler 2012).

Panicum (L), es uno de los géneros más grandes dentro de la familia de las Poaceae. Incluye aproximadamente 450 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales de diferentes hábitats en todo el mundo, tales como sabanas, pastizales en zonas secas o húmedas, cauces de ríos, bordes de los bosques, incluso hasta aproximadamente 2500 mts sobre el nivel del mar (Zuloaga *et al.*, 2007).

Es una especie altamente polimórfica, con una considerable variación morfológica y fisiológica que está estrechamente relacionada con los factores climáticos. Es altamente fotoperiódico en su amplio rango de adaptación de norte a sur. En su hábitat natural, las poblaciones localizadas en el norte pueden florecer a finales de junio o principios de julio cuando han desarrollado 3-4 fitómeros. Contrariamente, las poblaciones del extremo sur del hemisferio norte, florecen a mediados de octubre, luego de producir entre 7-10 fitómeros.

En el hemisferio Norte, el germoplasma del norte no es lo suficientemente tolerante al calor y posee una floración demasiado temprana para ser productivo en el sur; mientras que el germoplasma del sur puede carecer de tolerancia al frío suficiente como para sobrevivir en las áreas del norte (Casler 2012).

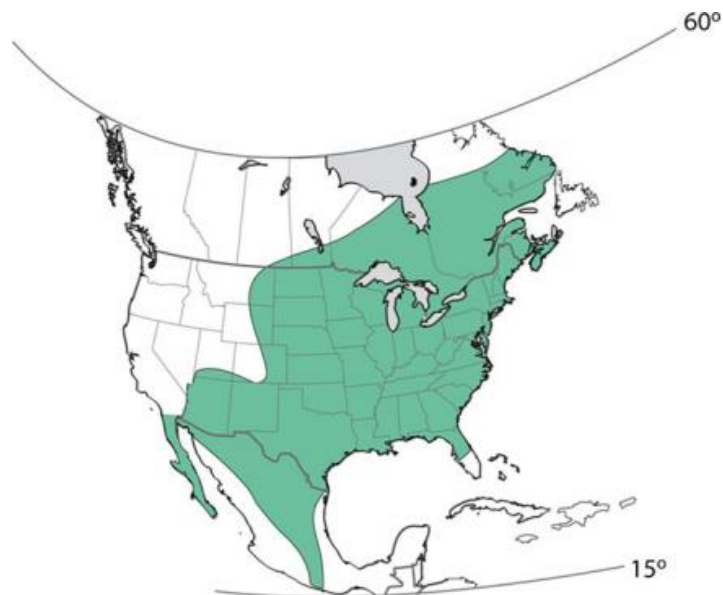


Figura 1. Distribución de *Panicum virgatum* en su centro de origen.

En esta especie se han realizado estudios a nivel de ecotipo, basados en observaciones de distintos polimorfismos asociados con su hábitat (Porter 1966). De esta manera, se han dividido en ecotipos de tierras bajas y de tierras altas. Ecotipos ampliamente adaptados a tierras altas se extienden desde latitud norte 34°N hasta gran parte del este de Canadá, y son extremadamente raros en latitudes por debajo de 34°N sujetas a sequías ocasionales o frecuentes. Mientras tanto, los ecotipos de tierras bajas se encuentran en sitios con suelos húmedos propensos a la estacionalidad, están ampliamente adaptados en la porción occidental de la cordillera a aproximadamente 42° N (Figura 2; Casler 2012).

El ecotipo de tierras bajas es tetraploide (Casler 2012), por lo general de alto porte, tallos gruesos y vigorosos, crecimiento acelerado y tipo manojo, debido a que posee rizomas menos vigorosos (Moser and Vogel, 1995; Carrera 2010). La producción de biomasa tiene mayor rendimiento en los lugares más al sur, ventaja que disminuye al aumentar la latitud. Rinde entre un 30-50% más que los cultivares de tierras altas en la zona de transición donde ambos están adaptados, mientras que en los lugares más extremos del norte, el rendimiento de la biomasa está limitado por su incapacidad para

sobrevivir varios inviernos (Casler *et al.*, 2004). Contrariamente, el ecotipo de tierras altas (tetraploide y octoploide), tiene bajo porte y tallos finos, posee rizomas más vigorosos y por ello presenta un desarrollo en forma de césped (Casler 2012). Este biotipo logra su mayor desarrollo bajo condiciones más moderadas de agua en el suelo, y de acuerdo a algunos autores presenta mayor tolerancia a la sequía que el ecotipo descrito anteriormente, el cual se destaca en zonas húmedas (Voguel 2004). Sin embargo, otros autores han estudiado la respuesta de ambos ecotipos a diferentes situaciones de estrés y han encontrado que el ecotipo de tierras bajas presenta mayor tolerancia frente a estrés hídrico y salino (Barney *et al.*, 2009, Aimar *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2015).



Figura. 2. Áreas de distribución natural de los ecotipos de tierras altas y tierras bajas de *Panicum virgatum*.

P. virgatum fue introducida en la Región Pampeana Semiárida por investigadores de la UNLPam y el INTA (Figura. 3; Covas, 1982; Stritzler *et al.*, 1996) y se encuentra actualmente bajo estudio (Ferri *et al.*, 1997; Petruzzini *et al.*, 2005; van Dam *et al.*, 2009, Aimar *et al.*, 2014).



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

El valor agronómico de *P. virgatum* se debe a que conjuga gran productividad de biomasa con reducidos costos de producción y alto valor en el control de la erosión. Cuando se usa como forraje produce un canopeo denso y un extenso sistema radical (Figura 4) de alta eficiencia en la utilización de nutrientes y agua edáfica, adaptándose muy bien a climas semiáridos (Parrish and Fike, 2005).



Figura 4. Fotografía mostrando el sistema radical de *P. virgatum*. (<http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/897129>)

Estas características así como la perennidad 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 and Kszos, 2005). A pesar de las ventajas comparativas descritas, el uso comercial de esta especie es limitado por su lenta y dificultosa implantación (Aiken and Springuer 1995; Hintz *et al.*, 1998; Evers and Butler, 2000; Teel *et al.*, 2003). Los principales factores que condicionan su completo 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 (Smart and Moser, 1997; Petruzzi, comunicación personal). 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 (Hsu and Nelson, 1985; Newman and Moser, 1988 b).

Las gramíneas tolerantes a sequía son especies que se establecen, crecen y sobreviven durante los períodos de sequía, y además pueden tener buenos rendimientos económicos y buena calidad en estas regiones. 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 los forrajes (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 aspira a difundir su uso comercial y expandir el área cultivada. En esta línea, la comprensión de las bases bioquímicas y genéticas de esta tolerancia aportaría elementos para intervención biotecnológica en planes de mejoramiento de la especie. Estos aportes se tornan más relevantes si consideramos la gran sintenia que existe en la familia de la Poaceas, lo cual permitiría extender este conocimiento hacia otros miembros de la familia, de gran importancia en la alimentación humana por tratarse de especies que son el soporte de la dieta (ej: arroz, trigo, cebada, maíz).

En cuanto a su productividad, en la Región Semiárida Pampeana es capaz de producir entre 11 y 15 tn de Materia Seca (MS) y responde muy bien a la fertilización nitrogenada pudiendo duplicar la producción (Tabla 1; Petruzzi *et al.*, 2010) en parcelas de experimentación comparada con otras especies evaluadas localmente (Stritzler *et al.*, 1996), lo que se corresponde con los resultados obtenidos por otros autores en ambientes diferentes (Sharma *et al.*, 2003; Mc Laughlin and Kszos, 2005). Su valor nutritivo (Tabla

2), desde la etapa de brotación (salida del invierno) cuando las temperaturas se incrementan y hasta fines del otoño, mantiene calidad suficiente para lograr ganancias de peso de 800 gr. diarios por animal, con 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 fechas y frecuencias 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 ⁻¹		
1 ^{er} Corte	Rebrote (Tratam.)	1 ^{er} Corte	Rebrote	Total
Fertilizado				
Noviembre – Abril (F1)		6,8 ± 0,3	17,5 ± 4,3	24,3 ± 4,5
Diciembre – Abril (F2)		9,6 ± 3,8	12,3 ± 1,0	21,9 ± 3,2
Febrero – Abril (F3)		11,8 ± 1,3	5,8 ± 1,4	17,6 ± 1,3
Noviembre – Julio (F4)		6,9 ± 1,5	18,7 ± 2,5	25,6 ± 4,0
Diciembre – Julio (F5)		8,4 ± 2,0	11,5 ± 2,8	19,9 ± 1,7
Febrero – Julio (F6)		13,6 ± 2,9	5,8 ± 1,1	19,4 ± 1,9
Abril (F7)		20,9 ± 2,3		20,9 ± 2,3
Julio (F8)		22,3 ± 5,3		22,3 ± 5,3
No fertilizado				
Noviembre – Abril (NF1)		3,8 ± 0,3	11,1 ± 2,9	14,9 ± 2,8
Diciembre – Abril (NF2)		6,9 ± 1,6	6,9 ± 0,5	13,7 ± 1,6
Febrero – Abril (NF3)		13,5 ± 1,3	2,4 ± 0,3	15,8 ± 1,5
Noviembre – Julio (NF4)		3,6 ± 0,9	7,6 ± 1,3	11,2 ± 1,5
Diciembre – Julio (NF5)		7,2 ± 0,8	7,1 ± 0,9	14,3 ± 1,1
Febrero – Julio (NF6)		7,9 ± 1,6	3,1 ± 0,7	11,0 ± 1,1
Abril (NF7)		15,7 ± 5,6		15,7 ± 5,6
Julio (NF8)		13,1 ± 0,5		13,1 ± 0,5

Tabla 2. Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS; en %) y contenido 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 and 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 (Figura 5; Van Dam *et al.*, 2009).



Fig. 5. Superficie apta para la producción de *P. virgatum* en la República Argentina.

RESPUESTA A ESTRÉS HÍDRICO

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado diferentes respuestas y adaptaciones que les permiten sobrevivir en condiciones de constante déficit hídrico. La respuesta a la baja disponibilidad hídrica involucra cambios morfológicos, fisiológicos y moleculares. Algunas plantas poseen adaptaciones como el desarrollo del metabolismo C4 y del metabolismo ácido de las crasuláceas o CAM, que les permiten explotar ambientes más áridos (Black and Osmond, 2003; Lüttge, 2004). Si el déficit hídrico se desarrolla lentamente, las plantas pueden presentar respuestas de aclimatación que tienen efectos sobre el crecimiento, como la disminución de la expansión foliar y el aumento del crecimiento radicular (Potters *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2008). Otros mecanismos de resistencia a nivel fisiológico y morfológico son el cierre de estomas (Taiz and Zeiger, 2006), la inhibición del crecimiento (Bahrani *et al.*, 2010), la acumulación de solutos orgánicos compatibles (Sánchez-Díaz *et al.* 2008; DaCosta and Huang, 2009), la producción de especies reactivas de oxígeno (Apel and Hirt, 2004; Torres *et al.*, 2005) y el cambio en los contenidos endógenos de hormonas, entre otros (Moreno L, 2009).

A nivel celular y molecular, una de las principales respuestas al estrés hídrico es la modificación de la expresión génica, relacionada con la producción de enzimas clave en la vía de síntesis de osmolitos que permiten el ajuste osmótico y facilitan la toma de agua por la planta. La síntesis de enzimas antioxidantes, síntesis de factores de transcripción que median la respuesta de genes a estrés y otras proteínas involucradas en las respuestas al estrés hídrico (Bray, 1997; Zhu *et al.*, 2002). Entre las proteínas más importantes por su efecto protector potencial están las LEA (*Late Embriogenesis Abundant Proteins*) y las que funcionan como antioxidantes (Danon *et al.*, 2004). Se ha propuesto que las proteínas LEA protegen proteínas y membranas del daño debido a la deshidratación (Bray, 1993; Moreno, 2009).

Algunas de estas respuestas están disparadas directamente por cambios en el estado hídrico de los tejidos mientras que otras son provocadas por cambios en los niveles de ciertas hormonas vegetales (Chaves *et al.* 2003). Estas hormonas generan una red de señales que conduce a una cascada de eventos responsable de la adaptación fisiológica de las plantas a estrés (Miura *et al.* 2013; Yoshida *et al.* 2014; Ramegowda 2015). Hasta hace poco la participación de cada una de estas hormonas era estudiada de manera independiente. Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto la necesidad de estudiarlas de manera conjunta a la luz de nuevas evidencias que dan cuenta que más de una hormona estarían coordinando la respuesta a estreses (tanto biótico como abiótico) (Bandurska and Stroinski, 2005; Moeder *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013).

ABA, SA, y JA regulan respuestas de protección de las plantas mediante el entrecruzamiento de sus vías de señalización y respuesta, estableciendo relaciones tanto sinérgicas como antagónicas (Fujita *et al.*, 2006). Entre las interacciones hormonales en respuesta a estreses, la que posiblemente concentra la mayor atención es la relación entre ABA y SA. ABA ha sido involucrado ampliamente en las respuestas a estreses abióticos (sequía, salinidad, bajas temperaturas -Hirayama and Shinozaki, 2007; Wasilewska *et al.*, 2008), y por otro lado, SA, juega un papel clave en las respuestas a estrés biótico como lo es la infección por patógenos. Sin embargo, por ejemplo aunque ABA es la hormona más importante en respuesta a estrés hídrico, la participación de SA también ha sido reportada en la protección de las plantas frente a estrés abiótico (Kang and Saltveit, 2002; Shakirova *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2015). Estos resultados apuntan a

una respuesta conjunta donde ambas hormonas -ABA y SA- estarían activando las respectivas vías de señalización y respuesta. En éste mismo sentido, se ha observado que la inducción de proteínas reguladas por SA (i.e. Pathogen resistant, PR) en situaciones de estrés hídrico y baja temperatura ocurre en *Arabidopsis* y en algunos cereales de invierno (Yeh *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013).

Es decir que, cada vez más evidencia pone de manifiesto la intervención de ABA en las respuestas al estrés biótico (Ton *et al.*, 2005) así como la participación de SA en las respuestas a estrés abiótico, y proponen una interacción compleja entre ambos (Yuan and Lin, 2008; Yasuda *et al.*, 2008; Mosher *et al.*, 2010, Aimar *et al.*, 2011). Estas interacciones podrían contribuir de manera significativa tanto a la inmunidad de la planta como a la respuesta a estrés ambiental, proporcionando un sistema ventajoso para investigar el entrecruzamiento de señales bióticas y abióticas (Cao *et al.*, 2011; Ramegowda *et al.*, 2015).

ABA Y SU PARTICIPACIÓN EN LA RESPUESTA A ESTRÉS ABIÓTICO Y BIÓTICO

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 and McCourt, 2004; Christmann *et al.*, 2005; Wani *et al.*, 2016). 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 and 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 and Krochko, 1999; Zeevaart, 1999). En plántulas de *Arabidopsis thaliana*, Huang *et al.* (2008) mostró que la sequía activa 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. En relación al contenido de ABA endógeno, diferentes

reportes muestran que los cultivares tolerantes a sequía contienen más ABA que los sensibles (Perales *et al.*, 2005; Veselov *et al.*, 2008; Thameur *et al.*, 2011). ABA juega también un papel importante en el proceso de aclimatación, en el cual una exposición previa de la planta a un estrés de tipo abiótico, prepara a la planta para elaborar una respuesta potenciada frente al mismo tipo u otro tipo de estrés pero que ocurre a posteriori. Plantas de *Arabidopsis* que fueron expuestas a sequía o pre tratadas con ABA, desarrollaron tolerancia al congelamiento (Mantyla *et al.*, 1995).

Históricamente el rol de ABA se relacionó con el estrés de tipo abiótico, sin embargo esta hormona ha emergido como un importante regulador de la defensa a estrés biótico (Asselbergh *et al.*, 2008; Ton *et al.*, 2009; Yasuda *et al.*, 2008). Estudios recientes muestran que ABA juega un papel importante en la susceptibilidad a enfermedades, en la resistencia a la infección por patógeno y la interacción con respuestas a estrés biótico mediada por otras hormonas (Mauch-Mani and Mauch, 2005; Melotto *et al.*, 2006; Torres-Zabala *et al.*, 2007; Ton *et al.*, 2009). Los mecanismos que estarían siendo activados en esta respuesta están relacionados con el control del cierre estomático y la deposición de calosa en la pared celular, ambos procesos controlados por ABA (Ton *et al.*, 2009; Mauch-Mani and Mauch, 2005; Miura *et al.*, 2012). En éste sentido, varios estudios han propuesto que las respuestas de plantas a estrés medioambiental, tal como sequía y bajas temperaturas, tienen efectos positivos y negativos sobre la respuesta a patógeno y viceversa (Yasuda *et al.* 2008; Ramegowda 2013). En *Arabidopsis*, por ejemplo, la exposición a un corto período de sequía incrementó significativamente el crecimiento de la bacteria a-virulenta *Pseudomonas sinringae* pv tomato (Pst) en relación con su crecimiento en una planta no estresada (Mohr and Cahill, 2007). En arroz, la exposición a bajas temperaturas suprimieron la resistencia contra la infección de *Megnaphorte grisea* (Koga *et al.*, 2005). Asimismo, la aplicación exógena de ABA en soja (*Glicine max*) aumentó la susceptibilidad de la planta frente a *Phytophora sojae* (MacDonald and Cahil 1999). Sin embargo, otra serie de evidencias indican una correlación positiva entre los niveles de ABA y la resistencia a enfermedades. En plantas de tabaco, la infección viral incrementa las concentraciones de ABA, y el tratamiento con ABA exógeno incrementa la resistencia al virus (Whenham *et al.*, 1986). También en tabaco es interesante notar que ABA inhibe la transcripción de un gen que codifica la enzima β -1,3-glucanasa encargada de degradar la callosa -una barrera física para la propagación viral a través de los

plasmodesmos. Las plantas deficientes en β -1,3-glucanasa resultaron más resistentes que las plantas WT a la infección viral (Rezzonico *et al.*, 1998). Este mecanismo regulado por ABA podría funcionar también en la resistencia básica hacia hongos y oomicetos patógenos (Mauch Mani and Mauch, 2005). En suma, la evidencia disponible hasta el momento indica que el aporte de ABA en la interacción planta-patógeno, es ambiguo; en muchos casos ABA promueve la resistencia de la planta al patógeno, mientras que en otros promueve la susceptibilidad, actuando como regulador negativo de la resistencia a enfermedades.

SA Y SU PARTICIPACIÓN EN LA RESPUESTA A ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO

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 (Ryals *et al.*, 1996 ;Sanchez *et al.*, 2010). 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 (Janda *et al.*, 1999; Molina *et al.*, 2002; Nemeth *et al.*, 2002; Munné-Bosch and Peñuelas, 2003; Shi and Zhu, 2008). 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; Khan *et al.*, 2015).

White (White 1979) reportó por primera vez la participación de SA en la resistencia a enfermedades, en experimentos donde inyectó aspirina o directamente SA en hojas de tabaco de una línea resistente al virus del mosaico del tabaco (TMV; *N.tabacum* cv. Xanthi-nc) y observó la producción de proteínas relacionadas a la patogénesis (pathogen related proteins, PR), las cuales son un grupo heterogéneo de proteínas que se inducen en plantas por la infección de un patógeno. Junto con la producción de proteínas PR observó un aumento en la resistencia contra la infección por el TMV. En la actualidad se ha reportado que en muchas plantas el tratamiento con SA o compuestos afines induce la expresión de genes PR y/o resistencia contra virus, bacterias y hongos patógenos (Vlot

et al., 2009; Kumar 2014). SA no solo juega un papel esencial en la ruta de transducción de señales que conduce a la activación de genes que codifican para proteínas PR, sino también en el establecimiento de la respuesta hipersensible (HR), considerada como una muerte celular programada que se desarrolla para delimitar el área de infección de un patógeno, así como en la resistencia sistémica adquirida (SAR). Esta respuesta - a nivel sistémico- se produce como resultado de la exposición y supervivencia inicial a un patógeno (Sánchez *et al.*, 2010). El papel de SA como señal implicada en la defensa ha sido bien establecido en plantas dicotiledóneas; en monocotiledóneas éste fenómeno ha sido poco estudiado, no obstante se ha encontrado la expresión de proteínas PR en maíz, arroz, trigo (Morris *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 2008), y cebada (Kogel *et al.*, 1994).

En base a que se ha demostrado que el estrés abiótico altera el contenido endógeno de SA en planta, actualmente, se sugiere su participación como una señal de éste tipo de estrés (Horváth *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2015). Por ejemplo, el nivel de SA endógeno aumentó en raíces de las plantas de cebada bajo estrés hídrico mientras que en las hojas no fue alterado (Bandurska and Stroinski, 2005). Previamente, Munné-Bosch y Peñuelas (2003) informaron que en plantas de *Phillyrea angustifolia* L. expuestas a estrés hídrico SA aumentó progresivamente hasta un máximo de 5 veces durante la sequía, y en la recuperación los niveles de SA disminuyeron, aunque siguieron siendo ligeramente superiores a los observados antes de la sequía. En plantas de soja expuestas a estrés hídrico en la etapa vegetativa Hamayum *et al.* (2010) observaron un incremento significativo en el contenido endógeno de SA.

En esta línea, el SA muestra cada vez más indicios que evidencian un rol relacionado con el estrés de tipo abiótico, interfiriendo en ocasiones de manera positiva o negativa con la señalización del estrés abiótico. Por ejemplo, la aplicación exógena de SA en maíz condujo a un aumento de susceptibilidad a la sequía (Nemet *et al.*, 2002). En *Arabidopsis*, la inducción artificial de SAR llevo a la supresión de la respuesta a estrés abiótico (Yasuda *et al.*, 2008). Sin embargo, también hay evidencias que muestran una intervención más bien positiva sobre el estrés abiótico: la aplicación exógena de SA mejora el desempeño de las plantas bajo estrés hídrico, según lo informado por varios autores. Por ejemplo: 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 and Al-Hakimi, 2001; Hamada, 1998). En plantas de frijoles y tomates cuyas semillas habían sido embebidas en SA se observó un incremento de tolerancia al estrés por calor, enfriamiento y por sequía (Senaratana *et al.* 2000). En plántulas de trigo el pretratamiento con SA, potenció significativamente el crecimiento y la tolerancia a estrés por sequía, ésta mejora se evidenció con un incremento de peso seco de raíces y tallo y un decrecimiento en la peroxidación lipídica (Kang *et al.*, 2012). La aplicación exógena de SA, resulto suficiente para un aumento de tolerancia al estrés por frío en hojas de trigo (Tasgin *et al.*, 2003). En maíz, el agregado de una solución de SA adicionada al medio hidropónico, incrementó la tolerancia al estrés por bajas temperaturas, se postula que un aumento significativo en el nivel de poliaminas, podría contribuir parcialmente a la función protectora de SA (Janda *et al.*,1999; Nemeth *et al.*, 2002).

INTERACCIÓN ENTRE ABA Y SA: SINERGISMO Y ANTAGONISMO

Las plantas inevitablemente sufren diversos tipos de estrés, que con frecuencia ocurren en conjunto, tales como estrés medioambiental de tipo abiótico, ataques por patógenos, o herbivoría. Para sobrevivir a estas condiciones desfavorables, las plantas han desarrollado sistemas de autoprotección como la acumulación de hormonas, producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la expresión de genes que tienen funciones en la tolerancia al estrés (Ramegowda *et al.*, 2013). Actualmente se sabe que las vías de señalización de las hormonas actúan interconectadamente a fin de responder y hacer frente al estrés que, en la mayoría de los casos, es una combinación de efectos bióticos y abióticos.

Acciones antagónicas entre ABA y SA han sido informadas principalmente respecto a estrés biótico. Por ejemplo, Mohr y Cahill (2007) mostraron que ABA incrementa la susceptibilidad a *Pseudomonas syringae pv. tomato* en plantas de *Arabidopsis*, lo cual se debió a la supresión de la acumulación de lignina y SA, componentes esenciales de la resistencia a dicho patógeno. Un antagonismo similar ocurrió en la interacción arroz *Magnaporthe grisea* (Jiang *et al.*, 2010), donde la aplicación exógena de ABA comprometió drásticamente la resistencia del arroz a *M. grisea*. Un estudio realizado en

dicotiledóneas (*Arabidopsis*), donde se utilizaron dos inductores químicos que actúan corriente arriba y corriente abajo de SA en la vía de señalización de SAR, demostró que el tratamiento con ABA suprimió la inducción de SAR, mostrando que ABA juega un importante rol en la regulación de los mecanismos de defensa (Yasuda *et al.*, 2008). En plantas de tomate mutantes deficientes de ABA (*sitiens*), por alteración de la aldehído oxidasa (AAO3) que es una enzima requerida para la síntesis de ABA. Se observó que, luego de la infección con *Botrytis cinérea*, se produjo un rápido aumento de H₂O₂, llevando a una mayor respuesta mediada por SA y a una mayor resistencia al patógeno en comparación con el fenotipo WT; la aplicación exógena de ABA reestableció la susceptibilidad a patógeno. En este mismo trabajo se encontró que ABA no afectaba el crecimiento de *B. cynerea* en placas de crecimiento o en plantas, indicando que ABA actúa sobre el mecanismo de respuesta de la planta frente al patógeno, y no sobre el patógeno. Así mismo se observó que: en estas mutantes *sitiens* infectadas con *B. cynerea* hubo un claro incremento de PAL (fenil amonio liasa), enzima que interviene en la síntesis de SA, este incremento no se observó en plantas WT; y se observó además que las mutantes resultaron más sensibles al tratamiento en raíces con BHT (un activador de la vía dependiente de SA) que las WT. Todas estas evidencias permitieron concluir que ABA modula negativamente la vía de defensa dependiente de SA en tomate (Audenaert *et al.*, 2002).

Actualmente, existen muchas evidencias que sustentan que las hormonas ABA y SA también actúan sinérgicamente, es más, existen muchos puntos e intermediarios en común entre ambas vías (ROS, Ca²⁺, MAPK5, ADR1, entre otros), que sugieren un entrecruzamiento entre la respuesta mediada por ABA y por SA (Mauch-Mani and Mauch, 2005). En 2 genotipos de cebada (cv. Maresi y *Hordeum spontanium*) se evaluó el efecto de un estrés moderado (PEG -0.75Mpa) y otro severo (PEG -1,5Mpa) sobre los niveles de SA en hojas y raíces, y el efecto del pre-tratamiento con SA. El déficit hídrico incremento el contenido de SA en raíces, mientras que en hojas éste contenido no varió. El pre-tratamiento con SA previo al estrés, redujo el daño producido por la deficiencia de agua sobre la membrana celular de las hojas; es más el tratamiento con SA indujo un aumento en el contenido de ABA en las hojas. Los resultados obtenidos pueden indicar que el aumento del nivel de ABA que sigue a la aplicación de SA, antes de la exposición al estrés, puede ser responsable de la reducción de la lesión de la membrana bajo

condiciones de estrés. De esta manera ABA contribuiría al desarrollo de la respuesta anti estrés que estaría mediada por SA (Bandurska and Stroinski, 2005). En plántulas de trigo, el pre-tratamiento con SA causó la acumulación tanto de ABA como de prolina, llevando a un incremento de la resistencia a la salinidad (Shakirowa *et al.*2003). También en *Zea Mays*, el pre tratamiento con ABA, incrementó en hoja el nivel de SA conjugado y de uno de sus precursores o-HCA (ácido orto-hidroxicinámico) (Szalai *et al.*, 2011). En éste mismo sentido, en plantas de guisantes, el tratamiento con un inhibidor de la biosíntesis de ABA, resultó en la desaparición del pico de SA que se producía durante la aclimatación al calor (Liu *et al.*, 2006). Éstos resultados proveen evidencias de la co-participación que tienen SA y ABA durante el estrés abiótico. Las proteínas PR son un grupo heterogéneo codificado por genes que responden rápidamente a la infección por patógeno, a SA, JA y ET. Son consideradas marcadores moleculares de la resistencia a patógenos y de la SAR. Sin embargo, recientes estudios han demostrado que los genes PR son también regulados por factores medioambientales (incluyendo luz y estrés abiótico) y por señales del desarrollo; lo que sugiere que tienen un papel en la respuesta al estrés y en el desarrollo. En éste trabajo se demostró, entre otras cosas que ABA indujo la expresión de PR-3 (Seo *et al.* 2008).

Estudios realizados en nuestro laboratorio en dos cultivares de comportamiento contrastante frente a sequía (cultivar sensible Greenville y cultivar tolerante Kanlow) estarían indicando la existencia de una interacción entre ABA y SA en respuesta a estrés hídrico y posterior rehidratación, y esta respuesta podría ser diferente en ambos cultivares (Aimar *et al.*, 2014). En base a estos antecedentes, este trabajo profundiza el estudio de la interacción ABA/SA. El presente estudio contribuiría a la comprensión de la compleja red de entrecruzamiento en la respuesta a estrés hídrico en cultivares de *Panicum virgatum* de comportamiento contrastante en respuesta a estrés hídrico y posterior rehidratación.

MATERIALES Y METODOS

Los cultivares Kanlow (tolerante) y Greenville (sensible) se compararon en cuanto a su respuesta al estrés hídrico moderado y progresivo y al efecto de la aplicación exógena de ABA (100µM). Asimismo se evaluó la recuperación de las plantas luego del tratamiento de sequía, para ello las plantas fueron rehidratadas y se observó su comportamiento luego de 12 y 24 h posteriores al riego de recuperación. Los mismos tratamientos fueron evaluados con aplicación exógena de 100 µM de ABA. Los tratamientos establecidos para cada cultivar se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos para cada cultivar: (Kanlow y Greenville) Con y sin aplicación de 100µm de ABA; Control, Sequía y Rehidratación 12 y 24 h.

TRATAMIENTOS	
<i>Sin aplicación exógena de ABA</i>	<i>Con aplicación exógena de ABA</i>
Control (riego)	Control (riego)
Sequía	Sequía
Rehidratación 12 h	Rehidratación 12 h
Rehidratación 24 h	Rehidratación 24 h

1. ENSAYO DE TOLERANCIA A ESTRÉS HÍDRICO, RECUPERACIÓN Y PRE TRATAMIENTO CON ABA

1.1 Ensayo de estrés hídrico y recuperación

Semillas de *Panicum virgatum* provenientes de la colección de la EEA INTA Guillermo Covas (Anguil, La Pampa), de dos cultivares de comportamientos contrastantes: el cv. Kanlow y el cv. Greenville (Aimar *et al.*, 2014). 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. Las macetas se colocaron en cámara de crecimiento programada con 16 hs de luz (300 µE. m².s⁻¹) a 29 °C, y 8 hs de oscuridad a 20 °C. Luego de producida la emergencia se ralearon dejando una planta por maceta.

El estrés hídrico se proporcionó en plantas de 55 días mediante suspensión del riego hasta observar los primeros síntomas visuales de acartuchamiento. Para evaluar la recuperación a las 12 y 24 hs posteriores a la rehidratación las macetas se regaron a capacidad de campo (1 vez por día). En cada tratamiento se midió el CRA, altura de planta y el número de hojas completamente expandidas. Posteriormente parte del material vegetal se recolectó en nitrógeno líquido para el posterior estudio de expresión génica.

En todos los ensayos, para el análisis estadístico se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 4 réplicas; cada réplica estuvo compuesta por un conjunto de 6 plantas: 4 réplicas para CRA, 24 réplicas para AP y N° Hojas y 3 réplicas de un pool de 5 plantas para análisis de genes. 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.

1.2 Ensayo de pre-tratamiento con ABA

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 ABA sobre dicha respuesta. El ensayo se efectuó en macetas de 220 cm³ 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 hs de luz (300 μ E. m².s⁻¹) a 29 °C, y 8 hs de oscuridad a 20 °C.

La aplicación exógena de 100 μ M de ABA (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki,1993; Ding *et al.*,2009; Wang *et al.*, 2010) se proporcionó regando a capacidad de campo dos veces por día, durante tres días, previo al inicio del tratamiento de estrés hídrico según Vigliocco *et al.* (2002) con el fin de asegurarnos que al inicio y durante el estrés la planta ha recibido el estímulo de ABA. Así, los tratamientos para ambos cultivares fueron los siguientes: control, control + ABA, sequía, sequía + ABA.

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 completamente expandidas. Posteriormente parte del material vegetal se recolectó y se

colocó en nitrógeno líquido para su almacenamiento y posterior estudio de expresión génica.

1.2 Determinación del contenido relativo de agua (CRA)

Para evaluar el estado hídrico de las plantas sometidas a cada tratamiento y determinar el momento óptimo de cosecha, se determinó el CRA. El CRA se evaluó previo al comienzo del periodo luminoso, cuando el contenido de agua de la planta estuvo en equilibrio con contenido de agua del suelo. 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 hs. 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 (Barr, H.D. and Weatherley, P.E. 1962) 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

2. DETERMINACIÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA

2.1. Selección de los Genes y primers:

Mediante un relevamiento bibliográfico se seleccionaron una serie de genes de estrés hídrico, dependientes de ABA y de SA conocidos como genes reporteros en otras especies vegetales. A partir de esta lista de genes candidatos, se realizó una búsqueda en la base de datos dbEST (data base of Expressed Sequence Tags), donde se encuentran depositadas las secuencias de los cDNA de *Panicum virgatum* públicamente disponible en el National Center for Biotechnology information (NCBI). Se utilizó como sonda la secuencia de genes conocidos en *Arabidopsis*, depositadas en la base de datos TAIR utilizando el motor de búsqueda BLASTtn. Muchos de los genes buscados no tuvieron ortólogos en *Panicum virgatum*, lo cual explica la selección de los genes utilizados en este trabajo. Ejemplo de ello es el gen PR1, dependiente de SA, que no fue encontrado en la base de datos de los cDNA disponibles en *P. virgatum*. En base a la secuencia de cDNA de *Panicum virgatum* de cada gen, se diseñaron los primers correspondientes utilizando la herramienta Primer3 (Untergasser et al., 2012).

Como control se seleccionó **EF-1-alpha** 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** (Responsive to ABA 18 / Deshidrina de respuesta a ABA) y **RD22** (Responsive to Deydration 22/ nutrient reservoir) ABA dependientes, **DREB2A** (Dehydration-responsive element (DRE)-Binding proteína2A) de respuesta a la deshidratación, siendo su expresión independiente de ABA, **PR-2** (Phatogenesis responsive gene-2 / β -1,3 glucanasa) y **PR-5** (Phatogenesis responsive gene-5/ osmotina-proteína tipo taumatina) dependientes de SA .

Los primers utilizados para buscar la expresión diferencial de genes. (Tabla 4)

Tabla 4. Diseño de los diferentes primers utilizados en el estudio de expresión génica.

Secuencia	Primer
AGGACTTCTTCTCGCCCTTG	nutrient reservoir (RD22) RIGHT PRIMER
ACCGTCCAGTTCACCAACAC	nutrient reservoir (RD22) LEFT PRIMER
AGAAGGGCATCATGGACAAG	RAB 18 RIGHT PRIMER
TCACACTGCACACACAGGTG	RAB 18 LEFT PRIMER
GTGCCTTCACAGTGCTTGAA	Dreb 2 A RIGHT PRIMER
TCTTGCAGCAACAACCTCTG	Dreb 2 A LEFT PRIMER
TGAGATCCTTCACAGCAACG	EF-1-alpha RIGHT PRIMER
CCAAGAGGCCTTCAGACAAG	EF-1-alpha LEFT PRIMER
CCCGCCGAGTTGAAGATG	PR5 RIGHT PRIMER
TGAAGGTGCTGGTCTGGTC	PR5 LEFT PRIMER
GGCTGTCGGGGAAGTAGAC	PR2 RIGHT PRIMER
ACAATGGCGAGGCAACAAG	PR2 LEFT PRIMER

2.2 Extracción de RNAm y síntesis de DNAc

Del material vegetal conservado en nitrógeno líquido se tomó una porción y se trituró en mortero homogenizándose en 600 µl de Trizol. El homogenato se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µl 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 arrojó 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 Pormega M1701. El protocolo utilizado fue el indicado por el proveedor.

2.3 Cuantificación de los genes de interés

La cuantificación de los genes seleccionados se realizó mediante PCR semicuantitativa. 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 se determinó empíricamente para encontrar el rango lineal de amplificación. 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.

10 µl del producto de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% en búfer TBE 1X, 1h a 90 V. Los geles se visualizaron mediante GelRed (InvitroGen) expuestos en el trans iluminador con luz ultravioleta. Se obtuvieron imágenes digitales de los productos de PCR, los que se cuantificaron mediante el software J Image.

Para el análisis estadístico se utilizaron 3 réplicas; cada réplica estuvo compuesta por un conjunto de 5 plantas. Los datos se analizaron por ANOVA y test LSD para la comparación de medias, utilizándose el software InfoStat (2008). InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

RESULTADOS

1. CONTENIDO RELATIVO AGUA (CRA), ALTURA DE PLANTA Y NÚMERO DE HOJAS

1.1 CRA

En plantas del cultivar Kanlow sometidas a estrés hídrico, el CRA disminuyó al 52 % en plantas sin pre-tratamiento con ABA, mientras que en plantas pre-tratadas con ABA el CRA fue de 60 % ($p < 0,05$, Figura 6). Esto indica que el agregado exógeno de ABA mejoró significativamente ($p < 0.05$) la capacidad de las plantas para controlar el estado hídrico durante el tratamiento de estrés.

Posteriormente al riego de rehidratación, tanto las plantas pre-tratadas como las no pre-tratadas con ABA, alcanzaron los niveles del control a las 12 horas, con valores de CRA similares entre sí. Sin embargo, durante la recuperación a las 24 horas post hidratación se observaron diferencias entre los tratamientos con y sin aplicación de ABA exógeno, indicando nuevamente que el agregado exógeno de ABA influyó en la capacidad de las plantas para controlar el estado hídrico durante el tratamiento de estrés; mejorándolo significativamente ($p < 0.05$) (Figura 6).

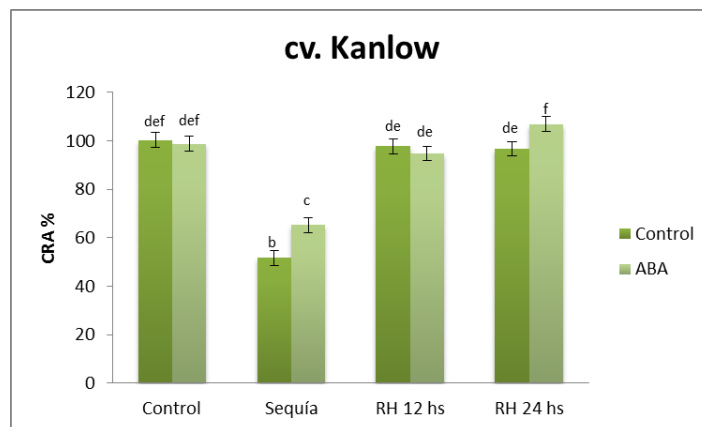


Figura 6. Contenido Relativo de Agua en el cv. Kanlow. Condiciones control, sequía, 12 horas posteriores a la rehidratación (RH 12 h), 24 horas posteriores a la rehidratación (RH 24h), en plantas con y sin aplicación exógena de ABA. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($n=16$, $p < 0.05$).

Por su parte, en el cv Greenville también se observó una disminución significativa del CRA frente a sequía. En las plantas sin pre tratamiento con ABA alcanzó un valor del 24%; mientras que en las plantas pre tratadas con ABA el CRA fue del 55% ($p < 0,05$, Figura 7). La recuperación post hidratación fue similar en plantas con y sin aplicación de ABA exógeno, alcanzando los valores del control a las 24 hs posteriores a la rehidratación. Finalmente, la aplicación de ABA exógeno mejoró significativamente la respuesta de las plantas frente al estrés hídrico, mostrando una disminución del CRA menos abrupta en las plantas pretratadas con ABA.

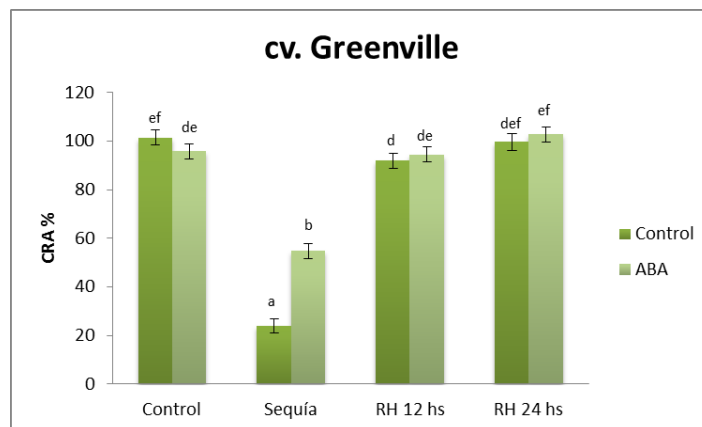


Figura 7. Contenido Relativo de Agua en el cv. Greenville. Condiciones control, sequía, 12 horas posteriores a la rehidratación (RH 12 h), 24 horas posteriores a la rehidratación (RH 24h), en plantas con y sin aplicación exógena de ABA. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($n=16$, $p < 0.05$).

Los resultados indican que el tratamiento de sequía afectó de manera diferente al cultivar Kanlow y al cultivar Greenville. En plantas sometidas a estrés, el cv. Kanlow controló mejor su balance hídrico en comparación con el cv. Greenville, superando en dos veces los valores de CRA. En cuanto al agregado exógeno de ABA, éste mejoró significativamente ($p < 0.05$) la capacidad de las plantas para controlar su balance hídrico durante el tratamiento de estrés en ambos cultivares.

1.2 Numero de hojas

El número de hojas en el cultivar Kanlow no disminuyó durante la sequía, pero si lo hizo de manera significativa a las 12 h luego de la rehidratación, recuperando los valores del control a las 24 h de rehidratación (Figura 8). En aquellas plantas pre tratadas con ABA tampoco se observó una disminución significativa frente a sequía, sin embargo a las 24 hs posteriores a la rehidratación se observó una disminución respecto al control, a diferencia de lo observado en plantas sin aplicación de ABA. Posiblemente los recursos energéticos empleados para el control del balance hídrico en la planta hayan limitado de alguna manera la expansión foliar.

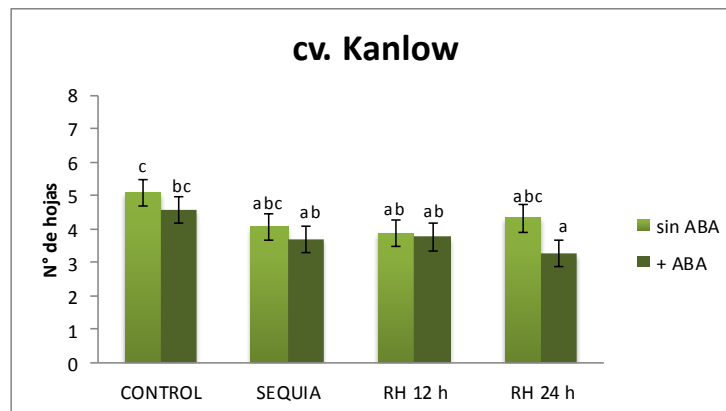


Figura 8. Número de hojas del cultivar Kanlow. Condiciones control, sequía, 12 horas posteriores a la rehidratación (RH 12 h), 24 horas posteriores a la rehidratación (RH 24h), en plantas con y sin aplicación exógena de ABA. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=16, p<0.05).

El cv. Greenville, por su parte, vio afectado el número de hojas de manera significativa en ambas condiciones (con y sin agregado exógeno de ABA, Figura 9). La disminución en el número de hojas no recupero los niveles del control luego de la rehidratación en ninguna de las dos situaciones. De este modo, el estrés hídrico tuvo efecto diferente en ambos cultivares según estuvieron, o no, expuestos a ABA. En las plantas sin aplicación de ABA, el cv. Kanlow pudo revertir el efecto causado por la restricción hídrica a diferencia del cv. Greenville. En plantas pre tratadas con ABA, el número de hojas no recupero los niveles del control en ninguno de los dos cultivares.

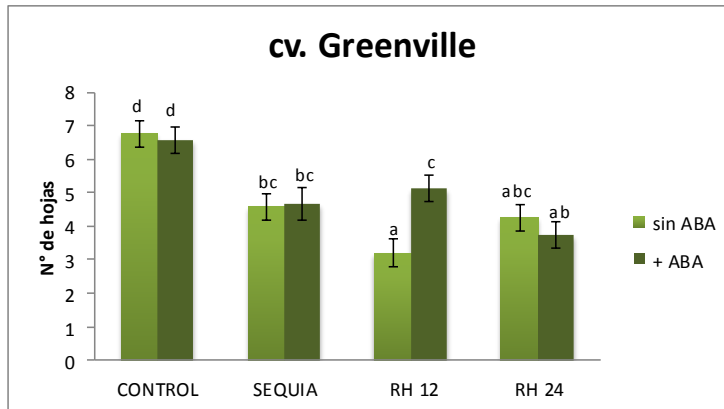


Figura 9. Número de hojas del cultivar Greenville. Condiciones control, sequía, 12 horas posteriores a la rehidratación (RH 12 h), 24 horas posteriores a la rehidratación (RH 24h), en plantas con y sin aplicación exógena de ABA. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=16, p<0.05).

1.3 Altura de Planta

En cuanto a la altura de la planta, en el cultivar Kanlow, ambos tratamientos (con y sin ABA) se vieron afectados y mostraron una disminución significativa en situación de sequía que se mantuvo estable durante las 24 hs posteriores a la rehidratación (Figura 10).

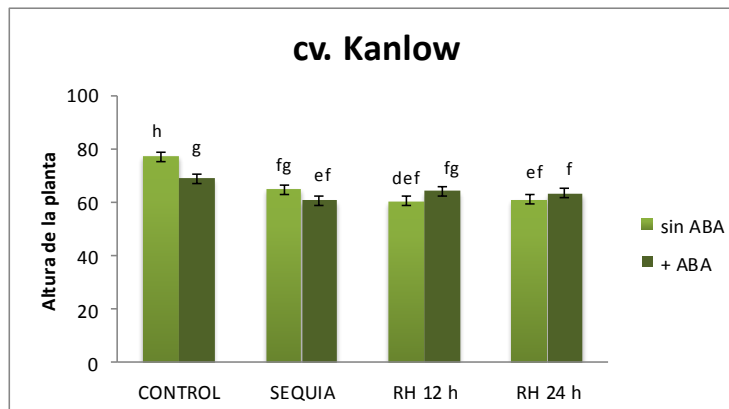


Figura 10. Altura de planta del cultivar Kanlow. Condiciones control, sequía, 12 horas posteriores a la rehidratación (RH 12 h), 24 horas posteriores a la rehidratación (RH 24h), en plantas con y sin aplicación exógena de ABA. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=16, p<0.05).

Por su parte, en el cv. Greenville no se registró una disminución significativa de la altura durante el déficit de agua, tanto en plantas pre-tratadas como no pre-tratadas con ABA. Sin embargo, en aquellas plantas que no fueron tratadas con ABA, la restricción hídrica causó un efecto que se observa horas después del riego de recuperación ($p < 0,05$, Figura 11).

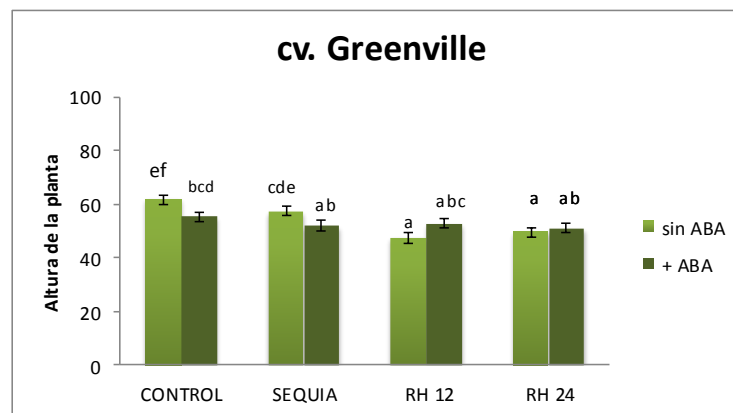


Figura 11. Altura de planta del cultivar Greenville. Condiciones control, sequía, 12 horas posteriores a la rehidratación (RH 12 h), 24 horas posteriores a la rehidratación (RH 24h), en plantas con y sin aplicación exógena de ABA. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias ($n=16$, $p < 0.05$).

En suma, nuestros resultados indican que el cultivar Kanlow realiza un mejor ajuste de su balance hídrico comparado con el cultivar Greenville, lo cual se evidencia a partir de la evolución del contenido relativo de agua a lo largo del ensayo. Asimismo se observa que el ABA mejora el contenido relativo de agua en ambos cultivares. Sin embargo, el tratamiento exógeno con ABA no mejoró la altura de planta ni el número de hojas en comparación con las plantas no tratadas con ABA. Esto indica que ABA estaría actuando sobre otras variables que no fueron las evaluadas. Posiblemente estas no sean las variables apropiadas para evidenciar el efecto de estrés hídrico moderado o de la aplicación de ABA exógeno en tratamientos a corto plazo.

2. EXPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS HÍDRICO INDEPENDIENTES DE ABA, DEPENDIENTES DE ABA Y DEPENDIENTES DE SA.

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* y *PR5*) durante estrés hídrico y rehidratación, en plantas pre-tratadas con ABA exógeno 100 μ M y en plantas sin pre tratar.

2.1 Expresión de genes dependientes de ABA: *RAB18* y *RD22*

En el cv. Kanlow, el estrés hídrico causó un incremento de la expresión de *RAB18*. De manera similar, en plantas pre-tratadas con ABA, el tratamiento de sequía incremento los niveles del transcripto ($p < 0.05$). A las 24h posteriores a la rehidratación los niveles de expresión volvieron a las condiciones control tanto en plantas tratadas como en las no tratadas con ABA (Fig. 12 a, Figura suplementaria I a).

En el cv. Greenville el estrés hídrico causó un incremento en la expresión de *RAB 18*. Este aumento se mantuvo a las 24 hs posteriores a la rehidratación, a diferencia del cultivar Kanlow. En el cultivar tratado con ABA se observó el mismo comportamiento, es decir, un aumento de la expresión del gen frente a sequía que se mantuvo durante las 24 hs posteriores a la rehidratación. Esto difiere, nuevamente, con lo ocurrido en Kanlow, donde los niveles de *RAB18* a las 24 hs volvieron a los niveles del control (Fig. 12 b, Figura suplementaria I b).

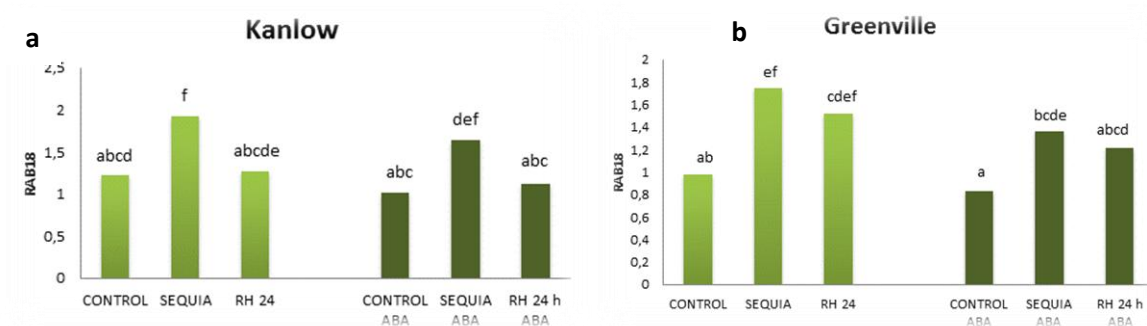


Figura 12 a y b. Abundancia relativa de transcritos del gen *RAB18* en hojas *P. virgatum* cv. Kanlow (A) y Greenville (B) bajo estrés hídrico, y 24h (RH 24 h) posterior a la rehidratación, pre-tratado con ABA y sin pre-tratamiento con ABA. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05). **Fig. Supl. I a y b**

En cuanto a RD22, en el cv. Kanlow no se observó diferencias significativas en la expresión durante el estrés hídrico, tanto en plantas que fueron expuestas a una aplicación de ABA como aquellas que no lo fueron. A las 24 h posteriores a la rehidratación, se observó una disminución significativa en la expresión del gen en plantas sin aplicación exógena de ABA. Si bien esta tendencia se mantuvo en plantas tratadas con ABA, la misma no es significativa (Figura 13 a; Figura suplementaria II a).

En el cultivar Greenville, por su parte, se observó una mayor expresión de *RD22* solo en el control bien regado. En condiciones control la expresión de *RD22* duplicó a la del resto de los tratamientos con y sin agregado exógeno de ABA (Figura 13 b; Figura suplementaria II b).

Frente a los resultados observados en los cvs. Greenville y Kanlow, se infiere que la expresión del gen RD22 no se correlaciona con los tratamientos de estrés hídrico y recuperación, a diferencia de que ha sido propuesto en la bibliografía para otras especies vegetales. Desde este punto de vista no se comporta como un buen gen reportero de estrés en *Panicum virgatum* en las condiciones ensayadas.

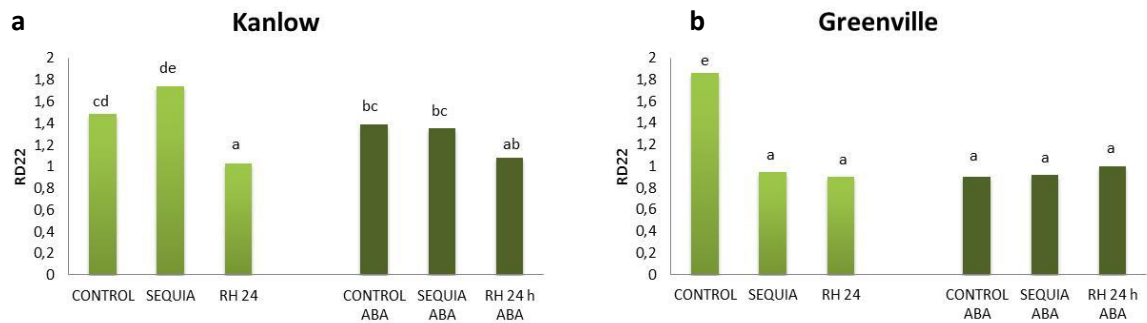


Figura 13: a y b. Abundancia relativa de transcritos del gen *RD22* en hojas *P. virgatum* cv. Kanlow y cv. Greenville bajo estrés hídrico, y 24h (RH 24 h) de rehidratación, pre tratado con ABA y sin pre-tratamiento con ABA. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05). **Fig. Supl. II a y b**

2.2 Expresión del gen independiente de ABA: *DREB2A*

La expresión de *DREB2a* mostro un aumento significativo frente a sequía en plantas del cv. Kanlow sin aplicación exógena de ABA. A las 24 hs posteriores al riego de rehidratación la expresión de *DREB2A* retomó los niveles del control. Las plantas pre-tratados con ABA no mostraron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 14 a, Figura suplementaria III a).

Para el cv. Greenville, no hubo diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos con y sin aplicación exógena de ABA (Figura 14 b, Figura suplementaria III b). A partir de lo observado en ambos cultivares, y teniendo en cuenta que la expresión del gen en las réplicas biológicas, *DREB2A* no mantuvo un patrón de expresión homogéneo para cada tratamiento particular (Figura Suplementaria III b). De esta manera, se considera que los resultados obtenidos con *DREB2A* no son concluyentes frente a situaciones de estrés como la planteada en este trabajo en *Panicum virgatum*, y, desde este punto de vista, no actuaría como un gen indicador en nuestro sistema.

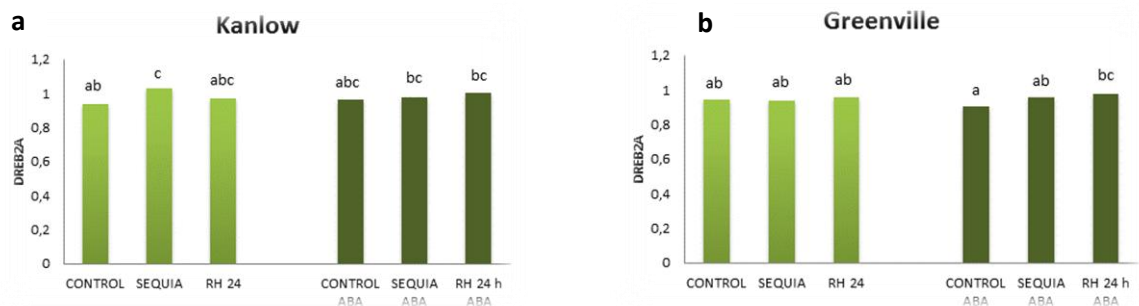


Figura 14: a y b. Abundancia relativa de transcritos del gen *DREB2A* en hojas *P. virgatum* cv. Kanlow y cv. Greenville bajo estrés hídrico, y 24h (RH 24 h) de rehidratación, pre tratado con ABA y sin pre-tratamiento con ABA. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05). **Fig. Supl. III a y b**

2.3 Expresión de los genes dependientes de SA: *PR2* y *PR5*

La expresión de *PR2* sólo se observó frente a estrés hídrico en las tres replicas analizadas en el cv. Kanlow (Fig. 15, Figura suplementaria IV a). La presencia de transcritos disminuyo a valores del control luego de 24 h. de rehidratadas las plantas. En el tratamiento de estrés hídrico pre tratado con ABA exógeno no hubo expresión de *PR2*, lo que sugiere que la expresión de este gen podría ser inhibida por ABA.

Por su parte en el cultivar Greenville (Figura suplementaria IV b), no hubo expresión en ninguno de los tratamientos, ya sea pre-tratados o no con ABA (datos no mostrados). Esto estaría sugiriendo una respuesta diferencial en ambos cultivares, ya que *PR2* parecería no estar participando en la respuesta a estrés hídrico en el cv. Greenville, a diferencia del cv. Kanlow. Estas observaciones se corresponden con resultados previos de nuestro laboratorios (Aimar *et al.*, 2014).

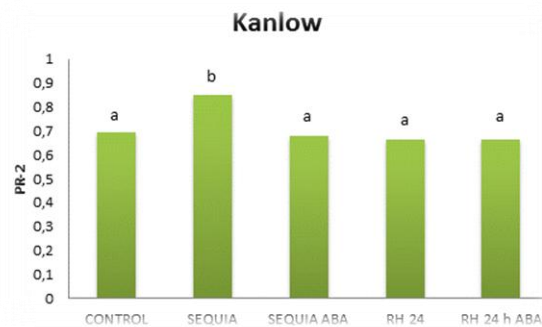


Figura 15. Abundancia relativa de transcritos del gen *PR2* en hojas *P. virgatum* cv. Kanlow bajo estrés hídrico, y 24h (RH 24 h) de rehidratación, pre tratado con ABA y sin pre-tratamiento con ABA. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05). La expresión de PR 2 en el control ABA no se muestra, dado que no se contó con suficiente cDNA del tratamiento. **Fig. Supl. IV a y b**

En el caso del gen *PR5* se observó expresión frente a sequía en las tres replicas analizadas tanto del cv. Kanlow como del cv. Greenville (Fig. 16 a y b, Figura suplementaria V a y b). Si bien *PR5* se expresó en condiciones de estrés hídrico, esto no sucedió cuando plantas de ambos cultivares fueron pre-tratadas con ABA exógeno. Esto sugeriría, tanto en Greenville como en Kanlow, que la presencia de ABA podría reprimir la expresión de *PR5* en condiciones de sequía, similar a lo que sucede con *PR2* en el cv. Kanlow.

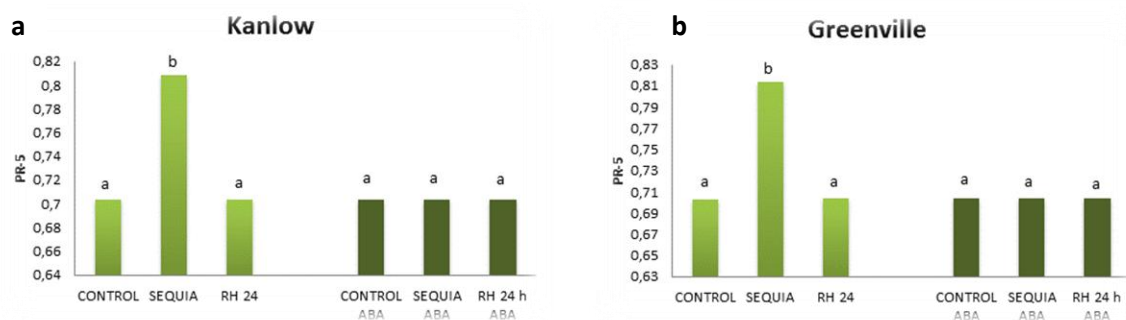


Fig 16: a y b. Abundancia relativa de transcritos del gen *PR5* en hojas *P. virgatum* cv. Kanlow y cv. Greenville bajo estrés hídrico, y 24h (RH 24 h) de rehidratación, pre tratado con ABA y sin pre-tratamiento con ABA. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre las medias (n=3, p<0,05). **Fig. Supl. V a y b.**

DISCUSSION

1. COMPORTAMIENTO DE LOS CULTIVARES KANLOW Y GREENVILLE FRENTE A ESTRÉS HÍDRICO: CRA, ALTURA DE PLANTA Y NÚMERO DE HOJAS.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten observar que el cultivar Kanlow ajustó su balance hídrico de una manera más eficiente que el cv. Greenville. Asimismo, el agregado exógeno de ABA, si bien mejoró significativamente ($p < 0.05$) la capacidad de las plantas de ambos cultivares para controlar el balance hídrico durante el tratamiento de estrés, fue más efectivo en Kanlow.

Las plantas de ambos cultivares ajustaron su crecimiento frente a la situación de estrés, y estas modificaciones se manifestaron durante el tratamiento de sequía y posterior rehidratación. En el cultivar Kanlow, la altura de planta fue la variable más afectada, que no llegó a recuperarse luego de la rehidratación tanto en los tratamientos pre tratados y no pre tratados con ABA. En el cv. Greenville contrariamente, se vio afectado el número de hojas que no se recuperó aun luego de la rehidratación, tanto en los tratamientos con y sin agregado exógeno de ABA.

Desde el punto de vista morfo-fisiológico se puede afirmar que el control diferencial del estado hídrico en condiciones de estrés en el cultivar Kanlow (ecotipo de tierras bajas) aportaría una ventaja significativa en ambientes con restricciones hídricas comparado con el cultivar Greenville (ecotipo de tierras altas). Asimismo, se observa que el agregado exógeno de ABA mejora el balance hídrico de las plantas en ambos cultivares. Sin embargo, el tratamiento exógeno con ABA no mejoró la altura de planta ni el número de hojas. Esto sugiere que ABA estaría actuando sobre otras variables, diferentes de las características morfológicas evaluadas en este estudio. Esto coincide con lo observado por Liu y col. (2015) donde estudian una serie de parámetros fisiológicos, morfológicos y metabólicos en respuesta a sequía en *P. virgatum*, y observan que los parámetros fisiológicos contribuyen más que los morfológicos para distinguir entre los controles y los tratamientos, es decir que las características fisiológicas estarían más cercanamente asociadas con la tolerancia a la sequía a corto plazo de *Panicum*.

En la última década se han producido importantes avances en el conocimiento del comportamiento de *Panicum virgatum* a nivel agronómico, fisiológico y morfológico frente

a estrés hídrico, salino, osmótico y por temperaturas extremas (Wang *et al.*, 2012; Duclos *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Anderson *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2016). Parte importante de esos esfuerzos han estado dirigidos a la caracterización de los ecotipos de tierras altas y tierras bajas, en pos de precisar las bases genéticas y fisiológicas que estarían definiendo la adaptación a diferentes ambientes y la diversidad de la especie. Barney y col. (2009) evaluaron la germinación, el establecimiento, el rendimiento y la capacidad de reproducción de cuatro cultivares, dos ecotipos de tierras altas y dos de tierras bajas. Se evaluaron distintos niveles de disponibilidad de agua en el suelo (desde déficit hídrico a saturación) en condiciones de invernadero. Las semillas emergieron y se establecieron en todas las condiciones de humedad del suelo evaluadas, en un rango de -0,3 MPa a sobresaturación. Los ecotipos de tierras bajas, en condiciones de inundación, rindieron como los controles regados a capacidad de campo, mientras que, en estas mismas condiciones, cultivares de tierras altas rindieron menos que los controles. El tratamiento de sequía (- 4,0 a -11,0 MPa), por su parte, redujo la longitud y el número de brotes, área foliar, biomasa y la producción hasta en un 80%. Sin embargo, una vez establecido, todas las plantas sobrevivieron a -4,0 MPa y tenían la misma proporción de brotes en flor como en los controles. En condiciones de invernadero, el pasto varilla mostro una amplia tolerancia frente a un rango importante de condiciones de humedad del suelo. Si bien a varias escalas, ambos ecotipos germinaron, se establecieron y florecieron en condiciones de suelo inundado o con déficit de agua (-0.3 MPa). En condiciones de inundación los ecotipos de tierras bajas superaron a los de tierras altas en la producción y altura de macollos, área foliar, biomasa, eficiencia fotosintética y eficiencia en el uso del agua. Asimismo, las variedades de tierras bajas se comportaron de manera similar en situación de estrés y en condiciones control, mientras que las de tierras altas vieron afectada su productividad frente a condiciones de estrés. Contrariamente a lo esperado por este grupo de investigación, los genotipos de tierras altas no superaron a los de tierras bajas en las condiciones de sequía impuestas, según lo indica la caracterización de genotipos propuesta por Porter (1966). Finalmente este trabajo concluye que los genotipos de tierras bajas pueden sobrevivir en un amplio rango de condiciones de humedad edáfica, y son buenos candidatos para futuros planes de mejoramiento de la especie. Estos resultados coinciden con los encontrados en este trabajo y otros desarrollados en nuestro laboratorio

(Aimar *et al.*, 2014), donde el genotipo de tierras bajas (cv. Kanlow) muestra un mejor comportamiento en condiciones de estrés hídrico.

En 2015, un grupo de trabajo (Liu, *et al.*, 2015) realizó un estudio donde evaluó la tolerancia a sequía de 49 genotipos de *P. virgatum*, usando parámetros fisiológicos, morfológicos y metabólicos tales como, tasa fotosintética (FN), Conductancia estomática (g), tasa de transpiración (Tr), concentración intercelular de CO₂ (Ci), eficiencia en el uso del agua (EUA), fuga electrolítica (EL), Contenido relativo de agua (CRA), y otros como peso de la planta, longitud de hoja, ancho de la hoja y longitud de la vaina de la hoja. Asimismo midieron los metabólicos: ABA, espermina, trealosa y fructuosa. Lo primero que encontraron fue que los parámetros fisiológicos evaluados contribuyeron más que los morfológicos para distinguir entre los controles y los tratamientos, es decir que las características fisiológicas estarían más cercanamente asociadas con la tolerancia a la sequía a corto plazo de *Panicum*. Por otro lado, los resultados mostraron que los genotipos tolerantes a la sequía tenían mayor CRA, g, FN, Tr, y Ci, y un menor EL que los genotipos sensibles a la sequía. Así mismo, los 5 genotipos más tolerantes mostraron niveles superiores de ABA, espermina, fructuosa y trealosa en comparación con los 5 genotipos más sensibles. Todos estos resultados les permitieron hacer un ranking de genotipos en función de su mayor o menor tolerancia al estrés. De los 10 más tolerantes al estrés 7 resultaron de tierras bajas (Liu *et al.*, 2015).

En este mismo sentido, otro grupo de trabajo (Hu *et al.*, 2015), evaluó la tolerancia a estrés salino-alkalino de 30 líneas y cultivares de *Panicum virgatum*, con el objetivo de identificar materiales genéticos tolerantes y sensibles a dicho estrés. El estrés fue impuesto sobre plantas en estado vegetativo con cuatro nudos bien desarrollados con 150 mM de Na⁺ y pH de 9,5 durante 20 días. Se evaluaron los parámetros fisiológicos de contenido relativo de agua (CRA), fuga de electrolitos (EL), fotosíntesis neta (FN), conductancia estomática (g) y tasa de transpiración (Tr). Los resultados mostraron que el estrés alcalo-salino causó daño en la membrana celular (mayor nivel de EL) y reducción de CRA, así como también de los parámetros FN, g, y Tr, independientemente de la línea. Los materiales genéticos evaluados mostraron diferencias significativas en su tolerancia a salinidad. En base a estas variables se calculó un índice de estrés alcalo-salino (ASTTI),

que fue considerado como un rasgo de tolerancia. Para cada uno de éstos parámetros, se utilizó la relación entre los valores de cada parámetro durante el estrés y los valores normales de los controles. Estudios combinados de componentes principales, análisis de cluster y el índice ASTTI permitió esclarecer que las líneas de tierras bajas TEMSEC, Alamo, TEM-SLC y Kanlow se clasificaron como tolerantes a las condiciones alcalo-salinas y que, en contraste, tres líneas de tierras bajas (AM-314 / EM-155, BN-13645-64) y dos líneas de tierras altas (Caddo y Blackwell-1) resultaron sensibles a estas condiciones (Hu *et al.*, 2015). Estos resultados se suman a lo encontrado por Barney *et al.*, (2009) y Liu *et al.* (2015) y aportan al cuerpo de conocimiento que sostiene que el ecotipo de tierras bajas manifiesta una mayor tolerancia frente a situaciones de estrés ambiental. A su vez, esto está en línea con los resultados encontrados en nuestro laboratorio (Aimar *et al.*, 2014) y a los presentados en este trabajo.

Las evidencias descritas precedentemente (Barney 2009; Liu *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2015), sumado a nuestro trabajo, se contraponen a la descripción histórica de Porter (1966). Este autor 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). Y refuerzan el concepto que los cultivares de tierras bajas son más tolerantes al estrés hídrico que los de tierras altas.

2. EXPRESIÓN DE GENES MARCADORES DE ESTRÉS HÍDRICO

Para comprender mejor la participación de ABA y SA en la respuesta de la planta a estrés hídrico y a la recuperación se estudiaron genes marcadores de estrés dependientes de ABA (*RAB18* y *RD22*) e independiente (*DREB2a*) y dependientes de SA (*PR-2* y *PR-5*) en respuesta al estrés hídrico moderado y progresivo y rehidratación.

2.1 *RAB18* y *RD22*

Bajo estrés hídrico, en varias especies como *Arabidopsis*, cereales y cultivos forrajeros, tales como maíz (Xin *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2008), sorgo (Kannangara *et al.*, 1983), trigo (Iqbal and Bano 2010), festuca (Abernethy, McManus, 1998), cebada (Thameur *et al.*, 2011) y alfalfa (Han *et al.*, 2008) se ha reportado aumento de los niveles de ABA endógeno (Wasilewska *et al.*, 2008). A su vez se ha observado que ABA controla algunos genes de respuesta a la deshidratación que participan en la tolerancia a la sequía, como por ejemplo los genes de la embriogénesis tardía abundante (LEA), tales como *RAB18* (en respuesta a ABA) y *RD22* (ampliamente distribuida entre monocotiledóneas y dicotiledóneas; Harb *et al.*, 2010; Rabbani *et al.*, 2003). Las proteínas LEA (Late Embriogénesis Abundant) son varias familias de proteínas que se acumulan en tejidos vegetativos en respuesta a estrés osmótico generado por diversos agentes ambientales (deshidratación, salinidad, frío y congelamiento) su función general es proteger a proteínas y membranas del daño por deshidratación. Durante el desarrollo embrionario y en la gran mayoría de los estreses medioambientales, la inducción de la expresión de los genes *LEA* depende de ABA, ésta fitohormona es capaz de inducir éstos genes en embriones inmaduros o en tejidos vegetativos no estresados cuando se aplica exógenamente (Dure, 1993).

La expresión de *RAB18* frente a sequía se comportó de manera similar en ambos cultivares (Greenville y Kanlow), mostrando un aumento en su expresión en condiciones de estrés hídrico, tanto en plantas tratadas con ABA como en aquellas no tratadas. Esto concuerda con trabajos previos que muestran correspondencia entre la expresión de *RAB18* en diferentes especies de plantas bajo estrés (Lang *et al.*, 1994; Mäntylä *et al.*, 1995; Rabbani *et al.*, 2003; Harb *et al.*, 2010). Esto también coincide con trabajos previos en nuestro laboratorio realizados en *Panicum virgatum*; donde los niveles de ABA y la expresión de *RAB18* aumentaron frente a sequía (Aimar *et al.*, 2014). En nuestro caso, el aumento en la expresión de *RAB18* no se vio afectado por el agregado exógeno de ABA, es decir que la concentración de ABA que está presente frente a estrés sería suficiente para disparar la expresión de *RAB18*.

En el cv. Greenville, la expresión de *RAB18* luego de 24 h del riego de rehidratación se mantuvo alta, a los mismos niveles alcanzados durante la sequía. Se ha propuesto que *RAB18*, ya sea a nivel de transcritos o de proteína, podría actuar como una "señal" de memoria al estrés. Este efecto ha sido ampliamente propuesto en animales (Korzus, 2004; Ding *et al.*, 2012), así como en plantas (Bruce *et al.*, 2007; Trewavas, 2005), y se ha tratado como un mecanismo de memoria a largo plazo. Por ejemplo, en *Arabidopsis*, la alteración de la disponibilidad de agua produjo un aumento en el contenido de ABA y en la expresión de *RAB18*. Una pequeña pero reproducible acumulación de ARNm de *RAB18* persistió tras el tratamiento de estrés junto con la expresión de la proteína *RAB18*, incluso después de que el contenido de ABA disminuyó hasta el nivel basal. Esta exposición al estrés hídrico resultó en un incremento de la tolerancia al frío de 4-5 °C en *Arabidopsis* (Umezawa *et al.*, 2006).

Un mecanismo de memoria también ha sido reportado en la regulación de cierre de los estomas inducido por ABA, *RD22* y *RAB18* en *Arabidopsis* (Goh *et al.*, 2003). En plantas de *Arabidopsis* expuestas varias veces a ABA exógeno, seguida por una inducción con luz azul -señal que induce la apertura de los estomas- no tuvo lugar la apertura de los estomas. En las plantas control no se detectaron *RAB18* y *RD22*, pero en las plantas tratadas con ABA los transcritos de ambos genes tuvieron alta expresión a 1, 2, 4 y 8 h después el nivel de expresión disminuyó. Los autores proponen que la aplicación de ABA actúa como un estímulo a corto plazo y bajo estrés para el crecimiento vegetal, y *RD22* y *RAB18*, entre los genes candidatos, juegan un papel en la regulación de la respuesta de memoria.

Boominathan *et al.* (2004) estudiaron la adaptación a la deshidratación en plantas de garbanzo (*Cicer arietinum*) sometidas a deshidratación y posterior recuperación. Estos autores encontraron una mayor tolerancia en las plántulas de garbanzo pre-expuestas a shock de deshidratación. Con el fin de detectar cualquier evidencia a largo plazo de un estrés después de la eliminación de dicho estrés, analizaron la expresión de un conjunto de genes después de 5 y 24 h de rehidratación. En concordancia con nuestros resultados en el cv. Greenville, encontraron que algunos de los transcritos mantuvieron sus niveles de expresión más de dos veces en comparación a la condición sin estrés, incluso después de 24 h de la fase de recuperación, apoyando la línea de evidencia en la

que la exposición a un estrés define la respuesta a los siguientes estreses (Knight *et al.*, 1998).

En un estudio más reciente, Liu y col. (2014) trabajaron con plantas de *Arabidopsis*, sometidas a una primera situación de estrés (S1), una posterior recuperación (R1) y una segunda situación de estrés (S2). Encontraron que el CRA resultante de S1 fue de un 65%, mientras que el CRA resultante de S2, fue de un 85%, indicando que la planta que ha sido sometida a un estrés previo, responde mejor frente a un próximo estrés. Analizando los niveles de los transcritos de genes de respuesta a estrés, observaron que eran diferentes en S2 comparados con S1. A estos genes (*RAB18*, *RD29B*, *LTP3*, *LTP4*, *HIPP2.2*) los denominaron “genes de memoria”. Estas evidencias son similares a las encontradas en este trabajo en cuanto al comportamiento de *RAB 18* frente a estrés hídrico y posterior recuperación en el cv. Greenville. En Kanlow, por el contrario, éste fenómeno no se observó ya que, en condiciones de rehidratación (RH24h), *RAB18* recuperó los niveles del control. Esto podría indicar que dos mecanismos diferentes estarían operando en ambos cultivares.

En cuanto a *RD22*, los resultados observados en el cv. Greenville y cv. Kanlow permiten inferir que la expresión del gen *RD22* no se correlaciona con los tratamientos de estrés hídrico y recuperación, tal cual ha sido propuesto en la bibliografía para otras especies vegetales como soja (Neves-Borges *et al.* 2012), manglares de la familia de las rhizophoraceae *Bruguiera gymnorhiza* (donde *RD22* es reprimido por desecación y por el agregado exógeno de ABA; Banzai *et al.* 2002). Desde este punto de vista no se comporta como un buen gen reportero de estrés en *Panicum virgatum* en las condiciones ensayadas.

El gen *RD22*, en conjunto *RD20A*, *RD29B*, han sido consistentemente informados como marcadores de las respuestas ABA-dependientes en situación de estrés, y a partir de allí se los considera como clásicos reporteros de estrés en *Arabidopsis* y algunas otras especies vegetales (Pellegrineschi *et al.*, 2004; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007; Huang *et al.*, 2011). Sin embargo, estudios realizados en soja en respuesta a distintas situaciones de estrés hídrico, evaluaron la aptitud de los genes *RD20A*, *RD22* y *RD29B* como reporteros de estrés. Se analizó una situación de estrés generada por suspensión del riego en macetas con sustrato suelo –simulando un contexto de estrés progresivo y

aclimatación, y otra en condiciones de hidroponía generando una exposición rápida frente a estrés. Encontraron que *RD29B* no fue regulado por estrés hídrico en ninguna de las dos situaciones. A su vez, diferentes perfiles de expresión y diferentes niveles de inducción se observaron entre genes y entre los dos sistemas de generación de estrés. *RD20A* se indujo de manera importante durante la sequía progresiva inducida por suspensión de riego, mientras que la respuesta de *RD22* disminuyó en el sistema de hidroponía luego de una exposición abrupta al estrés. Así, los autores remarcan la importancia de validar los genes reporteros de estrés en diferentes especies y frente a condiciones de estrés bien definidas, que no necesariamente estarían disparando respuestas similares (Neves-Borges *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos al analizar la expresión de *RD22* en *Panicum virgatum* y en las condiciones de estrés generadas permiten afirmar que no es un buen gen reportero de estrés hídrico, y estos resultados confirman lo obtenido en estudios previos del laboratorio (Aimar *et al.* 2014). La expresión tanto de *RD22* como de *RAB18* no han sido investigadas con anterioridad en *Panicum virgatum* en este contexto, y, desde este punto de vista, estos resultados son un aporte al conocimiento al sistema de respuesta a estrés hídrico en condiciones controladas.

2.2 DREB2a

Además de los genes dependientes de ABA, hay una serie de genes sensibles a la deshidratación que son independientes de ABA. Uno de los más estudiados es la familia DRE (elemento de respuesta a la deshidratación) un factor de transcripción que controla una vía de señalización del estrés. Dentro de esta familia, el subgrupo 2 (*DREB2*) es el más implicado en la respuesta a la sequía (Liu *et al.*, 1998) y salinidad. Genes de tipo *DREB2* fueron investigados en especies de la familia de las gramíneas, como el arroz (Matsukura *et al.*, 2010), el maíz (Qin *et al.*, 2007), *Penisetum glaucum* (Agarwal *et al.*, 2010) y ortólogos y también han sido reportados en otras especies de plantas (Chen *et al.*, 2011), mostrando una amplia distribución de la familia dentro del reino vegetal.

Los genes *DREB* son considerados reguladores centrales de la respuesta a estrés abiótico y de la tolerancia en plantas expuestas a condiciones adversas (Lata and Prasad;

2011). DREBs es una de las principales familias de factores de transcripción que se unen y activan a la mayoría de los genes inducibles por estrés osmótico, responsables de proveer osmotolerancia a la planta bajo condiciones de estrés. Análisis de microarreglos revelaron más de 40 genes diana de DREB, incluyendo TFs, fosfolipasa C, proteínas LEA, proteínas KIN (frío-inducible), proteínas de transporte de azúcar, desaturasa, proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, proteínas de la biosíntesis de osmoprotectores, e inhibidores de proteasa (Fowler and Thomashow, 2002; Maruyama *et al.*, 2004). Su relevancia en el control de varios mecanismos regulatorios hace que sea muy investigado, en especial como herramienta biotecnológica para mejorar la tolerancia a estrés en varias especies vegetales.

En nuestro trabajo, *DREB2A* se expresa en condiciones de estrés solo en el cultivar Kanlow. En los restantes tratamientos evaluados no se observa expresión diferencial del gen. Resultados similares se han informado en plántulas de maíz (Qin *et al.*, 2007) y en plantas de arroz (Matsukura *et al.*, 2010), donde la expresión de *DREB2a* incrementó luego de un tratamiento de estrés (sequía y shock de calor).

Los resultados en este trabajo no son concluyentes en cuanto a su efectividad como reportero en las condiciones ensayadas, dado que su expresión no ha sido consistente en las réplicas biológicas evaluadas. En estudios previos de nuestro laboratorio la expresión de *DREB2a* no se incrementó durante una situación de estrés, por el contrario hubo un incremento de los transcritos a las 24 horas luego de suministrar un riego de recuperación (Aimar *et al.*, 2014). Ante esta situación, se considera necesario profundizar los estudios para clarificar su participación efectiva en respuesta a estrés hídrico moderado y progresivo como el planteado en este estudio.

Miembros de la familia *DREB* han sido identificados y estudiados en organismos modelos como *Arabidopsis*, tabaco (Liu *et al.* 2007) y arroz (Chen *et al.*, 2011), y en forrajeras como festuca, alfalfa y raigrás (Tang *et al.* 2005, Xiong *et al.* 2006, Niu *et al.*, 2010); sin embargo han sido poco estudiados en pastos de clima templado como el género *Panicum*. Desde este punto de vista se consideran valiosos los aportes que se puedan realizar en *Panicum virgatum* ya que esta familia de genes posee alto potencial como herramienta biotecnológica para mejorar el comportamiento de genotipos en regiones semiáridas.

2.3 PR-2 y PR-5

Las proteínas PR (Pathogenesis related proteins) son proteínas antimicrobianas clasificadas en 17 familias (en base a sus propiedades biológicas y moleculares) y son ampliamente utilizadas como marcadores de respuesta a patógenos en ensayos donde se evalúa la resistencia a microorganismos e insectos que generan daños y enfermedades (Van Loon, 1997; Van Loon and Pieterse., 2006). Las primeras fueron descubiertas en plantas de tabaco infectadas con el virus del mosaico del tabaco (TMV; Seo *et al.*, 2008). Muchas de éstas proteínas son inducidas a través de la acción coordinada de varias hormonas endógenas tales como JA, ET y SA, cuyos niveles son también incrementados en tejidos infectados. Una de las respuestas de defensa que se desencadenan es la Respuesta Sistémica Adquirida (SAR). SAR implica la producción por parte de la planta de una o varias señales móviles que están involucradas en la activación de los mecanismos de resistencia en partes no infectadas (Sanchez *et al.*, 2010), y SA ha sido identificado como una molécula señal que actúa durante el desarrollo de dicha respuesta. En *Arabidopsis*, el desarrollo de SAR requiere de SA y de la inducción de genes codificados por *PR-1*, *PR-2* y *PR-5* (Pathogenesis responsive 2 y 5, Thomma *et al.*, 2001). En dicotiledóneas como tabaco (*Nicotiana tabacum*) y *Arabidopsis*, plantas transgénicas que expresaban el gen NahG de la bacteria *Pseudomonas putida* (gen que codifica la enzima Salicilato Hidroxidasa, que a su vez metaboliza al SA y lo inactiva biológicamente) se observó que, luego de la infección por patógeno, éstas plantas fueron incapaces de acumular altos niveles de SA y expresar genes *PR* (*PR-1*, *PR-2* y *PR-5*) en las hojas, por lo que no desarrollaron SAR y fueron más susceptibles a patógenos tanto virulentos como avirulentos (Gaffney *et al.*, 1993, Delaney, 1994). El agregado de un compuesto análogo a SA reestableció la resistencia a patógenos y la expresión de genes *PR* (Vernooij *et al.*, 1995; Shah, 2003). En plantas de tabaco, un tratamiento con SA indujo resistencia a patógeno y la expresión de un set de genes *PR* (pathogenesis-related) que son parte de la respuesta hipersensible de SAR (Ward *et al.*, 1991; Yasuda *et al.*, 2008). Es decir, el incremento en la expresión de los genes *PR1*, *PR2* y *PR5* con los incrementos en los niveles de SA en planta, los indican como genes de defensa inducidos por SA e indicadores de respuesta a SA (Sanchez *et al.*, 2010, Kumar 2014).

Resultados de nuestros experimentos en este trabajo muestran la expresión de genes *PR-2* y *PR-5* en el cv. Kanlow frente a un estrés de tipo abiótico, como es el estrés hídrico. En cuanto al cv. Greenville, se observó expresión de *PR-5* pero no de *PR-2* frente a sequía. Estos resultados estarían en línea con estudios previos de nuestro laboratorio donde se observa expresión del gen *PR-2* sólo en el cv. Kanlow (Aimar *et al*, 2013). Estos resultados son novedosos en cuanto dan cuenta de la activación de una vía de respuesta dependiente de SA en una situación de estrés abiótico que, si bien se conoce en algunas especies vegetales, no ha sido informado en *Panicum virgatum* a la fecha.

Asimismo, se observó en nuestro trabajo que la expresión de *PR-2* y *PR-5* se reprime en una situación de déficit hídrico cuando las plantas de *Panicum virgatum* han sido pre-tratadas con ABA, sugiriendo que en esta situación la vía dependiente de SA no estaría activa. Estos resultados permiten pensar que la participación de ambas hormonas podría ser antagónica, y contribuye a responder a la hipótesis planteada en el presente proyecto, que investiga la existencia de una interacción entre ambas hormonas y la naturaleza (sinérgica o antagónica) de la misma. En la figura 17 se presenta un modelo conceptual de los resultados obtenidos en este trabajo.

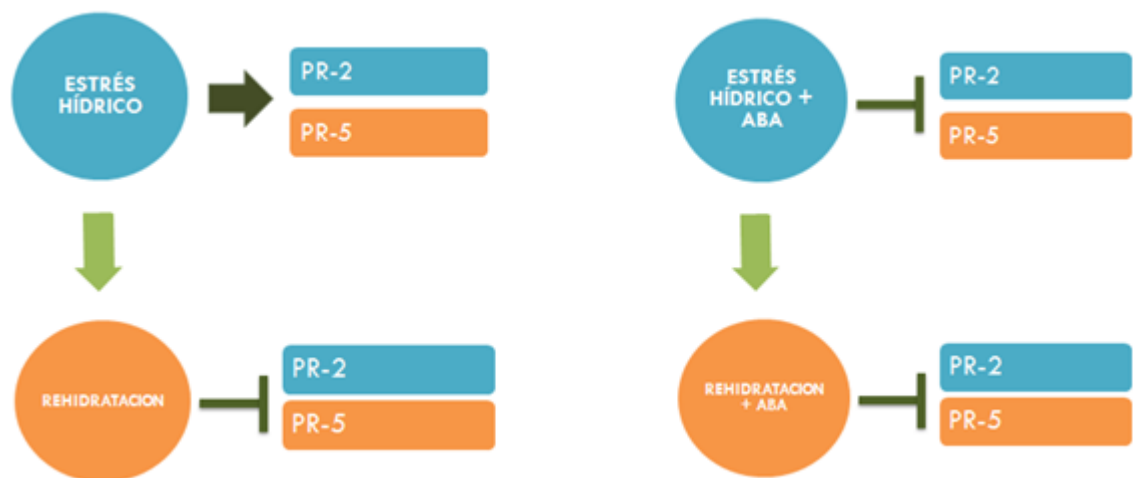


Figura 17: Modelo de los resultados obtenidos en nuestro trabajo. En situación de estrés hídrico, se activa la expresión de ambos genes PR2 y PR5, mientras que luego de un riego de rehidratación la expresión de ambos genes se reprime. Cuando se realiza una aplicación exógena con ABA a las plantas sometidas a estrés, los genes PR2 y PR5 no se expresan, lo mismo sucede cuando estas plantas son rehidratadas.

La expresión de los genes *PR-2* y *PR-5* frente a un estrés de tipo abiótico ha sido informada en varias especies de plantas. En *Arabidopsis*, la sequía indujo la expresión de *PR-1* y *PR-2*, sugiriendo que la acumulación de SA probablemente sea requerida para la tolerancia a sequía (Miura *et al.*, 2012). Plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés hídrico y salino mostraron alta expresión de los genes *PR-1* y *PR-5* dependientes de SA (Jakab *et al.* 2005). En línea con estos resultados, se ha observado la inducción de proteínas PR en situaciones de estrés hídrico y baja temperatura no solo en *Arabidopsis* sino también en algunos cereales de invierno (Griffith and Ewart, 1995; Yeh *et al.*, 2000; Griffith, M. and Yaish, 2004). En trigo, la expresión de *PR-5* fue inducida por injuria mecánica, bajas temperaturas y alta salinidad (Wang, *et al.*, 2010). En *Phillyrea angustifolia*, SA incrementó 5 veces su nivel durante el estrés por sequía, y también se activó la expresión de los genes *PR* (Munné Bosch and Peñuelas, 2003). La expresión de genes *PRs* dependientes de SA es un hecho que se ha comprobado en situaciones de estrés abiótico y la participación de SA en la respuesta de las plantas a estrés de tipo ambiental está hoy bien documentada (Horváth *et al.*, 2007, Khan *et al.*, 2015).

La expresión de genes *PR*-dependientes de SA con frecuencia se ve inhibida en presencia de ABA. En suspensiones celulares y explantos de hojas de tabaco, el agregado de 10 μ M de ABA reprimió la expresión de *PR2* (Rezzonico *et al.*, 1998). En *Arabidopsis*, se analizó el patrón de expresión de genes *PRs* ante un estrés abiótico, la aplicación exógena de ABA, y de SA. La expresión del gen *PR2* fue totalmente reprimida con la aplicación exógena de ABA (50 μ M) y fue inducida en presencia de SA 1mM (Seo *et al.*, 2008). En esta misma especie, Yasuda y col. (2008), trabajando con ABA y dos inductores químicos de SAR sobre plantas de *Arabidopsis* observo que ABA reprimió la expresión de *PR1*, *PR2* y *PR5* e inhibió la inducción de SAR.

La inhibición de la expresión de genes *PRs* dependientes de SA en presencia de altos contenidos de ABA da cuenta de una interacción antagónica entre ambas hormonas (Moeder *et al.* 2010, Seo *et al.*, 2008). En muchos casos ABA actúa como regulador negativo de la resistencia a las enfermedades (Cao *et al.*, 2011, Narusaka *et al.*, 2004, Yasuda *et al.*, 2008). Por ejemplo, se ha observado que mutantes de tomate deficientes en ABA (mutantes *sitiens*) presentan una resistencia a patógenos incrementada, mientras que la aplicación exógena de ABA restaura la susceptibilidad en dichos mutantes

(Audenaert *et al.*, 2002, Thaler and Bostock, 2004). Así, los mutantes *sitiens* tienen incrementada la respuesta mediada por SA, lo que sugiere que las altas concentraciones de ABA estarían inhibiendo la respuesta de defensa mediada por SA. Igualmente se ha reportado que el tratamiento con ABA suprime la inducción de la resistencia sistémica adquirida (SAR) frente a un estrés abiótico en *Arabidopsis*. El uso de diversos mutantes en combinación con inductores químicos de SAR, reveló que ABA suprime la inducción de SAR, inhibiendo la acción de SA aguas abajo. A la inversa, la activación de SAR suprimió la expresión de genes sensibles a ABA y relacionados a la biosíntesis de ABA, en el que la proteína NPR1 (Non-expressor of Pathogen Resistant 1) dependiente de SA parece contribuir. Por lo tanto, la interferencia antagónica se produce en varias etapas entre la señalización mediada por SA de la inducción de SAR y la señalización mediada por ABA de las respuestas de estrés ambiental (Yasuda *et al.*, 2008). Esta interacción antagónica entre la señalización mediada por ABA y la mediada por SA podría indicar que las plantas desarrollan estrategias produciendo simultáneamente proteínas involucradas en la vía de señalización y/o respuesta de ambas hormonas, poniendo a la planta ante la disyuntiva de activar diferentes vías (Anderson *et al.*, 2004). Dado que las reacciones de respuestas en ambas situaciones requieren una alta inversión energética para la expresión de genes y activación de vías metabólicas, se vuelve crítico regular la intensidad de estas respuestas para sobrevivir y multiplicarse (Heil *et al.*, 2000, Heil M, 2001; Tian *et al.*, 2003, Dietrich *et al.*, 2005).

En este contexto, tiene sentido que frente a una situación de estrés moderado y progresivo, como el generado en el experimento de nuestro trabajo, la planta articule una respuesta capaz de superar la restricción impuesta, minimizando el costo energético empleado. Es decir que tanto la duración del estrés, como su intensidad, estarían planteando un escenario que la planta debe identificar, y que debe sobrellevar, invirtiendo en una serie de reacciones metabólicas los mínimos recursos posibles. Frente a una situación como la planteada en el experimento, tanto las vía de respuesta de ABA como la de SA están activadas, en cuanto *RAB18*, *PR2* y *PR5* están expresados. Sin embargo, frente a la condición impuesta de pre-tratamiento con ABA, la vía dependiente de SA se inhibe. Esto podría sugerir que ante esta situación, la vía de respuesta dependiente de ABA predomine sobre la de SA de manera tal que ABA dirija el “operativo” de

recuperación frente al estrés, y que SA contribuya en menor medida, o incluso se inhiba por completo.

Finalmente, los aportes al conocimiento sobre la interacción ABA/SA en la respuesta a estrés hídrico y recuperación en *Panicum virgatum* (L.) son valiosos en cuanto esta especie pertenece a la familia *Poaceae*, que es la cuarta familia botánica con mayor número de especies, y comprende cultivos que alimentan aproximadamente a 60% de la población mundial en forma directa o indirecta. Dada la gran similitud que existe entre los genomas de los miembros de la familia de los cereales, el conocimiento adquirido en esta especie puede ser extrapolado al resto del grupo, hecho que pone de relieve los estudios realizados.

CONCLUSIONES

1- El cultivar Kanlow manifestó un mejor comportamiento en la regulación de su estado hídrico comparado con el cultivar Greenville frente al tratamiento de estrés impuesto mediante suspensión de riego. Estos resultados aportan al cuerpo de conocimiento que sostiene que los ecotipos de tierra bajas, al cual pertenece el cv. Kanlow, tienen mejor comportamiento en condiciones de estrés ambiental. Esto está en contraposición con la clasificación propuesta por Porter vigente en la actualidad.

2- El gen *RAB18* dependiente de ABA se comportó como un buen reportero frente a estrés hídrico en ambos cultivares (Greenville y Kanlow), validando su cualidad de gen marcador en *Panicum virgatum*. Esto confirma resultados de nuestro laboratorio y aportan información sobre *RAB18* en esta especie, no reportado hasta el momento.

3- La expresión del gen *RD22* no se correlacionó con los tratamientos de estrés hídrico y recuperación en ninguno de los dos cultivares, contrariamente a lo propuesto en la bibliografía para otras especies vegetales. Desde este punto de vista no se comporta como un buen gen reportero de estrés en *Panicum virgatum* en las condiciones ensayadas. Estos resultados son un aporte al conocimiento ya que no existen antecedentes sobre la expresión de este gen en la especie estudiada.

4- La expresión del gen *DREB2a* en las condiciones ensayadas no fue concluyente, debido a que su comportamiento no fue consistente en las réplicas biológicas evaluadas. Ante esta situación, se considera necesario profundizar los estudios para conocer mejor sobre su participación efectiva en respuesta a estrés hídrico como el planteado en este estudio.

5- La expresión de genes *PR5* y *PR2* (dependientes de SA) en plantas sometidas a estrés hídrico indica la activación de una respuesta mediada por esta hormona frente a una situación de restricción hídrica. Estos resultados son originales en cuanto éste es el primer reporte que informa sobre el comportamiento de *PR2* y *PR5* en *Panicum virgatum* ante una situación de estrés hídrico.

6. La disminución en los niveles de expresión de los genes *PR2* y *PR5* en plantas pre-tratadas con ABA podrían sugerir una interacción negativa entre las vías de respuestas gobernadas por ABA y por SA

BIBLIOGRAFIA

Abernethy GA, McManus MT. (1998). Biochemical responses to an imposed water deficit in mature leaf tissue of *Festuca arundinacea*. *Environ Exp Bot* ; 40:17e28.

Agarwal P, Agarwal PK, Joshi AJ, Sopory SK, Reddy MK. (2010). Overexpression of PgDREB2A transcription factor enhances abiotic stress tolerance and activates downstream stressresponsive genes. *Mol Biol Rep*; 37:1125e35.

Agarwal P.K. and Jha B. (2010). Transcription factors in Plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling. *Biologia Plantarum* ; 54 (2): 201-212.

Aiken G.E. y Springuer T.L. (1995). Seed size, germination and emergence of 6 switchgrass cultivars. *J. Range Manage.* 48:455-458.

Aimar D., Calafat M., Andrade A.M., Carassay L., Abdala G.I. and Molas M.L. (2011). Drought Tolerance and Stress Hormones: From Model Organisms to Forage Crops, Plants and Environment, Hemanth KN. Vasanthaiah and Devaiah Kambiranda (Ed.), ISBN: 978-953-307-779-6, InTech,

Aimar D. (2013) Estudios fisiológicos y genéticos de la tolerancia a estrés hídrico en *Panicum virgatum* L. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales Universidad Nacional de Río Cuarto. 1-110

Aimar D, Calafat M, Andrade A.M, Carassay, Bouteau F, Abdala G, Molas M.L. (2014). Drought effects on the early development stages of *Panicum virgatum* L.: Cultivar differences. *Biomass and Bioenergy.* 66: 49-59.

Anderson JP, et al. (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 16:3460e79.

Anderson E.K., Voigt T.V., Kim S., Lee D.K. (2014). Determining effects of sodicity and salinity on switchgrass and prairie cordgrass germination and plant growth. *Industrial Crops and Products* 64: 79–87.

Apel K., & Hirt. H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 50:373–399.

Asselbergh, B. et al. (2008) Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21,709–719

Audenaert, K., De Meyer, G.B. and Hofte, M.M. (2002) Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiol.* 128:491-501.

Bahrani M. J., Bahrami H. & Haghighi, A.A.K. (2010). Effect of water stress on ten forage grasses native or introduced to Iran. *Grassl. Sci.* 56: 1–5.

Bandurska H. and Stroinski A. (2005). The effect of salicylic acid on barley response to water deficit. *ACTA PHYSIOLOGIAE PLANTARUM.* 27. N° 3B: 379-386.

- Banzai T., Sumiya K., Hanagata N., Dubinsky Z. & Karube I.** (2002). Molecular cloning and characterization of genes encoding BURP domain-containing protein in the mangrove, *Bruguiera gymnorhiza*. *Trees – Struct Funct* 16, 87–93.
- Barney JN, Mann JJ, Kyser GB, et al.** (2009) Tolerance of switchgrass to extreme soil moisture stress: ecological implications. *Plant Sci.* 177(6):724–32.
- Barr, H.D. and Weatherley, P.E.** (1962). A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Aust. J. Biol. Sci.* 15:413-428.
- Barrero, J.M., Piqueras, P., Gonzalez-Guzman, M., Serrano, R., Rodriguez, P.L., Ponce, M.R., and Micol, J.L.** (2005). A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *J. Exp. Bot.* 56, 2071–2083.
- Black, C.C. and B. Osmond.** (2003). Crassulacean acid metabolism photosynthesis: "working the night shift". *Photosynth. Res.* 76, 329-341.
- Bray, E.A.** (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103, 1035-1040.
- Bray, E.A.** (1997). Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 2, 48-54.
- Bruce TJA, Matthes MC, Napier JA, Pickett JA.** (2007) Review stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. *Plant Sci* 173:603e8.
- Boominathan P, Shukla R, Kumar A, Manna D, Negi D, Verma PK, Chattopadhyay D.** (2004). Long term transcript accumulation during the development of dehydration adaptation in *Cicer arietinum*. *Plant Physiol.* 135, 1608–1620.
- Cao FY, Yoshioka K, Desveaux D** (2011) The roles of ABA in plant-pathogen interactions. *J Plant Res.* 124:489-99. Epub 2011 Mar 5.
- Carrera, J. P.** (2010). Evaluación de la producción de biomasa de dos cultivares de *Panicum virgatum* (L.) durante el período de implantación y el primer año de producción [en línea]. Trabajo final, Universidad Católica Argentina, Facultad de Ciencias Agrarias, Argentina. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/evaluacion-produccionbiomasa-panicum-virgatum.pdf>
- Casler MD, Vogel KP, Taliferro CM, Wynia RL** (2004) Latitudinal adaptation of switchgrass populations. *Crop Sci* 44:293–303.
- Casler M. D.** (2012). Switchgrass Breeding, Genetics, and Genomics. *Switchgrass, Green Energy and Technology*. London: A. Monti, Cap 2, pp. 29-48
- Chaves M.M., Maroco J.P. & Pereira J.S.** (2003). Understanding plant responses to drought-from genes to the whole plants. *Funct. Plant Biol* 30: 239-264.
- Chen J, Xia X, Yin W.** (2011). A poplar DRE-binding protein gene, PeDREB2L, is involved in regulation of defense response against abiotic stress. *Gene*; 483(1e2):36e42.
- Chow B. and McCourt P.** (2004). Hormone signalling from a developmental context. *J. Exp. Bot.* 55:247–51.

- Christmann A., Hoffmann T., Teplova I., Grill E. & Müller A.** (2005). Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed Arabidopsis. *Plant Physiol.* 137: 209–219.
- Covas, G.M. and Frecentese, M.** (1982). Tres pastos nativos con posibilidades de ser introducidos al cultivo para integrar pasturas perennes en La Pampa árida y semiárida. *Boletín del Centro Pampeano de Estudios en Ciencias Naturales y Agronómicas, Santa Rosa*, 4: 28-31.
- Cutler A.J. and Krochko J.E.** (1999). Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci.* 4: 472-478.
- DaCosta M. and Huang B.** (2009). Physiological adaptations of perennial grasses to drought stress. In: *Perspectives in biophysical plant ecophysiology*. E.D. Barrera and W.K. Smith, Editors, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 169–190. ISBN 987-0-578-00421-1.
- Danon, A., K. Apel y C. Laloi.**(2004). Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 323-328.
- De Smet I., Zhang H., Inze D. & Beeckman T.** (2006). A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends Plant Sci.* 11: 434–439.
- Delaney, T.P. Uknes, S. Vernooij, B. Friedrich, L. Weymann, K. Negrotto, D. Gaffney, T. Gut-Rella, M. Kessman H. Ward E. y J. Ryals.** (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science.* 266: 1247–1250.
- Dietrich O.** (2005). Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science*, Volume 10, Issue 9, Pages 444-449
- Ding Y, Fromm M, Avramova Z.** (2012) Multiple exposures to drought ‘train’ transcriptional responses in Arabidopsis. *Nat Commun*; 3:740.
- Ding Z., Li S., An X., Liu X., Qin H., Wang D.** (2009). Transgenic expression of MYB15 confers enhanced sensitivity to abscisic acid and improved drought tolerance in Arabidopsis thaliana. *J Genet Genomics.*36 (1):17-29.
- Duclos D.V., Altobello C.O., Taylor A.G.** (2014). Investigating seed dormancy in switchgrass (*Panicum virgatum* L.): Elucidating the effect of temperature regimes and plant hormones on embryo dormancy. *Industrial Crops and Products* 58: 148–159.
- Dure, III , L.**(1993). Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. Structural motifs in *Lea* proteins. *American Society of Plant Physiologists* pp. 91-103.
- Evers G.W. and Butler T.W.** (2000). Switchgrass establishment on coastal plain soil. In: *Proceeding of America Forage Grassland Council*. pp. 150–154.
- Ferri C.M.; Petruzzi H.J., Stritzler N.P. & Jouve V.V.** (1997). Consumo voluntario, digestibilidad in vivo y proteína bruta dietaria en distintas épocas de utilización de *Panicum coloratum* diferido. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 18(3-4): 163-170.
- Finkelstein R., Gampala S. & Rock C.** (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell.* 14: S15-S45.

- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K. & Shinozaki K.** (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: A current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 436-442.
- Fowler S, Thomashow MF.** (2002). Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *The Plant Cell* 14, 1675–1690.
- Gaffney, T. Friedrich, L. Vernooij, B. Negrotto, D. Nye, G. Uknes, S. Ward, E. Kessmann, H. y J. Ryals.** (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science.* 261: 754–756.
- Goh C.H., Nam H.G. & Park Y.S.** (2003). Stress memory in plants: A negative regulation of stomatal response and transient induction of RD22 gene to light in abscisic acid-entrained Arabidopsis plants. *Plant J.* 36: 240–255.
- Griffith M. and Ewart K.V.** (1995). Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. *Biotechnol Adv* 13: 375–402.
- Griffith, M. and Yaish, M.W.F.** (2004) Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends Plant Sci.* 9: 399–405.
- Hamada A.M.** (1998). Effects of exogenously added ascorbic acid, thiamin or aspirin on Photosynthesis and some related activities of drought-stressed wheat plants. In: *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Garab G. (Ed.). Vol. 4, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 2581-2584.
- Hamada A.M. and Al-Hakimi A.M.A.** (2001). Salicylic acid versus salinity-drought induced stress on wheat seedlings. *Rostl. Vyr.* 47: 444-450.
- Hamayun M., Afzal S. K., Shinwari Z. K., Khan A., Ahmad N. & Lee I.** (2010). Effect of polyethylene glycol induced drought stress on physio-hormonal attributes of soybean. *Pak. J. Bot.* 42(2): 977-986.
- Han R, Zhang Y, Tian H, Lu X.**(2008). Study on changes of endogenous hormones in the leaves of alfalfa under drought stress. *Acta Agric Bor Sin*;3:81e4
- Harb A, Krishnan A, Ambavaram MM, Pereira A.** (2010). Molecular and physiological analysis of drought stress in Arabidopsis reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiol* ;154:1254e71.
- Hayat Q., Hayat S., Irfan M. & Ahmad A.** (2010). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environ. Exp. Bot.* 8: 14-25.
- Heil M, Hilpert A, Kaiser W, Linsenmair KE.** (2000). Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? *Journal of Ecology*88: 645–654.

- Heil M.** (2001). The ecological concept of costs of induced systemic resistance (ISR). *European Journal of Plant Pathology* 107: 137–146.
- Hintz R.L., Harmoney K.R., Moore K.J., George J.R. & Brummer E.C.** (1998). Establishment of switchgrass and big bluestem in corn with atrazine. *Agron. J.* 90:591–596.
- Hirayama T. and Shinozaki K.** (2007). Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci.* 12: 343-351.
- Hohenstein W.G. and Wright L.L.** (1994). Biomass energy production in the United States: an overview. *Biomass Bioenergy.* 6: 161-73.
- Horváth E., Szalai G. & Janda T.** (2007). Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *J. Plant Growth Regul.* 26: 290-300.
- Hsu F.H. and Nelson C.J.** (1985). Relationships between germination tests and field emergence of perennial warm-season forage grasses. In: *Proceedings XV International Grassland Congress*, pp. 380-381. Kyoto, Japan, August 24–31, 1985.
- Hu G, Liu Y, Zhang X, Yao F, Huang Y, Ervin EH, et al.** (2015) Physiological Evaluation of Alkali-Salt Tolerance of Thirty Switchgrass (*Panicum virgatum*) Lines. *PLoS ONE* 10(7): e0125305.
- Huang D., Wu W., Abrams S.R. & Cutler A.J.** (2008). The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *J. Exp. Bot.* 11: 2991-3007.
- Huang G-T, Ma S-L, Bai L-P, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M, Guo Z-F.** (2011). Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Mol Biol Rep.* 39:969–987. [PubMed]
- Hwang, S.H. Lee, I.A. Yie, S.W. y D.J. Hwang.** (2008). Identification of an OsPR10a promoter region responsive to salicylic acid. *Planta.* 227: 1141–1150.
- Iqbal S, Bano A.** (2010) Effect of drought and abscisic acid application on the osmotic adjustment of four wheat cultivars. *J Chem Soc Pak;*32(1):13e9.
- Jakab G., Ton J., Flors V., Zimmerli L., Metraux J-P. & Mauch-Mani B.** (2005). Enhancing *Arabidopsis* salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiol.* 139: 267–27.
- Janda T., Szalai G., Tari I. & Páldi E.** (1999). Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* 208:175–180.
- Jiang, Y., Y. Yao, and Y. Wang.** 2012. Physiological Response, Cell Wall Components, and Gene Expression of Switchgrass under Short-Term Drought Stress and Recovery. *Crop Sci.* 52:2718-2727.
- Kang H.M. and Saltveit M.E.** (2002). Antioxidant Enzymes and DPPH-Radical Scavenging Activity in Chilled and Heat-Shocked Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings Radicles. *J Agric Food Chem.* 50:513-518.

- Kannangara T, Seetharama N, Durley RC, Simpson GM. (1983)** Drought resistance of Sorghum bicolor. 6. Changes in endogenous growth regulators of plants grown across an irrigation gradient. *Can J Plant Sci* 63(1):147e55.
- Khan MIR, Fatma M, Per TS, Anjum NA and Khan NA (2015)** Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Front. Plant Sci.* 6:462.
- Knight R.T., Staines W.R., Swick D., & Chao L.L. (1998).** Prefrontal cortex regulates inhibition and excitation in distributed neural networks. *Acta Psychologica.* 101, 159-178.
- Koga, H., Dohi, K., and Mori, M. (2005).** Abscisic acid and low temperatures suppress the whole plant-specific resistance reaction of rice plants to the infection of *Magnaporthe grisea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65: 3–9.
- Koch J.R., Creelman R.A., Eshita S.M., Seskar M., Mullet J.E. & Davis K.R. (2000).** Ozone sensitivity in hybrid poplar correlates with insensitivity to both salicylic acid and jasmonic acid: the role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiol.* 123: 487–496.
- Kogel, K.H. Beckhove, U. Dreschers, J. Münch, S. y Y. Rommé. (1994).** Acquired resistance in barley: the resistance mechanism induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance. *Plant Physiology.* 106: 1269–1277.
- Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M. (2004).** CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron*;42:961e72.
- Kumar, D. (2014).** Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Sci.*228,127–124.
- Lang V., Mantyla E., Welin B., Sundberg B. & Palva E.T. (1994).** Alterations in water status, endogenous abscisic acid content and expression of *rabZ8* gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 104: 1341-1349.
- Lata C. and Prasad M. (2011).** Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*,62, N°.14, 4731–4748.
- Liang Y., Mitchell D.M. & Harris J.M. (2007).** Abscisic acid rescues the root meristem defects of the *Medicago truncatula* *latd* mutant. *Dev Biol.* 304: 297–307.
- Liu HT, Liu YY, Pan QH, Yang HR, Zhan JC, Huang WD (2006)** Novel interrelationship between salicylic acid, abscisic acid, and PIP2 -specific phospholipase C in heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves. *J Exp Bot* 57:3337-3347
- Liu Q, et al. (1998).** Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain, separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*;10:1391e406.
- Liu WQ, Shi YC, Hu YJ, Liu QZ. (2007).** The tolerance to abiotic stresses mediated by DREB-like transcription factors in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Wuhan Botanical Research.*3:001.
- Liu W-X., Zhang F.C., Zhang W-Z., Song L-F., Wu W-H and Chen Y-F. (2013).** *Arabidopsis* Di19 Functions as a Transcription Factor and Modulates PR1, PR2, and PR5 Expression in Response to Drought Stress. *Molecular Plant*, 6 (5): 1487–1502

Liu Y, Wang Q, Zhang Y, Cui J, Chen G, et al. (2014) Synergistic and Antagonistic Effects of Salinity and pH on Germination in Switchgrass (*Panicum virgatum* L.). PLoS ONE 9(1): e85282.

Liu Y., Zhang X., et al. (2015). Assessment of drought tolerance of 49 switchgrass (*Panicum virgatum*) genotypes using physiological and morphological parameters. Biotechnology for Biofuels. 8:152.

Lüttge U. (2004). Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). Annals of Botany 93: 629-652.

MacDonald, K.L., and Cahill, D.M. (1999). Influence of abscisic acid and the abscisic acid biosynthesis inhibitor, norflurazon, on interactions between *Phytophthora sojae* and soybean (*Glycine max*). Eur. J. Plant Pathol. 60: 185–195.

Mantyla, E.; Lang, V.; Palva, E.T. (1995) Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation, and accumulation of LT178 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 107, 141-148.

Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2004). Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. The Plant Journal 38, 982–993.

Matsukura S, et al. (2010). Comprehensive analysis of rice DREB2- type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. Mol Genet Genom ;283:185e96.

Mauch-Mani, B. and Mauch, F. (2005) The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. Curr. Opin. Plant Biol. 8: 409–414.

McLaughlin S.B. y Kszos L.A. (2005). Development of switchgrass (*Panicum virgatum*) as a bioenergy feedstock in the United States. Biomass Bioenergy 28:515-538.

Melotto, M. et al. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. Cell 126, 969–980.

Miura K., Okamoto H., Okuma E., Shiba H., Kamada H., Hasegawa P.M. and Murata Y. (2012). SIZ1 deficiency causes reduced stomatal aperture and enhanced drought tolerance via controlling salicylic acid-induced accumulation of reactive oxygen species in *Arabidopsis*. The Plant Journal: 73, 91–104.

Moeder W., Ung H., Mosher S. and Yoshioka K. (2010). SA-ABA antagonism in defense responses. Plant Signaling & Behavior 5:10, 1231-1233.

Mohr, P.G. and Cahill, D.M. (2007) Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. tomato. Funct. Integr. Genomics 7, 181–191.

Molina A., Bueno P., Marín M.C., Rodríguez-Rosales M.P., Bolver A. & Venema K. (2002). Involvement of endogenous salicylic acid content, lipoxygenase and antioxidant enzyme activities in the response of tomato cell suspension cultures to NaCl. New Phytol. 156: 409–415.

Moreno Liz P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. Departamento de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. lpmorenof@unal.edu.com

Morris, S.W. Vernooij, B. Titatarn, S. Starrett, M. Thomas, S. Curtis, C.W. Frederiksen, R.A. Bhandhufalck, A. Hulbert, S. y S. Uknes. (1998). Induced resistance responses in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 11: 643–658.

Moser, L.E., and K.P.Vogel, (1995). Switchgrass, Big Bluestem, and Indiangrass. In: An introduction to grassland agriculture. R. F. Barnes, D. A. Miller and C.J. Nelson (eds.). Forages, 5th ed. Vol.1, Ames, IA:Iowa University Press, pp. 409-420.

Mosher Mosher S, Moeder W, Nishimura N, Jikumaru Y, Joo SH, Urquhart W, Klessig DF, Kim SK, Nambara E, Yoshioka K (2010) The lesion-mimic mutant *cpr22* shows alterations in abscisic acid signaling and abscisic acid insensitivity in a salicylic acid dependent manner. *Plant Physiol* 152:1901–1913

Munne-Bosch S. and Peñuelas J. (2003). Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta*. 217: 758–766.

Narusaka Y, et al. (2004). Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in Arabidopsis: analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. *Plant Mol Biol*. 55:327e42.

Nemeth M, Janda T, Horvath E, Paldi E, Szalai G. 2002. Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. *Plant Science* 162, 569–574.

Neves-Borges AC, Guimarães-Dias F, Cruz F, Oliveira Mesquita R, Lima Nepomuceno A, Romano E, Ehlers Loureiro M, Grossi-de-Sá MF y Alves-Ferreira M. (2012) Expression pattern of drought stress marker genes in soybean roots under two water deficit systems *Genet Mol Biol*.35: 212–221.

Newman P.R. y Moser L.E. (1988b). Seedling root development and morphology of cool-season and warm-season forage grasses. *Crop Sci*. 28:148–151.

Niu YD, Hu TM, Zhou YG, Hasi A. (2010). Isolation and characterization of two *Medicago falcata* AP2/EREBP family transcription factor cDNA, MfDREB1 and MfDREB1s. *Plant Physiol Biochem*. 48(12):971–6.

Parrish D.J. and Fike J.H. (2005). The Biology and Agronomy of Switchgrass for Biofuels. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 24:423–459.

Pellegrineschi A, Reynolds M, Pacheco M, Brito RM, Almeraya R, Yamaguchi-Shinozaki K, Hoisington D. (2004). Stress-induced expression in wheat of the Arabidopsis thaliana DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. *Genome*. 47:493–500.

Perales L., Arbona B., Gómez-Cadenas A., Cornejo M.J. & Sanz A. (2005). A relationship between tolerance to dehydration of rice lines and ability for ABA synthesis under stress. *Plant Physiol. Biochem*. 43: 786-792.

Petruzzi H.J., Castro M., Gonzalez H., Strizler N.P. & Ruiz M. (2005). Efecto de la fecha de cosecha y la fertilización sobre la producción de semilla de *Panicum virgatum*. Actas de la XIX Reunión de la Asociación latinoamericana de Producción Animal. pp 451-453.

Petruzzi H.J.; Orelia M. & Strizler N.P. (2010). Influencia de la fertilización nitrogenada y la fecha y frecuencia de cosecha sobre la producción de biomasa de pasto varilla (*Panicum virgatum* L). Boletín de divulgación técnica N° 100, ISSN 0325-2167/2010. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Porter C.L. (1966). An analysis of variation between upland and lowland switchgrass, *Panicum virgatum* L., in central Oklahoma. *Ecology*. 47:980–992.

Potters, G., T.P. Pasternak, Y. Guisez, K.J. Palme y M.A.K. Jansen. (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci.* 12(3), 99-105.

Qin F, et al. (2007). Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stress in *Zea mays* L. *Plant J*;50:54e9.

Rabbani MA, et al. (2003). Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol* ;133:1755e67.

Ramegowda V., Senthil-Kumar M., Ishiga Y., Kaundal A., Udayakumar M. and Mysore K.S. (2013). Drought Stress Acclimation Imparts Tolerance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Pseudomonas syringae* in *Nicotiana benthamiana*. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 9497-9513.

Ramegowda V and Senthil-Kumar M. (2015). The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination. *Journal of Plant Physiology* 176.47–54.

Rao M.V. and Davis R.D. (1999). Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanism in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant J.* 17: 603-614.

Raziuddin J., Bakht Swati Z.A., Shafi M., Farhat U. & Akmal M. (2010). Effect of cultivars and culture medium on callus formation and plant regeneration from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L). *Pak. J. Bot.* 42: 639-652.

Rezzonico, E., Flury, N., Meins, F. and Beffa, R. (1998) Transcriptional down-regulation by abscisic acid of pathogenesis-related b-1,3-glucanase genes in tobacco cell cultures. *Plant Physiol.* 117: 585–592.

Rivas-San Vicente M. and Plasencia J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J. Exp. Bot.* doi: 10.1093/jxb/err031.

Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner H-Y, Hunt MD, (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 1996,8:1809-1819.

Sánchez-Díaz M., Tapia C. & Antolín M.C. (2008). Abscisic acid and drought response of Canarian laurel forest tree species growing under controlled conditions. *Environ. Exp. Bot.* 64: 155-161.

- Sánchez G.R., Castro Mercado E., Beltran Peña E., Reyes de la Cruz H. y García Pineda E.** (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*, 12(2): 90 – 95.
- Sanchez E., Gil S., Azcon-Bieto J., Nogues S.** (2016). The response of *Arundo donax* L. (C3) and *Panicum virgatum* (C4) to different stresses. *Biomass and Bioenergy* 85: 335e345.
- Senaratana T., Touchell D, Bunn E., Dixon K.** (2000) .Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid in duce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regul.* 30: 157-161.
- Seo P.J., Lee A.K., Xiang F., and Park C.** (2008). Molecular and Functional Profiling of Arabidopsis Pathogenesis-Related Genes: Insights into Their Roles in Salt Response of Seed Germination. *Plant Cell Physiol.* 49(3): 334–344
- Shah, J.** (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology.* 6: 365–371.
- Shakirova F.M., Sakhabutdinova A.R., Bezrukova M.V., Fatkhutdinova R.A. & Fatkhutdinova D.R.** (2003). Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Sci.* 164: 317-322.
- Sharma N., Piscioneri I. and Pignatelli V.** (2003). An evaluation of biomass yield stability of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars. *Energy Conversion and Management*, 44 (18), pp. 2953-2958.
- Shao, H.B., L.Y. Chu, C.A. Jaleel y C.X. Zhao.** (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *C.R. Biol.* 331, 215-225.
- Shi Q. and Zhu Z.** (2008). Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environ. Exper. Bot.* 63: 317-326.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot.* 58:221–227.
- Smart A.J. and Moser L.E.** (1997). Morphological development of switchgrass as affected by planting date. *Agron. J.* 89:958-962.
- Stritzler N.P., Pagella J.H., Jouve V.V. & Ferri C.M.** (1996). Semi-arid warm-season grass yield and nutritive value in Argentina. *J. Range Manage.* 49:121-125.
- Stritzler N.P.** (2008) Producción y calidad nutritiva de especies forrajeras megatérmicas.. XXXIº Congreso Argentino de Producción Animal, Potrero de los Funes, San Luis.
- Szalai, G., Pál, M., and Janda, T.** (2011). Abscisic acid may alter the salicylic acid related abiotic stress response in maize. *Acta Biol. Szeged.* 55, 155–157.
- Taiz, L. and E. Zeiger.** (2006). *Plant Physiology*. 4th ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA .

- Tang MJ, Lü SY, Jing YX, Zhou XJ, Sun JW, Shen SH.** (2005). Isolation and identification of a cold-inducible gene encoding a putative DRE-binding transcription factor from *Festuca arundinacea*. *Plant Physiol Biochem.* 43(3):233–9.
- Tasgin E., Atici O., and Nalbantoglu B.** (2003), Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regul.* 41, 231-236.
- Teel A., Barnhart S. y Miller G.** (2003). Management Guide for the Production of Switchgrass for Biomass Fuel in Southern Iowa. Iowa State University Extension, Ames, IA.
- Thaler JS, Bostock RM** (2004) Interactions between abscisic acid mediated responses to osmotic stress and plant resistance to pathogens and insects. *Ecology* 85: 48–58
- Tian D, Traw MB, Chen JQ, Kreitman M, Bergelson J.** (2003). Fitness costs of R-gene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 423, 74–77.
- Thameur A, Ferchichi A, Lopez-Carbonell M.** (2011). Quantification of free and conjugated abscisic acid in five genotypes of barley (*Hordeum vulgare* L.) under water stress conditions. *J S Afr Bot*;77:222e8.
- Thomma Bart PHJ., Penninckx I.A., Broekaert W.F and Cammue B.P.A.** (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology*, 13:63–68
- Trewavas A.** (2005) Plant intelligence. *Naturwissenschaften.* 92:401–413. doi:10.1007/s00114-005-0014-9.
- Ton J., Flors V. and Mauch-Mani B.** (2009). The multifaceted role of ABA in disease Resistance. *Trends in Plant Science* Vol.14 No.6.
- Ton J., Jakab G., Toquin V., Flors V., Iavicoli A., Maeder N., JP Me´traux & e Mauch-Mania B.** (2005). Dissecting the b-Aminobutyric Acid-Induced Priming Phenomenon in *Arabidopsis*. *The Plant Cell.* 17: 987–999.
- Torres M.A., Jones J.D. & Dangl J.L.** (2005). Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 37: 1130–1134.
- Torres-Zabala, M. et al.** (2007) *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signaling pathway to cause disease. *EMBO J.* 26, 1434–1443.
- Umezawa t., Okamoto M. et al.** (2006). CYP707A3, a major ABA 8´-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 46, 171–182.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG** (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115
- Van Dam J., Faaij A.P.C., Hilbert J., Petruzzi H. & Turkenburg W.C.** (2009) Large-scale bioenergy production from soybeans and switchgrass in Argentina: part A. Potential and economic feasibility for national and international markets. *Ren Sust En Rev.* 13(8): 1710-33.

- Van Lon L.C.** (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103: 753–765.
- Van Loon L.C., Rep M., and Pieterse C.M.J.** (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:135–62.
- Vernooij, B. Friedrich, L. Goy, P.A. Saub, T. Kessmann, H. y J. Ryals.** (1995). 2,6-dichloroisonicotinic acid induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 8: 228–234.
- Veselov D.S., Sharipova G.V., Veselov S.U. & Kudoyarova G.R.** (2008). The effects of NaCl treatment on water relations, growth and ABA content in barley cultivars differing in drought tolerance. *J. Plant Growth Regul.* 27: 380-386.
- Vigliocco A., Bonamico B., Alemanno S., Miersch O. & Abdala G.** (2002). Stimulation de jasmonic acid production in *Zea Mays* L. infected by the maize rough dwarf virus – Río Cuarto. Reversion of symptoms by salicylic acid. *Biocell.* 26(3): 369-374.
- Vlot, A.C. Dempsey, D.A. y D.F. Klessig.** (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology.* 47: 177-206.
- Vogel KP** (2004). Switchgrass. In: Moser LE, Burson BL, Sollenberger LE (eds) Warm season (C4) grasses. ASA-CSSA-SSSA, Madison.
- Wang C, Yang A, Yin H, Zhang J.** (2008) Influence of water stress on endogenous hormone contents and cell damage of maize seedlings. *J Integr Plant Biol*;50:427e34.
- Wang X., Tanga Ch., Denga L., Cai G, Liu X., Liu B., Han Q., Buchenauer H., Weia G., Hana D., Huang L. nd Kang Z.** (2010). Characterization of a pathogenesis-related thaumatin-like protein gene TaPR5 from wheat induced by stripe rust fungus. *Physiologia Plantarum* 139: 27–38.
- Wang Q., Wu C., Xie B., Liu Y., Cui J., Chen G., Zhang Y.** (2012). Model analysing the antioxidant responses of leaves and roots of switchgrass to NaCl-salinity stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 58 :288-296
- Wani S.H., Kumar V., Shriram V., Sah S,J.**(2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *THE CROP JOURNAL* 4:162 – 176
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl Goy, P., Me´traux, J.P., and Ryals, J.A.** (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3: 1085–1094.
- Wasilewska A, et al.** (2008). An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Molecular Plant*; 1:198e217.
- White RF.** (1979) Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus. *Virology* 99 410-412.

Whenham, R.J., Fraser, R.S.S., Brown, L.P., Payne J.A. (1986). Tobacco mosaic virus-induced increase in abscisic acid concentration in tobacco leaves: intracellular location in light and dark green areas, and relationship to symptom development *Planta*, 168, pp. 592–598.

Xin ZY, Zhou X, Pilet PE. (1997). Level changes of jasmonic, abscisic and indole-3yl-acetic acids in maize under desiccation stress. *J Plant Physiol*;151:120e4.

Xiong YW, Fei SZ. (2006). Functional and phylogenetic analysis of a DREB/CBF-like gene in perennial ryegrass (*Lolium perenne L.*). *Planta*. 224(4):878–88.

Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1993). The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 238:17 25

Yasuda M, et al. (2008). Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*.20:1678e92.

Yasuda M., Ishikawa A., Jikumaru Y., Seki M., Umezawa, Asami T., Maruyama-Nakashita A., Kudo T., Shinozaki K., Yoshida S. and Nakashita H. (2008). Antagonistic Interaction between Systemic Acquired Resistance and the Abscisic Acid–Mediated Abiotic Stress Response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, Vol. 20: 1678–1692.

Yeh S., Moffatt B.A., Griffith M., Xiong F., Yang D.S., Wiseman S.B., Sarhan F., Danyluk J., Xue Y.Q., Hew CL, et al (2000). Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. *Plant Physiol* 124: 1251–1264.

Yoshida T., Mogami J. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2014). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 21: 133-139.

Yuan S. and Lin H. (2008) Role of Salicylic Acid in Plant Abiotic Stress. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen · <http://www.znaturforsch.com>

Zeevaart J.A.D. (1999). Abscisic acid metabolism and its regulation. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. (Eds.), Hooykaas P.J.J., Hall M.A., Libbenga K.R. Elsevier Science. ISBN 10: 0-444-89825-5 Amsterdam, The Netherlands, pp. 189–207.

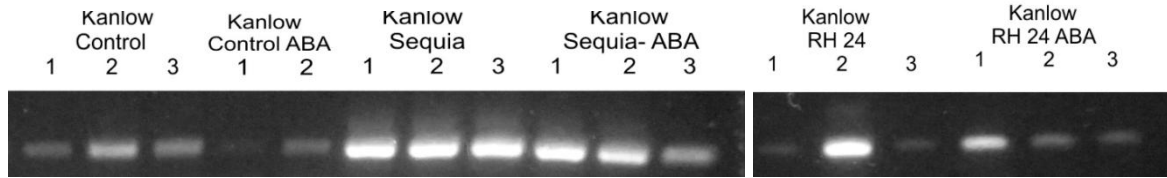
Zhu, J.K, K.S. Scumaker y L. Xiong. (2002). Cell signalling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14, 165-183.

Zuloaga F., Giussani L.M y Morrone O. (2007). *Hopia*, a new monotypic genus segregated from *Panicum* (*Poaceae*). *TAXON*. International Journal of Plant Taxonomy, Phylogeny and Evolution. Febrero, Vol. 56, pp. 145-156.

APENDICE

FIGURAS SUPLEMENTARIAS:

a)



b)

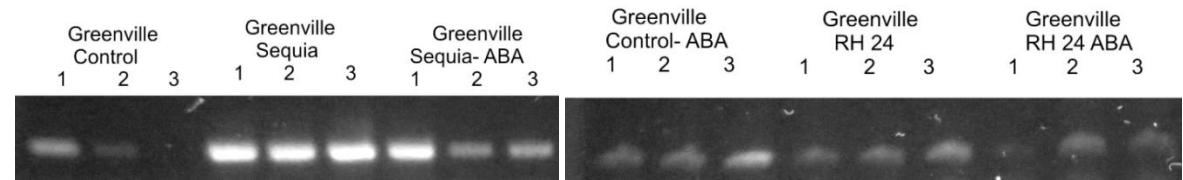
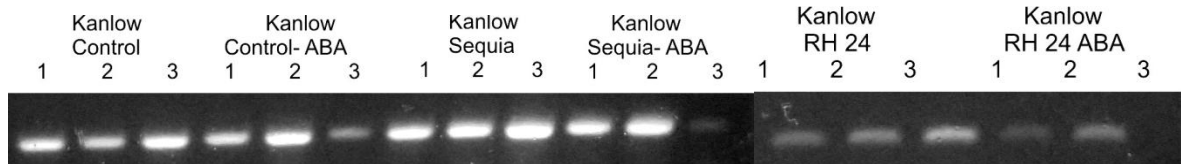


Fig. Supl I: a y b: Imágenes de geles de agarosa (1%) mostrando la expresión y la expresión del gen de interés (***RAB18***) en el cv. Kanlow (a). y en el cv. Greenville (b). Se presentan tres réplicas biológicas de cada tratamiento (1,2,3).

a)



b)

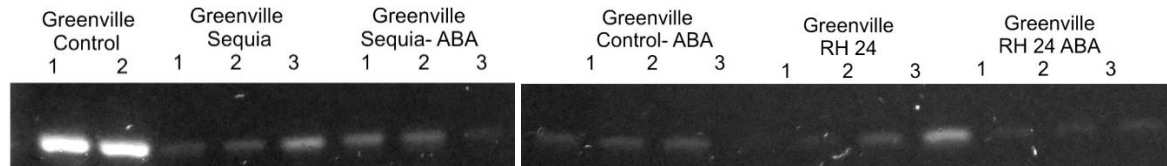
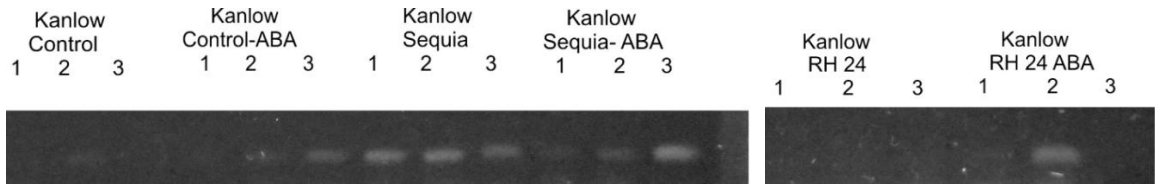


Fig. Supl II: a y b: Imágenes de geles de agarosa (1%) mostrando la expresión del gen de interés (***RD22***) en el cv. Kanlow (a) y en el cv. Greenville (b). Se presentan tres réplicas biológicas de cada tratamiento (1,2,3).

a)



b)

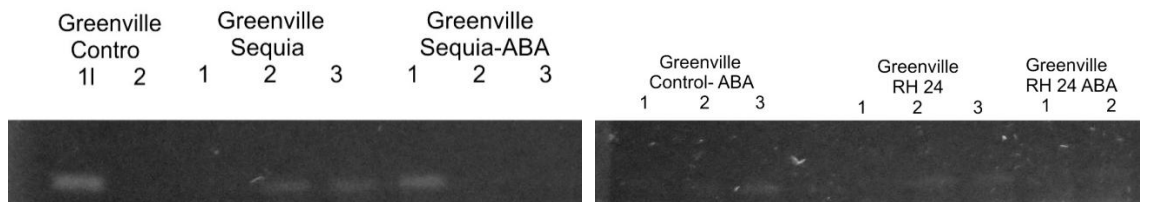
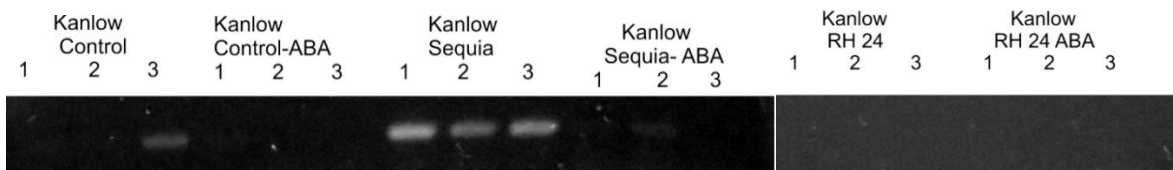


Fig.Supl III: a y b: Imágenes de geles de agarosa (1%) mostrando la expresión del gen de interés (***DREB2a***) en el cv. Kanlow (a) y en el cv. Greenville (b). Se presentan tres réplicas biológicas de cada tratamiento (1,2,3).

a)



b)

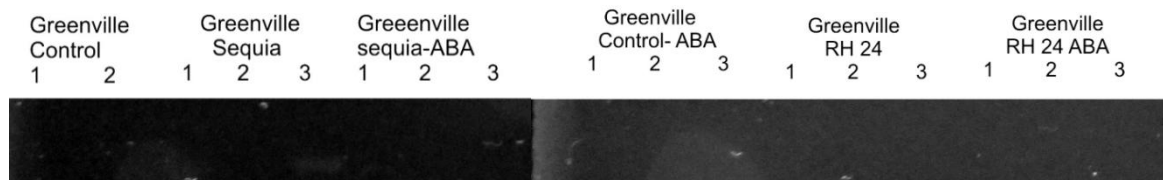
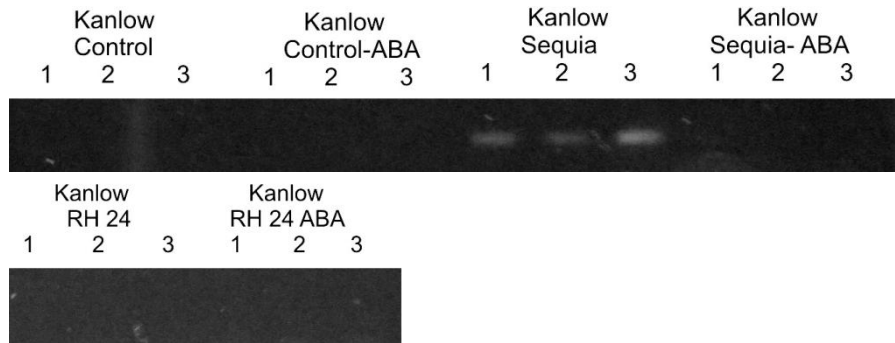


Fig.Supl IV: a y b: Imágenes de geles de agarosa (1%) mostrando la expresión del gen de interés (***PR-2***) en el cv. Kanlow (a) y en el cv. Greenville (b). Se presentan tres réplicas biológicas de cada tratamiento (1,2,3).

a)



b)

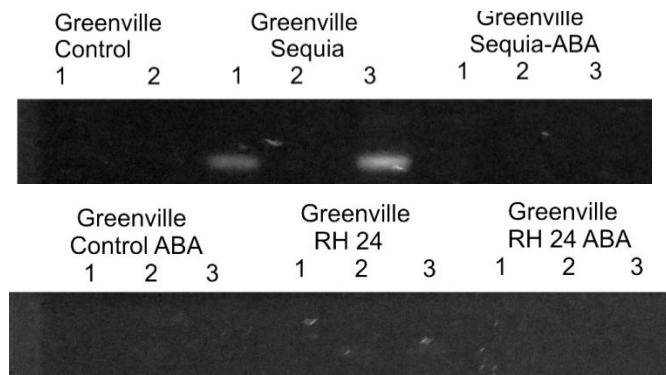


Fig.Supl V: a y b: Imágenes de geles de agarosa (1%) mostrando la expresión del gen de interés (**PR-5**) en el cv. Kanlow (a) y en el cv. Greenville (b). Se presentan tres réplicas biológicas de cada tratamiento (1,2,3).