



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

**Caracterización molecular de genes que otorgan tolerancia a estrés en
trigo (*Triticum aestivum*) mediante la aplicación de modernas técnicas de
biología molecular**

Tesis doctoral



Doctorando

Ing. Agr. María Silvia Tacaliti Terlera

Directora

Dra. Ana María Castro

Codirector

Dr. Juan Pedro Lirón

Defensa: 12 de diciembre de 2017.

ÍNDICE GENERAL

Índice de tablas	V
Índice de figuras	VII
Agradecimientos	XI
Resumen	XII
Abstract	XVI

INTRODUCCIÓN GENERAL

Generalidades del trigo	2
El cultivo del trigo en la Argentina. Distribución	2
Perspectivas a futuro del cultivo de trigo	3
Taxonomía del trigo	3
Breve descripción morfológica de la planta	4
El genoma del trigo	8
Generalidades acerca de los sistemas de defensa de las plantas	9
El concepto de la tolerancia de las plantas frente a insectos plaga	11
Del mejoramiento tradicional del trigo a la mejora asistida por marcadores moleculares	14
Marcadores microsatélites	15
Marcadores microsatélites en trigo pan	16
Microsatélites ubicados en el cromosoma 6A del trigo	18
Hipótesis	19
Objetivos generales	19
Objetivos particulares	19
Bibliografía	21

CAPÍTULO 1. Variación en el patrón de estearasas reveladas en la parte aérea y en raíces de plantas de trigo, sometidas a aplicaciones con ET, AJ, AS y ABA.

Introducción	30
Las estearasas como sistema isoenzimático	31
Materiales y métodos	33
Material vegetal	33
Tratamientos	33

Preparación de extractivos	34
Electroforesis	34
Cribado de estearasas	34
Análisis de las estearasas	35
Resultados	35
Discusión	40
Conclusiones	43
Bibliografía	44
<hr/>	
CAPÍTULO 2. Evaluación de la actividad peroxidasa y del contenido de ácido ascórbico en dos líneas de trigo.	
<hr/>	
Introducción	50
Moléculas antioxidantes	51
Materiales y métodos	56
Material vegetal	56
Tratamientos	57
Determinación del contenido de ácido ascórbico total y reducido por HPLC-MS	58
Determinación de la actividad peroxidasa mediante espectrofotometría	59
Resultados	59
Determinación del contenido de ácido ascórbico mediante HPLC-MS	62
Determinación de la actividad peroxidasa mediante espectrofotometría	62
Discusión	64
Conclusiones	64
Bibliografía	64
<hr/>	
CAPÍTULO 3. Estudio de la tolerancia a etileno de dos líneas progenitoras y sus descendientes F ₁ , F ₂ y F ₃ .	
<hr/>	
Introducción	71
Los mecanismos celulares y moleculares de la acción del etileno ET como hormona elicitada en condiciones de estrés	73
ET como hormona elicitada en condiciones de estrés	74
Materiales y métodos	75
Material vegetal empleado	75
Cruzamientos	75

Tratamientos	75
Manejo de las plantas	76
Selección de las plantas F_2 para la obtención de la filial F_3	77
Análisis estadístico	78
Resultados	78
Líneas progenitoras madre (M) y padre (P)	78
Primera filial (F_1)	80
Segunda filial (F_2)	81
Tercera filial (F_3)	83
Discusión	85
Conclusiones	88
Bibliografía	89
<hr/>	
<u>CAPÍTULO 4.</u> Estudio de la tolerancia al pulgón ruso en dos líneas progenitoras de trigo y en la descendencia F_1 y F_2 .	
<hr/>	
Introducción	95
Los áfidos	95
El pulgón ruso del trigo	95
Manejo de la plaga	101
Genética de la tolerancia/ resistencia al pulgón ruso	102
Materiales y métodos	104
Material vegetal	104
Los áfidos	105
Determinaciones realizadas	106
Resultados	109
Discusión	115
Conclusiones	119
Bibliografía	119
<hr/>	
<u>CAPÍTULO 5.</u> Estudio de la tolerancia al ácido jasmónico y al ácido abscísico en plantas F_3 .	
<hr/>	
Introducción	130
El ácido jasmónico	134
El ácido abscísico	136

Contenido de clorofila y tolerancia al estrés	137
Materiales y métodos	138
Material vegetal	138
Separación de macollos de las plantas F3	138
Tratamientos hormonales	139
Determinación del contenido de clorofila	139
Determinación del peso seco	140
Determinación de la altura del rebrote	140
Análisis estadístico	140
Correlación entre tratamientos y determinaciones	140
Resultados	141
Discusión	156
Conclusiones	159
Bibliografía	160
<hr/>	
<u>CAPÍTULO 6. Estudio de la expresión del gen <i>NAC2</i> en dos líneas de trigo tratadas con ABA, ET e infestadas con pulgón ruso del trigo</u>	
Introducción	166
PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	169
Materiales y métodos	171
Tratamientos	171
Extracción de ARN	172
Síntesis del ADNc mediante transcripción inversa	173
Determinación del gen candidato	173
Estudio de la expresión del gen <i>NAC2</i> mediante RT-qPCR	178
Normalización de resultados	180
Resultados	181
RT-qPCR	182
Discusión	188
Conclusiones	192
Bibliografía	192
<hr/>	
<u>CONCLUSIONES GENERALES</u>	199

ÍNDICE DE TABLAS

<u>CAPÍTULO 2.</u> Evaluación de la actividad peroxidasa y del contenido de ácido ascórbico en dos líneas de trigo.	
Tabla 1. Análisis de la varianza para el contenido de AA _T .	60
Tabla 2. Análisis de la varianza para el AA.	60
Tabla 3. Análisis de la varianza para la actividad peroxidasa.	62
<u>CAPÍTULO 3.</u> Estudio de la tolerancia a etileno de dos líneas progenitoras y sus descendientes F ₁ , F ₂ y F ₃ .	
Tabla 1. ANOVA para el crecimiento relativo de las líneas progenitoras, testigos y tratadas con ET	78
Tabla 2. Test de Tukey para el crecimiento relativo medio de ambos progenitores (M y P) y tratamientos (T y ET)	80
Tabla 3. ANOVA para el crecimiento relativo medio de las plantas F ₁ , testigos y tratadas con ET	80
Tabla 4. Clasificación de plantas F ₂ según su crecimiento relativo en respuesta al tratamiento con ET.	81
Tabla 5. ANOVA para el crecimiento relativo medio de las plantas F ₂ tratadas con etileno (ET)	82
Tabla 6. Clasificación de plantas F ₃ según su crecimiento relativo en respuesta al tratamiento con ET.	84
Tabla 7. ANOVA para el crecimiento relativo medio de las plantas F ₃ tratadas con ET	84
<u>CAPÍTULO 4.</u> Estudio de la tolerancia al pulgón ruso en dos líneas progenitoras de trigo y en la descendencia F ₁ y F ₂ .	
Tabla 1. Evaluación del daño provocado por el pulgón ruso sobre plantas infestadas	108
Tabla 2. ANOVA del contenido de clorofila en las líneas Synthetic, M, P, F ₁ y F ₂ .	109
Tabla 3. Contraste mediante el test de LSD para el contenido de clorofila (SAPD).	110
Tabla 4. ANOVA de la tasa de crecimiento en las líneas progenitoras y la F ₁	111
Tabla 5. Contraste mediante el test de LSD para la tasa de crecimiento	111
Tabla 6. Test de t para el estriado y enrollamiento de las hojas en plantas F ₁	112

Tabla 7. Correlación entre las determinaciones realizadas en plantas F ₁	113
Tabla 8. ANOVA de las determinaciones de área foliar, peso fresco y peso seco en plantas F ₂	114
Tabla 9. Contraste mediante el test de LSD para el peso fresco	114
<hr/>	
<u>CAPÍTULO 5.</u> Estudio de la tolerancia al ácido jasmónico y al ácido abscísico en plantas F ₃ .	
<hr/>	
Tabla 1. Análisis de la varianza del contenido de clorofila en las plantas F ₃	141
Tabla 2. Test de diferencias mínimas significativas (LSD) para el contenido de clorofila	142
Tabla 3. Análisis de la varianza del peso seco en las plantas F ₃	142
Tabla 4. Análisis de la varianza del rebrote post-corte en las plantas F ₃	143
Tabla 5. Test de diferencias mínimas significativas (LSD) para el rebrote post-corte	144
Tabla 6. Correlaciones entre el contenido de clorofila, peso seco y rebrote de plantas F ₃ tratadas y el crecimiento de sus progenitoras F ₂ tolerantes	145
Tabla 7. Correlaciones entre los contenidos de clorofila, peso seco y rebrote de plantas F ₃ tratadas y el crecimiento de sus progenitoras F ₂ susceptibles	145
Tabla 8. Correlación entre el contenido de clorofila en plantas F ₃ tratadas y testigos con la tasa de crecimiento de las progenitoras F ₂ , caracterizadas como tolerantes o susceptibles al ET	146
Tabla 9. Correlación entre el PS en plantas F ₃ tratadas y testigos con la tasa de crecimiento de las progenitoras F ₂ , caracterizadas como tolerantes o susceptibles al ET	146
Tabla 10. Correlación entre el rebrote post-corte en plantas F ₃ tratadas y testigos con la tasa de crecimiento de las progenitoras F ₂ , caracterizadas como tolerantes o susceptibles al ET	146
<hr/>	
<u>CAPÍTULO 6.</u> Estudio de la expresión del gen <i>NAC2</i> en dos líneas de trigo tratadas con ABA, ET e infestadas con pulgón ruso del trigo	
<hr/>	
Tabla 1. Características del <i>primer</i> utilizado para amplificar el gen candidato. Secuencia 5'-3', cantidad de bases, temperatura de fusión (T°m) y porcentaje de bases G-C (% GC)	179
Tabla 2. Concentración (ng/ µl) y relación de absorbancia 260/280 del ARN total por muestra.	182
Tabla 3. Ct promedio, coeficiente de variación (CV%) y diferencial de Ct de los tratamientos respecto de los testigos, para el gen control (18S) y el gen de interés (<i>NAC2</i>), en las líneas M y P.	184
Tabla 4. ANOVA de los tratamientos hormonales y con pulgón en la	187

línea M.

Tabla 5. ANOVA de los tratamientos hormonales y con pulgón en la línea P. 187

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN GENERAL

Figura 1. Subregiones trigueras de la Argentina	3
Figura 2. Raíces seminales, dos y tres días luego de la germinación de la semilla	4
Figura 3. Hoja del trigo: lámina, lígula, aurículas y vaina de la hoja. Detalle: aurículas pilosas	5
Figura 4. Detalle del macollaje en trigo	6
Figura 5. Espiga de trigo. A la derecha, detalle de una espiguilla	7
Figura 6. Detalle de las partes de la flor de trigo	7

CAPÍTULO 1. Variación en el patrón de estearasas reveladas en la parte aérea y en raíces de plantas de trigo, sometidas a aplicaciones con ET, AJ, AS y ABA.

Figura 1. Bandejas conteniendo las plantas sembradas en viales.	33
Figura 2. Electrofenotipos revelados en la parte aérea (a) y en la raíz (b) para las líneas DHR, CS y S6A. Ejemplo sobre un gel de algunos de los patrones revelados (c).	36
Figura 3. Estearasas reveladas en gel de poliacrilamida a partir de las líneas DHR número 32 (izquierda) y 33 (derecha), como ejemplo de distribución de las bandas.	37
Figura 4. Estearasas reveladas en gel de poliacrilamida a partir de las líneas CS (Chinese Spring) y S6A (Synthetic 6A).	39
Figura 5. Dendrograma de las 78 líneas DHR basado en la actividad estearasa para cada parte de la planta y tratamiento, según el método UPGMA.	40

CAPÍTULO 2. Evaluación de la actividad peroxidasa y del contenido de ácido ascórbico en dos líneas de trigo.

Figura 1. Ubicación de los marcadores microsatélites en el mapa de ligamiento del cromosoma 6AS de trigo.	57
Figura 2. Reacción de formación de purpurogalina a partir de pirogalol por acción de peroxidases	59

Figura 3. Correlación entre el contenido de ácido ascórbico (pM) y las unidades de área debajo del pico del cromatograma	60
Figura 4. Contenido de ácido ascórbico total (AA _T) y su forma reducida (AA) en las líneas M y P, para los tratamientos con pulgón (P), ABA, ET y sus testigos (T)	61
Figura 5. Salida del equipo de HPLC para la línea M tratada con ET. A- Contenido total de ácido ascórbico (AA _T). B- Contenido de ácido ascórbico reducido (AA)	61
Figura 6. Salida del equipo de HPLC para la línea P tratada con ET. A- Contenido total de ácido ascórbico (AA _T). B- Contenido de ácido ascórbico reducido (AA)	62

CAPÍTULO 3. Estudio de la tolerancia a etileno de dos líneas progenitoras y sus descendientes F₁, F₂ y F₃.

Figura 1. Medición de la altura de coleoptilo bajo luz roja	77
Figura 2. Estado de las plantas al momento del trasplante	77
Figura 3. Plantas establecidas en el umbráculo	77
Figura 4. Distribución del crecimiento relativo de la línea M, testigos (T) y tratadas con etileno (ET)	79
Figura 5. Distribución del crecimiento relativo de la línea P, testigos (T) y tratadas con etileno (ET)	79
Figura 6. Distribución por categorías según el crecimiento relativo de las plantas F ₁ tratadas con etileno (ET) y testigos (T)	81
Figura 7. Distribución por categorías según el crecimiento relativo de las plantas F ₂ tratadas con ET	82
Figura 8. Detalle de plantas F ₂ susceptibles, muertas	83
Figura 9. Distribución por categorías según las tasas de crecimiento en plantas F ₃ tratadas con ET	85

CAPÍTULO 4. Estudio de la tolerancia al pulgón ruso en dos líneas progenitoras de trigo y en la descendencia F₁ y F₂.

Figura 1. Hembra áptera de <i>Diuraphis noxia</i> .	97
Figura 2. Hembra áptera adulta (derecha) y ninfa (izquierda) de <i>Diuraphis noxia</i>	97

Figura 3. Macetas de cría de los áfidos sobre cebada susceptible	106
Figura 4. Detalle del estriado ocasionado por el pulgón ruso	107
Figura 5. Detalle del enrollamiento causado por el pulgón ruso	107
Figura 6. Distribución del contenido medio de clorofila por genotipo	110
Figura 7. Distribución de la tasa de crecimiento en las plantas F ₁ respecto de M y P.	111
Figura 8. Distribución del estriado en las hojas de las F ₁ infestadas con pulgón ruso, según una escala preestablecida (1: sin estriado; 6: máximo estriado)	112
Figura 9. Distribución del enrollamiento en las hojas de las F ₁ infestadas con pulgón ruso	113
Figura 10. Distribución de las plantas F ₂ según su peso fresco.	115
<hr/>	
<u>CAPÍTULO 5.</u> Estudio de la tolerancia al ácido jasmónico y al ácido abscísico en plantas F ₃ .	
<hr/>	
Figura 1. Bandejas conteniendo los macollos F ₃ tratados	139
Figura 2. Interacción entre los genotipos F ₃ y los tratamientos (T, AJ y ABA)	143
Figura 3. Diagrama de dispersión del contenido de clorofila de plantas F ₃ testigos, tratadas con AJ y con ABA, respecto de las plantas F ₂ progenitoras	147
Figura 4. Diagrama de dispersión del peso seco de plantas F ₃ testigos, tratadas con AJ y con ABA, respecto de las plantas F ₂ progenitoras	149
Figura 5. Diagrama de dispersión del rebrote post-corte de plantas F ₃ testigos, tratadas con AJ y con ABA, respecto de las plantas F ₂ progenitoras	150
Figura 6. Representación del contenido de clorofila (unidades Spad) por familia de plantas F ₃	151
Figura 7. Representación del peso seco por familia de plantas F ₃	152
Figura 8. Representación del rebrote post-corte por familia de plantas F ₃	153
Figura 9. Distribución de las plantas caracterizadas según el comportamiento ante los tratamientos hormonales, en comparación con el testigo	153
Figura 10. Dispersión del contenido de clorofila en la totalidad de las plantas F ₃ descendientes de una única planta F ₂ , para ambos tratamientos hormonales respecto del testigo y en comparación con las líneas M y P	155

Figura 11. Dispersión del peso seco (PS) en la totalidad de las plantas F ₃ descendientes de una planta F ₂ , para ambos tratamientos hormonales respecto del testigo y en comparación con las líneas M y P	155
---	-----

CAPÍTULO 6. Estudio de la expresión del gen NAC2 en dos líneas de trigo tratadas con ABA, ET e infestadas con pulgón ruso del trigo

Figura 1. Posibles diez juegos de <i>primers</i> que amplifican el gen NAC2.	176
Figura 2. Búsqueda de <i>primers</i> para amplificar el gen 18S ARNr en trigo.	177
Figura 3. Secuencia consenso de los genes NAC del cromosoma 6AS del trigo.	179
Figura 4. Curva de disociación del gen 18S. La totalidad de las muestras se observan por separado, una por línea graficada.	183
Figura 5. Curva de disociación del gen NAC2 para la totalidad de las muestras de cADN reunidas en un mix.	183
Figura 6. Curva de amplificación del gen NAC2 en la línea M, tratada con ET.	184
Figura 7. Curva estándar del Ct de los genes control (18S) y candidato (NAC2) respecto del contenido de cADN (expresado en forma logarítmica).	186
Figura 8. Expresión diferencial (R) del gen NAC2 en las líneas M y P sometidas a los tratamientos con ET, ABA, pulgones y en los testigos.	188

Agradecimientos

A la Dra. Ana Castro por su apoyo académico y personal en todas las etapas de mi formación, por su ayuda y gran generosidad. Por sus palabras de aliento ante las complicaciones del camino y por respetar mis elecciones aún sin compartirlas.

Al Dr. Juan Pedro Lirón por sus aportes y aliento constantes a lo largo de estos años, por hacer cambiar mi visión sobre las herramientas biotecnológicas y por hacer amenas mis jornadas de laboratorio.

A la Dra. Pilar Peral García por abrirme las puertas del IGEVET, por sus cálidas palabras de siempre. A los miembros del IGEVET por su inagotable paciencia.

A los Dres. Guillermo Bártoli y Gustavo Gergoff por su invaluable ayuda y total generosidad.

A la Dra. Sandra Sharry por apoyarme en el intento de cultivar in vitro mis plantas de trigo, por la total confianza depositada en mí.

A Érica Tocho por tantas alegrías y algunos desvelos compartidos, por su amistad y compañía durante más de la mitad de mi vida. A Daniel Giménez por su apoyo constante y sus palabras de aliento. A Marcos Yannicari, Carolina Sgarbi, Mariana Barragán, Mónica Collado, Francisco Ezquiaga y Luciana Saldúa por los buenos años compartidos en el laboratorio de la Cátedra de Genética. A Carla Valenzuela, Santiago Martínez, Nicolás Vera y muchísimos otros por tan gratos días de trabajo compartidos. A Mónica Ricci y Cecilia Margaría por la confianza y el abrazo afectuoso.

A mis amigos de hoy y de siempre por ser mi soporte afectivo, mi oasis. A Susana y Alberto por hacerme sentir en casa. A mi gran familia por compartir la vida. A Maia, Matías y Lautaro, personitas alegres imprescindibles.

A mis padres por ser mi modelo y por construir un hogar amoroso, por darme los elementos para discernir por qué cosas vale la pena luchar. Por el apoyo constante. A Ana y a Pablo por la vida juntos, por ser mis primeros amigos.

A Guillermo por ser mi compañero, un eterno optimista, por caminar a mi lado. A Santiago y Emilia por ser mi fuente de alegría, el verdadero motivo. Los tres inclinan la balanza hacia donde vale la pena. Los amo profundamente.

Resumen

El trigo es uno de los principales cultivos producidos y comercializados mundialmente. Ocupa el 17% de la superficie cultivable del mundo, participa en la alimentación del 40% de la población mundial y provee el 20% del total de calorías y proteínas en la nutrición humana. Se estima que para el año 2050, la producción de granos debería aumentar un 2% anual a fin de satisfacer las necesidades del hombre. Actualmente, se calcula que el cultivo de trigo sufre un 25% de pérdidas de producción debidas a factores bióticos como abióticos. En un contexto productivo en el que no se prevé un aumento significativo de la superficie destinada a la agricultura, resulta prioritaria la protección de este cultivo de importancia mundial y nacional ante los factores de estrés a los que se encuentra sometido.

El trigo hexaploide es uno de los genomas vegetales de mayor tamaño ya que contiene 15.966 Mb en total, superando así en 8 veces al del maíz y en 40 veces al del arroz. Se estima que cada genoma del trigo contiene entre 40.000 y 50.000 genes, aunque su complejidad radica en que más del 80% de su ADN consiste en secuencias repetidas, principalmente transposones y retro-transposones. A pesar de tener los cromosomas por triplicado, sus genes son específicos de cada cromosoma. Dada la gran complejidad de este genoma, la secuenciación completa del trigo no es aún pública.

Tanto los estreses abióticos como bióticos, desafían un amplio rango de respuestas propias de las plantas, desde la alteración de la expresión génica y cambios en el metabolismo celular, hasta modificaciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas, con la consiguiente variación en el rendimiento de los cultivos.

Las fitohormonas son responsables de activar los genes de defensa involucrados con eventos de estrés. Luego de que un organismo patógeno o un insecto genera un daño, la planta responde mediante el incremento de la síntesis endógena de ácido abscísico (ABA), giberelinas, etileno (ET), ácido jasmónico (AJ), ácido salicílico (AS), citocininas, brasinoesteroides y hormonas peptídicas, sustancias directamente relacionadas con la interacción planta-predador. Estas moléculas desempeñan un rol preponderante en la regulación de los mecanismos de resistencia. Ha sido probada la relación entre las

fitohormonas y las respuestas defensivas en las plantas, como así también la inducción de ciertos genes de respuesta luego de aplicaciones exógenas fitohormonales. Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a través de los cuales las plantas integran los cambios inducidos por estrés en los niveles hormonales e inician las respuestas adaptativas no están completamente elucidados.

El presente estudio trata de caracterizar molecularmente un segmento localizado en el brazo corto del cromosoma 6A de trigo pan (*Triticum aestivum*) involucrado con la tolerancia a áfidos. Para ello se trabajó cruzando dos líneas progenitoras (M y P) doble haploides recombinantes (DHR) seleccionadas por ser contrastantes para los marcadores *Xgwm334a* y *Xgwm459*, ambos ubicados en dicho segmento cromosómico. Se obtuvieron las generaciones subsiguientes para conocer si el efecto de los tratamientos se mantenía en la descendencia.

Las plantas fueron asperjadas con ET, AS, ABA y AJ así como también a través de infestaciones con el pulgón ruso del trigo (RWA), se inició la caracterización a nivel isoenzimática y a través de sus parámetros de crecimiento. Luego se estudió la expresión de un factor de transcripción (NAC2) como gen candidato en las líneas progenitoras tratadas, a fin de caracterizar un gen inducido por los tratamientos aplicados.

Los patrones de estearasas difirieron en el tejido aéreo o radical mediante la inducción con las fitohormonas ET, AS, ABA y AJ en las líneas DHR para el cromosoma 6A. El ET silenció las estearasas provenientes de la parte aérea del 58% de las líneas DHR.

En los cereales, la relación entre los niveles de actividad de los antioxidantes y la tolerancia al estrés ha sido establecida en plantas sometidas a estrés. Las líneas progenitoras evaluadas en este estudio (M y P) mostraron que los contenidos de ácido ascórbico (total y reducido) y de peroxidasas no fueron modificados cuando fueron tratadas con ET, ABA y mediante la infestación con el pulgón ruso del trigo. En conclusión, ambos sistemas antioxidantes no evidenciaron una actividad o contenido diferenciales respecto de los testigos sin tratar, y por lo tanto no constituyeron un buen indicador de tolerancia al estrés en los materiales ensayados.

Las dos líneas progenitoras (M y P), las F₁, las F₂ y un grupo selecto de plantas F₃ fueron caracterizadas por su grado de tolerancia/ susceptibilidad según la longitud del coleoptilo medida a las 24 h posteriores al tratamiento exógeno con ET. Dado que el efecto del ET sobre el crecimiento de las plantas se asocia con la restricción en la elongación de las células, y por ende con la inhibición de la elongación del hipocótilo, se pudo caracterizar a la línea M como tolerante y a la línea P como susceptible según la variación de la tasa de crecimiento del coleoptilo por efecto del ET. Las generaciones F₂ y F₃ mostraron diferencias altamente significativas en el crecimiento relativo de sus integrantes, según su caracterización como susceptibles, medias y tolerantes.

Con el propósito de conocer el comportamiento ante la acción del pulgón ruso de las líneas de trigo M, P y de sus descendientes F₁ y F₂, se pudo probar que la acción del insecto afectó diferencialmente los parámetros de crecimiento de estos genotipos. La inducción de las defensas de las plantas por efecto del pulgón ruso fue evidenciada a través de los cambios manifestados mediante el contenido de clorofila, la tasa de crecimiento, el peso fresco, el estriado y el enrollamiento de las hojas de las distintas generaciones filiales. Se observó que los genotipos tolerantes mostraron en todos los casos crecimiento compensatorio, aunque esto no se observó en los genotipos susceptibles. Por lo tanto, se comprueba que los genes responsables de crecimiento compensatorio son inducidos por la infestación con el pulgón ruso del trigo.

Un grupo de plantas F₃ (obtenidas a partir de la autofecundación de plantas F₂ seleccionadas por su crecimiento compensatorio o su inhibición, ante aplicaciones de ET) en estado de macollaje fue caracterizado de acuerdo a su crecimiento diferencial inducido por tratamientos exógenos con las hormonas AJ y ABA. A través de los cambios observados en el contenido de clorofila, en el peso seco y en el rebrote pos corte se pudo demostrar que las defensas fueron inducidas. Aquellas plantas que evidenciaron valores superiores al de sus testigos en estos parámetros serían las que lograron encender sus sistemas de defensa eficientemente, sobreponerse al mayor costo metabólico que implica el mantenimiento de dicho sistema y, en consecuencia, crecer diferencialmente. Finalmente, puede afirmarse que los genes responsables del crecimiento compensatorio fueron inducidos por la aplicación externa de las fitohormonas AJ y ABA.

Los genes NAC son específicos y muy abundantes en las plantas. Constituyen una de las mayores familias de factores de transcripción que funcionan en las regiones promotoras de diferentes genes relacionados con el estrés. Bajo condiciones de estrés biótico o abiótico, los genes relacionados con las defensas de las plantas presentan un patrón de expresión específico, de modo tal que su sobreexpresión o supresión pueden incrementar la tolerancia de las plantas a ambos tipos de estrés. Para las líneas progenitoras evaluadas, se observó que el tratamiento con ABA aumentó significativamente la expresión del gen *NAC2* en la línea M, mientras que el tratamiento con ET tuvo el mismo efecto en la línea P. Por el contrario, el ataque del pulgón no provoca mermas ni incrementos en la expresión del gen candidato, lo que estaría poniendo en evidencia la tolerancia de estas líneas al áfido.

La utilización de las defensas de las plantas en la mejora de los cultivos resulta promisoría desde el punto de vista ecológico. El hecho de comprender la naturaleza de la expresión de los genes relacionados con las características defensivas de las plantas será de importancia en el diseño de plantas cultivadas más tolerantes a los herbívoros, con la consecuente disminución de pesticidas tóxicos empleados normalmente para el control de las plagas en los cultivos.

Por último, la identificación del gen *NAC2* cercano a los microsatélites *Xgwm459* y *Xgwm334a* en el cromosoma 6AS del trigo permitirá su empleo como marcador altamente asociado en la obtención de plantas tolerantes al estrés.

Abstract

Wheat is among the leading crops worldwide. It represents 17% of the world arable land, is used for feeding 40% of the world's population, and provides 20% of the total calories and proteins necessary for human nutrition. The annual crop production will need to rise by 2% to satisfy human nutritional demands by the year 2050. Nowadays, wheat yield loss amounts arise to 25% due to a number of biotic and abiotic factors. Thus, the protection of wheat from stress factors, should be a priority, particularly in a productivity context where it is not expected to expand the areas of arable land.

Hexaploid wheat is one of the largest plant genomes (genome size, 15966 Mb), eight times larger than the maize and 40 times larger than rice genomes, respectively. The wheat genome has about 40000- 50000 genes; more than 80% of its DNA is formed by transposon and retro-transposon repeated sequences. Despite chromosomes are triplicate, genes are chromosome-specific. Due to its complexity, the complete wheat genome sequence is not presently available.

Abiotic and biotic stresses challenge a wide range of plant responses, from changes in gene expression and cell metabolism to changes in plant growth and development, with the consequent fluctuations in crop yield.

Phytohormones are responsible for the activation of the defense genes involved in stress events. After a pathogenic organism or an insect injury, the plant respond by the increase of the endogenous synthesis of abscisic acid (ABA), gibberellin, ethylene (ET), jasmonic acid (JA), salicylic acid (SA), cytokinin, brassinosteroids and peptide hormones. These molecules are directly involved in plant-predator interaction and play a key role in the regulation of resistance mechanisms. Although the relationship between phytohormones and plant defense responses as well as the induction of certain defense related genes after the exogenous application of phytohormones is well-known, the underlying molecular mechanisms whereby plants incorporate stress-induced changes in hormone levels and initiate adaptative responses are still unknown.

The present study is aimed at performing the molecular characterization of a segment located on the short arm of bread wheat (*Triticum aestivum*) chromosome 6A involved with the tolerance to aphids. It was crossed two

parental lines (M and P) double haploid recombinants (DHR) which were selected for their contrasting markers *Xgwm334a* and *Xgwm459*, both located on the mentioned chromosome segment. Subsequent generations were obtained to get to know whether tolerance to the different treatment effect was maintained in the progeny.

Plants subjected to ET, SA, ABA and JA spraying and infestation with russian wheat aphid (RWA) were assessed by their isoenzymatic profiles and by plant growth parameters. Then, the expression of NAC2 transcription factor as a candidate gene was also studied in treated progenitor lines and their controls, in order to characterize a gene induced by those treatments. The esterase patterns differed in aerial and root tissues by the induction with phytohormones ET, SA, ABA and JA in DHR lines of chromosome 6A. ET switched off aerial esterases in 58% of DHR lines.

In cereals, the relationship between changes in the levels of antioxidant activity and stress tolerance has been stated when plants were subjected under stress. Parental lines evaluated in this study (M and P) showed that total and reduced ascorbic acid and peroxidase content were not modified when treated with ET-, ABA- and RWA infestation. In conclusion, both antioxidant systems did not show a differential activity or content with respect to untreated controls, and therefore did not constitute a good indicator of stress tolerance in the assayed materials.

Both parental lines (M and P), F₁, F₂ and a select group of F₃ plants were assessed by their tolerance/ susceptibility according to coleoptile length measured 24 h after treatment with exogenous ET applications. Since the effect of ET on plant growth is associated with restrictions in cell elongation and therefore inhibition of hypocotyl length, line M was identified as tolerant and line P as susceptible according to variations in coleoptile growth. F₂ and F₃ generations showed significant differences in growth and were characterized as susceptible, medium and tolerant.

On the other hand, growth parameters of wheat lines M and P and their progeny F₁ and F₂ were affected differently by RWA. Thus, RWA-induced defense response were manifested by chlorophyll content, growth rate, fresh weight, and the presence of striated and rolled leaves of the different generations. Tolerant genotypes showed compensatory growth for all the

parameters but that was not observed in susceptible ones. We can therefore conclude that the genes responsible for compensatory growth are induced by infestation with RWA.

A group of F_3 tillers (obtained from inbred F_2 plants selected by their compensatory or inhibited growth after ET spreads) was characterized by their differential growth induced with exogenous JA and ABA treatment. The changes observed in chlorophyll content, dry weight and sprouting after cutting showed that the defense response was induced. Plants with higher values in the mentioned parameters than controls could switch on the defense system, overcome the higher metabolic cost needed to sustain the system and, consequently, grow differently. We can state that genes responsible for compensatory growth were induced by exogenous JA and ABA application.

Concerning gene expression, we studied *NAC2* because NAC genes are specific and abundant in plants. NAC are one of the main transcription factor families operating in gene promoting regions related with stress. Under abiotic or biotic stress conditions, plant defense genes have a specific expression pattern, so that their overexpression or suppression may enhance the plant tolerance to both stresses. In the case of the progenitor lines evaluated, we observed that whereas ABA treatment significantly increased *NAC2* gene expression in line M, ET treatment did so in line P. On the other hand, RWA did not elicit decreases or increases in the candidate gene expression, thus suggesting the tolerance of this parental line to the aphid.

Ecologically, the use of defense mechanisms in plants for crop improvement is promissory. Understanding the expression of genes related with the defense characteristics of plants would be important to select cultivated plants more tolerant to herbivores, with the consequent decrease of toxic pesticides normally used for pest management control.

Finally, the identification of *NAC2* gene next to microsatellites *Xgwm459* and *Xgwm334a* in wheat chromosome 6AS will enable its use as a highly associated marker in the obtainment of stress tolerant plants.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Contenido

<u>Generalidades del trigo</u>	2
<u>El cultivo del trigo en la Argentina. Distribución</u>	2
<u>Perspectivas a futuro del cultivo de trigo</u>	3
<u>Taxonomía del trigo</u>	3
<u>Breve descripción morfológica de la planta</u>	4
<u>El genoma del trigo</u>	8
<u>Generalidades acerca de los sistemas de defensa de las plantas</u>	9
<u>El concepto de la tolerancia de las plantas frente a insectos plaga</u>	11
<u>Del mejoramiento tradicional del trigo a la mejora asistida por marcadores moleculares</u>	14
<u>Marcadores microsatélites</u>	15
<u>Marcadores microsatélites en trigo pan</u>	16
<u>Microsatélites ubicados en el cromosoma 6A del trigo</u>	18
<u>Hipótesis</u>	19
<u>Objetivos generales</u>	19
<u>Objetivos particulares</u>	19
<u>Bibliografía</u>	21

Generalidades del trigo

El trigo es una de las primeras especies domesticadas por el hombre, hace aproximadamente 10.000 años (Evans *et al.*, 1983). Es una planta anual perteneciente a la familia de las Gramíneas, ampliamente cultivada en todo el mundo. Se asume que el centro de origen coincide con el Valle del Nilo o Medialuna Fértil, región que ocupa el norte de Siria, oeste de Irán, el valle de los ríos Tigris y Éufrates en el norte de Irak, sudeste de Turquía, el centro de Israel y Jordania (Feldman & Sears, 1981).

El trigo ocupa un 17% de la superficie cultivable del mundo, participa en la alimentación del 40% de la población mundial y provee el 20% del total de calorías y proteínas en la nutrición humana (Gupta *et al.*, 2008). Uno de los principales usos del trigo en la alimentación humana consiste en la elaboración de productos de panificación (*Triticum aestivum*) y de pasta (*Triticum durum*), si bien el 95% del trigo cultivado en el mundo corresponde a la primera especie (Schewry, 2009). La harina de trigo es preferida respecto de otras por sus aportes nutricionales; su composición está dada por almidón (65-75%), proteínas (12-14%), la mayoría de los aminoácidos esenciales, grasas (1,5-2%), minerales (1,5-2%), vitaminas del complejo B, vitamina E, vitamina K y fibras (2,2%) (Schewry, 2009).

El cultivo del trigo en la Argentina. Distribución

En la Argentina, el trigo es uno de los principales cereales cultivados. Siguiendo la tendencia mundial (Gupta *et al.*, 2008), en el país los stocks relativos de este cereal han ido disminuyendo de la mano de la tendencia decreciente de la superficie sembrada, muy marcada en los últimos ocho años. No obstante, los analistas auguran un buen futuro para el cultivo en la Argentina, tanto para la producción como para la superficie sembrada, así como también en el volumen de trigo destinado a la exportación (López, 2016).

El cultivo de trigo pan en Argentina se realiza en la zona comprendida entre los 30-40° de latitud sur y 57-68° de longitud oeste, región que se divide en nueve subregiones trigueras que abarcan desde el Noroeste y Noreste argentino hasta el sur de La Pampa y Buenos Aires (Figura 1). Estas subregiones tienen características agroecológicas diferenciales, lo que

condiciona los parámetros productivos y de calidad específicos de cada una de ellas.

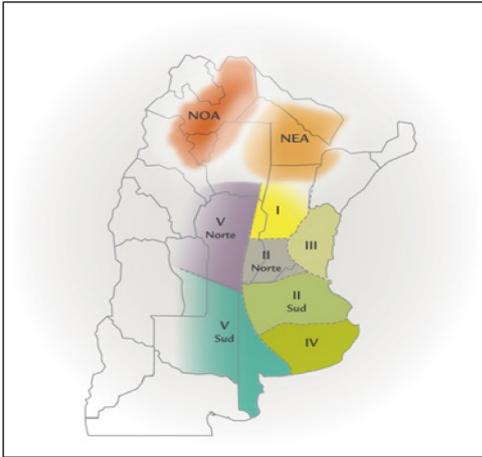


Figura 1. Subregiones trigueras de la Argentina.

(Fuente: Trigo argentino, <http://www.trigoargentino.com.ar>)

La cosecha de trigo en la campaña 2014/15 evidenció un incremento significativo en el área sembrada (5,04 millones ha) y en la producción (13,9 millones de tn), un incremento del 25% en relación al ciclo anterior. El rendimiento promedio nacional fue de 2.915 kg/ha (Trigo argentino, 2014-2015).

Perspectivas a futuro del cultivo de trigo

Se estima que para el año 2050, la producción de granos debería aumentar un 2% anual a fin de satisfacer las necesidades alimentarias del hombre. En un contexto productivo en el que no se prevé un aumento significativo de la superficie destinada a la agricultura, la protección del cultivo ante los factores de estrés biótico a los que se encuentra sometido se torna imprescindible (Gill *et al.*, 2004). Se calcula que el cultivo de trigo sufre un 25% de pérdidas de producción, debidas tanto a factores bióticos (plagas) como abióticos (altas temperaturas, heladas, sequía y salinidad).

En este marco, completar la secuenciación del genoma de trigo brindará información para acelerar la mejora genética del trigo. Además de garantizar mayor seguridad alimentaria, la secuenciación de dicha especie permitirá mejoras a nivel de la salud y de la nutrición humana (Gill, *et al.*, 2004).

Taxonomía del trigo

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Subfamilia: Pooideae

Tribu: Triticeae

Género: *Triticum* L.

Especie: *Triticum aestivum* L.

Breve descripción morfológica de la planta

El trigo es una planta anual, de hábito de crecimiento determinado. La altura de la planta varía entre 30 y 120 cm.

Las *raíces* son de dos tipos: seminales, las que emergen en la geminación (Figura 2) y las raíces nodales o adventicias, las cuales emergen de los nudos inferiores del tallo. Aproximadamente seis primordios de raíces están presentes en el embrión. Al iniciar la germinación, la raíz primaria emerge a través de la coleorriza, seguida luego por cuatro o cinco raíces laterales seminales. Así queda conformado el sistema radical, el cual puede expandirse hasta los 2 m de profundidad y tiene la función de sostener a la planta hasta que se desarrollen las raíces nodales. Dichas raíces nodales se originan desde el tercer al séptimo nudos basales, aunque las últimas (superiores) quizás no logran penetrar en el suelo y permanecen en forma de apéndices cortos que sobresalen del tallo. En la madurez, el sistema radical puede profundizar entre 1 y 2 m según las condiciones edáficas, aunque la mayoría de las raíces se ubican en los primeros 30 cm del suelo.



Figura 2. Raíces seminales, dos y tres días luego de la germinación de la semilla (Adaptado de Winfield)

El *tallo* está conformado por unidades repetitivas o *fitómeros*, cada uno de los cuales posee potencialmente un nudo, una hoja, un entrenudo elongado y una yema en la axila de la hoja. Cada una de estas unidades se repite entre seis y 16 veces para conformar así la parte vegetativa de cada tallo. El largo de los entrenudos se incrementa desde los basales hacia aquellos más distales, culminando en el pedúnculo de la espiga. El tallo termina en una *espiga* constituida aproximadamente por 20 espiguillas alternadas sobre un raquis. Los

trigos estudiados en la presente tesis tienen la particularidad de ser mútricos, o sea, carecen de aristas en sus flores.

Los *macollos* se originan de las axilas de las hojas basales y finalizan en una inflorescencia terminal. Su estructura es coincidente con la del tallo principal. A partir de la antesis, sólo algunos macollos sobreviven para producir una espiga. Las *hojas* se componen de una vaina cilíndrica y una lámina plana con una nervadura principal muy marcada, en cuya unión se ubican una lígula membranosa pequeña (1 a 2 cm) y un par de pequeñas aurículas pilosas (Figura 3). La vaina es tubular en la base y se abre en la proximidad de la lámina. Las hojas se alternan a derecha e izquierda en un plano respecto del tallo y se componen de lámina y vaina. La nomenclatura de las hojas seguida en la presente tesis corresponde con la identificación desde la base hacia la zona distal de la planta (la hoja bandera).



Figura 3. Hoja del trigo: lámina, lígula, aurículas y vaina de la hoja.
(Adaptado de Rawson, 2001).

Crecimiento y desarrollo

El trigo tiene la habilidad de macollar, o sea, de producir ramificaciones laterales. Al finalizar la fase vegetativa de desarrollo, la planta consiste en el tallo principal y un número de macollos (Figura 4). El número de macollos que se producen en una planta depende de numerosos factores, como la fecha de siembra, la nutrición mineral, la densidad de siembra, etc. Debido a la competencia por recursos como el agua y los nutrientes que tiene lugar entre los macollos, sólo algunos de ellos sobreviven y producen espigas. La emergencia de los macollos ocurre cuando la tercera hoja está completamente expandida y la cuarta está comenzando a hacerlo. Luego, los siguientes macollos aparecen secuencialmente cada tres hojas expandidas.

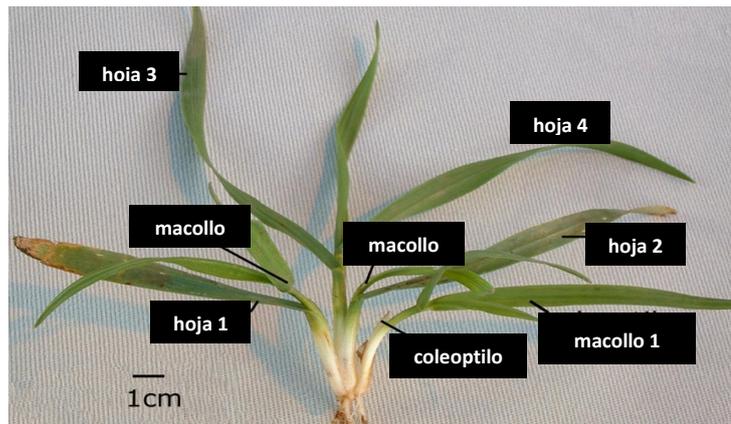


Figura 4. Detalle del macollaje en trigo (Adaptado de Winfield).

Floración, fertilización y formación del fruto

La espiga de trigo está conformada por un eje principal o raquis articulado que contiene una espiguilla por nudo (Figura 5). Al acercarse la floración, la espiga está completamente formada y los granos de polen y carpelos totalmente desarrollados. Luego de la antesis, las flores se abren, el polen se libera y poliniza a los carpelos. Una vez finalizada la polinización, los estambres mueren y se marchitan, mientras que los carpelos continúan desarrollando los granos.

A lo largo de la espiga se observa un gradiente de tamaño y de madurez, según el cual las espiguillas más avanzadas son las de la parte media de la espiga. Sin embargo, las condiciones de crecimiento limitan el completo desarrollo de las espiguillas ubicadas en ambos extremos de la espiga.

Cada espiguilla se compone por un eje o raquilla que sostiene dos glumas y numerosas flores, siendo entre dos y cuatro la cantidad de flores fértiles en cada espiguilla (a, b, c, d en Figura 5). Las flores están revestidas por dos estructuras, denominadas pálea (la interior) y lemma (la exterior), que envuelven a dos lodículas, tres estambres y un carpelo. Las flores basales son fértiles en general, pero las apicales pueden morir en el transcurso del desarrollo de la espiga.

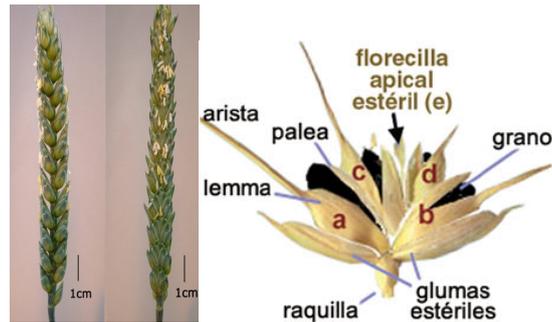


Figura 5. Espiga de trigo. A la derecha, detalle de una espiguilla (Adaptado de Rawson, 2001)

Cada estambre está formado por un filamento y una antera amarilla de 3 mm de longitud que contiene numerosos granos de polen esféricos. La parte basal del carpelo, el ovario, es blanco y de superficie suave excepto en su extremo, el cual se halla recubierto por numerosos pelos unicelulares (Figura 6). El ovario contiene un solo óvulo.



Figura 6. Detalle de las partes de la flor de trigo (Adaptado Kirby y Appleyard, 1987)

Mientras que la espiga se encuentra protegida por la hoja bandera, las partes de las flores están madurando. Cada espiguilla produce ocho a doce flores, aunque varias abortarán antes del inicio de la floración. La *floración o antesis* ocurre unos días después de que la espiga emerge a partir de la vaina de la hoja bandera, mediante la elevación de la espiga unos centímetros por encima de esta última hoja tanto en el tallo principal como en cada macollo. A continuación, se inicia la elongación de los filamentos estaminales entre seis y ocho veces desde su tamaño original. Simultáneamente aparecen dos poros en las anteras a partir de los cuales el polen será derramado sobre los estigmas receptivos del carpelo, con la colaboración de las lodículas en su rol de apartar la lemma de la pálea. Dos eventos de fertilización ocurren dentro del carpelo para originar al embrión (tejido diploide) y al endosperma (tejido triploide). Los siguientes diez días, el embrión crece rápidamente. Los granos se llenan en veinte días más y se secan en los siguientes treinta a cuarenta días.

El genoma del trigo

Según su número haploide, el trigo posee representantes diploides (2x), tetraploides (4x) y hexaploides (6x), en concordancia con las dos, cuatro o seis copias del genoma. Además, existen en la literatura citas de trigos octoploides y decaploides (Goncharov, 2011).

El trigo hexaploide ($2n = 6x = 42$) consiste en tres genomios (A, B y D) con un número básico (x) de 7 cromosomas cada uno. Los tres genomios surgen de eventos de poliploidización natural ocurrida hace 7000 años, que involucran a las especies *Triticum urartu* (donante del genomio A), una especie desconocida perteneciente a la sección *Sitopsis* (genomio B) y *Triticum tauschii* que aportó el genomio D, respectivamente (Feldman & Levy, 2005).

El trigo hexaploide es uno de los genomas vegetales de mayor tamaño ya que contiene 15.966 Mb (Mega bases) en total, superando así en 8 veces al del maíz y en 40 veces al del arroz (Arumuganathan & Earle, 1991). Se estima que cada genoma del trigo contiene entre 40.000 y 50.000 genes, aunque su complejidad radica en que más del 80% de su ADN consiste en secuencias repetidas, principalmente transposones y retrotransposones (Devos *et al.*, 2005; Wanjugi *et al.*, 2009; Safár *et al.*, 2010). Además, el mapeo realizado mediante líneas de delección ha permitido conocer que los genes no se distribuyen homogéneamente en los cromosomas, sino que se localizan principalmente en las zonas teloméricas (Qi *et al.*, 2004).

A pesar de tener los cromosomas por triplicado, sus genes son específicos de cada cromosoma y no se repiten en tres copias. Por ejemplo, los genes relativos a la resistencia a plagas como hongos (royas, mildews) e insectos (pulgón ruso, pulgón verde, mosca del trigo) se supone que están presentes en uno solo de los grupos homeólogos (Gill *et al.*, 2004). En consecuencia, la suposición de que cada gen se encuentra representado en al menos tres copias, pierde exactitud debido a la permanente recombinación entre cromosomas y a la presencia/ ausencia de retrotransposones, procesos que en conjunto son causales de la disminución de la sintenia entre genomas (Akhunov *et al.*, 2003) y de la elevada complejidad del mapeo de genes del trigo basado en la técnica de clonación (Qi *et al.*, 2004).

Generalidades acerca de los sistemas de defensa de las plantas

La antigua concepción que abordaba a los estreses biótico y abiótico de forma independiente (Anderson *et al.*, 2004), se ha ido reformulando en base al significativo solapamiento en las vías metabólicas de señalización de ambos tipos de estrés, como por ejemplo entre la tolerancia a estrés abiótico y la resistencia a enfermedades (Mauch-Mani & Mauch, 2005). En ambos casos, las respuestas inducidas por las plantas muestran un elevado grado de coordinación, demostrado por medio de la superposición de sets de genes que fueron activados ante ambos tipos de estrés (Cheong *et al.*, 2002; Fujita *et al.*, 2006).

A lo largo de su vida, las plantas están expuestas a varios factores de estrés biótico. Uno de los principales desafíos a los que se enfrentan es el ataque de insectos, cuyo principal daño consiste en la pérdida de la biomasa tanto aérea como subterránea (War *et al.*, 2011). Con la intención de explicar que plantas e insectos se comunican y que la emisión de químicos volátiles propicia esta relación, varios investigadores han llegado a asegurar que las plantas ‘hablan’ unas con otras, con los insectos herbívoros e inclusive con los predadores de dichos insectos (Leopold, 2014). El término ‘neurobiología’ de las plantas profundiza sobre la comunicación (Brenner *et al.*, 2006; Stahlberg *et al.*, 2006) un concepto que resulta controvertido si se tiene en cuenta que las plantas no poseen ‘nervios’ (Leopold, 2014).

A través de su larga co-evolución, estimada en 350 millones de años, plantas e insectos han desarrollado estrategias para evitarse mutuamente y evadir los sistemas de defensa recíprocos. Para contrarrestar el ataque de los herbívoros, las plantas se defienden a través de variados mecanismos, como son el desarrollo de estructuras morfológicas especializadas, la producción de metabolitos secundarios y proteínas con efectos tóxicos, repelentes y/o antinutricionales sobre los herbívoros, así como mediante la atracción de enemigos naturales de los insectos plaga (War *et al.*, 2011a y b).

A fin de completar su ciclo de vida en ambientes por naturaleza estresantes y adaptarse a muy diversas situaciones, las plantas han desarrollado sofisticados mecanismos que les permiten percibir señales del ambiente y modular su crecimiento y desarrollo (Yang *et al.*, 2013). La

adaptación bioquímica de las plantas involucra varios cambios a nivel celular, por ejemplo la evolución hacia nuevas vías metabólicas, la acumulación de metabolitos de bajo peso molecular, la síntesis de proteínas especiales, la ocurrencia de mecanismos de detoxificación y los cambios en los niveles de las hormonas vegetales (Kahn *et al.*, 2012).

Una planta se defiende mediante una combinación de **defensas** constitutivas e inducibles. Todas las defensas, ya sean expresadas constantemente o transitoriamente, son costosas metabólicamente (Staskawicz *et al.*, 1995; Baldwin & Preston, 1999). Aunque ambos sistemas son diferentes entre sí, las plantas son capaces de defenderse con una combinación de los dos sistemas. Según el objetivo y el intervalo de tiempo en que comienzan a actuar, las defensas se clasifican en:

1. Defensas constitutivas. Son aquellas que están presentes siempre y se deben a características morfológicas, estructurales, anatómicas y químicas. Por ejemplo, el hecho de que las cutículas estén recubiertas de cera, suberina o calosa las torna rígidas, impidiendo o dificultando el ingreso de patógenos o herbívoros a las células.

2. Defensas inducidas. Se activan luego de un daño sufrido por una planta. Se caracterizan por ser rápidas, dinámicas y por el importante rol de protección que ejercen ante próximos daños (Kessler & Baldwin, 2001). Las defensas inducidas se clasifican a su vez en:

- 2.1. Directas: a través de compuestos tóxicos o de características morfológicas, el agente atacante se ve directamente afectado (Zhao *et al.*, 2009; Usha Rani & Jyothsna, 2010). Las defensas directas incluyen barreras estructurales (como por ejemplo, durezas de un tejido, pubescencias, tricomas) o aleloquímicas (glucósidos cianogénicos, enzimas digestivas inhibitorias, lectinas, glucosinolatos, alcaloides, terpenoides, etc.) que exhiben efectos tóxicos, antialimentarios o repelentes para los insectos. Una recopilación sobre los numerosos estudios de defensas constitutivas e inducibles morfológica o químicamente, mediando en los mecanismos de antixenosis y antibiosis, puede apreciarse en Smith & Clement (2012).

2.2. Indirectas: se basa en la atracción de enemigos naturales de los insectos herbívoros que se encuentran infestando a una planta (Arimura *et al.*, 2009). Las defensas indirectas consisten en la liberación de compuestos orgánicos volátiles a partir de las plantas que han sido dañadas por artrópodos y que funcionan como atrayentes de predadores y parasitoides, o que repelen la oviposición de dichos artrópodos (Smith & Clement, 2012).

Las plantas activan sus sistemas de defensas como consecuencia del reconocimiento de **moléculas inductoras o elicitores** (Baker *et al.*, 1997), compuestos de bajo peso molecular capaces de producir una respuesta bioquímica o fisiológica de defensa de la planta (Kogel *et al.*, 1998). En el caso de la inducción de resistencia a insectos, las moléculas de ácido jasmónico, ácido salicílico, metil-jasmonato, metil-salicilato y etileno se constituyen en los principales elicitores (Bruinsma *et al.*, 2010; Scott *et al.*, 2010).

El concepto de la tolerancia de las plantas frente a insectos plaga

A pesar de que la capacidad de identificar plantas susceptibles a las plagas data de los primeros cultivos en el valle del Nilo, el mejoramiento basado en la selección de especies resistentes a los artrópodos sienta sus bases con posterioridad a los descubrimientos de Mendel y se afirma luego como campo de estudio con los trabajos de Painter (Smith & Clement, 2012).

La resistencia de las plantas a los insectos plaga se puede definir a través de tres mecanismos o categorías, definidos por Painter (1951):

- 1- Antixenosis o no preferencia: condición por medio de la cual una planta es menos apetecida que otra para la alimentación, reproducción o protección del insecto.
- 2- Tolerancia: es la capacidad de las plantas de soportar el ataque de una plaga sin que se afecten significativamente su calidad y rendimiento agronómico.
- 3- Antibiosis: la planta incide sobre la biología del insecto que se alimenta de ella, afecta así directa o indirectamente el potencial de reproducción del mismo.

Los tres tipos de resistencia pueden existir en una misma planta. Si dos o tres se hallan presentes, puede deberse a la acción de diferentes genes e inclusive a la expresión de un mismo gen con efecto pleiotrópico (actúa sobre más de un carácter). De no tratarse de dicho efecto pleiotrópico, estos tres mecanismos podrían acumularse en una misma planta mediante la pirimidización de los genes y lograr, en consecuencia, aumentar el grado de resistencia.

Posteriormente, Smith (2005) definió a la resistencia como el conjunto de características constitutivas genéticamente heredables que hacen que un cultivar o una especie resulte menos dañada que otra planta susceptible, carente de estas cualidades. Luego, algunos autores plantean como algo obsoletas las categorías definidas por Painter y, en algunos casos, imposibles de diferenciar. Por consiguiente se reemplazarían por un esquema dicotómico que divide a la tolerancia/ resistencia en constitutiva/ inducible y directa/ indirecta (Stout, 2013).

Por otro lado, se conoce al **crecimiento compensatorio** como la **expresión exacerbada del crecimiento frente al ataque de insectos**, por ejemplo pulgones. Este mayor crecimiento fue observado en líneas de trigo infestadas por *Schizaphis graminum* y *Diuraphis noxia*, compensación que se asume como mecanismo de tolerancia. Sin embargo, el crecimiento compensatorio como respuesta al ataque de pulgones puede conducir a un retraso en la cosecha (Castro *et al.*, 2001; van Emden & Harrington, 2007).

Recientes avances genéticos y moleculares en la comprensión de las respuestas ante el estrés redundaron en la identificación de numerosos loci simples y loci de efecto cuantitativo (QTLs), genes relacionados con la tolerancia al estrés (Cattivelli *et al.*, 2002). Más de 100 genes de resistencia monogénica y poligénica a los artrópodos fueron identificados, junto con los marcadores a los que se encuentran ligados, y localizados en los mapas moleculares de numerosas especies. Por medio de la mejora asistida por marcadores (MAS, del inglés *Marker Assisted Selection*) es posible rastrear la resistencia en líneas para desplegarla en cultivares comerciales (Smith & Clement, 2012).

La percepción del estrés en una parte de la planta puede causar el incremento de la resistencia en la totalidad de la planta (Pecinka & Mittelsten

Scheid, 2012), proceso denominado **resistencia sistémica adquirida**. Además, mediante **priming** la exposición a un estrés suave conlleva a respuestas más efectivas y rápidas ante subsecuentes tratamientos más severos. Ambos fenómenos pueden explicarse por efectos moleculares relativos a la percepción del estrés y por los componentes de señalización (Conrath, 2011), pero no hay evidencia de su transmisión a la siguiente generación.

Sin embargo, se sabe que las plantas pueden percibir el estrés durante el estado vegetativo y memorizarlo mediante **mecanismos epigenéticos**. Así, cambios epigenéticos inducidos por el medio ambiente pueden ser traspasados a la progenie (Mirouze & Paszkowski, 2011). La inducción de estados epigenéticos alternativos no sólo estimula la formación de nuevos epialelos, sino que promueve la movilidad de transposones de ADN y retrotransposones, elementos muy abundantes en los genomas vegetales (Mirouze & Paszkowski, 2011). Esto es de especial relevancia dado que la zona del cromosoma 6A de trigo que se estudia en la presente tesis corresponde a una zona muy rica en transposones, como es la zona telomérica (Devos *et al.*, 2005).

Algunos cambios en la cromatina son estables y se tornan independientes del inductor, originando, en casos extremos, epialelos heredables (Cubas *et al.*, 1999, Soppe *et al.* 2000, Manning *et al.*, 2006). Por lo tanto, es aceptada la idea de que el estrés induce modificaciones persistentes y heredables de la cromatina, las cuales redundan en cambios a nivel de la expresión génica y de las características fenotípicas (Pecinka & Mittelsten Scheid, 2012). En consecuencia, fenotipos nuevos inducidos epigenéticamente podrían incrementar la capacidad adaptativa de las plantas ante cambios medioambientales.

La obtención de plantas tolerantes, que activen sus defensas eficientemente, resulta promisorio desde el punto de vista ecológico. Comprender la naturaleza de la expresión de los genes relacionados con las características defensivas de las plantas será de importancia en el diseño de plantas cultivadas más tolerantes a los herbívoros, con la consecuente disminución de pesticidas tóxicos empleados normalmente para el control de las plagas en los cultivos. Sin embargo, la lucha entre plantas y herbívoros seguirá teniendo lugar y, además, estos últimos seguirán evolucionando y

desafiando a nuevos genotipos de plantas resistentes. Por lo tanto, para la optimización de la producción de los cultivos es imprescindible conocer profundamente las interacciones químicas que se dan entre ambos organismos (War *et al.*, 2011b).

Del mejoramiento tradicional del trigo a la mejora asistida por marcadores moleculares

El mejoramiento genético, junto con las herramientas propias de la tecnología agrícola, ha hecho notables progresos para incrementar los rendimientos de los cultivos por más de un siglo. Sin embargo, estos avances se encuentran constantemente expuestos a los numerosos cambios suscitados en los ambientes y en los organismos que lo habitan. Por ejemplo, hongos e insectos plaga logran evolucionar y superar la resistencia de la planta hospedante. En consecuencia, los mejoradores deben encarar continuamente el desarrollo de nuevas variedades (Evans, 1997; Collard & Mackill, 2008).

El mejoramiento genético tradicional en plantas es altamente dependiente de las condiciones ambientales y conlleva un largo tiempo de desarrollo. Básicamente, consiste en cruzar aquellas líneas deficientes en una o más características con otras que sí la/las poseen, para luego seleccionar las recombinantes buscadas entre la totalidad de una amplia descendencia segregante. Este laborioso proceso involucra numerosas generaciones de plantas, implica sucesivos ciclos de selección y cruzamiento, con un cierto grado de desarrollo artesanal e intuitivo. Esto ha motivado a los mejoradores a incluir nuevas tecnologías que permitan lograr mayor eficiencia en los procesos convencionales de mejora, basadas principalmente en el empleo de marcadores moleculares, siendo la selección asistida por marcadores una estrategia fundamental en el mejoramiento vegetal. Así, la tecnología basada en los marcadores de ADN se ha convertido en una herramienta que intenta superar varias de las dificultades relativas al mejoramiento convencional (Varshney *et al.*, 2007).

Los marcadores moleculares han sido extensamente utilizados en el armado de mapas moleculares saturados, tanto genéticos como físicos (Varshney *et al.*, 2007). Su asociación con genes o QTLs que controlan características de importancia económica han sido empleados en estudios de

selección asistida por marcadores (MAS, del inglés *Marker Assisted Selection*) (Koebner, 2004; Korzun, 2002). Asimismo, se utilizan en trabajos de introgresión por retrocruzamiento, diagnóstico genético, caracterización de individuos transformados, en estudios de la organización del genoma y en análisis filogenéticos (Varshney *et al.*, 2007).

En trigo, el mejoramiento ha tenido como objetivos principales acrecentar la calidad y favorecer su adaptabilidad a diversas condiciones ambientales. Tomando en consideración el hecho de que conocer la variabilidad genética de líneas elite adaptadas a distintos ambientes resulta fundamental (Salem *et al.*, 2008), numerosos investigadores han estudiado la diversidad genética de este cereal mediante el uso de variados marcadores moleculares (Röder *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1996; Bryan *et al.*, 1997; Paull *et al.*, 1998; Szucs *et al.*, 2000; Eujay *et al.*, 2002). Además de ser uno de los principales objetivos de la mejora la introgresión de uno o más genes favorables provenientes de un padre donante en el background de una variedad elite (Korzun *et al.*, 2007), el MAS implica conocer la localización de esos caracteres y sus alelos específicos.

Durante los últimos veinte años, los marcadores moleculares han sido utilizados en el estudio del genoma del trigo. Los primeros mapas físicos, construidos mediante la técnica de RFLP, permitieron ubicar loci en cada uno de los 21 cromosomas del trigo. Sin embargo, los microsatélites son los marcadores que propiciaron notables avances en la descripción del genoma del trigo hexaploide (Ganal & Röder, 2007).

Marcadores microsatélites

Actualmente, los microsatélites o secuencias simples repetitivas (SSR) son los marcadores moleculares más ampliamente empleados debido principalmente a que son ubicuos y abundantes en los genomas de animales y vegetales, incluyendo secuencias repetitivas o únicas (Wang *et al.*, 2007). Pueden ubicarse tanto en regiones codificantes del gen como en intrones, regiones 3' y 5' UTR (del inglés, *Untranslated Regions*, regiones no traducidas del gen). Aquellos SSR ubicados dentro de genes y que sufran una mutación, originarán cambios en el ADN sujetos posteriormente a mecanismos de reparación. Si estos cambios logran escapar a la corrección, se generan

nuevos alelos para los loci SSR involucrados, en concordancia con cambios en los productos génicos y, eventualmente, en el fenotipo. En definitiva, los SSRs localizados dentro de genes están sujetos a una mayor presión selectiva debido a su implicancia en la funcionalidad de la región y, consecuentemente, constituirían una base molecular de importancia para la adaptación a cambios ambientales, tanto en procariotas como en eucariotas (Li *et al.*, 2004).

Los SSR son regiones hipervariables del genoma que contienen arreglos de secuencias simples en tándem de mono, di, tri, tetra o pentanucleótidos que se repiten entre 10 y 100 veces (Litt & Luty, 1989). Su variabilidad se debe a la variación en el número de estas secuencias, fenómeno que ocurre por corrimientos durante la replicación o por crossing-over desbalanceados (Hancock, 1999). El elevado nivel de polimorfismo propio de los microsatélites constituye una de sus cualidades destacables respecto de otros marcadores (Russell *et al.*, 1997; Shariflou *et al.*, 2001). Suelen ser monolocus y mostrar herencia de tipo mendeliana. La metodología de trabajo con los microsatélites es relativamente sencilla y posee un alto grado de automatización (Shariflou *et al.*, 2001), son altamente informativos y su costo (por genotipo y por primer) es relativamente bajo. Estas características, junto con la posibilidad de analizar varios microsatélites en un elevado número de plantas, los convierte en los marcadores predilectos para la selección asistida y el mapeo en programas de mejoramiento genético (Koebner & Summers, 2003).

Marcadores microsatélites en trigo pan

En el trigo pan, el uso de marcadores moleculares se ha extendido gracias a los primeros marcadores SSR descritos en esta especie (Devos *et al.*, 1995; Röder *et al.*, 1995; Bryan *et al.*, 1997). El alto grado de polimorfismo encontrado mediante el empleo de marcadores microsatélites (Plaschke *et al.*, 1995; Röder *et al.*, 1995; Bryan *et al.*, 1997) permitió considerar a los SSR como una excelente herramienta de mapeo genético, también en el caso del trigo (Korzun *et al.*, 1997a, 1999; Röder *et al.*, 1998; Somers *et al.*, 2004; Ijaz, 2011). Se utilizan además para establecer la autenticidad de líneas de sustitución intervarietales desarrolladas mediante citogenética (Korzun *et al.*, 1997b), en el estudio de la diversidad genética de trigo y las especies relacionadas (Plaschke *et al.*, 1995; Fahima *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2005), para clarificar la diversidad genética entre variedades (Islam *et al.*, 2012) y la historia

evolutiva de genes simples en trigo pan (Worland *et al.*, 1998; Hammer *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004). El uso de este tipo de marcadores en bancos de germoplasma es también muy frecuente (Börner *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2002; Khlestkina *et al.*, 2004), como por ejemplo para el estudio de la diversidad alélica en la conservación de germoplasmas antiguos (Börner *et al.*, 2012). Además, se emplean en estudios sobre resistencia a plagas y enfermedades del trigo, por ejemplo en la búsqueda de genes de resistencia a roya en varios genotipos de trigo (Sehgal *et al.*, 2012).

Los EST- SSR (del inglés *Expressed Sequence Tags*, etiquetas de las secuencias expresadas) constituyen una variante de los microsatélites que resultan de gran utilidad al basarse en secuencias del ADN que se expresan indefectiblemente. Al encontrarse físicamente asociados con regiones codificantes en el genoma, permiten acrecentar la utilidad de los marcadores genéticos en la evaluación de transcritos y genes de función conocida que se desea analizar (Holton *et al.*, 2002). El potencial de los marcadores EST como fuente de microsatélites fue demostrada para numerosas especies, como en vid, trigo, *Arabidopsis*, soja, arroz, maíz, cebada y sorgo (Scott *et al.*, 2000; Holton *et al.*, 2002; Kantety *et al.*, 2002; Morgante *et al.*, 2002). A diferencia de los SSRs, que frecuentemente no pueden transferirse entre especies relacionadas, los marcadores EST-SSRs demuestran un alto nivel de transferencia (Holton *et al.*, 2002). Por lo tanto, cualquier polimorfismo detectado usando EST-SSRs (eSSR) debería reflejar la estrecha relación existente entre especies o variedades.

Dentro de la tribu Tritíceas, este tipo de marcador puede ser muy útil en estudios filogenéticos debido a que las secuencias codificantes están conservadas entre las copias homeólogas del trigo, incluso si están rodeando un microsatélite localizado dentro de un gen (Zhang *et al.*, 2006). Nicot *et al.* (2004) observan un solo locus mapeado para el 89% de los EST-SSRs estudiados en una población de trigo, quizás debido a la ausencia de polimorfismos en los otros dos loci o a la especificidad de los primers diseñados. Sin embargo, la modificación de unas pocas bases o incluso de los juegos de primers, llevaría a la amplificación del segmento en los tres loci homeólogos. Wang *et al.* (2007) plantean el uso de marcadores EST-SSR para el genotipado molecular de colecciones de germoplasma de *Triticum durum* L.

mediante el monitoreo constante del pool génico elite, identificando así 87 alelos eSSR mayoritariamente en el genomio B.

La evaluación de un germoplasma mediante SSRs derivados de regiones EST intensifica el rol de los marcadores genéticos en el análisis de las variaciones en genes transcritos y de función conocida. El número de ESTs reportados en los cereales ha aumentado considerablemente durante los últimos años, siendo actualmente de dominio público más de 1 millón de estas secuencias en trigo disponibles en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>).

Microsatélites ubicados en el cromosoma 6A del trigo

En un estudio que combinó marcadores SSR y gliadinas, ambos sistemas muy concordantes para la identificación de genotipos, se encontró que los loci ubicados en el cromosoma 6A del trigo resultaron ser los más polimórficos al analizar la variabilidad en una colección de einkorn cultivado (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*) (Ruiz *et al.*, 2007).

La denominación de los microsatélites se refiere a su procedencia, específicamente los Xgwm (*Gatersleben wheat microsatellite*) fueron obtenidos en el Leibniz Instituto de Genética de Plantas (IPK) de Gatersleben, sobre los cromosomas del trigo. En dicho laboratorio se identificaron más de 1.000 marcadores SSR derivados de clones generados a partir de una copia de secuencia única, mediante la hipometilación de regiones (Ganal & Röder, 2007).

Dos QTLs que explican la resistencia antixenótica ante el pulgón verde fueron mapeados en el brazo corto del cromosoma 6A, región en la que también asociaron otros QTLs que explicaron la variación de peso seco aéreo, peso seco de raíces y área foliar, ante la aplicación exógena de las fitohormonas ET, ABA, AS y AJ (Castro *et al.*, 2008). Se asume que en dicha región cromosómica (mapa de Röder *et al.*, 1998), y más específicamente en el intervalo comprendido por los marcadores Xgwm459 y Xgwm334a en el cromosoma 6AS, se ubica algún/ algunos genes de similar o idéntica función (Castro *et al.*, 2008). Se ha encontrado, además, otro QTL relativo al rendimiento en condiciones de sequía en el cromosoma 6A (Snape *et al.*, 2007), en otra población de trigo. Por lo tanto, existiría una intrínseca relación

entre los estreses bióticos y abióticos y con la síntesis de las fitohormonas (Quarrie *et al.*, 1994; Cattivelli *et al.*, 2002).

De acuerdo a lo desarrollado se proponen las siguientes

Hipótesis

1. Los genes que aportan al crecimiento compensatorio son inducibles por tratamientos exógenos con fitohormonas.
2. Los genes que aportan al crecimiento compensatorio bajo infestación se ubican en las mismas regiones cromosómicas que aquellos genes que son elicitados por hormonas, siendo activados por estos.
3. Los genes que aportan al crecimiento compensatorio pueden ser mapeados y secuenciados.

Para poder probarlas se plantean los siguientes

Objetivos generales

1. Caracterizar los genes que son inducidos por tratamientos exógenos de hormonas y otorgan crecimiento compensatorio, evaluando los genes ubicados en las regiones flanqueadas por los marcadores *Xgwm459* y *Xgwm334a* en el brazo corto del cromosoma 6A de *Triticum aestivum*.
2. Caracterizar los genes que otorgan tolerancia a áfidos analizando los genes ubicados en las regiones flanqueadas por los marcadores *Xgwm459* y *Xgwm334a* en el brazo corto del cromosoma 6A de *Triticum aestivum*.
3. Conocer la expresión del/ de los gen/ genes que son inducidos por tratamientos exógenos hormonales y por la infestación con el pulgón ruso del trigo.

Objetivos particulares

Con el propósito de probar la Hipótesis 1, alcanzar el objetivo general 1 y dar respuesta a la pregunta: ***los genes responsables del crecimiento compensatorio ¿son inducidos por la aplicación exógena de fitohormonas?***, se detallan los siguientes objetivos particulares:

1.1. Caracterizar a un grupo de líneas doble haploides recombinantes (DHR) a nivel de **proteínas isoenzimáticas**. Se identificarán los patrones de estearasas revelados en las líneas DHR para el cromosoma 6A de trigo, luego de haber sido asperjadas con ET, ABA, AJ y AS, como así también posibles diferencias en las isoformas halladas en la parte aérea y en las raíces de las plantas evaluadas (Se desarrolla en el CAPÍTULO 1).

1.2. Estudiar la **actividad antioxidante** a través de las determinaciones de ácido ascórbico y peroxidasas de las plantas asperjadas exógenamente con las hormonas involucradas en las vías de señalización post- inducción de las defensas de la planta (CAPÍTULO 2).

1.3. Caracterizar como tolerantes o susceptibles a un grupo de plantas mediante aplicaciones exógenas de **ET**, grupo conformado por dos líneas progenitoras (M y P) contrastantes para los marcadores *Xgwm334a* y *Xgwm459*, ambos ubicados en el cromosoma 6AS de *Triticum aestivum*, la F₁ producto del cruzamiento dirigido entre ambas, la F₂ obtenida por autofecundación y plantas F₃ proveniente de las anteriores (CAPÍTULO 3).

1.4. Caracterizar a un grupo de plantas F₃ de acuerdo a su crecimiento compensatorio inducido por tratamientos exógenos con las hormonas **AJ y ABA**, obtenidas a partir de la autofecundación de plantas F₂ seleccionadas por su crecimiento diferencial ante aplicaciones de ET (CAPÍTULO 5).

Con el propósito de probar la Hipótesis 2, alcanzar el objetivo general 2 y dar respuesta a las preguntas: ***los genes responsables del crecimiento compensatorio ¿son inducidos por la infestación con el pulgón ruso del trigo?*** Además, ***los genes que determinan el crecimiento compensatorio bajo infestación ¿se ubican en las mismas regiones cromosómicas que aquellos genes que son elicitados por hormonas?***, se proponen los siguientes objetivos particulares:

2.1. Estudiar la **actividad antioxidante** a través de las determinaciones de ácido ascórbico y peroxidasas en las plantas sometidas a estrés biótico generado por la acción directa de un insecto, como inductor de las defensas (CAPÍTULO 2).

2.2. Evidenciar la influencia de un insecto inductor de las defensas vegetales, el **pulgón ruso del trigo**, mediante la determinación de parámetros

fisiológicos del crecimiento de una población de trigo originada a partir del cruzamiento de dos líneas de comportamiento contrastante. Se intenta así evaluar si la acción del pulgón afecta diferencialmente los parámetros de crecimiento de las líneas progenitoras y sus descendientes F₁ y F₂ (CAPÍTULO 4).

Con el propósito de probar la Hipótesis 3, alcanzar el objetivo general 3 y dar respuesta a las preguntas: **los genes que aportan al crecimiento compensatorio ¿pueden ser mapeados y secuenciados?** Además, el gen **NAC2** localizado en la región flanqueada por los marcadores *Xgwm334a* y *Xgwm459*, ambos ubicados en el cromosoma 6AS de *Triticum aestivum*, **¿está relacionado con las respuestas contrastantes entre las líneas progenitoras?** se planteó

3.1. Conocer la expresión diferencial del gen NAC2 en dos líneas de trigo (M y P) tratadas en forma exógena con las hormonas ET y ABA, así como también infestadas con el pulgón ruso (CAPÍTULO 6).

Bibliografía

- Akhunov, E.D., A.R. Akhunova, A.M. Linkiewics, J. Dubcovsky, D. Hummel, G. Lazo, S. Chao, O.D. Anderson, J. David & L. Qi. 2003. Synteny perturbation between wheat homeologous chromosomes caused by locus duplications and deletions correlate with recombination rates along chromosome arms. *Proceedings National Academy of Science* 100: 10836-10841.
- Anderson, J.P., E. Badruzsaufari, P.M. Schenk, J.M. Manners, O.J. Desmond, C. Ehlert, D.J. Maclean, P.R. Ebert & K. Kazan. 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 3460-3479.
- Arimura, G., K. Matsui & J. Takabayashi. 2009. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. *Plant Cell Physiology* 50: 911-23.
- Arumuganathan, K. & E.D. Earle. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 208-218.
- Baker, B., P. Zambryski & S.P. Dinesh-Kumar. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726-733.

- Baldwin, I.T. & C.A. Preston. 1999. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. *Plant* 208: 137-145.
- Börner, A., S. Chebotar & V. Korzun. 2000. Molecular characterization of the genetic integrity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm after long-term maintenance. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 494-497.
- Börner, A., E.K. Khlestkina, S. Chebotar, M. Nageli, M. Abdru Rehman Arif, K. Neumann, B. Kobiljski, U. Lohwasser & M.S. Röder. 2012. Molecular markers in management of *ex situ* PGR – A case study. *Journal of Biosciences* 37: 871-877.
- Brenner, E.D., R. Stahlberg, S. Mancuso, J. Vivanco, F. Baluska & E. Van Volkenburgh. 2006. Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling. *Trends Plant Science* 11: 413-9.
- Bruinsma, M., J.J.A. Van Loon & M. Dicke. 2010. Increasing insight into induced plant defense mechanisms using elicitors and inhibitors. *Plant Signaling and Behavior* 5: 271-274.
- Bryan, G.J., A.J. Collins, P. Stephenson, A. Orry, J.B. Smith & M.D. Gale. 1997. Isolation and characterisation of microsatellites from hexaploid bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 557-563.
- Castro, A.M., S. Ramos, A. Vasicek, A. Worland, D. Giménez, A.A. Clúa & E. Suárez. 2001. Identification of wheat chromosomes involved with different types of resistance against greenbug (*Schizaphis graminum*, Rond.) and the Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*, Mordvilko). *Euphytica* 118: 321-330.
- Castro, A.M., M.S. Tacaliti, D. Giménez, E. Tocho, O. Dobrovolskaya, A. Vasicek, M. Collado, J.W. Snape & A. Börner. 2008. Mapping Quantitative Trait Loci for growth responses to exogenously applied stress induced hormones in wheat Springer, *Euphytica* 164: 719-727.
- Cattivelli, L., P. Baldi, C. Crosatti, N. Di Fonzo, P. Faccioli, M. Grossi, A. Nastrangelo, N. Pecchioni & A. Stanca. 2002. Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in *Triticeae*. *Plant Molecular Biology* 48: 649-665.
- Cheong, Y.H., H.S. Chang, R. Gupta, X. Wang, T. Zhu & S. Luan. 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129: 661-677.
- Collard, B.C.Y. & D.J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363: 557-572.
- Conrath, U. 2011. Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science* 10: 524-531.
- Cubas, P., C. Vincent & E. Coen. 1999. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* 401: 157-161.

- Devos, K.M., G.J. Bryan, A.J. Collins & M.D. Gale. 1995. Applications of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 247-252.
- Devos, K.M., J. Ma, A.C. Pontaroli, L.H. Pratt & J.L. Bennetzen. 2005. Analysis and mapping of randomly chosen bacterial artificial chromosome clones for hexaploid bread wheat. *Proceedings National Academy of Science USA* 102: 19243-19248.
- Eujay, I., M.E. Sorrells, M. Baum, P. Wolters & W. Powell. 2002. Solation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 399-407.
- Evans, L.T. 1997. Adapting and improving crops: the endless task. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 352: 901-906.
- Evans L.T., Wardlaw I.F. & Fisher R.A. 1983. *Fisiología de los cultivos*. LT Evans Ed. Editorial Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina.
- Fahima, T., M.S. Röder, A. Grama & E. Nevo. 1998. Microsatellite DNA polymorphism divergence in *Triticum dicoccoides* accessions highly resistant to yellow rust. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 187-195.
- Feldman, M. & E.R. Sears. 1981. The wild resources of wheat. *Scientific American* 244: 102-112.
- Feldman, M. & A.A. Levy. 2005. Allopolyploidy- a shaping form in the evolution of wheat genomes. *Cytogenetic and Genome Research* 109: 250-258.
- Fujita, M., Y. Fujita, Y. Noutoshi, F. Takahashi, Y. Narusaka, K. Yamaguchi-Shinozaki & K. Shinozaki. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 436-442.
- Ganal, M.W. & M.S. Röder. 2007. Microsatellites and SNP markers in wheat breeding. En: *Genomics-Assisted Crop Improvement: Vol. 2: Genomics Applications in Crops*, 1-24. Varshney RK and Tuberosa R (eds.) Springer.
- Gill, B.S., R. Appels, A.M. Botha Oberholster, C.R. Buell, J.L. Bennetzen, B. Chalhoub, F. Chumley, J. Dvorák, M. Iwanaga, B. Keller, W. Li, W.R. McCombie, Y. Ogihara, F. Quetier & T. Sasaki. 2004. A workshop report on wheat genome sequencing: international genome research on wheat consortium. *Genetics* 168: 1087-1096.
- Goncharov, N.P. 2011. Genus *Triticum* L. taxonomy: the present and the future. *Plant Systematics and Evolution* 295: 1-11.
- Gupta, P.K., R.R. Mir, A. Mohan & J. Kumar. 2008. Wheat Genomics: Present Status and Future Prospects. *International Journal of Plant Genomics*, Article ID 896451, 36 pág.

- Hammer, K., A.A. Filatenko & V. Korzun. 2000. Microsatellite markers -a new tool for distinguishing diploid wheat species. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47: 497-505.
- Hancock, J.M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. En: Goldstein DB, Schlötterer C (eds). *Microsatellites: evolution and application*. Oxford University Press, Oxford, pp 1-6.
- Holton, T.A., J.T. Christopher, L. McClure, N. Harker & R.J. Henry. 2002. Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. *Molecular Breeding* 9: 63-71.
- Huang, Q., A. Borner, M.S. Roder & W. Ganal. 2002. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 699-707.
- Ijaz, S. 2011. Microsatellite markers: An important fingerprinting tool for characterization of crop plants. *African Journal of Biotechnology* 10: 7723-7726.
- Islam, S., M.S. Haque, R.M. Emon, M.M. Islam & A.N. Begum. 2012. Molecular characterization of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes through SSR markers. *Bangladesh Journal of Agricultural Research* 37: 389-398.
- Kahn, T.A., M. Mazid & F. Mohammad. 2012. Potential of Ascorbic acid against oxidative burst in plants under biotic stress: A Review. *Journal of Industrial Research and Technology* 2: 72-80.
- Kantety, R.M., D.E. Matthews & M.E. Sorrells. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology* 148: 501-510.
- Kessler, A. & I.T. Baldwin. 2001. Defensive function of herbivore induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291: 2141-4.
- Khlestkina, E.K., X.Q. Huang, F.J.B. Quenum, S. Chebotar, M. Röder & A. Börner. 2004. Genetic diversity in cultivated plants—loss or stability? *Theoretical and Applied Genetics* 108: 1466-1472.
- Kirby, E.J.M. Botany of the wheat plant. En *Bread Wheat, improvement and protection*. Editado por B.C. Curtis, S. Rajaram y H.G. Gómez Macpherson. Roma, 2002. *FAO Plant Production and Protection Series* No. 30. <http://www.fao.org/docrep/006/y4011e/y4011e05.htm#bm05>. Último acceso: mayo 2016.
- Kirby, E.J.M. & M. Appleyard. 1987. *Cereal development guide*. Stoneleigh, Kenilworth, UK, NAC Cereal Unit. 85pp.
- Koebner, R.M.D. 2004. Marker-assisted selection in the cereals: the dream and the reality. In: Gupta PK, Varshney RK (eds) *Cereal genomics*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p 199.

- Koebner, R.M.D. & R.W. Summers. 2003. 21st century wheat breeding: plot selection or plate detection? *Trends in Biotechnology* 21: 59-63.
- Kogel, G., B. Beissman, H.J. Reisener & K.H. Kogel. 1998. A single glycoprotein from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* cell walls elicits the hypersensitive lignification response in wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 33: 173-185.
- Korzun, V., M. Röder, A.J. Worland & A. Börner. 1997a. Mapping of the dwarfing (Rht12) and vernalisation response (Vrn1) genes in wheat by using RFLP and microsatellite markers. *Plant Breeding* 116: 227-232.
- Korzun, V., A. Börner, A.J. Worland, C.N. Law & M.S. Röder. 1997b. Application of microsatellite markers to distinguish inter-varietal chromosome substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 95: 149-155.
- Korzun, V. 2002. Use of molecular markers in cereal breeding. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7: 811-820.
- Korzun, V. 2007. Molecular markers and their applications in cereals breeding. Marker Assisted Selection: A Fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding? Session I: MAS in plants. En: <http://www.fao.org/biotech/docs/korzun.pdf>
- Leopold, A.C. 2014. Smart plants: Memory and communication without brains. *Plant Signaling and Behavior* 9: 10.
- Li, Y.C., A.B. Korol, T. Fahima & E. Nevo. 2004. Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21: 991-1007.
- Litt M. & Luty J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44:398-401. 1989.
- Liu, Z.H., J.A. Anderson, J. Hu, T.L. Friesen, J.B. Rasmussen & J.D. Faris. 2005. A wheat intervarietal genetic linkage map based on microsatellite and target region amplified polymorphism markers and its utility for detecting quantitative trait loci. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 782-794.
- López, G. 2016. A todo trigo 2016. http://www.atodotrigo.com.ar/presentaciones/Gustavo%20Lopez%20%20Panorama%20mundial%20y%20local_199005.pdf Último ingreso 6/5/2016.
- Ma, Z.Q., M. Roder & M.E. Sorrells. 1996. Frequencies and sequence characteristics of di-, triand tetra-nucleotide microsatellites in wheat. *Genome* 39: 123-130.
- Manning, K., M. Tor, M. Poole, Y. Hong, A.J. Thompson & G.J. King. 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box

- transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics* 38: 948-952.
- Mauch- Mani, B. & F. Mauch. 2005. The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 409-414.
- Mirouze, M. & J. Paszkowski. 2011. Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 267-274.
- Morgante, M., M. Hanafey & W. Powell. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics* 30: 194-200.
- National Center for Biotechnology Information. Base de datos de secuencias EST. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/?term=triticum+aestivum>. Último acceso: 21/12/2016.
- Nicot, N., V. Chiquet, B. Gandon, L. Amilhat, F. Legeai, P. Leroy, M. Bernard & P. Sourdille. 2004. Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs) *Theoretical and Applied Genetics* 109: 800-805.
- Painter, RH. 1951. *Insect Resistance in Crop Plants*. The McMillan Co. New York, 151p.
- Paull, J.G., K.J. Chalmers, A. Karakousis, J.M. Kretschmer, S. Manningand & P. Langridge. 1998. Genetic diversity in Aus Australian wheat varieties and breeding material based on RFLP data. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 435-446.
- Pecinka, A. & O. Mittelsten Scheid. 2012. Stress-Induced Chromatin Changes: A Critical View on Their Heritability. *Plant Cell Physiol.* 53: 801-808.
- Plaschke, J., M.W. Ganai & M.S. Röder. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1001-1007.
- Qi, L.L., B. Echalié, S. Chao, G.R. Lazo, G.E. Butler, O.D. Anderson, E.D. Akhunov, J. Dvorák, A.M. Linkiewicz, A. Ratnasiri, J. Dubcovsky, C.E. Bermudez-Kandianis, R.A. Greene, R. Kantety, C.M. La Rota & J.D. Munkvold. 2004. A chromosome bin map of 16,000 expressed sequence tag loci and distribution of genes among the three genomes of polyploid wheat. *Genetics Society of America*. DOI: 10.1534/genetics.104.034868.
- Quarrie, S.A., A. Steed, C. Lebreton, M. Gulli, C. Calestani & N. Marmioli. 1994. QTL analysis of ABA production in wheat and maize and associated physiological traits. *Russian Journal of Plant Physiology* 41: 565-571.
- Rawson, H.M. & H. Gómez Macpherson. 2001. *Trigo regado*. FAO, ISBN 92-5-304488-8

- Röder, M.S., J. Plaschke, S.U. König, A. Börner, M.E. Sorrells, S.D. Tanksley & M.W. Ganal. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular Genetics and Genomics* 246: 327-333.
- Röder, M.S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M.H. Tixier, P. Leroy & M.W. Ganal. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.
- Ruiz, M., E. Aguiriano, R. Fité & J.M. Carrillo. 2007. Combined use of gliadins and SSRs to analyse the genetic variability of the Spanish collection of cultivated diploid wheat (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*). *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 1849-1860.
- Russell, J.R., J.D. Fuller, M. Macaulay, B.G. Hatz, A. Jahoor, W. Powell & R. Waugh. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 714-722.
- Safár, J., H. Simková, M. Kubaláková, J. Cíhalíková, P. Suchánková, J. Bartos & J. Dolezel. 2010. Development of chromosome-specific BAC resources for genomics of bread wheat. *Cytogenetic and Genome Research* 129: 211-223.
- Salem, K.F.M., A.M. El-Zanaty & R.M. Esmail. 2008. Assessing Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genetic Diversity Using Morphological Characters and Microsatellite Markers. *World Journal of Agricultural Sciences* 4: 538-544.
- Schewry, R.P. 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany* 60: 1537-1553.
- Scott, I.M., S.J. Thaler & G.F. Scott. 2010. Response of a generalist herbivore *Trichoplusia ni* to jasmonate-mediated induced defense in tomato. *Journal of Chemical Ecology* 36: 490-9.
- Scott, K.D., P. Eggler, G. Seaton, M. Rossetto, E.M. Ablett, L.S. Lee & R.J. Henry. 2000. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 723-726.
- Sehgal, S.A., R.A. Tahir, M. Nawaz & M. Younas. 2012. Genic microsatellite markers for genetic diversity of rust resistant wheat genotypes. *Journal of Biochemical Technology* 4: 480-484.
- Shariflou, M.R., M.E. Hassani & P.J. Sharp. 2001. A PCR-based DNA marker for detection of mutant and normal alleles of the Wx-D1 gene of wheat. *Plant Breeding* 120: 121-124.
- Smith, C.M. 2005. *Plant Resistance to Arthropods: Molecular and Conventional Approaches*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Smith, C.M. & S.L. Clement. 2012. Molecular Bases of Plant Resistance to Arthropods. *Annual Review of Entomology* 57: 309-328.

- Snape, J.W., M.J. Foulkes, J. Simmonds, M. Leverington, L.J. Fish, Y. Wang & M. Ciavarrella. 2007. Dissecting gene x environmental effects on wheat yields via QTL and physiological analysis. *Euphytica* 154: 401-408.
- Somers, D.J., P. Isaac & K. Edwards. 2004. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1105-1114.
- Soppe, W.J.J., S.E. Jacobsen, C. Alonso-Blanco, J.P. Jackson, T. Kakutani & M. Koornneef. 2000. The late flowering phenotype of *fwa* mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene. *Molecular Cell* 6: 791-802.
- Stahlberg, R. 2006. Historical overview on plant neurobiology. *Plant Signaling and Behavior* 1:6-8.
- Staskawicz, B.J., F.M. Ausubel, B.J. Baker, J.G. Ellis & J.D.G. Jones. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268: 661-667.
- Stout, M.J. 2013. Reevaluating the conceptual framework for applied research on host-plant resistance. *Insect Science* 20: 263-272.
- Szucs, P., A. Juhasz, I. Karsai, L. Lang, O. Veisz & Z. Bedo. 2000. Use of molecular markers for studying genetic diversity in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Journal of Genetics and Breeding* 54: 25-33.
- Trigo argentino. Informe Institucional sobre su calidad. Cámara arbitral de la Bolsa de Cereales de Buenos Aires (<http://www.cabcbue.com.ar/camara/index.php>) último ingreso 5/5/2016.
- Usha Rani, P. & Y. Jyothsna. 2010. Biochemical and enzymatic changes in rice as a mechanism of defense. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 695-701.
- Van Emden, H.F. and R. Harrington. 2007. *Aphids as Crop Pests*. CAB International. Cromwell Press, Trowbrige, Inglaterra. Pp 717.
- Varshney, R.K., T. Mahend, R.K. Aggarwal & A. Börner. 2007. Chapter 2: Genic molecular markers in plants: development and applications. En: *Genomics-Assisted Crop Improvement: Vol. 1: Genomics Approaches and Platforms*, 13–29. Varshney RK and Tuberosa R (eds.) Springer.
- Wang Han-Yan, Wei Yu-Ming, Yan Ze-Hong & Zheng You-Liang. 2007. EST-SSR DNA polymorphism in durum wheat (*Triticum durum* L.) collections. *Journal of Applied Genetics* 48: 35-42.
- Wanjugi, H., D. Coleman-Derr, N. Huo, S.F. Kianian, M.C. Luo, J. Wu, O. Anderson & Y.Q. Gu. 2009. Rapid development of PCR-based genome-specific repetitive DNA junction markers in wheat. *Genome* 52: 576-87.
- War, A.R., M.G. Paulraj, M.Y. War & S. Ignacimuthu. 2011a. Jasmonic acid-mediated induced resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *J Plant Growth Regulation* 30: 512-523.

- War, A.R., M.G. Paulraj, M.Y. War & S. Ignacimuthu. 2011b. Herbivore- and elicitor-induced resistance in groundnut to Asian armyworm, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Plant Signal Behavior* 6: 1769-1777.
- Winfield, M. Development of the wheat plant. School of Biological Sciences, University of Bristol. <http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/WheatBP/Documents>. Último acceso: 19/05/2016.
- Worland, A.J., V. Korzun, M.W. Ganai, M.S. Röder & C.N. Law. 1998. Genetic analysis of the dwarfing gene (Rht8) in wheat. II. The distribution and adaptive significance of allelic variants at the Rht8 locus of wheat as revealed by microsatellite screening. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 1110-1120.
- Yang, D.L., Y. Yang & Z. He. 2013. Roles of plant hormones and their interplay in rice immunity. *Molecular Plant* 6: 675-685.
- Zhao, L.Y., J.L. Chen, D.F. Cheng, J.R. Sun, Y. Liu & Z. Tian. 2009. Biochemical and molecular characterizations of *Sitobion avenae*-induced wheat defense responses. *Crop Protection* 28: 435-42.
- Zhang, L.Y., C. Ravel, M. Bernard, F. Balfourier, P. Leroy, C. Feuillet & P. Sourdille. 2006. Transferable bread wheat EST-SSRs can be useful for phylogenetic studies among the Triticeae species. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 407-418.

CAPÍTULO 1.

Variación en el patrón de estearasas reveladas en la parte aérea y en raíces de plantas de trigo, sometidas a aplicaciones con ET, AJ, AS y ABA

Contenido

<u>Introducción</u>	30
<u>Las estearasas como sistema isoenzimático</u>	31
<u>Materiales y métodos</u>	33
<u>Material vegetal</u>	33
<u>Tratamientos</u>	33
<u>Preparación de extractivos</u>	34
<u>Electroforesis</u>	34
<u>Cribado de estearasas</u>	34
<u>Análisis de las estearasas</u>	35
<u>Resultados</u>	35
<u>Discusión</u>	40
<u>Conclusiones</u>	43
<u>Bibliografía</u>	44

Introducción

La gran difusión de la tribu *Triticeae* sugiere que sus representantes contienen genes que facilitan la adaptación al ambiente y la tolerancia al estrés biótico (Cattivelli *et al.*, 2002). En la búsqueda de una producción de trigo pan con menores pérdidas debidas al estrés, tanto biótico como abiótico, numerosos genes de tolerancia han sido identificados (Quarrie, 1994, 2005; Cattivelli *et al.*, 2002; Snape *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2008).

Las fitohormonas acarrear las señales que activan los genes de defensa involucrados con eventos de estrés (Bostock, 2005; Fujita, 2006; Bari & Jones, 2009). Luego de la acción de un organismo patógeno o de un insecto que genera un daño, la planta responde incrementando la síntesis endógena de ácido abscísico (ABA), giberelinas, etileno (ET), ácido jasmónico (AJ), ácido salicílico (AS), citocininas, brasinoesteroides y hormonas peptídicas, sustancias directamente relacionadas con la interacción planta-insecto (Stotz *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2007; Koornneef & Pieterse, 2008; Spoel & Dong, 2008). Estas moléculas actúan separadamente o en forma conjunta, mediante interacciones sinérgicas o antagónicas en la compleja red de señalizaciones (Morkunas *et al.*, 2011), desempeñando un rol preponderante en la regulación de los mecanismos de resistencia (Reymond & Farmer, 1998; Glazebrook, 1999; Feys & Parker, 2000; Glazebrook, 2005).

Ha sido probada la intensa relación entre las fitohormonas y las respuestas defensivas en las plantas (Mauch-Mani & Mauch, 2005), como así también la inducción de ciertos genes de respuesta luego de aplicaciones exógenas de fitohormonas (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006). Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a través de los cuales las plantas integran los cambios inducidos por estrés en los niveles hormonales e inician las respuestas adaptativas no están completamente elucidados (Bari & Jones, 2009). No obstante, se conoce que las aplicaciones exógenas de estas hormonas potencian los niveles de resistencia en las plantas (Pieterse *et al.*, 2001).

A lo largo de la evolución, las plantas lograron integrar la información que captan del ambiente y distribuir sus limitados recursos a fin de contener las

amenazas, a medida que van apareciendo, de herbívoros, patógenos y aquellas propias del medio (Browse, 2009). La interacción que ocurre entre las rutas metabólicas que involucran al AS, AJ y ET provee un importante potencial regulatorio contra los organismos invasores (Pieterse *et al.*, 2001; Koornneef & Pieterse, 2008). Así, las plantas intentan minimizar los costos energéticos en pos de ajustar las reacciones de defensa (Pieterse *et al.*, 2001; Bostock, 2005).

Las estearasas como sistema isoenzimático

Las estearasas son un grupo de hidrolasas que catalizan la formación o ruptura del enlace éster en sustratos hidrosolubles. Generalmente estas enzimas tienen un amplio espectro de sustratos y actúan sobre una variedad de compuestos naturales y xenobióticos. Según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), las estearasas se dividen en distintos grupos. Entre ellos se destacan las carboxilestearasas o “verdaderas estearasas” (EC 3.1.1.1), que actúan sobre ésteres carboxílicos de cadena corta (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/1/1/1.html>).

Las isoenzimas son marcadores moleculares de utilidad en el desarrollo de mapas genéticos que fueron utilizados en la mejora vegetal (Korzum *et al.*, 2001). En el pasado, las estearasas del trigo fueron empleadas tanto en estudios de evolución, como en la identificación de híbridos interespecíficos y en la evaluación de variabilidad de los genotipos hexaploides (Ainsworth *et al.*, 1984; Fernández & Jouve, 1987). Estudios realizados hace ya algún tiempo identificaron cuatro sets de loci homólogos en trigos hexaploides: *Est-1*, localizado en granos inmaduros, raíces y hojas en líneas de sustitución del cromosoma 3 (3AS, 3BS y 3DS) (Barber *et al.*, 1969); *Est-2* y *Est-3* identificados a nivel de coleoptilo y localizados en los cromosomas 3 y 7 respectivamente (3AL, 3BL, 3DL, 7BS y 7DS) (Jaaska, 1980); *Est-4* hallado en hojas normales y etioladas de las líneas de sustitución 6AL, 6BL y 6DL (May *et al.*, 1973; Jaaska, 1980).

En cuanto a la distribución de las estearasas en las distintas partes de la planta, se identificaron más estearasas en hojas y tallos de maní respecto de las reveladas en raíces (Hassanein *et al.*, 1999), lo cual responde a la idea de

que existiría un patrón específico para cada tejido debido a que un gen puede expresarse en un tejido, pero no en otro (Kumar *et al.*, 2009).

Existe evidencia de que pueden identificarse plantas tolerantes al estrés salino a través de patrones específicos de estearasas. Tal es el caso del arroz, en el que se observó que la presencia de una banda en particular, con un valor Rf (Relación de frente) de 0,6, que permite identificar plantas tolerantes a salinidad (Swapna, 2002). En otra especie adaptada a ambientes marinos, *Centaurea ragusina* L., las estearasas resultaron ser un biomarcador eficaz de estrés salino, con consecuentes modificaciones en los patrones revelados en tallos y raíces sometidos a distintos potenciales osmóticos (Radic & Pevalek-Kozlina, 2010). Además, en este último estudio se estableció que las estearasas fueron más eficaces como marcadores que las peroxidasas (Radic *et al.*, 2006), ya que fueron identificadas más bandas diferenciales con el primer sistema isoenzimático (Radic & Pevalek-Kozlina, 2010). Por otro lado, las estearasas fueron efectivas como indicadores de la tolerancia en plantas de cebada cultivadas en medios ricos en aluminio (Tamás *et al.*, 2005).

Específicamente en el cromosoma 6A del trigo, fueron identificados genes de resistencia al pulgón verde de los cereales (*Schizaphis graminum*, Rond) y al pulgón ruso (*Diuraphis noxia*, Mordv) (Castro *et al.*, 2005), así como también a ciertos hongos como *Mycosphaerella graminicola* (Arraiano *et al.*, 2007) y a las royas de la hoja y del tallo (McIntosh *et al.*, 2003). Además, algunos QTLs para peso seco y para área foliar fueron localizados en el cromosoma 6A en líneas dihaploides recombinantes expuestas a tratamientos con ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (AJ), etileno (ET) y ácido salicílico (AS) (Castro *et al.*, 2008), sugiriendo que dicho cromosoma porta genes relacionados con el mejor comportamiento ante el estrés biótico (Castro *et al.*, 2008).

El **objetivo** del presente capítulo consistió en identificar los patrones de estearasas revelados en líneas doble haploides recombinantes para el cromosoma 6A de trigo, luego de haber sido asperjadas con ET, ABA, AJ y AS, como así también conocer posibles diferencias en las isoformas halladas en la parte aérea y en las raíces de las plantas evaluadas.

Materiales y métodos

Material vegetal. Se probaron setenta y ocho líneas doble haploide recombinantes (DHR) para el cromosoma 6A, derivadas de la F₁ del cruzamiento entre los progenitores “Chinese Spring” (CS) x “Chinese Spring (Synthetic 6A)” (S6A) de trigo (*Triticum aestivum* L.). Las semillas de las líneas DHR, de CS y de 6SA fueron pregerminadas en cajas de Petri cubiertas en su base con papel de filtro y luego mantenidas a 21°C por 24 h en completa oscuridad. Luego fueron pasadas a viales plásticos de 20 cc de volumen rellenos de vermiculita estéril y perforados en la base para facilitar su irrigación. Las plantas fueron colocadas en bandejas conteniendo 2 l de solución de Hoagland para garantizar el aporte de minerales y de agua (Figura 1). Las bandejas fueron mantenidas en un invernáculo en condiciones naturales de luz y temperatura.



Figura 1. Bandejas conteniendo las plantas sembradas en viales

Tratamientos. Las plantas de cada DHR, en el estado de tercera hoja expandida fueron asperjadas con etileno (ET), ácido jasmónico (AJ), ácido salicílico (AS) y ácido abscísico (ABA) en forma separada. Se hicieron 10 repeticiones por tratamiento y genotipo y se reservó igual cantidad de plantas como control, habiendo recibido estas últimas sólo agua destilada y Tween 20 (0,01% P/V). Las soluciones hormonales fueron preparadas con agua destilada y Tween 20 (0,01% P/V) según las dosis seleccionadas en ensayos previos

(Castro *et al.*, 2003), siendo 10^{-5} M de AJ, 50 mM de AS, 50 mM de ET (Ethrel®) y 10^{-5} M de ABA.

Preparación de extractivos. De las plantas de cada genotipo (78 líneas DHR, CS y S6A), se separaron la parte aérea y las raíces y en cada tratamiento (ET, AJ, AS, ABA y controles) se formó un pool reuniendo a la totalidad de las repeticiones en una misma muestra (genotipo*tratamiento). De cada una de ellas se tomó 1 g de tejido fresco para constituir las submuestras desde las cuales se prepararon los extractivos. El material se trituró en mortero con nitrógeno líquido y homogeneizado con 1 ml de Tris-glicina (pH = 8,7) por muestra. La nomenclatura de las muestras se corresponde con el tratamiento recibido, en tanto se denominaron: ET_A (ET en parte aérea), ET_R (ET en raíces), AJ_A (AJ en parte aérea), AJ_R (AJ en raíces), AS_A (AS en parte aérea), AS_R (AS en raíces), ABA_A (ABA en parte aérea), ABA_R (ABA en raíces), C_A (control en parte aérea) and C_R (control en raíces).

Electroforesis. Se realizaron corridas electroforéticas verticales en geles discontinuos (8% y 10%) de poli-acrilamida (PAGE) compuestos de 4% acrilamida y 2% bis-acrilamida, utilizando un equipo LKB Bromma 2197. Para el armado del gel se usó el buffer Tris-HCl 3 M (pH = 8,8) y en la cuba electroforética se usó Tris-glicina (pH = 8,3). Aproximadamente 80 µl del extractivo adicionados con 20 µl de glicerol fueron sembrados por celda del gel. Las corridas electroforéticas se condujeron a 4°C, con un amperaje fijo de 70 mA por 10 min hasta que las muestras atravesaron el gel de stacking (4%), luego a 50 mA por un período aproximado de 2 h 30 min.

Cribado de estearasas. Las estearasas (EST 3.1.1.1) fueron cribadas según el procedimiento descrito por Vazquez *et al.* (2000). Las distancias de migración en el gel de poli-acrilamida fueron normalizadas por la distancia del frente de corrida (valor Rf), para lo cual se trabajó con el sistema Image Master Total Lab V1.11 (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Para cada parte de la planta y tratamiento, las bandas fueron clasificadas en lentas y rápidas de acuerdo a su valor Rf. Por lo tanto, cuatro grupos de bandas fueron identificados: bandas

rápidas y lentas provenientes de la parte aérea, bandas rápidas y lentas provenientes de las raíces.

Análisis de las estearasas. Se computaron los coeficientes de similitud de Jaccard (Sneath & Sokal, 1973) para los genotipos, partes de la planta y tratamientos. Las bandas se computaron como presencia (valor 1) o ausencia (valor 0). La matriz de los coeficientes de similitud fue sometida al análisis de cluster a través del método de agrupamiento de pares con la media aritmética no ponderada (UPGMA, del inglés *unweighted pair-group method with arithmetic averages*), con la ayuda del paquete MVSP version 3.2 (Multivariate Statistica Package) (Kovach, 1986-1993).

Resultados

El análisis de estearasas mostró dos zonas discontinuas: la zona I, superior y cerca del cátodo, y la zona II, inferior y cercana al ánodo.

Según el patrón revelado, se identificaron cinco electrofenotipos diferentes para las líneas DHR, CS y S6A (Figura 2). Tanto en la parte aérea como en la raíz, se identificaron tres patrones similares definidos por una banda en la zona I, una banda en cada zona simultáneamente o una única banda en la zona II (electrofenotipos 1, 2 y 3, Figuras 2a y 2b).

Un cuarto patrón constituido por tres bandas, dos más claras y una central de mayor grosor, se identificó en la zona I en las muestras provenientes de parte aérea, aunque a partir de las muestras provenientes de raíces este mismo patrón se observó en la zona II (electrofenotipo 4, Figuras 2a y 2b).

La quinta variante corresponde a la ausencia tanto en la zona más cercana al cátodo (I) como en la más cercana al ánodo (II) (electrofenotipo 5, figuras 2a y 2b).

En cada gel de poliacrilamida se identificaron algunos de estos patrones en la parte aérea y en las raíces para cada genotipo analizado, presentado a modo de ejemplo en la Figura 2c.

a-

Zone	1	2	3	4	5
I	—	—		≡	
II		—	—		

b-

Zone	1	2	3	4	5
I	—	—			
II		—	—	≡	

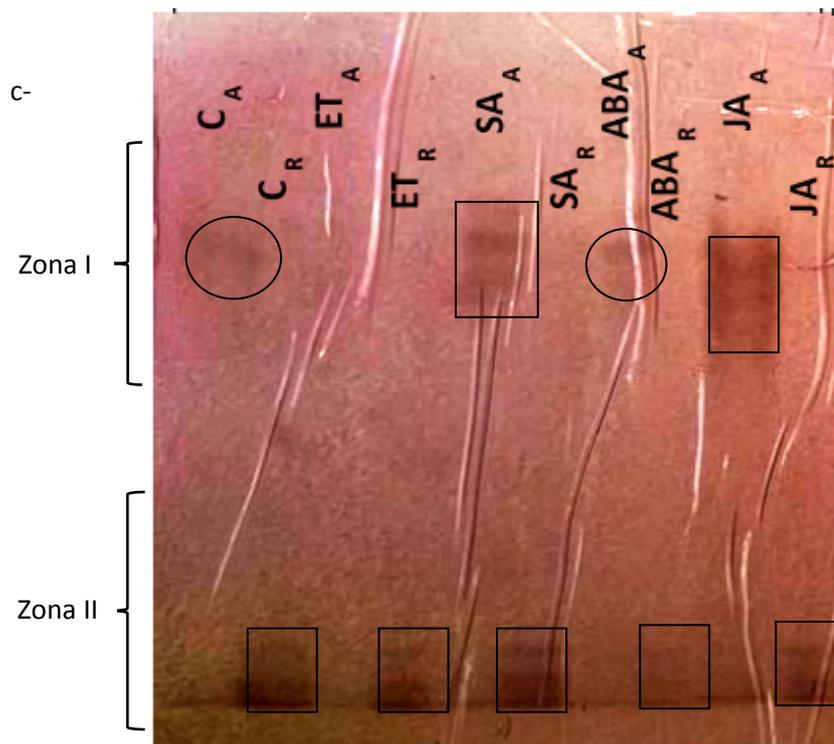


Figura 2. Electrofenotipos revelados en la parte aérea (a) y en la raíz (b) para las líneas DHR, CS y S6A. Ejemplo sobre un gel de algunos de los patrones revelados (c).

Bandas encerradas por círculos y rectángulos identifican los electrofenotipos número 1 y 4, respectivamente. La muestra ET_A constituye un ejemplo del electrofenotipo número 5, caracterizado por la ausencia de bandas en ambas zonas.

En cuanto a la afinidad por los sustratos suministrados en la reacción, las estearasas de la zona I manifestaron gran afinidad por el β -naftil-acetato y, en consecuencia, su coloración se tornó amarronada (Figura 3). Por el contrario, en la zona II prevaleció la coloración rojiza típica de las carboxilestearasas y debida a su afinidad con el α -naftil-acetato (Figura 3).

En cuanto al número de bandas, en la totalidad de las líneas se revelaron sólo una o tres bandas en cada zona (Figura 3), patrón que responde a lo descrito por Kephart (1990) para proteínas diméricas. Se descarta la presencia de alelos nulos, en cuyo caso deberían haberse revelado sólo una o dos bandas por muestra (Kephart, 1990).

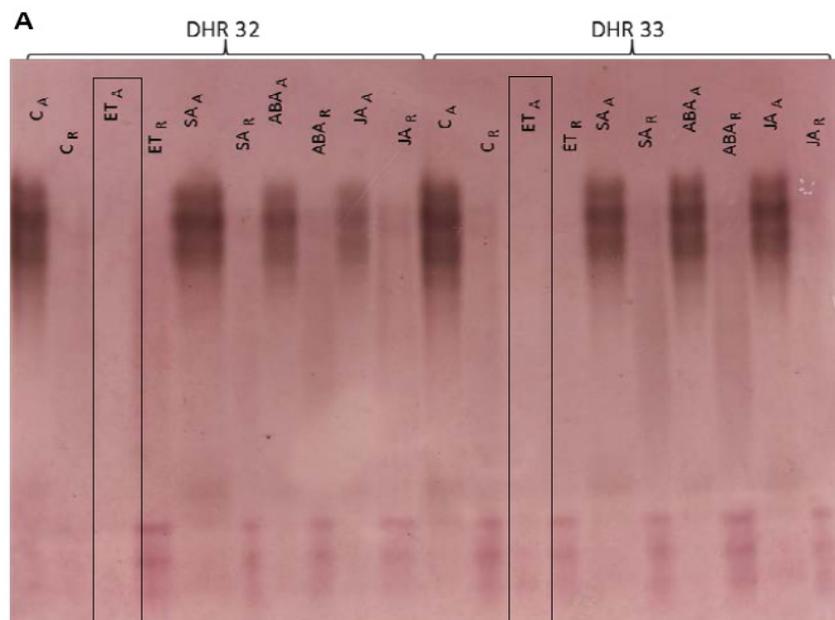


Figura 3. Estearasas reveladas en gel de poliacrilamida a partir de las líneas DHR número 32 (izquierda) y 33 (derecha), como ejemplo de distribución de las bandas.

C: control, ET: etileno, SA: ácido salicílico, ABA: ácido abscísico, JA: ácido jasmónico.

Los subíndices A y R indican parte aérea y raíz, respectivamente. Las calles señalizadas con un rectángulo negro correspondiente a las muestras ET_A de las DHR 32 y 33 denotan la ausencia de bandas en la zona I

En el 61% de las líneas analizadas, las estearasas se ubicaron en la zona I (bandas lentas) cuando las muestras provenían de las partes aéreas, mientras que únicamente se hallaron en la zona II aquellas provenientes de las raíces (Figura 3). Este comportamiento se repitió en todos los tratamientos y en los controles, con excepción del 13% de los casos en que se revelaron sólo bandas lentas en la parte aérea de plantas tratadas con ET.

El tratamiento con ET fue el que mostró las mayores diferencias entre los genotipos analizados. En el 58% de ellos no se revelaron bandas en la parte aérea (ET_A), mientras que se observaron bandas lentas en muestras provenientes de las raíces (ET_R) de las mismas líneas (Figura 3). Idéntica situación se observó en las líneas CS y S6A (Figura 4). En el caso de las muestras control, en el 37% se revelaron dos patrones diferentes en la parte aérea y en las raíces. Así, la misma banda se observó en ambas partes o, por el contrario, no se revelaron estearasas ni en la parte aérea, ni en las raíces. Por otro lado, en otro 31% de los controles se observó actividad estearasa en la parte aérea pero no en las raíces del mismo genotipo. En cambio en los controles provenientes de la línea progenitora CS se reveló una sola banda en la zona I a partir de la parte aérea, mientras que a partir de las raíces se identificaron tres bandas en la zona II (Figura 4). Los controles de la línea S6A evidenciaron tres bandas en zona I en partes aéreas y tres bandas también, aunque en zona II, a partir de las raíces de este último genotipo (Figura 4).

En comparación con ambos parentales, CS y S6A, en las líneas DHR se revelaron patrones de estearasas con mayor similitud respecto de CS. En el padre S6A, se destaca que las estearasas de parte aérea se silenciaron cuando las plantas fueron asperjadas con AJ (AJ_A).

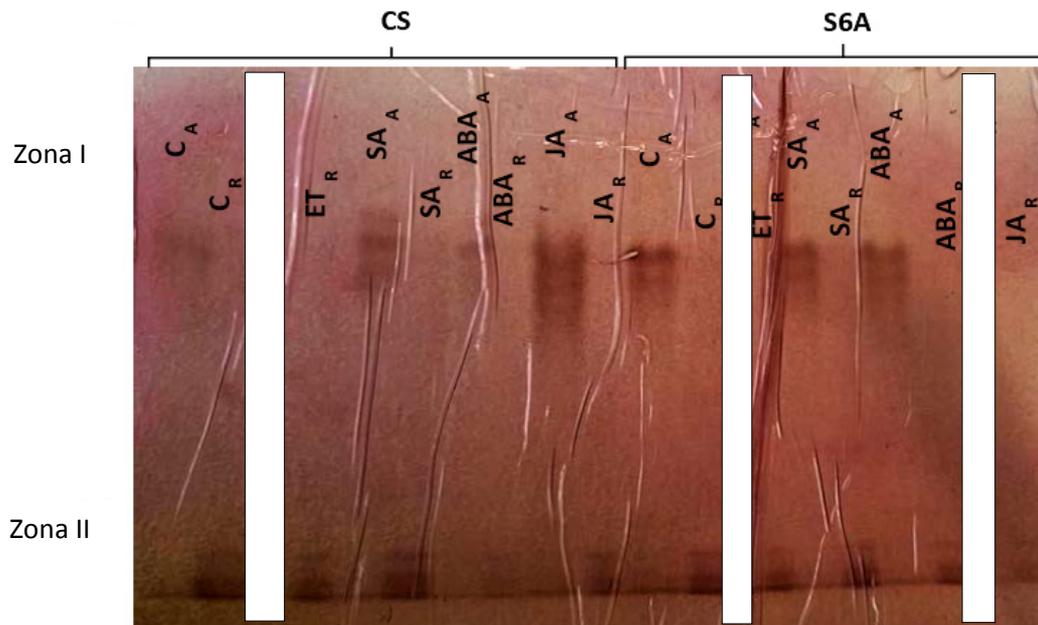


Figura 4. Estearasas reveladas en gel de poliacrilamida a partir de las líneas CS (Chinese Spring) y S6A (Synthetic 6A).

C: control, ET: etileno, SA: ácido salicílico, ABA: ácido abscísico, JA: ácido jasmónico. Los subíndices A y R indican parte aérea y raíz, respectivamente. Las calles **ET_A** de la línea CS, **ET_A** y **JA_A** de S6A fueron señalizadas con un rectángulo negro para indicar la ausencia de bandas.

En el caso de las estearasas reveladas a nivel de las raíces, se observó ausencia de bandas en el 17% de las líneas DHR tratadas con ABA, patrón que se repitió en el 13% de las tratadas con AJ y en el 9% de aquellas tratadas con AS, aunque en todos los casos se trató de líneas diferentes. Por el contrario, a partir de los mismos genotipos y tratamientos se revelaron estearasas en muestras provenientes de la parte aérea.

El análisis de presencia/ ausencia de estearasas mediante el coeficiente de similitud de Jaccard mostró un agrupamiento de las estearasas expresadas en las raíces de todos los tratamientos y controles de las líneas DHR. Por el contrario, en los tejidos aéreos la actividad estearasa se agrupó en dos clústeres separados, uno de los cuales incluyó solamente al tratamiento ET (ET_A) y el otro que agrupó a los demás tratamientos (Figura 5). En consecuencia, el tratamiento con ET indujo en la parte aérea la mayor divergencia por sobre los demás tratamientos aplicados.

Los tratamientos con ABA y AS mostraron coeficientes altos de similitud, tanto en parte aérea como en raíz (coeficientes de Jaccard mayores a 0,85) (Figura 5).

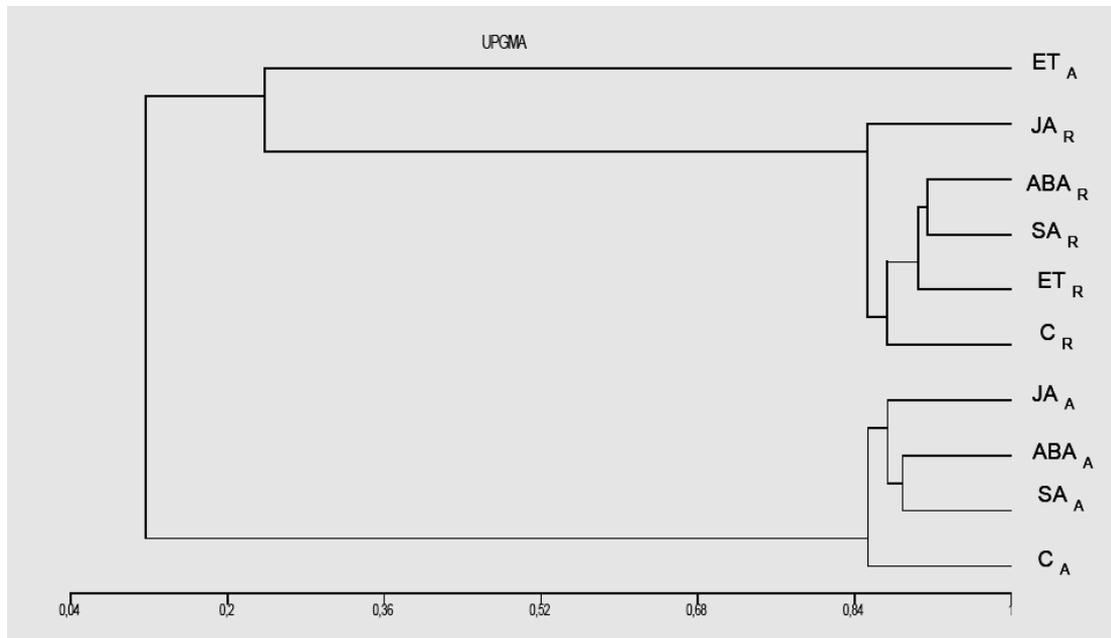


Figura 5. Dendrograma de las 78 líneas DHR basado en la actividad estearasa para cada parte de la planta y tratamiento, según el método UPGMA. C: control, ET: etileno, SA: ácido salicílico, ABA: ácido abscísico, JA: ácido jasmónico. Los subíndices A y R indican parte aérea y raíz, respectivamente.

Discusión

Todos los organismos que existen en ambientes naturales están expuestos a algún tipo de estrés. Los mecanismos a través de los cuales las plantas inducen sus respuestas defensivas no se conocen en su totalidad. Es muy complejo el metabolismo que se activa cuando una planta es sometida a algún factor desencadenante de estrés, dado por una intrincada red de componentes moleculares intervinientes (Kuppusamy *et al.*, 2009), entre los que se destacan las hormonas (Bari & Jones, 2009).

Resulta importante comprender los mecanismos por medio de los cuales las plantas responden y se adaptan al estrés. En este sentido, las variaciones en la actividad isoenzimática de los tejidos reflejan cambios en la actividad metabólica durante el crecimiento, desarrollo y diferenciación de las plantas,

por lo cual se pueden considerar índices bioquímicos de utilidad (Radic & Pevalek-Kozlina, 2010). Si bien las estearasas han sido más estudiadas en vertebrados e insectos pero bastante menos en plantas, varios estudios relacionan su actividad y la variabilidad en sus patrones con la tolerancia al estrés salino (Swapna, 2002; Radic & Pevalek-Kozlina, 2010) o a algún metal pesado (Tamás *et al.*, 2005).

Por medio de la aplicación exógena de las hormonas se observó que los patrones de estearasas revelados fueron variables según el tratamiento hormonal recibido y la porción de la planta de la que se hubiera extraído la muestra (parte aérea o raíz). En particular, en las plantas tratadas con ET se observó el silenciamiento de la actividad estearasa en la parte aérea de más de la mitad de las plantas. Se destaca un clúster separado que contiene únicamente a las muestras ET_A, con baja similitud respecto de los mismos genotipos y partes de las plantas aunque tratados con AJ, ABA y AS.

El AJ se considera la hormona de mayor relación con las defensas ante ataques de herbívoros en las plantas (Wu & Baldwin, 2010). Varios trabajos indican que el AJ y el ET actúan sinérgicamente para la expresión de los genes de defensa, como consecuencia de la acción de un agente patógeno o de un insecto (Reymond & Farmer, 1998; Maleck *et al.*, 2000; Reymond *et al.*, 2000; Schenk *et al.*, 2000; Bari & Jones, 2009). Sin embargo, no se observó tal relación sinérgica AJ/ ET a través del patrón de estearasas revelado en las líneas DHR analizadas. Cerca del 60% de los genotipos tratados con AJ o con ET mostraron presencia o ausencia de bandas lentas, en forma indistinta. Si bien Castro *et al.* (2008) habían encontrado diferencias significativas en parámetros de crecimiento, como el peso seco aéreo y área foliar, entre las mismas líneas analizadas en el presente estudio y tratadas con AJ o ET, esas diferencias no se evidenciaron a nivel de las estearasas. Por otro lado, las mismas líneas DHR tratadas independientemente con AJ y con ET mostraron alta similitud entre las estearasas evaluadas de tejidos provenientes de las raíces.

El hecho de haber encontrado estearasas diméricas concuerda con lo descrito por May (1973) y Jaaska (1980) en trigo. Una o tres bandas fueron reveladas para cada muestra, como es esperado para genotipos casi homocigotas como son las líneas DHR. Por otro lado, en comparación con las

líneas progenitoras CS y S6A, las estearasas reveladas en las DHR mostraron mayor similitud respecto de CS. Esto resulta lógico dado el método de obtención de las líneas DHR en las que predominó el genoma de CS y se incorporó sólo una porción del cromosoma 6A de Synthetic (S6A).

Tal como explicitaran Kumar *et al.* (2009), cobra importancia el tejido a partir del cual se extraen las estearasas. Cambios en las estearasas reveladas en las distintas porciones de las plantas fueron reportados, así como también ante diversas situaciones de estrés (Audran *et al.*, 1998; Tamás *et al.*, 2005; Radic & Pevalek-Kozlina, 2010). En el presente análisis, las estearasas expresadas diferencialmente en la parte aérea o en las raíces mostraron su patrón específico, como así también entre los controles y los tratamientos hormonales inductores de los genes de defensa.

Ante una adversidad biótica como es el daño generado por la actividad de los insectos, las plantas deben ajustar finamente sus sistemas de defensa para hacer frente a tal injuria (Reymond & Farmer, 1998; Walling, 2000), de modo que activan complejos mecanismos para contrarrestar a distintas plagas y patógenos. Las principales moléculas involucradas con la señalización en el metabolismo defensivo son el AJ, el ET, el AS, el ABA y el ácido giberélico (Bari & Jones, 2009). En este contexto, en el cromosoma 6A de trigo se identificaron genes relacionados con el crecimiento de plantas inducidas por hormonas, colindantes con genes de resistencia a áfidos y a patógenos (Castro *et al.*, 2008). Conjuntamente a la estrecha relación que se manifestó entre la resistencia a insecticidas en clones y poblaciones de áfidos del país y la presencia de α -carboxylesterasas (Saldúa *et al.*, 2011), también observada en el presente estudio a nivel de las raíces de las líneas DHR, dichas bandas de coloración rojiza podrían llegar a estar relacionadas con algún mecanismo de tolerancia inducido por un evento de estrés biótico, si bien no existe aquí evidencia que permita validar esa relación.

Finalmente, se puede afirmar que el análisis isoenzimático constituye una herramienta apropiada para identificar genotipos tolerantes y ante eventos de estrés biótico. El análisis electroforético de isoenzimas es una técnica de implementación simple, que requiere equipamiento básico y a través del cual se obtienen resultados prontamente. Su baja repetitividad en los resultados obtenidos en distintos laboratorios, junto con el avance de nuevas tecnologías,

hicieron que fuera dejada de lado hoy en día como herramienta. Sin embargo, como metodología complementaria a las determinaciones fisiológicas o moleculares más complejas y como primera aproximación en la búsqueda de materiales tolerantes, aporta resultados preliminares. Con el fin de profundizar en el conocimiento relacionado con el estrés biótico y la inducción de las defensas, estudios basados en el ADN, y no en el producto de su transcripción como son las isoenzimas (Kephart, 1990), permitirán complementar la información aquí obtenida.

Conclusiones

- Los patrones de estearasas se expresaron diferencialmente en partes aéreas y en raíces de las líneas DHR.
- En comparación con las líneas progenitoras, las líneas DHR mostraron patrones de isoestearasas más similares a CS que a S6A.
- El ET silenció las estearasas provenientes de la parte aérea del 58% de las líneas DHR, ubicándose este tratamiento en un clúster único y con poca similitud según Jaccard respecto de los demás tratamientos hormonales.
- A pesar de que actualmente los marcadores isoenzimáticos son poco utilizados y fueron desplazados por tecnologías y herramientas que brindan mayores precisiones y mejor repetitividad de resultados, las estearasas resultaron una herramienta sencilla, económica y rápida para identificar patrones específicos en ambas porciones de las plantas de trigo estudiadas (parte aérea y raíces)
- Aún con los riesgos que implica analizar el producto final de la expresión de un gen, como en este caso en base a las proteínas isoenzimáticas, resultan ser aproximaciones de utilidad que sirven de base para profundizar en los siguientes estudios que contemplan la expresión a nivel génico.

Este trabajo fue publicado en el Journal of Basic and Applied Genetics: Tacaliti M.S., Tocho E. and Castro A.M. 2016. Differential esterase activity in aerial and root tissues from S6A DHR wheat lines after phytohormonal treatments. Journal of Basic and Applied Genetics 27: 41-42.

Bibliografía

- Adams, E., A. Devoto & J.G. Turner. 2007. Analysis of a novel ethylene-induced COI1-dependent signalling pathway in *Arabidopsis thaliana*. A. Ramina et al. (eds.), *Advances in Plant Ethylene Research: Proceedings of the 7th International Symposium on the Plant Hormone Ethylene*, 81-87.
- Ainsworth, C.C., H.M. Johnson, E.A. Jackson, T.E. Miller & M.D. Gale. 1984. The chromosomal locations of leaf peroxidase genes in hexaploid wheat, rye and barley. *Theoretical Applied Genetics* 69: 205-210.
- Arraiano, L.S., L. Chartrain, E. Bossolini, H.N. Slatter, B. Keller & J.K.M. Brown. 2007. A gene in European wheat cultivars for resistance to an African isolate of *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Pathology* 56: 73-78.
- Audran, C., C. Borel, A. Frey, B. Sotta, C. Meyer, T. Simonneau & A. Marion-Poll 1998. Expression studies of the Zeaxanthin Epoxidase gene in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiology* 118: 1021-1028.
- Barber, H.N., C.J. Driscoll, P.M. Long & R.S. Vickery. 1969. Gene similarity of the *Triticinae* and the study of segmental interchanges. *Nature* 22: 897-898.
- Bari, R. & J.D.G. Jones. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69: 473-488.
- Bostock, R.M. 2005. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annual Review Phytopathology* 43: 545-580.
- Browse, J. 2009. Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. *Annual Review Plant Biology* 60: 183-205.
- Castro, A.M., A. Clúa, D. Giménez, E. Tocho, M.S.Tacaliti, A. Worland, E. Sayers, H. Chidichimo & J. Snape. 2003. Chromosomal effects on tolerance to the stress-induced hormones ethylene, jasmonic acid, salicylic acid and ABA in wheat (*Triticum aestivum*) substitution lines. In: Pogna N. Mugnozza G, Bianchi A (eds) *Proc Int Wheat Genet Symp Instituto Sperimentale per la Cerealicoltura*, Rome, Italy, 3: 1111-1114.
- Castro, A.M., A. Vasicek, M. Manifiesto, D. Giménez, M.S. Tacaliti, O. Dobrovolskaya, M.S. Röder, J. Snape & A. Borner. 2005. Mapping resistance genes to greenbug and RWA on chromosome 6A of wheat. *Plant Breeding* 124: 229-233.

- Castro, A.M., M.S. Tacaliti, D. Giménez, E. Tocho, O. Dobrovolskaya, A. Vasicek, M. Collado, J.W. Snape & A. Börner. 2008. Mapping Quantitative Trait Loci for growth responses to exogenously applied stress induced hormones in wheat Springer, *Euphytica* 164: 719-727.
- Cattivelli, L., P. Baldi, C. Crosatti, N. Di Fonzo, P. Faccioli, M. Grossi, A. Nastrangelo, N. Pecchioni & A. Stanca. 2002. Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in Triticeae. *Plant Molecular Biology* 48: 649-665.
- Fernández, J.A. & N. Jouve. 1987. Chromosomal location of structural genes controlling isozymes in *Hordeum chilense*- 3. Esterases, glutamate oxaloacetate transaminase and phosphoglucomutase. *Theoretical Applied Genetics* 73: 690-698.
- Feys, B.J. & J.E. Parker. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *TIG* 16: 10.
- Fujita, M., Y. Fujita, Y. Noutoshi, F. Takahashi, Y. Narusaka, K. Yamaguchi-Shinozaki & K. Shinozaki. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 436-442.
- Glazebrook, J. 1999. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 280-286.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review Phytopathology* 43: 205-27.
- Hassanein, A.M. 1999. Alterations in protein and esterase pattern of peanut in response to salinity stress. *Biologica Plantarum* 42: 241-248.
- IUBMB Enzyme Nomenclature. EC 3.1.1.1.
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/1/1/1.html>
- Jaaska, V. 1980. Electrophoretic survey of seedling esterases in wheats in relation to their phylogeny. *Theoretical Applied Genetics* 56: 273-284.
- Kephart, S.R. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *American Journal of Botany* 77: 693-712.
- Koornneef, A. & C.M.J. Pieterse. 2008. Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology* 146: 839-844.
- Korzum, V., S. Malyshev, A.V. Voylokov, V. Smirnov & A. Börner. 2001. A genetic map of rye (*Secale cereale* L.). In: T.A. Pshenichnikova & A.J.

- Worland (Eds.), Proc. 11th EWAC Conf., 24-28, July, 2000, Novosibirsk, pp. 48-51.
- Kovach, W.L. 1986-1993. Multivariate Statistical Package for Windows (MVSP), ver. 2.1. Publ. Kovach Computing Services, London.
- Kumar P., V.K. Gupta, A.K. Misra, D.R. Modi & B.K. Pandey. 2009. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics Journal* 2: 141-162.
- Kuppusamy K.T., C.L. Walcher & J.L. Nemhauser. 2009. Cross-regulatory mechanisms in hormone signaling. *Plant Molecular Biology* 69: 375-381.
- Maleck K., A. Levine, T. Eulgem, A. Morgan, J. Schmid, K.A. Lawton, J.L. Dangl & R.A. Dietrich. 2000. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics* 26: 403-410.
- Mauch-Mani, B. & F. Mauch. 2005. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 409-414.
- May C.E., R.S. Vickery & C.S. Driscoll. 1973. Gene control in hexaploid wheat. In: Proc 4th Int Wheat Genet Symp, Columbia, pp 843-849.
- McIntosh, R.A., Y. Yamazaki, K. Devos, J. Dubcovsky, J. Rogers & R. Appels. 2003. Catalogue of gene symbols for wheat. <http://www.grs.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes>.
- Morkunas, I., V.C. Mai & B. Gabrys. 2011. Phytohormonal signaling in plant responses to aphid feeding. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 2057-2073.
- Pieterse, C.M.J., J. Ton & L.C. Van Loon. 2001. Cross-talk between plant defence signaling pathways: boost or burden? *Ag Biotech Net* 3: 068.
- Quarrie, S.A., A. Steed, C. Lebreton, M. Gulli, C. Calestani & N. Marmioli. 1994. QTL analysis of ABA production in wheat and maize and associated physiological traits. *Russian Journal Plant Physiology* 41: 565-571.
- Quarrie, S.A., A. Steed, C. Calestani, A. Semikhodskii, C. Lebreton, C. Chinoy, N. Steele, D. Pljevljakusic, E. Waterman, J. Weyen, J. Schondelmaier, D.Z. Habash, P. Farmer, L. Saker, D.T. Clarkson, A. Abugaliev, M. Yessimbekova, Y. Turuspekov, S. Abugaliev, R. Tuberosa, M.C. Sanguineti, P.A. Hollington, R. Aragués, A. Royo & D. Dodig. 2005. A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring ·SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments. *Theoretical Applied Genetics* 110: 865-880.

- Radic, S., M. Stojkovic- Radic & B. Pevalek- Kozlina. 2006. Influence of NaCl and mannitol on peroxidase activity and lipid peroxidation in *Centaurea ragusina* L. roots and shoots. *Journal Plant Physiology* 163: 1284-1292.
- Radic, S. & B. Pevalek-Kozlina. 2010. Differential esterase activity in leaves and roots of *Centaurea ragusina* L. as a consequence of salinity. *Periodicum biologorum* 112: 253-258.
- Reymond, P. & E.E. Farmer. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion Plant Biology* 1: 404-411.
- Reymond, P., H. Weber, M. Damond & E.E. Farmer. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 707-719.
- Saldúa, V.L., M.S. Tacaliti, E. Tocho, A.M. Castro & A.F.G. Dixon. 2011. Genetic analysis of greenbug populations of *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae) from Argentina and Chile based on enzyme variability. *Revista Sociedad Entomológica Argentina* 70: 83-92.
- Schenk, P.M., K. Kazan, I. Wilson, J.P. Anderson, T. Richmond, S.C. Somerville & J.M. Manners. 2000. Coordinate plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97: 11655-11660.
- Snape, J.W., M.J. Foulkes, J. Simmonds, M. Leverington, L.J. Fish, Y. Wang & M. Ciavarrella. 2007. Dissecting gene x environmental effects on wheat yields via QTL and physiological analysis. *Euphytica* 154: 401-408.
- Sneath, P.H.A. & R.R. Sokal. 1973. *Numerical taxonomy*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, USA.
- Spoel, S.H. & X. Dong. 2008. Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe* 3: 348-351.
- Stotz, H.U., B.R. Pittendrigh, J. Kroymann, K. Weniger, J. Fritsche, A. Bauke & T.M. Olds. 2000. Induced Plant Defense Responses against Chewing Insects. Ethylene Signaling Reduces Resistance of *Arabidopsis* against Egyptian Cotton Worm But Not Diamondback Moth. *Plant Physiology* 124: 1007-1017.
- Swapna, T.S. 2002. Esterase as molecular marker for salt tolerance in regenerated plants of rice *Oriza sativa* L. *Indian Journal of Experimental Biology* 40: 1056-1059.
- Tamás, L., J. Huttová, I. Mistrík, M. Šimonovičová & B. Široká. 2005. Aluminium induced esterase activity and isozyme pattern in barley root tip. *Plant Soil and Environment* 51: 220-225.

- Vazquez, J.F., M.D. Sanchez-Yelamo & J.M. Carrillo. 2000. Marcadores morfológicos y bioquímicos. Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal. Departamento de Biología, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, pp 25-89.
- Walling, L.L. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *Journal Plant Growth Regulation* 19: 195-216.
- Wu, J. & I.T. Baldwin. 2010. New Insights into Plant Responses to the Attack from Insect Herbivores. *Annual Review Genetics* 44: 1-24.
- Yamaguchi-Shinosaki, K. & K. Shinosaki. 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review Plant Biology* 57: 781-803.

CAPÍTULO 2.

Evaluación de la actividad peroxidasa y del contenido de ácido ascórbico en dos líneas de trigo

<u>Contenido</u>	
<u>Introducción</u>	50
<u>Moléculas antioxidantes</u>	51
<u>Materiales y métodos</u>	56
<u>Material vegetal.</u>	56
<u>Tratamientos.</u>	57
<u>Determinación del contenido de ácido ascórbico total y reducido por HPLC-MS</u>	58
<u>Determinación de la actividad peroxidasa mediante espectrofotometría</u>	59
<u>Resultados</u>	59
<u>Determinación del contenido de ácido ascórbico mediante HPLC-MS</u>	59
<u>Determinación de la actividad peroxidasa mediante espectrofotometría</u>	62
<u>Discusión</u>	62
<u>Bibliografía</u>	64

Introducción

Entre las respuestas más comunes a los estreses bióticos y abióticos, se destaca la aceleración en la producción de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO). Las ERO son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico (O_2) generadas a partir de la ganancia de uno, dos o tres electrones para constituir el radical superóxido (O_2^{-1}), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), respectivamente. En contraposición al oxígeno atmosférico, estas formas son capaces de oxidar distintos componentes celulares y provocar la destrucción de los tejidos vegetales (Mittler, 2002).

El **estrés oxidativo** surge a partir del incremento en la producción de ERO, lo cual implica un daño sobre las células vegetales. Esta producción exagerada de ERO constituye en sí misma un componente del sistema de señalización que las plantas utilizan para ajustar la expresión génica y las estructuras celulares en respuesta a desafíos ambientales (Foyer & Noctor, 2005). Además, si bien las ERO se originan durante los procesos metabólicos normales, situaciones de estrés biótico y abiótico inducen su producción (Bhattacharjee, 2011). Prolongadas exposiciones a altos niveles de ERO pueden resultar en daños celulares e incluso llevar a la muerte de la planta si dichas moléculas no son removidas (Apel & Hirt, 2004; Passardi *et al.*, 2005). En este contexto, el “estrés oxidativo” y el “daño oxidativo” sobre los componentes celulares son conceptos equivalentes; en situaciones en las que el daño oxidativo excede la posibilidad de reparación o reemplazo ocurre, entonces, una acumulación de componentes celulares dañados, se desencadena la pérdida de función de las células implicadas y eventualmente la muerte celular (Foyer & Noctor, 2011).

Como respuesta ante la acción de varios factores bióticos las plantas producen H_2O_2 , lo que se considera una respuesta general ante alguna condición estresante (Wojtaszek, 1997). El H_2O_2 actúa también como molécula de señalización capaz de activar mecanismos específicos e inespecíficos de protección (Janda *et al.*, 2007). Debido a su escaso peso molecular, tiene la capacidad de desplazarse en los tejidos vegetales a través de sus membranas, hasta alcanzar sitios distantes respecto de su lugar de formación (Wojtaszek, 1997). El H_2O_2 en la célula vegetal puede ser detoxificado mediante la

ascorbato peroxidasa, actuando en concordancia con la dehidroascorbato reductasa y la glutatión reductasa en la vía denominada Halliwell Asada (Wojtaszek, 1997).

Moléculas antioxidantes

Numerosas enzimas antioxidantes y varios metabolitos participan en la protección de las plantas ante el estrés oxidativo. Así, las células vegetales se protegen mediante distintas **moléculas antioxidantes**, entre las que se encuentran compuestos de bajo peso molecular (por ej., ácido ascórbico (AA), glutatión, tocoferoles), enzimas que regeneran las formas reducidas de los antioxidantes y otras que interactúan con las ERO (por ej., superóxido dismutasa (SOD), peroxidasas (POX) y catalasas (CAT)) (Kovalchuk, 2011). Además, las plantas contienen compuestos fenólicos que pueden funcionar como antioxidantes potenciales, como son los flavonoides, los taninos y los precursores de la lignina (Blokhina *et al.*, 2003).

El término antioxidantes incluye a los compuestos capaces de inactivar o directamente remover las ERO, sin sufrir ellos mismos modificaciones que los conviertan en radicales destructivos (Noctor & Foyer, 1998). Las enzimas antioxidantes participan directamente en el procesamiento de las ERO. Así, los antioxidantes y las enzimas antioxidantes interrumpen la oxidación descontrolada (Noctor & Foyer, 1998).

En cuanto a la localización de los sistemas antioxidantes en plantas, la enzima SOD se encuentra en casi todos los compartimentos celulares, el ciclo ascorbato- glutatión en cloroplastos, citosol, mitocondrias y peroxisomas, y las enzimas glutatión peroxidasa (GPX) y CAT en peroxisomas (Mittler, 2002). Dada la notable presencia del ciclo ascorbato- glutatión en casi todos los compartimentos, se destaca su importancia en el control de las ERO (Mittler, 2002).

En cereales, numerosos estudios sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en situaciones de estrés, demostraron la relación existente entre los cambios en los niveles de actividad de los antioxidantes y la tolerancia al estrés (Janda *et al.*, 2003; Balla *et al.*, 2009; Bencze *et al.*, 2011; Varga *et al.*, 2012). Sin embargo, en trigo se estableció que, a pesar de que el ácido

salicílico, las poliaminas y las enzimas antioxidantes tienen un importante rol en los mecanismos de defensa ante el estrés biótico, no hubo relación directa entre la actividad inicial de estos compuestos protectores y el nivel de tolerancia a la roya de la hoja (*Puccinia triticina*) (Kovács *et al.*, 2012). Los cambios en los contenidos de las enzimas catalasa, glutatión reductasa, glutatión S-transferasa, ascorbato peroxidasa y guaiacol peroxidasa estuvieron significativamente relacionados con el genotipo estudiado y se debieron a características intrínsecas de estos. Por el contrario, no se encontró relación entre la susceptibilidad/ tolerancia a la roya y el contenido de antioxidantes (Kovács *et al.*, 2012). Por otro lado, en plantas de trigo sometidas a estrés biótico mediante la infección con mildiu (*Blumeria graminis* (DC.) Speer f.sp. *tritici* Ém. Marchal), a pesar de que fue positiva la correlación entre la actividad de las distintas enzimas antioxidantes, no se encontraron diferencias en la respuesta en cuatro líneas de trigo, dos susceptibles y dos tolerantes al hongo (Pál *et al.*, 2013). Se deduce así que el grado de tolerancia del trigo a este último patógeno no está relacionado con la actividad de las enzimas antioxidantes. En condiciones de estrés abiótico, no se vio afectado el contenido de ácido ascórbico en sequía respecto de los testigos de dos cultivares de trigo comerciales (Bártoli *et al.*, 2005).

Ácido ascórbico y glutatión

El ácido ascórbico (AA) y el glutatión (GSH) son antioxidantes hidrosolubles, de bajo peso molecular (Blokhina *et al.*, 2000; Foyer & Noctor, 2011) y que tienen un rol fundamental en la defensa de las plantas contra el estrés oxidativo (Noctor & Foyer, 1998; Smirnoff, 2000).

El **glutatión** (GSH en su forma reducida) constituye un metabolito que posee múltiples funciones relacionadas con la homeostasis y la señalización. Además, actúa en la regulación del ciclo celular, en la muerte celular y en la señalización involucrada con el contenido lumínico (Foyer & Noctor, 2011). La estructura química del glutatión consiste en un tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicina (Hopkins, 1929). Se acumula en las células vegetales en concentraciones milimolares, aumentando 10 a 50 veces el contenido de cisteína libre de las células (Foyer & Noctor, 2011). A pesar de

que el GSH se relacionan con las defensas constitutivas de las plantas (Wittstock & Halkier, 2002), existe evidencia de que estos compuestos se acumulan también en respuesta a elicitores, tratamiento con ácido jasmónico, daño mecánico de tejidos o herbivoría (Bartlett *et al.*, 1999; Brader *et al.*, 2001; Doughty *et al.*, 1995; Mikkelsen *et al.*, 2003). Trabajos más recientes demuestran su rol en la resistencia de las plantas ante el ataque de insectos (Schlaeppli *et al.*, 2008), así como su función en los mecanismos de señalización mediados por ácido salicílico y ácido jasmónico (Foyer & Noctor, 2011).

El glutatión participa también en la regeneración de AA a partir del DHA, en una reacción catalizada por la enzima dehidroascórbico reductasa (DHAR) donde el GSH, dador de electrones, se oxida a disulfuro de glutatión (GSSG). Además, el GSH se regenera debido a la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR), reacción que depende del NADPH (Foyer *et al.*, 1994; Blokhina *et al.*, 2000).

El **ascorbato** constituye uno de los metabolitos más abundantes en las plantas (Noctor & Foyer, 1998; Smirnoff & Wheeler, 2000). Posee múltiples funciones antioxidantes como detoxificador de ERO, en la señalización redox, en la modulación de la expresión génica y en la regulación de la actividad enzimática (Noctor, 2006; Foyer *et al.*, 2009). Diversas técnicas demostraron que el ascorbato cumple un rol muy importante en las vacuolas en situaciones de estrés lumínico, por detoxificación directa o indirecta del H₂O₂ producida en los cloroplastos y volcada hacia las vacuolas. Sin embargo, el conocimiento acerca de la compartimentalización específica del ascorbato en la planta, involucrada con los procesos de desarrollo y de defensa, es aún escaso (Zechmann, 2011).

El ácido ascórbico se acumula en concentraciones intracelulares de 2 a 25 mM (Davey *et al.*, 2000). Constituye una molécula esencial para el crecimiento de las plantas (Alhagdow *et al.*, 2007), participa en la resistencia a estrés y en el control de la floración y el comienzo de la senescencia (Davey *et al.*, 2000). Además, el AA y su forma oxidada -ácido dehidroascórbico (DHA)- pueden actuar como moléculas de señalización (Pastori *et al.*, 2003; Fotopoulos *et al.*, 2008) participando en la interacción con el ambiente, por

ejemplo ante la presencia de organismos patógenos, de ozono y de otros agentes oxidantes (Sanmartin *et al.*, 2003; Fotopoulos *et al.*, 2006).

Varios genes y mecanismos moleculares están relacionados con las respuestas de las plantas al estrés biótico. Las plantas responden ante un daño causado por un insecto o un organismo patógeno mediante la combinación de rutas metabólicas de señalización caracterizadas por la producción de etileno (ET), citoquininas (Ck), ácido jasmónico (AJ), ácido salicílico (AS), ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GA₃) (Mazid *et al.*, 2011). Estudios genéticos y moleculares demostraron que existe una interacción o *cross talk* entre el ácido ascórbico (AA) y varias fitohormonas (Kahn *et al.*, 2012). Por otro lado, el AA como cofactor en la biosíntesis del ácido giberélico, ABA, AS y ET (Prescott *et al.*, 1996) no sólo influye sobre el nivel endógeno sino también sobre la señalización que involucra a estas hormonas. Por lo tanto, el AA afecta a las respuestas propias del estrés biótico al que están expuestas las plantas (Kahn *et al.*, 2012). A la vez, aplicaciones exógenas de AS actúan incrementando la capacidad oxidativa de las plantas (Janda *et al.*, 1999) o induciendo la síntesis de sustancias estabilizadoras como las poliaminas (Németh *et al.*, 2002).

A pesar de la importancia que reviste el AA en las plantas, la regulación de su metabolismo no es aún del todo conocida. El contenido de AA en las plantas varía ante una situación de estrés biótico o abiótico, incluyendo las que sufren un daño mecánico (*wounding*). A pesar de ser muy variable el comportamiento entre especies, predominan los casos en los que disminuye el AA total como consecuencia del daño mecánico (Suza *et al.*, 2010). Además, este daño hace decrecer la tasa de AA de su forma reducida hacia el estado oxidado (Watanabe *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 1997). En este sentido, numerosos estudios demostraron que el daño de los tejidos vegetales influye en la regulación transcripcional de varios genes que gobiernan la biosíntesis y el reciclado del AA. A pesar de ello, pocas generalizaciones pueden hacerse sobre los patrones de expresión de dichos genes ya que no son del todo predictivos sobre el nivel actual del AA (Suza *et al.*, 2010).

El balance entre las formas reducida (AA) y oxidadas (ácido monohidroascórbico y ácido dehidro-ascórbico, MDA y DHA respectivamente) está directamente relacionado con la capacidad de las plantas de responder al

estrés. En respuesta al estrés ambiental se forman especies ERO en las células, se produce la oxidación del ácido ascórbico y se liberan grandes cantidades de DHA, disminuyendo la capacidad antioxidante en la planta estresada. Además, el ascorbato puede considerarse un indicador de estrés biótico y abiótico, debido a que su contenido total en las plantas aumenta en una situación estresante (Vanacker *et al.*, 1998; Chamseddine *et al.*, 2009).

Es de destacar que el ascorbato y el glutatión no actúan de forma independiente, sino que lo hacen de manera conjunta (Noctor *et al.*, 2011; Foyer & Halliwell, 1976; Dixon *et al.*, 2002). Ambos antioxidantes son abundantes y estables en potenciales redox adecuados, interactuando con numerosos compuestos (Foyer & Noctor, 2011). Un ejemplo de su acción conjunta se da cuando una célula es expuesta al ozono. En esta situación, el ácido ascórbico actúa como antioxidante que interviene detoxificando el ozono a nivel del apoplasto y de la membrana plasmática, reacción que conlleva a una reducción del DHA hasta AA, con la colaboración del glutatión (Zechmann, 2011).

Peroxidasas

Las **peroxidasas** (PER; EC 1.11.1.7) son enzimas de óxido-reducción, que se localizan en múltiples sitios y poseen variados roles en las células vegetales. Entre sus funciones se encuentran la detoxificación de ERO, participan en los procesos de crecimiento y desarrollo de las paredes celulares, tales como la oxidación de fenoles, la suberización y la lignificación de las células hospedantes como respuestas al estrés (Hiraga *et al.* 2001; Welinder *et al.*, 2002; Allison & Schultz, 2004; Gulsen *et al.*, 2010).

Su rol defensivo se puede evidenciar por el rápido incremento de la actividad de peroxidasas y de polifenoloxidasas en plantas de maní tratadas con AJ y luego infestadas con el lepidóptero *Spodoptera litura*, así como también en las cantidades de fenoles totales, H₂O₂, MDA y en el contenido de proteínas (War *et al.*, 2011).

Cambios en la actividad de la peroxidasa fueron reportados como respuesta inicial ante estreses biótico y abiótico (Chaman *et al.*, 2001; Allison & Schultz, 2004; Heng-Moss *et al.*, 2004). Existen además trabajos que indican

un aumento en la regulación de la actividad peroxidasa como respuesta a la herbivoría, en plantas resistentes (Hildebrand *et al.*, 1986; Felton *et al.*, 1994; Heng-Moss *et al.*, 2004; Murugesan *et al.*, 2009). En definitiva, la mayor actividad peroxidasa constituye un componente esencial en la estrategia de resistencia de una planta (Hoang, 2010).

El **objetivo** de esta parte del trabajo consiste en estudiar la actividad antioxidante de las plantas ante situaciones de estrés biótico, generadas por la acción directa de un insecto o mediante el asperjado exógeno de las hormonas involucradas en las vías de señalización post- inducción de las defensas de la planta.

Materiales y métodos

Material vegetal. Para cuantificar el contenido de ácido ascórbico se utilizaron dos líneas de trigo (*Triticum aestivum*) como progenitoras de la población objeto de esta tesis. En la presente tesis se trabajó con dos líneas progenitoras seleccionadas por ser contrastantes para los marcadores *Xgwm 334a* y *Xgwm 459*, ambos ubicados hacia el extremo del brazo corto del cromosoma 6A de trigo tal como se muestra a continuación (Figura 1).

A- Röder *et al.*, 1998.

B- Ganal & Röder, 2007.

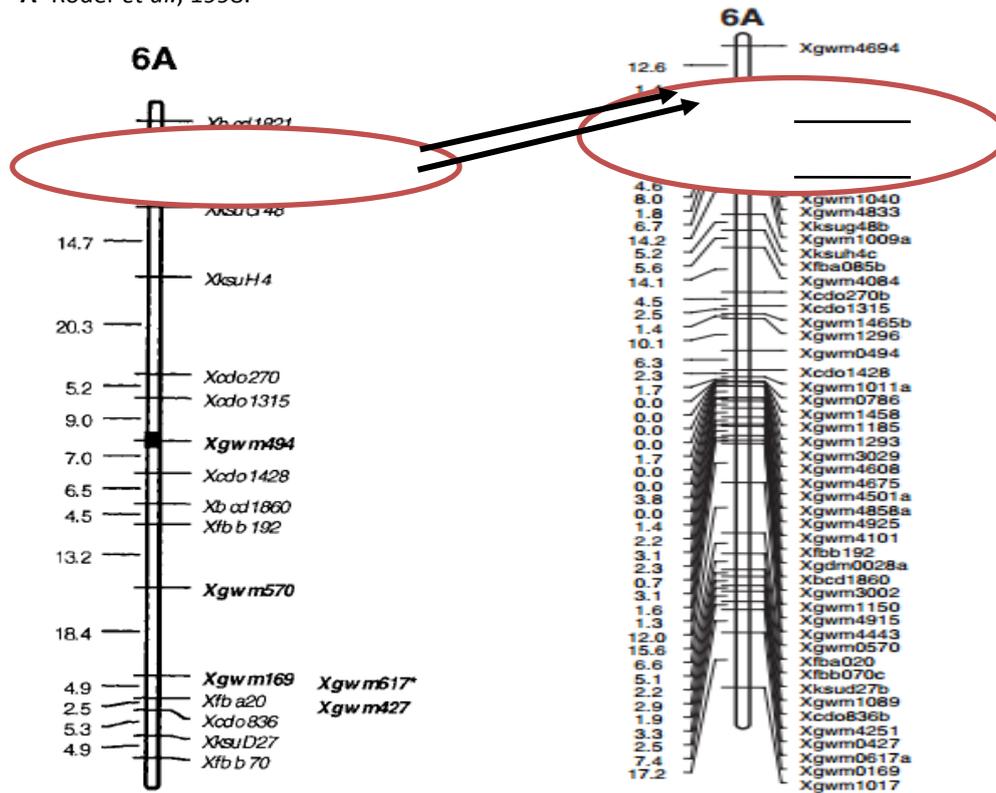


Figura 1. Ubicación de los marcadores microsatélites en el mapa de ligamiento del cromosoma 6AS de trigo.

A- Primer mapa de ligamiento de microsatélites en el cromosoma 6AS (Röder, 1998).

B- Publicación más reciente con mayor número de microsatélites mapeados en el cromosoma 6AS (Ganal & Röder, 2007).

La zona destacada identifica la región de interés para la presente tesis.

Semillas de las líneas madre (M) y padre (P) obtenidas en el IPK (Gatersleben, Alemania) y cuya nomenclatura responde a su rol en los cruzamientos artificiales realizados para este estudio, se pregerminaron en cajas de petri, sobre papel absorbente. Una vez germinadas fueron pasadas a macetas de 1 L de volumen que contenían tierra como sustrato.

Tratamientos. Cuando las plantas llegaron al estadio de entre 3 y 4 hojas expandidas, fueron sometidas a los tratamientos hormonales consistentes en el asperjado con ácido abscísico (ABA) 10 μ M y con etileno (ET, Ethrel®) 500 ppm, hasta chorreo en ambos casos. Otro grupo de plantas fue infestado con 8 pulgones rusos (PR) (*Diuraphis noxia*) por planta y un tercer grupo fue

reservado como testigo, habiendo recibido aspersiones con agua más el tensioactivo Tweed 20® (Polietilenglicol sorbitano monolaurato). Se realizaron 3 repeticiones para cada genotipo (líneas M y P) y tratamientos (ABA, ET, PR, testigos). Transcurridas 72 h desde la realización de los tratamientos, se cosecharon muestras de cada genotipo y tratamiento. Estas fueron llevadas rápidamente a nitrógeno líquido y conservadas a -80 °C hasta el momento de iniciar las determinaciones.

Determinación del contenido de ácido ascórbico. Esta determinación se realizó en un equipo de HPLC (del inglés, *high-performance liquid chromatography*) compuesto por un módulo de envío del solvente (Shimatzu LC-10Atpv) equipado con una columna C-18 (Varian Chromsep, 100 x 4.6 mm) y un detector Shimatzu UV-Vis SPD- 10Avp.

Se homogeneizaron 100 mg de tejido fresco de hojas en nitrógeno líquido con mortero y pilón y luego se agregó 1 ml de TFA (ácido trifluoroacético, 3% V/V) a cada muestra. Rápidamente se centrifugó en frío a 16.000 g por 10 min y se llevó el sobrenadante a un juego de tubos nuevos para luego conservarlos en hielo.

Se sembraron 500 µl del sobrenadante por una columna de elución (Bond Elute C18, Varian TM) para la purificación de la muestra, de acuerdo con Bártoli, *et al.* (2006). Luego se cargó cada columna con 1,5 ml de buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7 y el volumen eluido se colectó en un eppendorf, constituyendo así la muestra filtrada. Se mezclaron 245 µl de cada una de las muestras eluidas con igual cantidad de K₂HPO₄ 100 mM.

Para la determinación del ácido ascórbico total (AA_T) se agregaron 15 µl de ditiotreitól (DTT) 100 mM como agente reductor del DHA. Se agitó y se dejó reaccionar a temperatura ambiente por el término de 5 minutos. Para detener la reacción se agregó al medio 50 µl de TFA al 10%. Se filtraron las muestras y se procedió a la medición por HPLC. El buffer de corrida utilizado fue buffer fosfato de potasio 100 mM pH 3 y el caudal de trabajo fue de 0,5 ml min⁻¹.

Para cuantificar al ácido ascórbico reducido (AA) se agregaron 15 µl de buffer fosfato (pH 7). Se llevó a pH ácido agregando una décima parte de TFA 3% (50 µL). Luego, el contenido de ácido ascórbico oxidado (DHA) se midió por

diferencia entre el ascórbico total y reducido. Posteriormente al filtrado de todas las muestras más el control (ácido ascórbico 100 μM), se inyectaron consecutivamente en un equipo de HPLC Shimadzu LC-10ATvp solvent delivery module, con una columna C-18 (Varian Chromsep 100 mm x 4,6mm) La determinación se realizó a una longitud de onda de 265 nm (Bártoli *et al.*, 2006).

Determinación de la actividad peroxidasa mediante espectrofotometría. La actividad de peroxidasas fue determinada a partir de la capacidad de éstas de oxidar el ácido pirogálico formando el compuesto coloreado purpurogalina (Puntarulo *et al.*, 1988). La mezcla de reacción estuvo conformada por solución buffer fosfatos (50 mM; pH 6,5), ácido pirogálico (45 mM) y H_2O_2 (8 mM). A este medio se le incorporó 30 μl del extracto previamente obtenido por homogeneización con nitrógeno líquido, a partir de cada muestra y tratamiento. La actividad enzimática se midió a 20 °C por un minuto, a una longitud de onda de 430 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.

Finalmente, la actividad peroxidasa se expresó como milimoles de purpurogalina producidos por minuto y por gramo de peso fresco de tejido (Figura 2).

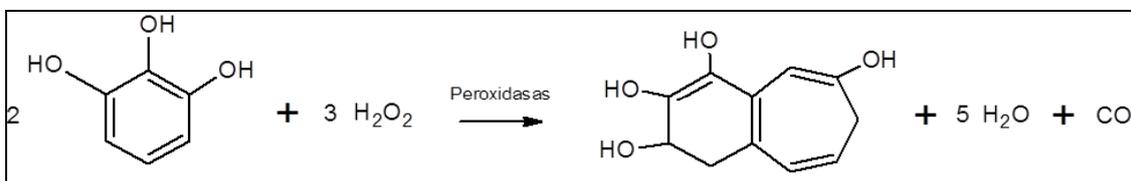


Figura 2. Reacción de formación de purpurogalina a partir de pirogálico por acción de peroxidasas

Análisis estadístico. En todos los casos, los datos se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA). El análisis de medias de las líneas progenitoras se realizó mediante el test de Tukey, por grupos homogéneos ($\alpha:0,05$). Se empleó el programa Statistica (StatSoft Inc, 2005).

Resultados

Determinación del contenido de ácido ascórbico mediante HPLC

La determinación del contenido de AA (expresado en μM) mostró una elevada correlación con las unidades de área del pico en el cromatograma

($R^2=0,9862$; $p<0,001$), valor que se utiliza para estimar el contenido de AA. En consecuencia, se pudo validar la evaluación del contenido de AA a través de la medición del área por debajo del pico del cromatograma (Figura 3).

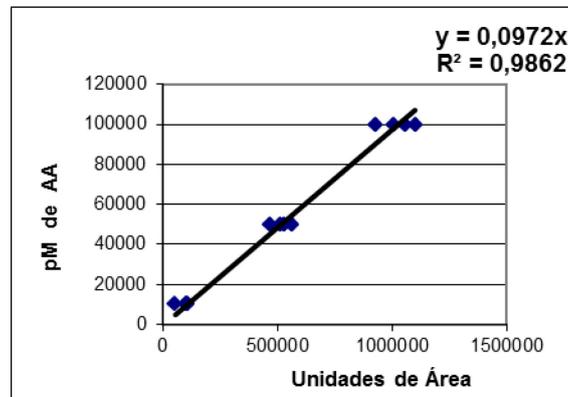


Figura 3. Correlación entre el contenido de ácido ascórbico (pM) y las unidades de área debajo del pico del cromatograma

A partir del análisis de las varianzas para el contenido de **ácido ascórbico total (AA_T)** no se observaron diferencias significativas entre las líneas de trigo estudiadas y tampoco entre los tratamientos aplicados (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de la varianza para el contenido de AA_T.

Fuente de variación	g.l.	CM	F	p
Líneas progenitoras	1	0,232	1,816 ns	0,188
Tratamientos	3	0,123	0,960 ns	0,424
Error	30	0,128		

g.l: grados de libertad; ns: diferencias no significativas; p: valor de probabilidad de la prueba de F

El análisis de la varianza para el contenido de **AA reducido (AA)** no evidenció diferencias significativas entre genotipos ni entre tratamientos (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de la varianza para el AA.

Fuente de variación	g.l.	CM	F	p
Líneas progenitoras	1	0,019	0,410 ns	0,527
Tratamientos	3	0,004	0,095 ns	0,962
Error	30	0,046		

g.l: grados de libertad; ns: diferencias no significativas; p: valor de la probabilidad de la prueba de F

A partir del contenido de AA_T , se puede observar una marcada disminución de la forma reducida (AA) en el caso del tratamiento con ET, para ambas líneas M y P. De manera referencial, la proporción de la forma oxidada (DHA) que se obtiene por diferencia entre AA_T y AA es mayor en el caso de la línea M (Figura 4). La gráfica en forma de picos realizada por el equipo permite apreciar que la diferencia en el contenido de ambas fracciones (AA_T y AA) es mayor en el caso de la línea M tratada con ET (Figura 5), en comparación con igual tratamiento en la línea P (Figura 6).

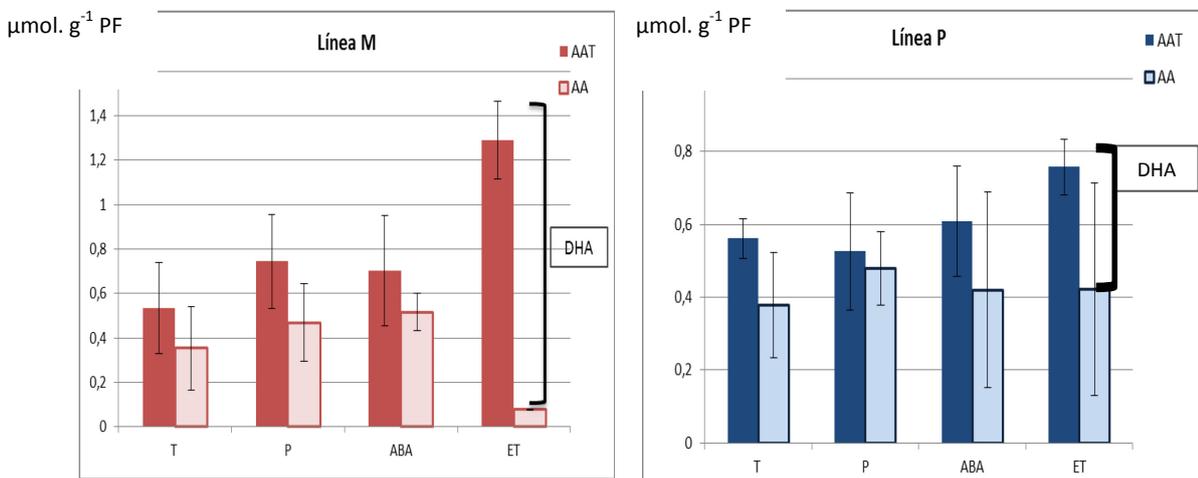


Figura 4. Contenido de ácido ascórbico total (AA_T) y su forma reducida (AA) en las líneas M y P, para los tratamientos con pulgón (P), ABA, ET y sus testigos (T)

Barras oscuras indican AA_T . Barras claras su forma reducida (AA). Los corchetes negros muestran la diferencia entre ambos, asignada a la porción oxidada (DHA).

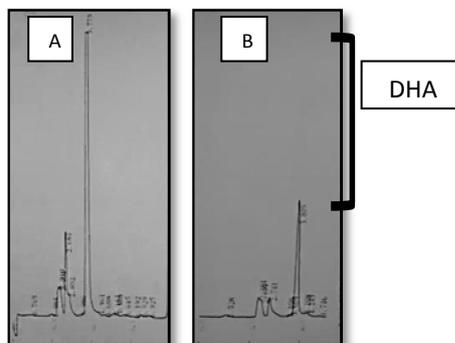


Figura 5. Salida del equipo de HPLC para la línea M tratada con ET.

A- Contenido total de ácido ascórbico (AA_T). B- Contenido de ácido ascórbico reducido (AA). El corchete indica contenido de ácido ascórbico oxidado (DHA)

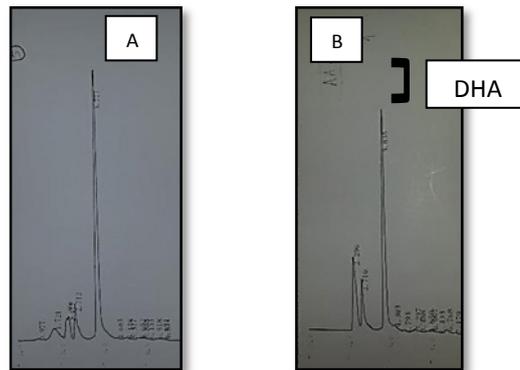


Figura 6. Salida del equipo de HPLC para la línea P tratada con ET. A- Contenido total de ácido ascórbico (AA_T). B- Contenido de ácido ascórbico reducido (AA). El corchete indica contenido de ácido ascórbico oxidado (DHA)

Determinación de la actividad peroxidasa mediante espectrofotometría

La actividad de la enzima peroxidasa no mostró diferencias significativas según el análisis de la varianza realizado (Tabla 3). No hubo diferencias entre las líneas progenitoras, entre los tratamientos recibidos como así tampoco en la interacción entre las líneas progenitoras y los tratamientos.

Tabla 3. Análisis de la varianza para la actividad peroxidasa.

Variables	CM	F	p
Líneas progenitoras (L.P.)	0,0001	1,16 ns	0,303
Tratamientos (Trat.)	0,00016	2,11 ns	0,152
Interacción L.P. x Trat	0,00004	0,57 ns	0,647
Error	0,00007		

ns: diferencias no significativas; p: valor de la probabilidad de la prueba de F

De esta manera, la actividad peroxidasa no se vio afectada por los tratamientos hormonales ni por la infestación con pulgón ruso.

Discusión

De acuerdo con lo observado en trigo para la roya de la hoja por Kovács *et al.* (2012), la tolerancia de las líneas de trigo evaluadas no mostró relación

con el contenido de antioxidantes observado. Líneas que son contrastantes para los marcadores ubicados en el brazo corto del cromosoma 6AS no mostraron diferencias en el contenido de ácido ascórbico ni en la actividad de peroxidasas, sistemas antioxidantes evaluados en el presente capítulo. El grado de tolerancia de las líneas de trigo M y P ante un factor que genera estrés biótico, como la infestación con pulgones y la aspersion de fitohormonas, no se encuentra relacionado ni con el contenido ni con la actividad de antioxidantes, lo que sugiere que la actividad de las enzimas antioxidantes es una consecuencia de la infección y no la causa de la resistencia, al igual que lo planteado por Pál *et al.* (2013).

La activación de las defensas para contrarrestar el efecto nocivo propio de las especies reactivas de oxígeno (ERO) por medio de la síntesis de ácido ascórbico y de peroxidasas, no se observó para los genotipos analizados cuando se aplicaron los inductores de defensas ET, ABA y la infestación con el pulgón ruso. En consecuencia, si bien el ascórbico es ampliamente conocido por sus propiedades detoxificantes, no es el agente antioxidante que las plantas activaron ante la aplicación de bajas concentraciones de fitohormonas o por la acción alimentaria del pulgón ruso para las líneas de trigo analizadas en el presente capítulo. Por lo tanto, no se pudo observar el rol que cumpliría el AA_T como indicador de condiciones de estrés biótico y abiótico (Vanacker *et al.*, 1998; Chamseddine *et al.*, 2009).

En el establecimiento de la interacción planta-áfido, la alimentación del insecto resulta en una activación de peroxidasas, quitinasas intercelulares y β -1,3- glucanasas relacionadas con la liberación de oligosacáridos de la pared celular de la planta (Smith & Boyko 2006). Se conoce que los genes que codifican para peroxidasas (PER), glutatión transferasas (GST), catalasas (CAT), nitrato reductasas y quinona-óxido reductasas son sobreexpresados en las plantas infestadas con áfidos (Zhu-Salzman *et al.*, 2004; Divol *et al.*, 2005; Boyko *et al.*, 2006; Couldridge *et al.*, 2007). No obstante, la determinación cuantitativa de peroxidasas efectuada en el presente capítulo no mostró diferencias significativas entre plantas infestadas con pulgón ruso y los testigos.

Del mismo modo, la actividad de peroxidasas fue la misma en las líneas evaluadas y en los tratamientos con ET y ABA a los que fueron sometidas. Si

bien se conoce que ante el estrés las plantas responden, entre otras cosas, incrementando la actividad peroxidasa (Chaman *et al.*, 2001; Allison & Schultz 2004; Heng-Moss *et al.*, 2004), en el estado fenológico de tercera a cuarta hoja expandida y con las concentraciones de ambas fitohormonas aplicadas, no se apreciaron esas diferencias citadas en la bibliografía. Así, no se observó inducción diferencial alguna entre las líneas evaluadas ni entre los tratamientos aplicados.

Aunque no se encontraron diferencias significativas en la evaluación del AA_T ni de su forma reducida (AA), entre las líneas evaluadas ni entre los tratamientos aplicados, se concluye que el contenido de ácido ascórbico de ambos genotipos no se vio afectado por estos tratamientos. Sin embargo, a partir del balance entre el AA y la forma oxidada (DHA) se observó una mayor proporción de esta última en el caso del tratamiento con ET para ambas líneas estudiadas, comportamiento que se vio aún más acentuado en el caso de la línea M. En consecuencia, aunque su contenido de AA_T no se modificó como respuesta al estrés, como propusieron Vanacker *et al.* (1998) y Chamseddine *et al.* (2009), la línea M liberó mayor cantidad de DHA ante la inducción con ET.

En definitiva, estos antioxidantes no serían indicadores en situaciones de estrés inducido mediante ET, ABA y pulgón ruso para las líneas de trigo estudiadas.

Conclusiones

La tolerancia al estrés biótico no está determinada por la actividad diferencial de los sistemas antioxidantes en respuesta a dicho estrés, como por ejemplo el ácido ascórbico, ni por un mayor contenido intrínseco de antioxidantes como peroxidasas para las líneas y las condiciones ensayadas.

Bibliografía

Alhag Dow, M., F. Mounet, L. Gilbert, A. Nunes-Nesi, V. Garcia, D. Just, J. Petit, B. Beauvoit, A.R. Fernie, C. Rothan & P. Baldet. 2007. Silencing of the Mitochondrial Ascorbate Synthesizing Enzyme L-Galactono-1,4-Lactone Dehydrogenase Affects Plant and Fruit Development in Tomato. *Plant Physiology* 145: 1408-1422.

- Allison, S.D. & J.C. Schultz 2004. Differential activity of peroxidase isozymes in response to wounding, gypsy moth, and plant hormones in northern red oak (*Quercus rubra* L.). *Journal of Chemical Ecology* 30: 1363-1379.
- Apel, K. & H. Hirt. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Balla, K., S. Bencze, T. Janda & O. Veisz. 2009. Analysis of heat stress tolerance in winter wheat. *Acta Agronomica Hungarica* 57: 437-444.
- Bartlett, E., G. Kiddle, I. Williams & R. Wallsgrove. 1999. Wound-induced increases in the glucosinolate content of oilseed rape and their effect on subsequent herbivory by a crucifer specialist. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 91: 163-167.
- Bártoli, C.G., J.J. Guamet, G. Kiddle, G.M. Pastori, R. Di Cagno, F.L. Theodoulou & C.L. Foyer. 2005. Ascorbate content of wheat leaves is not determined by maximal L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. *Plant, Cell and Environment* 28: 1073-1081.
- Bártoli, C.G., J. Yu, F. Gómez, L. Fernández, L. McIntosh & C.H. Foyer. 2006. Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany* 57: 1621-1631.
- Bencze, S., Z. Bamberger, T. Janda, K. Balla, Z. Bedő & O. Veisz. 2011. Drought tolerance in cereals in terms of water retention, photosynthesis and antioxidant enzyme activities. *Central European Journal of Biology* 6: 376-387.
- Bhattacharjee, S. 2011. Cap. 1: Sites of Generation and Physicochemical Basis of Formation of Reactive Oxygen Species in Plant Cell. Pág. 1-31. En: Gupta S. (2011). *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*, editado por S. Dutta. Published by Science Publishers. 362 pp.
- Blokhina, O.B., E. Virolainen, K.V. Fagerstedt, A. Hoikkala, K. Wähälä & T.V. Chirkova. 2000. Antioxidant status of anoxia tolerant and intolerant plant species under anoxia and reoxygenation. *Physiologia Plantarum* 109: 396-403.
- Blokhina, O., E. Virolainen & V. Fagerstedt. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91: 179-194.
- Boyko, E.V., C.M. Smith, V.K. Thara, J.M. Bruno & Y. Deng. 2006. The molecular basis of plant gene expression during aphid invasion: wheat Pto- and Pti-like sequences are involved in interactions between wheat

- and Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 99: 1430-1445.
- Brader, G., E. Tas & E.T. Palva. 2001. Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora*. *Plant Physiology* 126: 849-860.
- Chaman, M.E., L.J. Corcuera, G.E. Zuniga, L. Cardemil & V.H. Argandoña. 2001. Induction of soluble and cell wall peroxidases by aphid infestation in barley. *L. Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2249-2253.
- Chamseddine, M., B.A. Wided, H. Guy, C. Marie-Edith & J. Fatma. 2009. Cadmium and copper induction of oxidative stress and antioxidative response in tomato (*Solanum lycopersicon*) leaves. *Plant Growth Regulation* 27:89-99.
- Couldridge, C., H.J. Newbury, B. Ford-Lloyd, J. Bale & J. Pritchard. 2007. Exploring plant responses to aphid feeding using a full *Arabidopsis* microarray reveals a small number of genes with significantly altered expression. *Bulletin of Entomological Research* 97, 523-532.
- Davey, M.W., M.V. Montagu, D. Inzé, M. Sanmartin, A. Kanellis, N. Smirnov, I.J.J. Benzie, J.J. Strain, D. Favell & J. Fletcher. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of Science of the Food and Agriculture* 80: 825-860.
- Divol, F., F. Vilaine, S. Thibivilliers, J. Amselem, J.C. Palauqui, C. Kusiak & S. Dinant. 2005. Systemic response to aphid infestation by *Myzus persicae* in the phloem of *Apium graveolens*. *Plant Molecular Biology* 57: 517-540.
- Dixon, D.P., B.G. Davis, & R. Edwards. 2002. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 277: 30859-30869.
- Doughty K.J., Kiddle G.A., Pye B.J., Wallsgrave R.M. & Pickett J.A. 1995. Doughty, K.J., G.A. Kiddle, B.J. Pye, R.M. Wallsgrave & J.A. Pickett. 1995. Selective induction of glucosinolates in oilseed rape leaves by methyl jasmonate. *Phytochemistry* 38: 347-350.
- Felton, G.W., C.B. Summers & A.J. Mueller. 1994. Oxidative responses in soybean foliage to herbivory by bean leaf beetle and three-corned alfalfa leafhopper. *Journal of Chemical Ecology* 20: 639-650.
- Fotopoulos, V., M. Sanmartin & A.K. Kanellis. 2006. Effect of ascorbate oxidase over-expression on ascorbate recycling gene expression in response to agents imposing oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 57: 3933-3943.

- Fotopoulos, V., M.C. De Tullio, J. Barnes & A.K. Kanellis. 2008. Altered stomatal dynamics in ascorbate oxidase over-expressing tobacco plants suggest a role for dehydroascorbate signalling. *Journal of Experimental Botany* 59: 729-737.
- Foyer, C.H. & B. Halliwell. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25.
- Foyer, C.H., P. Derscourvières & K.J. Kunert. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* 17: 507-523.
- Foyer, C.H. & G. Noctor. 2009. Redox regulation and photosynthetic organisms: Signaling, acclimation and practical implications. *Antioxidant and Redox Signaling* 11: 861-905.
- Foyer, C.H. & G. Noctor. 2011. Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology* 155: 2-18.
- Gulsen, O., S. Kaymak, S. Ozongunb & A. Uzun. 2010. Genetic analysis of Turkish apple germplasm using peroxidase gene-based markers. *Scientia Horticulturae* 125: 368-373.
- Heng-Moss, T.M., G. Sarath, F. Baxendale, D. Novak, S. Bose, N. Xinhi & S. Quisenberry. 2004. Characterization oxidative enzyme changes in buffalograsses challenged by *Blissus occiduus*. *Journal of Economic Entomology* 97: 1086-1095.
- Hildebrand, D.F., J.G. Rodriguez, G.C. Brown, K.T. Luu & C.S. Volden. 1986. Peroxidative responses of leaves in two soybean genotypes injured by two-spotted spider mites (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology* 79: 1459-1465.
- Hiraga, S., K. Sasaki, H. Ito, Y. Ohashi & H. Matsui. 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 42: 462-468.
- Hoang, A. 2010. The rol of peroxidase in the defense response of buffalograss to chinch bugs. Tesis de maestría. Universidad de Nebraska. 88 pp.
- Hopkins, F.G. 1929. On glutathione: a reinvestigation. *Journal of Biological Chemistry* 84: 269-320.
- Janda, T., G. Szalai, I. Tari & E. Páldi. 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* 208: 175-180.
- Janda, T., G. Szalai, K. Rios-Gonzalez, O. Veisz & E. Páldi. 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Science* 164: 301-306.

- Janda, T., G. Szalai, K. Lesko, R. Yordanova, S. Apostol & L. Petrova Popova. 2007. Factors contributing to enhanced freezing tolerance in wheat during frost hardening in the light. *Phytochemistry* 68: 1674-1682.
- Kahn, T.A., M. Mazid & F. Mohammad. 2012. Potential of Ascorbic acid against oxidative burst in plants under biotic stress: A Review. *Journal of Industrial Research and Technology* 2: 72-80.
- Kovács, V., G. Vida, G. Szalai, T. Janda & M. Pál. 2012. Relationship between biotic stress tolerance and protective compounds in wheat genomes. *Acta Agronomica Hungarica* 60:131-141.
- Kovalchuk, I. 2011. Chapter 2: Multiple Roles of Radicals in Plants. En: Gupta S. 2011. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*, editado por S. Dutta. Publicado por Science Publishers. 362 pp.
- Mazid, M., T.A. Khan, A.H. Khan, S. Quddusi & F. Mohammad. 2011. Occurrence, biosynthesis and potentialities of ascorbic acid in plants. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences* 1: 167-184.
- Mikkelsen, M.D., B.L. Petersen, E. Glawischnig, A.B. Jensen, E. Andreasson & B.A. Halkier. 2003. Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in *Arabidopsis* by defense signaling pathways. *Plant Physiology* 131: 298-308.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Murugesan, K., I.H. Yang, Y.M. Kim, J.R. Jeon & Y.S. Chang. 2009. Enhanced transformation of malachite green by laccase of *Ganoderma lucidum* in the presence of natural phenolic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82: 341-350.
- Németh, M., T. Janda, E. Horváth, E. Páldi & G. Szalai. 2002. Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. *Plant Science* 162: 569-574.
- Noctor, G. 2006. Metabolic signalling in defence and stress: The central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell and Environment* 29: 409-25.
- Noctor, G. & C.H. Foyer 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279.
- Noctor, G., G. Queval, A. Mhamdi, S. Chaouch & C.H. Foyer. 2011. Glutathione. *The Arabidopsis Book*, 9: 1-32. Published by The American Society of Plant Biologists.
- Pál, M., V. Kovács, G. Vida, G. Szalai & T. Janda. 2013. Changes induced by powdery mildew in the salicylic acid and polyamine contents and the

- antioxidant enzyme activities of wheat lines. *European Journal of Plant Pathology* 135: 35-47.
- Passardi, F., C. Cosio, C. Penel & C. Dunand. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* 24: 255-265.
- Pastori, G.M., G. Kiddle, J. Antoniw, S. Bernard, S. Veljovic-Jovanovic, P.J. Verrier, G. Noctor & C.H. Foyer. 2003. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell* 15: 939-951.
- Prescott, A.G. 1996. Dioxygenases: molecular structure and role in plant metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology* 47:245-71.
- Puntarulo, S., R. Sánchez & A. Boveris. 1998. Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. *Plant Physiology* 86: 626-630.
- Sanmartin, M., P.D. Drogoudi, T. Lyons, I. Pateraki, J.D. Barnes & A.K. Kanellis. 2003. Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta* 216: 918-928.
- Schlaeppli, K., N. Bodenhausen, A. Buchala, F. Mauch & P. Reymond. 2008. The glutathione-deficient mutant *pad2-1* accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *The Plant Journal* 55: 774-786.
- Smirnoff, N. 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 229-235.
- Smirnoff, N. & G.L. Wheeler. 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *CRC Critical Reviews in Plant Science* 19: 267-290.
- Smith, C.M. & E.V. Boyko. 2006. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 122: 1-16.
- StatSoft Inc. 2005. Statistica (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com.
- Suza, W.P., C.A. Avila, K. Carruthers, S. Kulkarni, F.L. Goggin & A. Lorence. 2010. Exploring the impact of wounding and jasmonates on ascorbate metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 337-350.
- Vanacker H., T.L.W. Carver & C.H. Foyer. 1998. Pathogeninduced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology* 117: 1103-14.

- Varga, B., T. Janda, E. László & O. Veisz. 2012. Influence of abiotic stresses on the antioxidant enzyme activity of cereals. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 849-858.
- War A.R., M.G. Paulraj, M.Y. War & S. Ignacimuthu. 2011. Jasmonic acid-mediated induced resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Plant Growth Regulation* 30: 512-23.
- Watanabe, M., Y. Itho, Y. Jo, K. Yasuda, K. Kamachi & Y. Watanabe. 2007. Redox and translational regulation of glutamate dehydrogenase a subunits in *Brassica napus* under wounding stress. *Plant Science* 172: 1182-1192.
- Welinder, K.G., A.F. Justesen, I.V.H. Kjærsgard, R.B. Jensen, S.K. Rasmussen, H.M. Jespersen & L. Duroux. 2002. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry* 269: 6063-6081.
- Wittstock, U. & B.A. Halkier. 2002. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends Plant Science* 7: 263-270.
- Wojtaszek, P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* 322: 681-692.
- Wright, K.P. & A.A. Kader. 1997. Effect of slicing and controlled-atmosphere storage on the ascorbate content and quality of strawberries and persimons. *Postharvest Biology and Technology* 10: 39-48.
- Zechmann, B. 2011. Subcellular distribution of ascorbate in plants. *Plant Signaling and Behavior* 6: 360-363.
- Zhu-Salzman, K., R.A. Salzman, J.E. Ahn & H. Koiwa. 2004. Transcriptional Regulation of Sorghum Defense Determinants against a Phloem-Feeding Aphid. *Plant Physiology* 134: 420-431.

CAPÍTULO 3.

Estudio de la tolerancia a etileno de dos líneas progenitoras y sus descendientes F₁, F₂ y F₃

Contenido

<u>Introducción</u>	71
<u>Los mecanismos celulares y moleculares de la acción del etileno</u>	73
<u>ET como hormona elicitada en condiciones de estrés</u>	74
<u>Materiales y métodos</u>	75
<u>Material vegetal empleado</u>	75
<u>Cruzamientos</u>	75
<u>Tratamientos</u>	75
<u>Manejo de las plantas</u>	76
<u>Selección de las plantas F₂ para la obtención de la filial F₃</u>	77
<u>Análisis estadístico</u>	78
<u>Resultados</u>	78
<u>Líneas progenitoras madre (M) y padre (P)</u>	78
<u>Primera filial (F₁)</u>	80
<u>Segunda filial (F₂)</u>	81
<u>Tercera filial (F₃)</u>	83
<u>Discusión</u>	85
<u>Conclusiones</u>	88
<u>Bibliografía</u>	89

Introducción

Las fitohormonas desempeñan funciones clave en los procesos de crecimiento y desarrollo que lleva adelante una planta durante su vida, así como también actúan ante situaciones de estrés biótico y/o abiótico (Bari & Jones, 2009). Las plantas producen una amplia variedad de hormonas, como por ejemplo auxinas, giberelinas, ácido abscísico (ABA), citocininas, ácido salicílico (AS), etileno (ET), jasmonatos (AJ) y brasinoesteroides (BR) (Bari & Jones, 2009). Más recientemente, se ha identificado a las estrigolactonas como una nueva clase de hormona vegetal relacionada con la inhibición del crecimiento de las yemas axilares en el tallo (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008).

Se ha progresado en la comprensión de los aspectos individuales de la percepción hormonal, en la traducción de sus señales y en la influencia sobre su expresión génica. Sin embargo, aún resultan poco claros los mecanismos por medio de los cuales las plantas integran los cambios en los niveles hormonales inducidos por el estrés, así como la iniciación de sus respuestas adaptativas (Bari & Jones, 2009).

Ante la acción alimentaria de ciertos insectos chupadores- suctores, como los áfidos, las respuestas defensivas de las plantas involucran la acción en cascada de numerosas moléculas de defensa. Las vías de señalización son dirigidas por las fitohormonas AJ, AS, ET, ABA, AG, las cuales inducen las defensas de las plantas ante el ataque de los áfidos (Gao *et al.*, 2007). Estas moléculas ejercen su acción en forma conjunta o separadamente (Morkunas *et al.*, 2011).

La hormona vegetal etileno (ET) se produce en la mayoría de los órganos de las plantas superiores, dependiendo su nivel de producción del tipo de tejido y de su estado de desarrollo (Taiz & Zeiger, 2006). Esta hormona fue descubierta por su efecto sobre el crecimiento de las plántulas y la maduración de los frutos y, por lo tanto, es en las regiones meristemáticas y nodales donde es más evidente su actividad biosintética. En el año 1934, Gane y otros investigadores identificaron químicamente al etileno como un producto natural del metabolismo vegetal y fue posteriormente considerado una hormona debido a sus efectos sobre las plantas. Desde entonces se ha comprobado que regula

una gran cantidad de procesos en los vegetales, como la germinación de semillas, la expansión celular, la floración, la senescencia y la abscisión (Taiz & Zeiger, 2006; Yoo *et al.*, 2009).

El ET afecta tanto al crecimiento como al desarrollo de las plantas (Abeles *et al.*, 1992). En cuanto al crecimiento, su efecto se asocia con la regulación del tamaño celular a través de la restricción en la elongación de las células, aunque puede regular también la división celular. Se conoce que la aplicación de ET a plántulas que crecen en la oscuridad causa la inhibición de la elongación del hipocótilo (Guzmán & Ecker, 1990). La respuesta, visible a partir de los 15 minutos y de carácter reversible (Binder *et al.*, 2004), consiste en la disminución de la elongación celular y está asociada con la reorientación del citoesqueleto de las células (Le *et al.*, 2005). Asimismo, se considera que el ET influye sobre el desarrollo, particularmente en los procesos de maduración, senescencia y abscisión, fenómenos relacionados con los estadios finales del desarrollo de una planta. Además, el ET ejerce funciones de regulador a lo largo del ciclo de vida vegetal, como la estimulación de la formación de raíces, el control de la formación de nódulos en las leguminosas, la inhibición de la formación de tubérculos y bulbos (órganos de almacenamiento), promueve o inhibe la floración según la especie, induce la producción de flores femeninas en cucurbitáceas (Schaller, 2012). Además, casi todas las condiciones de estrés biótico y/o abiótico inducen la síntesis de etileno en las plantas (Bleecker & Kende, 2000).

El ET es una molécula sencilla que pertenece a la clase de las olefinas o alquenos y posee un bajo peso molecular (28). Es un compuesto inflamable que se oxida fácilmente a óxido de etileno, el cual puede hidrolizarse a etilenglicol. En la mayoría de los tejidos vegetales puede oxidarse completamente a CO₂. Además, es liberado fácilmente desde los tejidos vegetales y difunde a través de los espacios intercelulares hacia el exterior del tejido. El etileno se sintetiza a partir de la *metionina*, vía la *S-adenosil-metionina* (AdoMet) y el aminoácido cíclico no proteico ACC (ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico) (Adams & Yang, 1979), en presencia de oxígeno. A través de una ruta biosintética cíclica denominada 'ciclo de Yang' (Yang & Hoffman, 1984), la enzima ACC sintasa cataliza la conversión de AdoMet a ACC, mientras que la ACC oxidasa interviene en la conversión de ACC a etileno.

Varios estudios evidenciaron que la señalización mediada por ET es facilitada por una familia de receptores que contienen cobre. La ruta metabólica que utiliza para su síntesis está compuesta por una cascada de MAP kinasas, un intermediario transportador de metales y una cascada de transcripción (Bleecker & Kende, 2000).

Los mecanismos celulares y moleculares de la acción del etileno

A pesar de la gran cantidad de efectos del etileno sobre el desarrollo, se cree que las primeras etapas de la acción del etileno son similares en todos los casos. Implican la unión a un receptor, seguida de una o más vías de traducción de señal que dan lugar a una respuesta celular. El etileno ejerce su efecto, principalmente, por alteración del patrón de expresión génica (Taiz & Zeiger, 2006).

Ante el estrés biótico se activan en las plantas factores de respuesta a etileno (ERF), como por ejemplo ante la acción de un organismo patógeno (Sharoni *et al.*, 2011). El rol de las proteínas ERF y DREB en las respuestas de las plantas ante el estrés biótico y abiótico fueron bien documentadas (Agarwal *et al.*, 2006; Agarwal *et al.*, 2010). Además, serían los ERFs los principales componentes que posicionan al ET como regulador de un amplio rango de procesos fisiológicos, de forma coordinada (Pirrello *et al.*, 2012).

En *Arabidopsis*, tomate y probablemente otras especies vegetales, los receptores de etileno están codificados por familias multigénicas. Se ha identificado el rol de numerosos ERFs en las respuestas de defensa de las plantas de *Arabidopsis* (Mc Grath *et al.*, 2005). La mutagénesis dirigida que ocasiona una completa inactivación de los cinco receptores del etileno en *Arabidopsis* (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4) ha demostrado que son redundantes a nivel funcional (Hua & Meyerowitz, 1998). Es decir, la mutación de uno solo de los genes que codifica una de estas proteínas no tiene ningún efecto, aunque la mutación de los cinco genes de los receptores muestra una respuesta constitutiva al etileno. Además, los ERFs actúan en la integración del metabolismo cruzado (“crosstalk”) entre vías de señalización mediadas por ET, AJ, AS y otras fitohormonas, en pos de modular la expresión génica de acuerdo con el estímulo percibido por las plantas (Núñez-Pastrana *et al.*, 2013). Por otro lado, se conoce que la proteína CTR1 parece estar relacionada con RAF-1, una

proteína quinasa MAPKKK (proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógeno) que está implicada en la traducción de varias señales reguladoras externas y en las rutas de señalización en un amplio rango de organismos, desde la levadura hasta los seres humanos (Taiz & Zeiger, 2006).

ET como hormona elicitada en condiciones de estrés

Casi todas las condiciones de estrés abiótico y/o biótico elicitán ET en las plantas (Bleecker & Kende, 2000), como en el caso de los estreses causados por salinidad, sequía, frío, inundación y por infecciones/ infestaciones de microorganismos/ insectos (Yang *et al.*, 2013). Los tejidos vegetales que muestran signos de infección por parte de un patógeno o debidos al daño mecánico, producen niveles elevados de ET (Johnson & Ecker, 1998). Así, el aumento de la biosíntesis de esta hormona, en condiciones de estrés, parece ser debido a una mayor transcripción del ARNm de la ACC *sintasa*, enzima que cataliza la conversión de *AdoMet* (S- adenosil-metionina) al aminoácido cíclico no proteico ACC (ácido 1-aminociclopropano 1- carboxílico) (Adams & Yang, 1979).

A pesar de que se conoce que los niveles endógenos de ciertas hormonas aumentan ante situaciones estresantes, aún no es clara la relación que existe entre el contenido de las fitohormonas y el nivel de tolerancia al estrés, aunque se sabe que las plantas ajustan finamente el balance de sus sistemas de defensa luego de la percepción de una amenaza biótica, a fin de oponerse adecuadamente al organismo adverso (Reymond & Farmer, 1998; Walling, 2000).

Existe, además, una significativa interferencia entre las respuestas al estrés biótico mediadas por ET y los mecanismos que involucran al AS, mientras que la relación ET- AJ es de tipo sinérgica (Broekaert *et al.*, 2006).

Dos líneas progenitoras dihaploides (madre 'M' y padre 'P') obtenidas para el mapeo fino en el brazo corto del cromosoma 6A fueron seleccionadas por su comportamiento diferencial frente a áfidos y a tratamientos hormonales y, además, por ser portadoras de formas contrastantes en los marcadores que flanquean al gen de interés: Xgwm459 y Xgwm334a (Castro *et al.*, 2005, 2008).

El **objetivo** del presente capítulo consistió en caracterizar, mediante aplicaciones exógenas de ET, como tolerantes o susceptibles a un grupo de

plantas conformado por dos líneas progenitoras M y P contrastantes para dos marcadores ubicados en el cromosoma 6AS de *Triticum aestivum*, la F₁ producto del cruzamiento dirigido entre ambas, la F₂ obtenida por libre autofecundación y un grupo selecto de plantas F₃ proveniente de las anteriores.

Materiales y métodos

Material vegetal. Se evaluaron 64 plantas correspondientes a la línea progenitoras madre (M), 74 plantas de la línea progenitora padre (P) (ambas líneas obtenidas en el IPK, Gatersleben, Alemania) 38 plantas F₁ producto del cruzamiento forzado entre ambas y 6884 plantas F₂. Además, se utilizaron en este análisis 300 plantas F₃ descendientes de un grupo de 211 plantas F₂ que fueron seleccionadas según su crecimiento superior o inferior a la media, más o menos un desvío estándar, ante el tratamiento con ET. Las generaciones F₁, F₂ y F₃ se obtuvieron a lo largo de tres ciclos productivos.

Cruzamientos. Durante el año 2007 se sembraron ambos progenitores en forma escalonada y se cruzaron entre sí artificialmente. Siendo el trigo una especie cleistógama, para efectuar los cruzamientos debió evitarse la autofecundación. Ambos progenitores se cruzaron en forma recíproca, es decir, los dos fueron utilizados como padre (aportando el polen) y como madre (aportando los óvulos) en distintas oportunidades. Los cruzamientos artificiales se realizaron mediante la técnica tradicional que consiste en emascular y polinizar con la ayuda de un pincel. Se trabajó en las horas secas y soleadas del mediodía por ser el momento del día en el que los estigmas están más receptivos y el polen con menor humedad.

A partir de la evaluación y trasplante al suelo de las líneas progenitoras M y P, en años sucesivos se obtuvieron las F₁ (M x P), las F₂ y las F₃, estas últimas producto de la autofecundación de plantas seleccionadas en la generación anterior (F₂).

Tratamientos. La totalidad de las semillas evaluadas se germinaron en oscuridad a 27° C durante 24 h. Se trasplantaron a viales de 5 cm de largo x 1,4 cm de diámetro, conteniendo vermiculita estéril, trabajando bajo luz roja a

fin de suprimir la expansión del primer entrenudo y estimular el crecimiento del coleoptilo (Weaver, 1976; Castro *et al.*, 2003). Cuando el coleoptilo presentó una longitud de entre 0,5 y 0,7 cm, transcurridas entre 28 y 36 h desde la germinación, se midió dicha longitud (*longitud inicial*) y se aplicó el tratamiento correspondiente (ET o agua). Transcurridas 24 h de la aplicación, se volvió a medir la longitud del coleoptilo (*longitud final*). El manejo de las semillas y plántulas se realizó bajo luz roja (Figura 1). Como tratamiento inductor se aplicó 80 µl de ET (Ethrel®- 500 ppm) por vial. Los testigos recibieron una solución de agua y Tween20® (Polietilenglicol sorbitano monolaurato). La mitad de las plantas de ambas líneas progenitoras y la F₁ obtenida de su cruzamiento recibió el tratamiento con ET, mientras que la otra mitad de los progenitores y de la F₁ se mantuvo como control. Por el contrario, todas las plantas F₂ fueron tratadas con ET y no se reservó un grupo como testigo. Por tratarse de la primera generación segregante en la que se encontrará representada la máxima variabilidad genética, el genotipo es variable entre las plantas que pertenecen a dicha filial. En consecuencia, no es posible aislar el efecto del tratamiento del genotipo de cada planta en particular.

Manejo de las plantas. Después de evaluadas, el total de las plantas fue trasplantado (Figura 2) a bandejas 'speedlings' conteniendo tierra fértil, colocados sobre el suelo previamente fertilizado con urea en el umbráculo perteneciente a la cátedra de Genética (Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP). Allí pasaron todo el ciclo y fueron regadas según sus requerimiento, con una frecuencia diaria en las épocas de mayor evapotranspiración (primavera, principios de verano) y día por medio en los restantes meses de cultivo (Figura 3).



Figura 1. Medición de la altura de coleoptilo bajo luz roja



Figura 2. Estado de las plantas al momento del trasplante



Figura 3. Plantas establecidas en el umbráculo

Selección de las plantas F_2 para la obtención de la filial F_3 . Según el crecimiento relativo de las plantas F_2 en el estado de coleoptilo, se seleccionó entre ellas a un grupo de plantas correspondiente al 5% superior, identificadas por mostrar valores de tasas de crecimiento mayores a un desvío estándar del promedio de la generación F_2 . Se seleccionó también el 5% de las plántulas pertenecientes al extremo inferior, cuyas tasas de crecimiento fueron menores a un desvío estándar del promedio de dichas tasas. Las 211 plantas así escogidas, representantes de los extremos de la generación F_2 , conformaron la

generación filial F₃ sembrada el año siguiente. A partir de estas últimas, se seleccionó un grupo de 300 plantas F₃ para ser tratadas con ET.

Análisis estadístico. Se realizó el análisis de la varianza mediante el Modelo General Linear (GLM) y en los casos en que hubo diferencias significativas se determinaron las pruebas de medias, como el test de Tukey o la prueba LSD de Fisher (*LSD, least significant differences*, diferencias mínimas significativas). En la totalidad de los datos presentados se cumplen los supuestos de aleatoriedad, normalidad y homocedasticidad requeridos por el modelo. Los análisis se realizaron con el programa Statistica (StatSoft Inc, 2005).

Resultados

Líneas progenitoras madre (M) y padre (P)

En el análisis de la varianza (ANOVA) efectuado sobre el crecimiento relativo de las líneas progenitoras M y P, tratadas con ET y testigo, se observaron diferencias altamente significativas entre los genotipos, así como también entre los tratamientos. No obstante, no hubo diferencias en la interacción entre ambas variables (Tabla 1).

Tabla 1. ANOVA para el crecimiento relativo de las líneas progenitoras, testigos y tratadas con ET

Fuente de variación	CM	F	P
Genotipos	782,94	19,57***	0,0001
Tratamientos	563,50	65,34***	0,0001
Genotipos * Tratamientos	56,23	16,88 ns	0,16
Error	28,35		

CM: cuadrado medio; ***: diferencias altamente significativas ($p < 0,001$);

ns: diferencias no significativas

La distribución de las plantas pertenecientes a la línea M- testigo se modificó cuando las plantas fueron tratadas con ET, habiéndose agrupado hacia valores más bajos de crecimiento relativo. Sin embargo, no se observaron diferencias entre el crecimiento relativo medio en ambas situaciones (Figura 4).

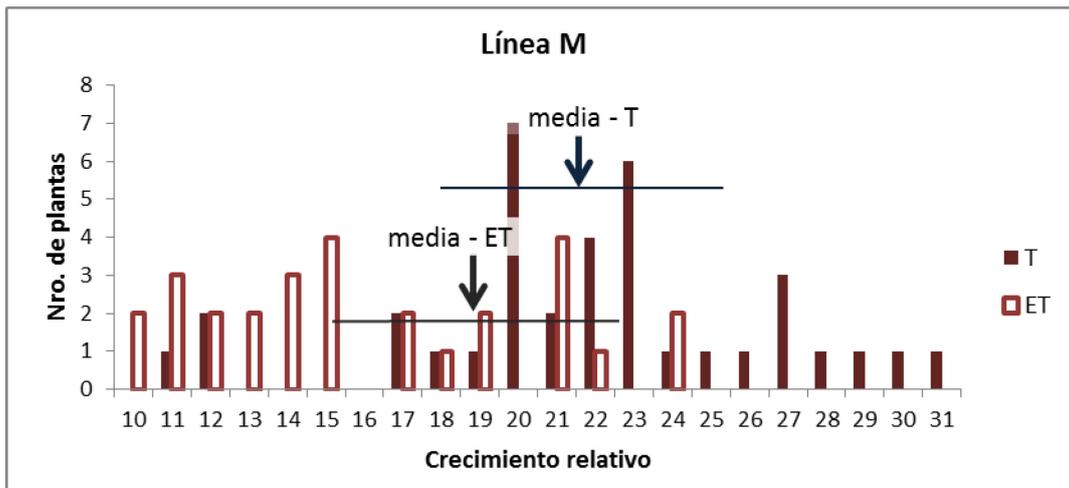


Figura 4. Distribución del crecimiento relativo de la línea M, testigos (T) y tratadas con etileno (ET)

Barras horizontales representan el desvío estándar del crecimiento relativo.

Por el contrario, la línea P evidenció una marcada disminución de su crecimiento relativo por efecto del tratamiento con ET, respecto de los testigos (Figura 5).

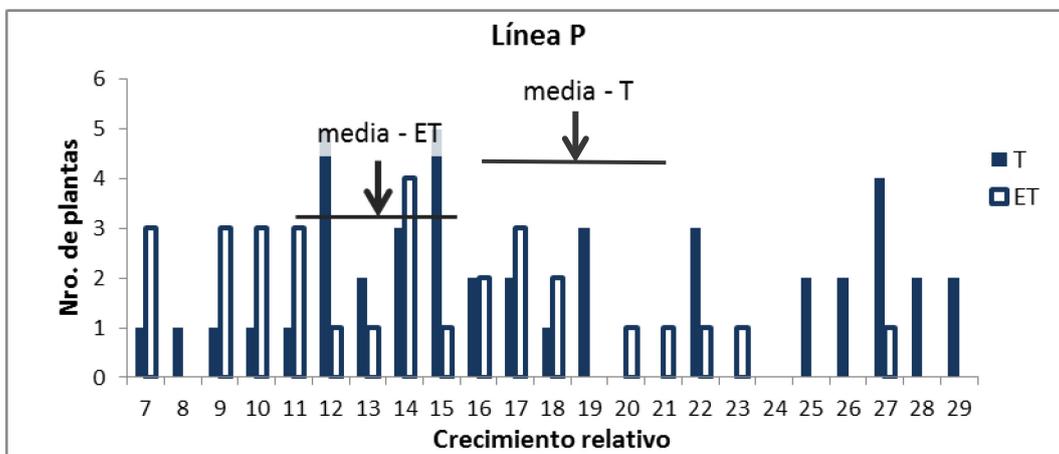


Figura 5. Distribución del crecimiento relativo de la línea P, testigos (T) y tratadas con etileno (ET)

Barras horizontales representan el desvío estándar del crecimiento relativo.

Mediante el test de Tukey se pudo apreciar que la línea M superó a la línea P en cuanto al crecimiento relativo medio, sin tratamiento hormonal. Además, el tratamiento con ET provocó una disminución significativa en la línea P, sin embargo no afectó a la línea M (Tabla 2). Así, se estableció que el

genotipo P evidenció una disminución del crecimiento por efecto del tratamiento con ET.

Tabla 2. Test de Tukey para el crecimiento relativo medio de ambos progenitores (M y P) y tratamientos (T y ET)

Genotipo	Tratamiento	Crecimiento relativo medio
P	T	18,66 ± 2,54 b
P	ET	13,73 ± 2,17 c
M	T	21,89 ± 4,67 a
M	ET	19,33 ± 4,30 ab

La misma letra indica diferencias no significativas ($p > 0,05$)

Primera filial (F₁)

El ANOVA no mostró diferencias significativas entre genotipos F₁, así como tampoco entre tratamientos ni en la interacción entre ambos (Tabla 3), como era de esperar dado que esta filial es genéticamente homogénea.

Tabla 3. ANOVA para el crecimiento relativo medio de las plantas F₁, testigos y tratadas con ET

Fuente de variación	CM	F	P
Genotipo F ₁	14,105	3,274 ^{ns}	0,079513
Tratamiento	2,390	0,555 ^{ns}	0,461636
Genotipo F ₁ x Tratamiento	0,078	0,018 ^{ns}	0,893489
Error	142,183		

ns: diferencias no significativas

La distribución del número de plantas según las categorías determinadas en base a las tasas de crecimiento de las plantas F₁, mostró que la mayoría de las plantas se ubican hacia el extremo inferior en el caso de los testigos y algo más diseminadas cuando fueron asperjadas con ET. Inclusive, se observó que cinco plantas se ubicaron en el extremo superior entre aquellas tratadas con ET, las cuales crecieron 24 mm y en cuya clase no se hallaron plantas testigo (Figura 6).

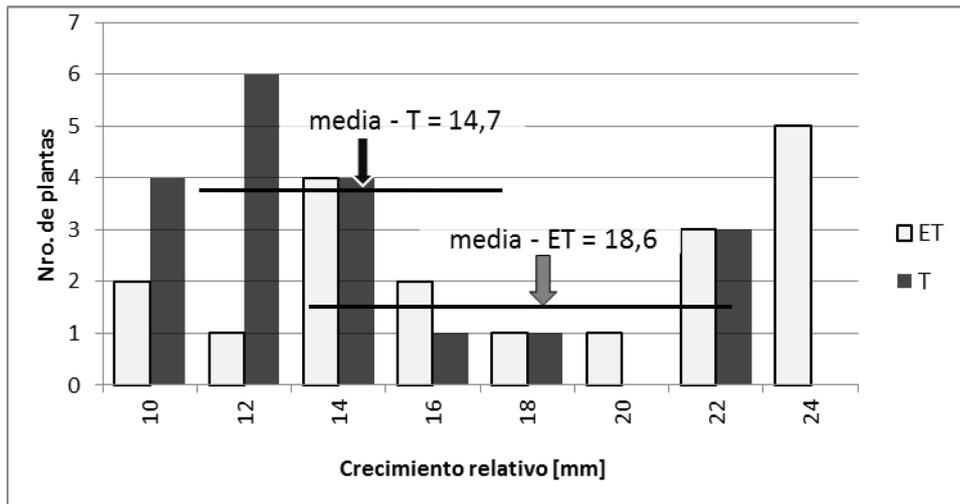


Figura 6. Distribución por categorías según el crecimiento relativo de las plantas F_1 tratadas con etileno (ET) y testigos (T)

Barras horizontales representan el desvío estándar del crecimiento relativo.

Segunda filial (F_2)

Las plantas F_2 evaluadas se agruparon en categorías según su crecimiento relativo en el estado de coleoptilo, habiendo sido tratadas con ET todas ellas. A partir del valor de crecimiento del total de plantas F_2 ($n = 6884$), estas se clasificaron como medias (M), tolerantes (T) y susceptibles (S) según su crecimiento respecto del valor promedio más/ menos su error estándar (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación de plantas F_2 según su crecimiento relativo en respuesta al tratamiento con ET.

F_2	n	Crecimiento medio \pm Error estándar
T	1198	23,02 \pm 0,04 a
M	4408	14,22 \pm 0,054 b
S	1278	6,82 \pm 0,077 c
Total	6884	

T: plantas tolerantes M: plantas de crecimiento medio; S: plantas susceptibles

El análisis de la varianza de las plantas F_2 evidenció que existen diferencias altamente significativas entre los genotipos susceptibles, medios y tolerantes a ET (Tabla 5).

Tabla 5. ANOVA para el crecimiento relativo medio de las plantas F_2 tratadas con etileno (ET)

Fuente de variación	g.l.	CM	F	P
Nivel de tolerancia (T, M,S)	2	81295	12542,9 ***	0,001
Error	6881	6		

T: tolerantes; M: intermedias; S: susceptibles

g.l: grados de libertad; CM: cuadrado medio; ***: diferencias altamente significativas ($p < 0,001$)

En forma gráfica, puede visualizarse la distribución del crecimiento por categoría, la media y el desvío estándar de la F_2 , así como de sus antecesores (líneas progenitoras y F_1). Se observa que la media del genotipo F_2 se encuentra aún comprendida en el intervalo entre ambos progenitores (M y P). Se identifica hacia la izquierda, hacia los valores inferiores a la media, al grupo de plantas considerado Susceptible; hacia la derecha de la media, hacia los valores superiores, se indica a las plantas Tolerantes (Figura 7).

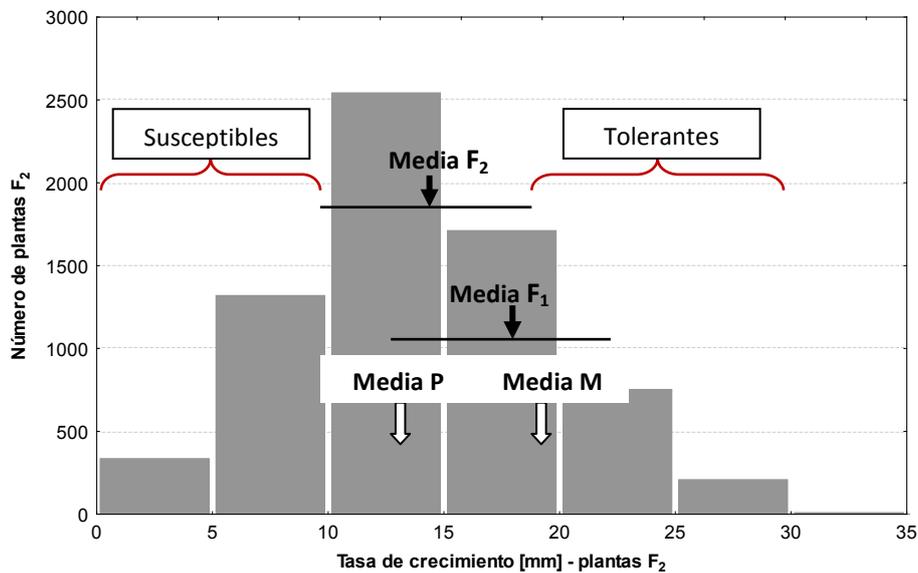


Figura 7. Distribución por categorías según el crecimiento relativo de las plantas F_2 tratadas con ET

La barra horizontal representa el desvío estándar de la tasa de crecimiento

La variabilidad pudo observarse en la generación F_2 en comparación con la hallada en la F_1 y en las clases paternas, donde sólo hay varianza ambiental. Por un lado, se hallaron plantas con menor crecimiento relativo en

comparación con ambos progenitores (M y P), aún respecto de aquél caracterizado como más susceptible ante el tratamiento con ET (progenitor P). Por el otro lado, 240 plantas superaron a ambos padres (con tasas de crecimiento de entre 25 y 30 mm) (Figura 7).

Entre la totalidad de las plantas F_2 estudiadas, se seleccionaron 160 plantas tolerantes y 51 susceptibles respecto de la media grupal de esta clase fenotípica, identificadas por ser las de mejor y peor comportamiento luego de ser asperjadas con ET en el estado de coleoptilo, respectivamente. La selección en el extremo inferior fue muy dificultosa debido a que las plantas caracterizadas como susceptibles al ET mostraron un menor crecimiento respecto de las tolerantes a la misma sustancia y, en la mayoría de los casos, murieron durante las primeras semanas pos-trasplante (Figura 8).



Figura 8. Detalle de plantas F_2 susceptibles, muertas

Tercera filial (F_3)

Las plantas obtenidas por autofecundación partir de las 211 plantas F_2 selectas se agruparon en categorías según sus tasas de crecimiento en el estado de coleoptilo, habiendo sido tratadas todas ellas con ET. A partir del valor de crecimiento de las plantas F_3 , estas se clasificaron como medias (M), tolerantes (T) y susceptibles (S) según su crecimiento respecto del valor promedio más/ menos su error estándar (Tabla 6).

Tabla 6. Clasificación de plantas F₃ según su crecimiento relativo en respuesta al tratamiento con ET.

F ₃	n	Crecimiento medio ± Error estándar
T	42	26,04 ± 0,48 a
M	200	15,73 ± 0,23 b
S	57	8,81 ± 0,24 c
Total	299	

T: plantas tolerantes M: plantas de crecimiento medio; S: plantas susceptibles

Mediante el análisis de la varianza se pudo observar que existen diferencias altamente significativas entre los genotipos susceptibles, medios y tolerantes a ET pertenecientes a esta filial (Tabla 7).

Tabla 7. ANOVA para el crecimiento relativo medio de las plantas F₃ tratadas con ET

Fuente de variación	g.l.	CM	F	P
Tolerancia	2	3885,07	392,508 ***	0,001
Error	296	9,90		

g.l: grados de libertad; CM: cuadrado medio; ***: diferencias altamente significativas (p < 0,001)

La distribución de las plantas F₃ permitió ubicar a la media de este grupo entre las medias de los genotipos F₁ y F₂, si bien esta distribución se basó en una selección sesgada hacia los extremos superior e inferior a partir del crecimiento relativo de la generación antecesora (F₂).

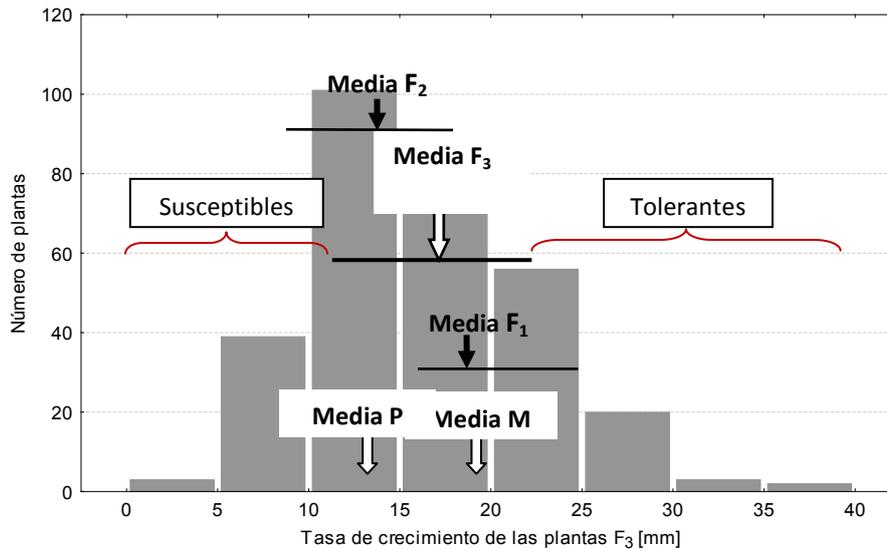


Figura 9. Distribución por categorías según las tasas de crecimiento en plantas F_3 tratadas con ET

La barra horizontal representa el desvío estándar de la tasa de crecimiento

Discusión

Los tejidos vegetales responden de diversas maneras ante la exposición con ET. Numerosos factores ambientales, internos o inherentes a la relación especie-específica influyen sobre dicha respuesta, de modo tal que no existe una manera simple de predecir la reacción de un tejido a las aplicaciones de ET. En conclusión, el ET debe ser considerado como un modulador del crecimiento y no un represor o estimulador en forma genérica (Dugardeyn & Van Der Straeten, 2008).

Las líneas progenitoras (M y P) evidenciaron un comportamiento diferencial expresado a través de sus tasas de crecimiento ante el tratamiento con ET, respecto de sus testigos. En este sentido, la línea M no modificó significativamente su tasa de crecimiento media por efecto del tratamiento y, por lo tanto, fue caracterizada como tolerante. Por el contrario, en comparación con su testigo la línea P mostró una merma en la tasa de crecimiento media debido al tratamiento con ET. Este fenómeno de ralentización del crecimiento (Guzmán & Ecker, 1990) fue percibido a nivel del coleoptilo en las plantas tratadas con ET respecto de los testigos en el caso de la línea P. En consecuencia, se caracterizó como susceptible al progenitor P. De todos

modos, esta diferencia podría deberse a que el genotipo de la línea M fuera insensible a la hormona.

En el caso de los materiales utilizados en este trabajo, la posible recombinación genética entre las líneas M y P cruzadas se reduce a una pequeña porción cromosómica en la que existe variación alélica. Dicha región está flanqueada por los marcadores *Xgwm459* y *Xgwm334a*, ubicados sobre el brazo corto del cromosoma 6A de trigo pan y es responsable de la variabilidad genética hallada a partir de la generación F₂.

En el caso de las plantas F₁ no se encontraron diferencias significativas entre individuos ni entre tratamientos (testigos y tratadas con ET). Esto permitió comprobar el principio mendeliano de uniformidad esperable en esta generación. Sin embargo, se destaca el bajo nivel de éxito logrado con los cruzamientos artificiales y, en consecuencia, el escaso número de plantas analizadas.

La segunda filial (F₂) mostró una distribución extendida de la tasa de crecimiento a nivel de coleoptilo tal como se esperaba para esta generación, en la cual la varianza es máxima. Así, pudo identificarse plantas que superaron a la F₁ y a sus progenitores, tanto hacia el extremo superior como hacia el inferior de los valores de dichas tasas. Si bien es reversible el efecto causado por esta hormona (Binder *et al.*, 2004), la identificación temprana de plantas susceptibles y tolerantes según sus valores menores y mayores de crecimiento del coleoptilo por efecto del ET, se mantuvo en plantas más grandes, al punto tal que la mayoría de las susceptibles murieron luego de ser trasplantadas y las tolerantes crecieron y se desarrollaron normalmente.

Se encontraron diferencias significativas entre los genotipos F₂ caracterizados como susceptibles, de comportamiento medio y tolerantes a ET según su ubicación respecto de la media de esta filial. Resultó notable la diferencia en el número de individuos F₂ pertenecientes a ambos grupos de plantas, selectas según su mayor/ menor tolerancia al ET para constituir al siguiente generación, F₃. Es posible que el menor número de plantas pertenecientes al grupo de las susceptibles se deba a un defecto en su crecimiento, evidenciado ya a nivel de coleoptilo y manifestado en posteriores estadios de crecimiento. En algunos casos, las plantas no han logrado superar los 30 cm de altura en el estado vegetativo, otras han muerto luego de su

trasplante al suelo. No obstante, se descarta como posible causa de su muerte a la mecánica del trasplante en sí mismo, ya que idénticos recaudos fueron tomados para la totalidad de las plantas.

La merma en el crecimiento e inclusive la muerte de las plantas F_2 susceptibles pudo deberse a que no soportaron el tratamiento con la dosis de ET aplicada en estadios tempranos de su crecimiento, debido quizás a la posible expresión de algún gen letal que se encontraba enmascarado en las generaciones parentales (Rick & Smith, 1953) y cuyo efecto pudo haber limitado el crecimiento en las plantas portadoras de esos alelos.

En cuanto a las plantas F_3 , se encontraron diferencias altamente significativas en el crecimiento relativo de las plantas susceptibles, medias y tolerantes respecto de la media. Además, la tasa de crecimiento resulta coincidente con la de la generación F_2 . Si bien el valor de la media de la última generación filial se desplazó ligeramente hacia valores superiores, las medias y desvíos de ambas clases mostraron la superposición de sus intervalos de confianza. Sin embargo, este comportamiento puede atribuirse a la selección sesgada que se realizó en la F_2 . La incorporación de toda la clase F_2 en el análisis podría haber modificado la ubicación de las medias correspondientes a las plantas F_2 y F_3 estudiadas.

Resulta importante destacar la dificultad de apreciar el efecto del ET de manera completamente aislada al de otras fitohormonas, ya que su funcionalidad depende también de la interacción entre el ET y el resto de aquellas. Si bien existen subsets de genes de respuesta al ET que pueden explicar parcialmente la diversidad de respuestas, nuevas investigaciones lograrán identificar los factores que modulan dichas respuestas tejido-específicas (Dugardeyn & Van Der Straeten, 2008).

Casi todas las condiciones de estrés biótico inducen la síntesis de etileno en las plantas (Bleecker & Kende, 2000). Debido a que la biosíntesis del etileno aumenta en condiciones de estrés, dada la mayor transcripción de la ACC sintasa, los tejidos vegetales que muestran signos de infección por parte de un patógeno o debidos al daño mecánico, producen niveles elevados de etileno (Johnson & Ecker, 1998). Además, se encontró que en plantas resistentes de trigo y cebada la producción de etileno aumenta significativamente luego de la acción de un áfido, a diferencia de lo que ocurre

en cultivares susceptibles (Argandoña *et al.*, 1981; Miller *et al.*, 2001; Boyko *et al.*, 2006). Se conoce también que la aplicación exógena de esta hormona sobre una planta activa las mismas rutas metabólicas que ante la acción de un insecto y un organismo patógeno, ambos factores bióticos de estrés (Farmer & Ryan, 1990; Walling, 2000; Glazebrook, 2001), alterando su patrón de expresión génica (Taiz & Zeiger, 2006).

La caracterización de las plantas con mayor o menor grado de tolerancia ante la aplicación exógena de ET, en estado de coleoptilo, permitió suponer cuál sería el comportamiento de dichas plantas ante la acción de un agente causal de estrés, como puede ser un áfido. De este modo, fue posible seleccionar plantas superiores e inferiores para continuar con este estudio e intentar identificar al gen/ genes de tolerancia ubicado/ubicados en la región telomérica del cromosoma 6A.

Conclusiones

- La línea M se caracterizó como tolerante, mientras que la línea P resultó susceptible al ET, lo cual se manifestó a través de la significativa disminución del crecimiento relativo medio de las plantas de la línea P tratadas respecto del testigo.
- Las plantas F_1 no mostraron diferencias significativas entre plantas ni entre tratamientos (testigos y tratadas con ET). Esto permitió comprobar el principio mendeliano de uniformidad en esta generación.
- Las generaciones F_2 y F_3 exhibieron diferencias altamente significativas en el crecimiento relativo de sus integrantes, según su caracterización como susceptibles, medias y tolerantes.
- La segunda filial (F_2) mostró una distribución extendida de la tasa de crecimiento a nivel de coleoptilo tal como se esperaba para esta generación, en la cual la varianza es máxima.
- El menor número de individuos F_2 selectos por su menor tolerancia al ET se debe a la susceptibilidad que presentaron ante el tratamiento. Un estudio más

acabado permitiría conocer si la muerte de estas plantas se debió a la expresión de algún gen letal enmascarado.

- La generación F₃ mostró una tasa de crecimiento similar a la generación predecesora, si bien un número limitado de plantas fue analizado.

Bibliografía

- Abeles, F.B., P.W. Morgan & M.E. Saltveit Jr. Ethylene in Plant Biology. 2nd edition. San Diego. Academic Press. 1992.
- Adams, D.O. & S.F. Yang. 1979. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane- 1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. Proceedings of National Academy of Sciences 76:170-74.
- Agarwal, P.K. & B. Jha. 2010. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biologia Plantarum* 54: 201-212.
- Agarwal, P.K., P. Agarwal, M.K. Reddy & S.K. Sopory. 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports* 86: 1263-1274.
- Argandoña, V.H., H.M. Niemeyer & L.J. Corcuera. 1981. Effect of content and distribution hidroxamic acids in wheat on infestation by the aphid *Schizaphis graminum*. *Phytochemistry* 20: 673-676.
- Bari, R. & J.D.G. Jones. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69: 473-488.
- Binder, B.M., R.C. O'Malley, W.Y. Wang, J.M. Moore, B.M. Parks, E.P. Spalding & A.B. Bleecker. 2004. Arabidopsis seedling growth response and recovery to ethylene. A kinetic analysis. *Plant Physiology* 136: 2913-2920.
- Bleecker, A.B. & H. Kende. 2000. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annual Review Cell Developmental Biology* 16: 1-18.
- Boyko, E.V., C.M. Smith, V.K. Thara, J.M. Bruno & Y. Deng. 2006. The molecular basis of plant gene expression during aphid invasion: wheat Pto- and Pti-like sequences are involved in interactions between wheat and Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 99: 1430–1445.
- Broekaert, W.F., S.L. Delaure, M.F. De Bolle & B.P. Cammue. 2006. The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review Phytopathology* 44: 393-416.
- Castro, A.M., A. Clua, D. Giménez, E. Tocho, M.S. Tacaliti, A. Worland, E. Sayers, H. Chidichimo & J.W. Snape. 2003. Chromosomal effects on tolerance to the stress-induced hormones ethylene, jasmonic acid, salicylic acid and ABA in wheat (*Triticum aestivum*) substitution lines. *In*

- Pogna N. Wheat Genetic Symposium. Vol 3, pp 1111-1114. Instituto Sperimentale per la Cerealicoltura Press, Viterbo. Italia.
- Castro, A.M., A. Vasicek, M. Manifiesto, D. Giménez, M.S. Tacaliti, O. Dobrovolskaya, M.S. Röder, J. Snape & A. Börner. 2005. Mapping resistance genes to greenbug and RWA on chromosome 6A of wheat. *Plant Breeding* 124: 229-233.
- Castro, A.M., M.S. Tacaliti, D. Giménez, E. Tocho, O. Dobrovolskaya, A. Vasicek, M. Collado, J.W. Snape & A. Börner. 2008. Mapping Quantitative Trait Loci for growth responses to exogenously applied stress induced hormones in wheat. *Euphytica*. 164: 719-727.
- Dugardeyn, J. & D. Van Der Straeten. 2008. Ethylene: Fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. *Plant Science* 175: 59-70.
- Farmer, E.E. & C.A. Ryan. 1990. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87: 7713-7716.
- Gane, R. 1934. Production of Ethylene by Some Ripening Fruits. *Nature* 134: 1008.
- Gao, L.L., J.P. Anderson, J.P. Klingler, R.M. Nair, O.R. Edwards & K.B. Singh. 2007. Involvement of the octadecanoid pathway in bluegreen aphid resistance in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 20: 82-93.
- Glazebrook, J. 2001. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*: 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 301-308.
- Gomez-Roldan, V., S. Fermas, P.B. Brewer, V. Puech-Pages, E.A. Dun, J.P. Pillot, F. Letisse, R. Matusova, S. Danoun, J.C. Portais, H. Bouwmeester, G. Becard, C.A. Beveridge, C. Rameau & S.F. Rochange. 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455: 189-194.
- Guzmán, P. & J.R. Ecker. 1990. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2: 513-523.
- Hua, J., E.M. Meyerowitz. 1998. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94: 261-271.
- Johnson, P.R. & J.R. Ecker. 1998. The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annual Review of Genetics* 32: 227-54.
- Le, J., F. Vandebussche, T. De Cnodder, D. Van Der Straeten & J.P. Verbelen. 2005. Cell elongation and microtubule behavior in the *Arabidopsis* hypocotyl: responses to ethylene and auxin, *Journal of Plant Growth Regulation* 24: 166-178.
- Mc Grath, K.C., B. Dombrecht, J.M. Manners, P.M. Schenk, C.I. Edgar, D.J. Maclean, W. Scheible, M.K. Udvardi & K. Kazan. 2005. Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression. *Plant Physiology* 139: 949-959.

- Miller, C.A., A. Altinkut & N.L.V. Lapitan. 2001. A microsatellite marker for tagging Dn2, a wheat gene conferring resistance to the Russian wheat aphid. *Crop Science* 41: 1584-1589.
- Morkunas, I., V.C. Mai & B. Gabrys. 2011. Phytohormonal signaling in plant responses to aphid feeding. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 2057-2073.
- Núñez-Pastrana, R., J.P. Anderson & K.P. Singh. 2013. Ethylene response factors and their role in plant defence. *CAB Reviews* 8, No. 8.
- Pirrello, J., B.C. Narasimha Prasad, W. Zhang, K. Chen, I. Mila, M. Zouine, A. Latché, J.C. Pech, M. Ohme-Takagi, F. Regad & M. Bouzayen. 2012. Functional analysis and binding affinity of tomato ethylene response factors provide insight on the molecular bases of plant differential responses to ethylene. *BMC Plant Biology* 12: 190 <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/12/190>
- Reymond, P. & E.E. Farmer. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion Plant Biology* 1: 404-411.
- Rick, C.M. & P.G. Smith. 1953. Novel variation in tomato species hybrids. *American Naturalist* 88: 359-373.
- Schaller, G.E. 2012. Ethylene and the regulation of plant development. *BMC Biology*, 10:9 <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/10/9>.
- Sharoni, A.M., M. Nuruzzaman, K. Satoh, T. Shimizu, H. Kondoh, T. Sasaya, I.R. Choi, T. Omura & S. Kikuchi. 2011. Gene Structures, Classification and Expression Models of the AP2/EREBP Transcription Factor Family in Rice. *Plant Cell Physiology* 52:344-360.
- StatSoft, Inc. 2005. Statistica (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com.
- Taiz, L. & E. Zeiger. 2006. Fisiología vegetal. Universitat Jaume I. Capítulo 22: Etileno, la hormona gaseosa. Pp 1265.
- Umehara, M., A. Hanada, S. Yoshida, K. Akiyama, T. Arite, N. Takeda-Kamiya, H. Magome, Y. Kamiya, K. Shirasu, K. Yoneyama, J. Kyojuka & S. Yamaguchi. 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455: 195-200.
- Walling, L.L. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 195-216.
- Weaver, R.J. 1976. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura (Traducción de Agustín Contin y Daniel H. Díaz Montenegro). Universidad de California, Davis. Editorial Trillas, México. 622 páginas.
- Yang, S.F. & N.E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher-plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 35: 155-189.
- Yang, L., Y.G. Zu & Z.H. Tang. 2013. Ethylene improves Arabidopsis salt tolerance mainly via retaining K⁺ in shoots and roots rather than decreasing tissue Na⁺ content. *Environmental and Experimental Botany* 86: 60-69.

Yoo, S.D., Y. Cho & J. Sheen. 2009. Emerging connections in the ethylene signaling network. *Trends Plant Science* 14: 270-279.

CAPÍTULO 4.

Estudio de la tolerancia al pulgón ruso en dos líneas progenitoras de trigo y en la descendencia F₁ y F₂.

Contenido

<u>Introducción</u>	95
<u>Los áfidos</u>	95
<u>El pulgón ruso del trigo</u>	95
<u>Manejo de la plaga</u>	101
<u>Genética de la tolerancia/ resistencia al pulgón ruso</u>	102
<u>Materiales y métodos</u>	104
<u>Material vegetal</u>	104
<u>Los áfidos</u>	105
<u>Determinaciones realizadas</u>	106
<u>Resultados</u>	109
<u>Discusión</u>	115
<u>Conclusiones</u>	119
<u>Bibliografía</u>	119

Introducción

Los áfidos

Los áfidos constituyen el grupo más numeroso dentro de los insectos que se alimentan del floema lo cual, además de su enorme potencial reproductivo, los convierte en la plaga más devastadora en la producción de los cultivos (Davis, 2012). Poseen un aparato bucal chupador succionador adaptado a la succión de líquidos que se encuentran en las plantas. Los estiletes alcanzan el floema, especialmente los tubos cribosos, utilizando al fluido floemático como alimento (Richardson, 1982). Sin embargo, algunas especies de áfidos tales como *Adelges piceae* (Ratz) pareciera que se alimentan principalmente del parénquima (Balch, 1952). Más aún, diferentes biotipos del pulgón verde (*Schizaphis graminum*, Rondani) pueden tener diferentes sitios de alimentación, como el floema o el parénquima del mesófilo de la hoja (Saxena & Chada, 1971).

La selección del sitio de alimentación estaría relacionada con la ubicación de sustancias esenciales para el insecto y con los metabolitos secundarios presentes en ellas. En este sentido, algunos áfidos prefieren hojas jóvenes, en tanto que otros prefieren aquellas que comienzan a senescer (Kennedy & Ibbotson, 1950). Basados en experimentos de alimentación e infestación, se ha propuesto que la distribución de los áfidos en hojas de diferentes edades está regulado por el contenido de ácidos hidroxámicos presentes en ellas (Argandoña *et al.*, 1981).

El pulgón ruso del trigo

En la Argentina, el pulgón ruso se detectó por primera vez en el año 1991, en la provincia de Mendoza. Luego se propagó a otras provincias (Salto & Imwinkelried, 1997), parasitando un amplio rango de hospederas (Clúa *et al.* 2004). Entre los cereales, se encontró al pulgón ruso sobre avena (*Avena sativa*), cebadilla (*Bromus unioloides*), *Hordeum comosum*, cebada cervecera

(*Hordeum distichum*), *Hordeum murinum*, *Hordeum secalicum*, cebada (*Hordeum vulgare*), centeno (*Secale cereale*) y trigo (*Triticum aestivum*) (Dughetti, 2012).

En el país, el pulgón ruso aumenta su población en primaveras secas. Las infestaciones en trigo comienzan a manifestarse a partir del mes de septiembre, aunque los mayores ataques se observan desde principios a mediados de noviembre en coincidencia con la etapa fenológica de plena espigazón. En la actualidad se distribuye entre los 26° 50' LS y los 43° 28' LS, limitado por las isothermas de 20-22 °C y de 8-10 °C y las isohietas de 400-600 mm y de 2000 mm de precipitaciones (Clúa *et al.*, 2004). Las principales provincias donde se localiza la especie son Mendoza, Neuquén y Buenos Aires (Dughetti, 2012).

En la clasificación taxonómica de los Insectos (clase *Insecta*), el pulgón ruso del trigo (*Diuraphis noxia*, [Mordvilko]) se ubica dentro del orden *Hemiptera*, suborden *Sternorrhyncha*, superfamilia *Aphidoidea*, familia *Aphididae*.

El pulgón ruso posee un cuerpo alargado de entre 2,2 y 3 mm, de coloración verde grisácea. Se caracteriza por tener antenas cortas de mismo color que el cuerpo. Presenta cornículos pequeños, poco desarrollados. Sus sifones son característicos de la especie debido a su reducido tamaño y difícil apreciación visual, así como por su proyección sobre la cauda otorgándole la apariencia de 'doble cola' (Figuras 1 y 2).

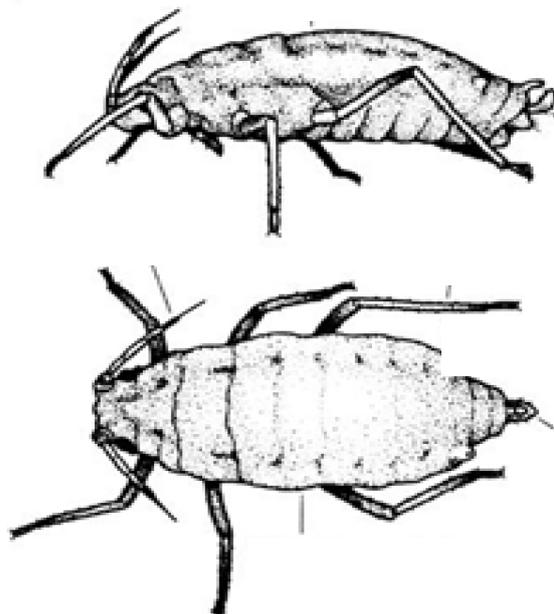


Figura 1. Hembra áptera de *Diuraphis noxia*.

Adaptado de Don Wysocki, Pacific Northwest Conservation Tillage Handbook. Oregon State University, Washington State University and University of Idaho.



Figura 2. Hembra áptera adulta (derecha) y ninfa (izquierda) de *Diuraphis noxia* (USDA, ARS, Agricultural Research Service).

En cuanto a su comportamiento reproductivo, se caracteriza por ser una especie monoico holocíclica en cereales, principalmente en trigo (Nieto Nafría *et al.*, 1994). En América del Norte y Argentina se reproduce por partenogénesis telitóquica (o sea, da una progenie o descendencia femenina)

por viviparidad (o sea, los embriones se forman en el interior del cuerpo de la madre), pasando el invierno como ninfa o hembra adulta (Dughetti, 2012). Sin embargo, se han encontrado poblaciones del áfido con diferenciación de hembras sexuales y machos (Ricci *et al.*, 2011).

Esta especie puede atacar al trigo durante todo el ciclo de cultivo, de modo tal que las colonias se ubican en la parte superior de las plantas principalmente desde fin de macollaje hasta precosecha. Mediante la inyección de fitotoxinas durante la alimentación, provoca la ruptura de membranas celulares. Este áfido provoca un estriado de coloración púrpura en condiciones de baja temperatura, o blanquecina si las temperaturas son templadas. Otro síntoma característico provocado por el pulgón ruso además del estriado es el enrollamiento de las hojas, con mayor preponderancia en la tercera y cuarta hoja del trigo (Riedell & Blackmer 1999). En estadíos más avanzados del cultivo, como en estado de hoja bandera, las infestaciones causan desde la producción de espigas vanas o malformadas hasta la imposibilidad de su emergencia (Imwinkelried *et al.*, 2004), aunque una vez superado el estado de grano pastoso, el pulgón no produce más daño (Salto & Imwinkelried, 1997).

Se conoce que aquellas plantas de trigo que resultan susceptibles al pulgón ruso, reaccionan ante la inyección de su saliva enrollando longitudinalmente sus hojas alrededor de la nervadura principal, formando un refugio tubular que protege a dicho áfido de la acción de los insecticidas (Smith *et al.*, 1992) y de sus predadores naturales. En los cereales, el enrollamiento de las hojas puede ser de dos tipos, según el estadío: el plegado de aquellas completamente expandidas y/o el impedimento de la expansión de las hojas inmaduras (Botha *et al.*, 2005). En consecuencia, la población de áfidos se establece exitosamente y las plantas sufren graves pérdidas de clorofila y de pigmentos carotenoides de sus hojas (Burd & Elliott 1996; Heng-Moss *et al.*, 2003). Una disminución de la eficiencia fotosintética redundaría en la obtención de plantas más débiles y de menor rendimiento en granos (Smith *et al.*, 1989).

Las variedades resistentes logran compensar la alimentación del áfido (Heng-Moss *et al.*, 2003), aunque para su efectiva compensación deben activarse una serie de estrategias defensivas. Un estudio sobre el comportamiento alimentario del pulgón ruso demuestra que éste prueba más y

se alimenta menos en cultivares resistentes, con la consiguiente formación de lesiones más numerosas en los tejidos resistentes en comparación con las variedades susceptibles (Bahlmann *et al.*, 2003).

Además del daño directo que provoca el pulgón ruso con fines alimenticios, es transmisor de virus tales como el BYD (Virus amarillo del enanismo de la cebada), el BMV (Virus del mosaico de la cebada) y el SMV (Virus del mosaico de la caña de azúcar) (Damsteegt *et al.*, 1992). Resulta interesante señalar que los insectos tienen simbiosis bacterianas que llevan a cabo funciones vitales para el hospedante, que podrían inclusive desactivar a las propias defensas de las plantas (Álvarez-Venegas, 2014).

La variación en el contenido de clorofila es uno de los parámetros más importantes en la relación planta- herbívoro. Durante el desarrollo de las plantas los niveles de clorofila se modifican (Costa *et al.*, 2001); de igual modo, varían debido a varios tipos de estreses (Fanizza *et al.*, 1991; Samdur *et al.*, 2000; Lawson *et al.*, 2001). La alimentación por parte de insectos, las deficiencias nutricionales y las infecciones parasitarias causan clorosis y degradación de la clorofila (Ni *et al.*, 2002).

Se encuentra bien documentada la pérdida de clorofila consecuencia de la infestación de los pulgones ruso y verde en trigo (Burd & Elliott, 1996; Girma *et al.*, 1998), así como las lesiones necróticas post- infestación en variedades resistentes al pulgón ruso (Botha *et al.*, 2005). La hipótesis actualmente aceptada sugiere que el pulgón causa el mal funcionamiento del aparato fotosintético a nivel de las membranas tilacoides durante su alimentación (Burd & Elliott, 1996; Heng-Moss *et al.*, 2003). Debido a que *Diuraphis noxia* no causa el colapso total a nivel de los cloroplastos, la degradación clorofílica inducida se distingue de aquella originada durante la senescencia de las hojas (Ni *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004).

Por otro lado, la fotosíntesis puede ser alterada por la alimentación de los herbívoros causando, entre otros, la reducción en el área foliar, provocada por el enrollamiento de hojas (Miller *et al.*, 1994), y la disminución en el contenido de clorofila (Riedell, 1989, Riedell & Blackmer 1999). Los síntomas específicos de la alimentación de *D. noxia* sobre cultivares susceptibles de trigo incluyen bandas longitudinales blancas o amarillas (Burd & Elliott 1996), que en

infestaciones severas producen una drástica reducción en el área foliar efectiva (Walters *et al.*, 1980). Aquellas plantas que poseen genes de resistencia al pulgón ruso provocan una significativa reducción del crecimiento poblacional y reproductivo del insecto, y en ellas ocurre además una menor pérdida de clorofila y pigmentos carotenoides (Smith *et al.*, 2010).

Estudios más recientes sobre las respuestas fisiológicas de resistencia/susceptibilidad de los cereales a *D. noxia*, demostraron que las plantas susceptibles adelantaron su declinación fotosintética respecto de las plantas control, en detrimento de su acelerada senescencia, mientras que aquellas resistentes lograron compensar el daño provocado por el pulgón (Franzen *et al.*, 2007). Aunque resulta claro que variedades resistentes logran compensar el daño causado por la alimentación de los pulgones de alguna manera (Heng-Moss *et al.*, 2003), para que dicha compensación ocurra es necesaria una defensa efectiva o estrategia ante el estrés, una serie de productos génicos capaces de activar los mecanismos de tolerancia al estrés (Botha *et al.*, 2005).

Al igual que en la interacción planta- patógeno, las defensas contra el pulgón ruso consisten en la producción de especies reactivas de oxígenos (ERO) como por ejemplo H₂O₂. Estas moléculas ERO inducen la acumulación de ácido salicílico (AS) en las células y disparan la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR, del inglés *pathogen related proteins*). Varios productos relacionados con la defensa se acumulan en el apoplasto de cultivares resistentes de trigo, incluyendo las proteínas PR β-1,3-glucanasas, quitinasas y peroxidasas (Van der Westhuizen *et al.*, 1998a, b). Además, el nivel de respuesta varía entre los diferentes cultivares de trigo resistentes (Botha *et al.*, 2006).

Existe una estrecha relación entre el daño provocado por los pulgones y la fitohormona etileno (ET). Se conoce que existen efectos específicos causados por el áfido sobre la ruta metabólica del ET, los cuales no ocurren cuando el tejido es lastimado en forma mecánica. Estudios con mutantes de la vía del ET se utilizaron para identificar genes blanco, así como también para aislar las moléculas de señalización emitidas por la actividad de los insectos sobre un tejido vegetal (Stotz, 2000). Más recientemente se demostró que la expresión del gen Cm-ETR2, receptor de ET en melón, se incrementó cinco

veces por efecto del tratamiento con Etephon respecto del incremento encontrado (2 veces) por efecto de la infestación con el pulgón *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). Esto podría indicar que la cantidad de ET emitida como consecuencia de la infestación con el áfido es significativamente menor en comparación con aquella producto del tratamiento exógeno con la hormona (Anstead *et al.*, 2010).

Manejo de la plaga

El manejo de la plaga es complejo. Si bien año a año varía la incidencia de la plaga en los cultivos de trigo argentinos, aspectos como la cuantiosa utilización de pesticidas y los daños implícitos para los aplicadores y para el ambiente en general, se vuelven prioritarios para la sustentabilidad del sistema global de cualquier planteo productivo. Históricamente, se han registrado casos de resistencia a los insecticidas por algunas especies de áfidos (Devonshire & Field, 1991), como así también se ha observado el desarrollo de virulencia a los genes de resistencia propios de las plantas (Smith *et al.*, 2010). En definitiva, la identificación de genotipos resistentes constituye una herramienta fundamental para el manejo sustentable de los áfidos en el marco de la producción cerealera.

El uso de pesticidas trajo aparejados serios problemas, como el efecto sobre organismos no blanco (organismos benéficos, el hombre), el resurgimiento o la emergencia de otras plagas secundarias, el elevado costo tanto de los ingredientes activos como de la aplicación y el desarrollo de resistencia a los pesticidas por la plaga blanco (Ekstrom & Ekbom, 2011). Futuros aumentos en la producción de alimentos se basan, entre otras cosas, en el desarrollo de un manejo integrado de la plaga y no centrado en el control químico, que represente menor costo y mayor sustentabilidad (Stout, 2013).

Por último, el control biológico como alternativa para el manejo de esta plaga se fundamenta en que los pulgones poseen numerosos enemigos naturales entomófagos (predadores y parasitoides) y entomopatógenos

(hongos) que ejercen fuerte presión en mantener las poblaciones por debajo de los umbrales de daño (Imwinkelried *et al.*, 2004).

Genética de la tolerancia/ resistencia al pulgón ruso

La interacción entre el cultivo de trigo (*Triticum aestivum*) y el pulgón ruso es objeto de numerosas investigaciones. Castro *et al.* (2001) han indicado que los mayores niveles de antibiosis a *D. noxia* y a *S. graminum* en trigo son atribuidos a diferentes cromosomas de trigo ‘Synthetic’, sugiriendo que algunos genes independientes podrían estar involucrados en la antibiosis. Los enfoques actuales se basan principalmente en el estudio de la identificación de los genes de resistencia al pugón en el trigo (Botha *et al.*, 2014).

El nivel de respuesta frente a la infestación del pulgón ruso varía en diferentes cultivares de trigo, según el fondo genético en el que se introduce un determinado **gen de resistencia** (*Dn*, gen de resistencia a *Diuraphis noxia*), quedando así condicionada la efectividad de la respuesta de resistencia (Botha *et al.*, 2005). Actualmente, la resistencia genética es el medio más efectivo y económico para el control del pulgón ruso, siendo una de sus principales ventajas la posibilidad de pirimidizar dos o más genes en un mismo material. Sólo aquellas plantas que contengan varios genes de resistencia serán capaces de responder ante la aparición de nuevos biotipos (Anderson *et al.*, 2003), si bien por el momento no se han detectado en el país (Dughetti, 2012).

Once genes *Dn* (*Dn1- Dn9*, *Dnx* y *Dny*) fueron descriptos por conferir resistencia al pulgón ruso de trigo. Se hipotetiza que estos funcionan como genes de resistencia codificando proteínas específicas que reconocen efectores, los cuales inician cascadas de señalización que resultan en una respuesta defensiva (Flor, 1971; Lacock *et al.*, 2003; Botha *et al.*, 2005; Lapitan *et al.*, 2007). La identificación de genes candidatos de resistencia a los áfidos apoyan la idea de que la interacción planta- áfido es gen a gen (Smith & Boyko, 2006). Sin embargo, la amplia variedad de secuencias identificadas en plantas producto de la inducción por parte de los áfidos, sugiere que más de un mecanismo está involucrado en el reconocimiento del daño en plantas resistentes (Botha *et al.*, 2014). El hecho de que ninguno de estos genes haya

sido clonado, además de que resultaran contradictorios o poco concluyentes los esfuerzos de mapeo realizados (Botha *et al.*, 2014), permite suponer que la resistencia a áfidos es un tema complejo y aún no abarcado en su totalidad.

Sin embargo, aún en aquellas interacciones compatibles en las que los genes R están ausentes y los áfidos son capaces de colonizar al hospedante, las plantas despliegan sus defensas en pos de reducir la magnitud de la infestación. Estas defensas presentes aún en los sistemas compatibles, constituidos por plantas susceptibles, se describen como *resistencia basal*. Tanto la resistencia basal como aquella mediada por los genes R involucran la señalización hormonal y la reprogramación transcripcional, ambos mecanismos superpuestos a menudo en pos de contribuir con ambas formas de defensa (Navarro *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2014).

Estudios previos en trigo y cebada habían indicado que los **genes R** de resistencia a áfidos se ubican en los grupos homeólogos 1 y 7 en la tribu Tritíceas (Ma *et al.*, 1998; Myburg *et al.*, 1998; Venter & Botha, 2000; Liu *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2001). Así, se ha mapeado en trigo el gen de resistencia *Dn7*, localizado originalmente en el cromosoma 1R de centeno y transferido a trigo en la translocación 1B/1R (Anderson *et al.*, 2003). Durante muchos años se utilizaron las translocaciones de centeno, con el objetivo de incrementar en el genoma del trigo la resistencia a varios patógenos e insectos, mejorar su adaptabilidad a distintos ambientes e incrementar el rendimiento del cultivo (Mater *et al.*, 2004). En este sentido, la translocación trigo-centeno 1AS/1RS encontrada originalmente en el cultivar de trigo 'Amigo' (Sebesta *et al.*, 1994), porta genes de resistencia a los biotipos B y C del pulgón verde de los cereales, al oídio (*Pm17*) y a la roya del tallo (*SrR*) (Mater *et al.*, 2004). A pesar de las numerosas e interesantes ventajas agronómicas observadas, ciertos efectos perjudiciales en cuanto a la calidad panadera del trigo se han incorporado en forma simultánea (Graybosch *et al.*, 1993; McKendry *et al.*, 1996; Graybosch, 2001). Este efecto deletéreo se encuentra muy asociado con la translocación 1BL/1RS, mientras que se encuentra atenuado en 1AL/1RS (Graybosch *et al.*, 1993; Kumlay *et al.*, 2003). No obstante, varios genes de interés aún no transferidos al trigo están disponibles en el genoma del centeno (Saulescu *et al.*, 2011).

En la Argentina, aquellos cultivares de trigo que portan genes de resistencia al pulgón ruso pero que han sido mejorados en otros países, pueden comportarse como susceptibles, debido a que la interacción del ambiente con el áfido origina poblaciones del pulgón ruso características de cada región. Por ende, los resultados obtenidos en líneas extranjeras no son extrapolables a las variedades locales (Ricci *et al.*, 2012), lo cual refuerza la idea de que estudios locales aportan mayor precisión para el manejo de la plaga.

En trigo, se han mapeado dos QTL de antixenosis en líneas infestadas con pulgón verde de los cereales y con pulgón ruso, ambos asociados al cromosoma 6A (Castro *et al.*, 2005). En cuanto a la tolerancia al pulgón ruso, se mapearon siete QTL para el contenido de clorofila, el peso seco aéreo, el número total de hojas y el número de hojas expandidas, ubicados ellos en los cromosomas 3AL, 3BS, 4DS, 5DS y 7AL de trigo (Ricciardi *et al.*, 2010). Todos ellos podrían ser transferidos a los cultivares de trigo para acrecentar la base genética de defensa contra los áfidos.

Con el propósito de conocer el comportamiento ante la acción del pulgón ruso de dos líneas de trigo y las plantas F₁ y F₂ descendientes de aquellas, se intentó conocer si *debido a la acción del pulgón, se vieron afectados diferencialmente los parámetros de crecimiento de dichas plantas*. Por lo tanto, el **objetivo** del presente capítulo consistió en evidenciar la influencia de un insecto inductor de las defensas vegetales, el pulgón ruso del trigo, mediante la determinación de parámetros fisiológicos del crecimiento de una población de trigo originada a partir del cruzamiento de dos líneas (M y P).

Materiales y métodos

Material vegetal. La evaluación de la tolerancia al pulgón ruso se realizó en las líneas recombinantes progenitoras madre (M) y padre (P), 106 plantas F₁ obtenidas del cruzamiento dirigido entre ambos progenitores y 27 plantas F₂ producto de la autofecundación de las anteriores. A modo de referencia, se utilizó también la línea Synthetic por ser una de las líneas utilizadas para la obtención de las recombinantes progenitoras de la población en estudio.

Se realizó una selección sobre la totalidad de las plantas pertenecientes a la generación F_2 que consistió en incluir en este estudio a aquellas plantas que habían representado a las clases de mejor y peor comportamiento ante la aspersión externa con etileno, en el estado de coleoptilo (Capítulo 3 de la presente tesis).

De las 27 plantas F_2 seleccionadas, se extrajeron macollos con el objetivo de obtener repeticiones de plantas infestadas y controles a partir de idéntico genotipo. El procedimiento consistió en la separación manual de los macollos a partir del tallo principal cuando estos tenían entre 3 y 4 hojas, estadio en el que los macollos de trigo logran una capacidad de abastecimiento individual. En todo momento la manipulación fue realizada con la precaución de no dañar excesivamente al tejido vegetal y comprobando que cada macollo portara consigo una raíz proveniente del tallo principal. Se lograron establecer cuatro macollos por genotipo, de los cuales dos fueron infestados y dos se reservaron como testigos. Los macollos fueron plantados en bandejas de plástico de 70 x 50 x 8 cm sobre un sustrato de tierra fértil. Así se obtuvieron 2 repeticiones por genotipo y tratamiento, máximo que se logró obtener dado que se estudió cada genotipo en forma independiente.

Los áfidos. Se utilizó una población de pulgones colectada entre los años 2004 y 2008 en regiones húmedas (Buenos Aires, Santa Fe) y subhúmedas (Córdoba, La Pampa, Mendoza, Neuquén) de Argentina por la Dra. Castro y colaboradores. Los pulgones fueron criados sobre cebada susceptible cv 'Maltería Eda' sembradas en macetas plásticas de 1 L de capacidad y cubiertas por capuchones plásticos con ventilación de voile (Figura 3). Se trabajó en el insectario perteneciente a la cátedra de Genética (Facultad Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP) en condiciones controladas de temperatura e iluminación ($20^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ y 16:8 h de luz: oscuridad).



Figura 3. Macetas de cría de los áfidos sobre cebada susceptible

Para la evaluación de la tolerancia de las líneas de trigo, las plantas en segunda hoja expandida se infestaron mediante la colocación de 7 pulgones rusos adultos sobre cada una de ellas, con la ayuda de un pincel.

Determinaciones realizadas

- 1- Índice de verdor:** se determinó a través del medidor de **clorofila** Spad-502 (Minolta Camera Co.). La fundamentación del método se basa en la directa relación que existe entre las lecturas del índice de verdor y el contenido de clorofila y, entre ambos y la cantidad de nitrógeno en la hoja (Schepers *et al.*, 1992). Se midió en la primera hoja completamente expandida de cada planta luego de 48 h de la infestación con los áfidos. La determinación se realizó en tres localizaciones (cerca de la base, en el medio y en el ápice de la hoja), valores que fueron promediados para el análisis estadístico. Al ser esta metodología de carácter no destructivo, pudieron realizarse las determinaciones subsiguientes sobre las mismas plantas. El contenido de clorofila se realizó en las plantas pertenecientes a las líneas M, P, F₁ y F₂.
- 2- Tasa de crecimiento.** El crecimiento se cuantificó mediante la determinación de la altura de cada planta (en mm), desde la base o nivel de plantación hasta el extremo de la hoja de mayor longitud, con la ayuda de una regla. La tasa de crecimiento ($Alt_f - Alt_i$) resultó del valor

absoluto de la diferencia entre la altura inicial (Alt_i), inmediatamente antes de la infestación con pulgones, y la altura final (Alt_f) a las 48 h de la infestación. Se midió en las líneas M, P y F_1 .

- 3- Estriado.** Consistió en la evaluación visual del estriado en la primera hoja expandida, daño típico provocado por el pulgón ruso. Se utilizó una escala de 1 a 6, donde 1 corresponde a la ausencia de estriado y 6 al máximo estriado. Se midió en plantas F_1 , a las 48 h luego de la infestación (Figura 4).

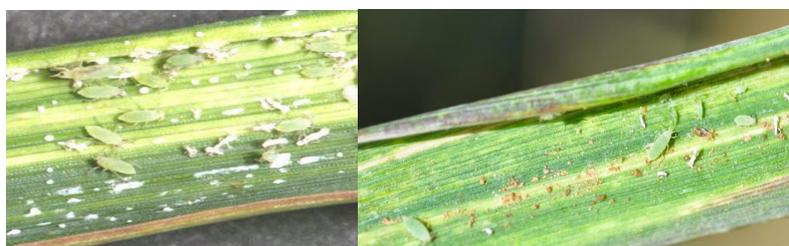


Figura 4. Detalle del estriado ocasionado por el pulgón ruso

- 4- Enrollamiento.** De igual manera, la evaluación de enrollamiento de la primera hoja expandida se relacionó directamente con el daño causado por el pulgón ruso. Se definió mediante una escala de 1 a 6, donde un valor de 1 se asignó a plantas cuya primera hoja carecía de enrollamiento y 6 cuando este fue completo. Se midió en F_1 , a las 48 h post infestación (Figura 5).



Figura 5. Detalle del enrollamiento causado por el pulgón ruso

Foto adaptada, Dr. Edgar Schliephake (Julius Kuehn Institute, Germany)

Tanto para el **estriado** como para el **enrollamiento**, se utilizó una escala que varía entre 1 y 6 (Du Toit, 1987; Robinson, 1994) que contempla una evaluación integral de los daños observados sobre una planta infestada (Tabla 1).

Tabla 1. Evaluación del daño provocado por el pulgón ruso sobre plantas infestadas

<i>Valor</i>	<i>Daño observado</i>	<i>Clasificación</i>
1	Sin daño aparente	Resistente
2	Estriado clorótico en pocas hojas	Resistente
3	Estriado clorótico en varias hojas, mínimo enrollamiento de las hojas	Intermedia
4	Estriado clorótico severo, enrollamiento evidente de las hojas	Intermedia
5	Estriado, enrollamiento severo de las hojas, necrosis	Susceptible
6	Severa necrosis, muerte inminente	Susceptible

(Robinson, 1994)

5- Área foliar. Se determinó con un medidor Área Meter LI-3100 y sus valores se expresaron en cm². El área foliar se cuantificó en plantas F₂.

6- Pesos fresco y seco. Se midieron con una balanza de precisión Mettler Toledo modelo PB303-S y se expresaron en miligramos (mg). El peso fresco se evaluó al cosechar las plantas, luego el material se llevó a estufa (60°C) para determinar el peso seco. Ambas determinaciones se realizaron en plantas F₂.

Análisis estadístico. Se utilizó el programa Statistica (StatSoft Inc, 2005) para realizar el análisis de la varianza, y luego la prueba LSD de Fisher (*LSD, least significant differences*, diferencias mínimas significativas) cuando las

diferencias encontradas fueron significativas. Los valores obtenidos en las determinaciones fueron transformados por la raíz cuadrada a fin de homogeneizar la varianza del error, aunque para una mejor visualización de los resultados en los gráficos se presentan las variables no transformadas.

En la totalidad de los datos presentados se cumplieron los supuestos de aleatoriedad, normalidad y homocedasticidad requeridos por el modelo. Los valores del estriado y del enrollamiento de las hojas se analizaron mediante el test de t (Student) debido a que sólo se contó con datos de plantas infestadas, no habiendo testigos para estas determinaciones.

Resultados

1- Contenido de clorofila (Índice de verdor)

El análisis de varianza para el contenido de clorofila (unidades SPAD) en las líneas progenitoras (**M** y **P**), **F₁** y **F₂** infestadas con pulgones mostró diferencias altamente significativas entre los genotipos estudiados (Tabla 2).

Tabla 2. ANOVA del contenido de clorofila (unidades SPAD) en las líneas Synthetic, M, P, F₁ y F₂

Fuente de variación	CM	F
Genotipos	642,67	39,319**
Error	16,34	

CM: cuadrado medio; **: diferencias altamente significativas ($p < 0,001$)

Mediante la prueba de LSD se pudo observar que no existen diferencias entre ambos progenitores, aunque sí entre la F₁ y la F₂, siendo todos ellos diferentes al progenitor donante Synthetic (Syn), el cual mostró el de mayor contenido de clorofila (Tabla 3).

Tabla 3. Contraste mediante el test de LSD para el contenido de clorofila (unidades SPAD)

Genotipo	SPAD medio \pm DE
F ₂	22,82 \pm 1,48 a
F ₁	25,76 \pm 1,3 b
M	29,01 \pm 2,75 b
P	29,61 \pm 3,21 b
Syn	42,35 \pm 2,06 c

DE: desvío estándar. Grupos homogéneos, $\alpha = 0,05$.

La misma letra indica similitud.

La distribución de los valores medidos de SPAD de cada una de las generaciones estudiadas permite apreciar que estos disminuyen a medida que avanzan las generaciones. Se destaca el mayor valor de SPAD de la línea Syn respecto de todos los demás genotipos analizados (Figura 6).

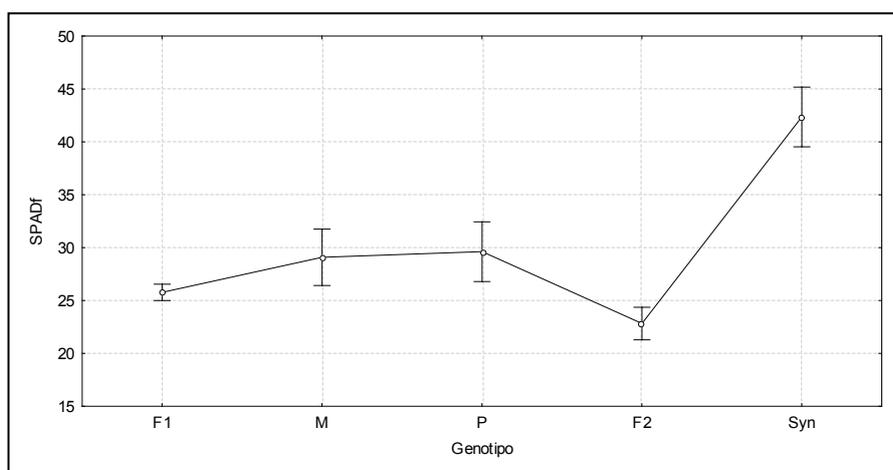


Figura 6. Distribución del contenido medio de clorofila (unidades SPAD) por genotipo

2- Tasa de crecimiento

El análisis de la varianza de la tasa de crecimiento en las líneas **M**, **P** y **F₁** permitió observar que existen diferencias altamente significativas entre ellas (Tabla 4).

Tabla 4. ANOVA de la tasa de crecimiento en las líneas progenitoras y la F₁

Fuente de variación	CM	F
Genotipos	109,323 **	19,89
Error	5,494	

CM: cuadrado medio; **: diferencias altamente significativas ($p < 0,001$)

Mediante el contraste de diferencias mínimas significativas (LSD) se estableció que las líneas M y P mostraron tasas de crecimiento similares y mayores respecto de la primera filial (F₁) obtenida a partir del cruzamiento de aquellas. El efecto del pulgón ruso sobre el crecimiento se observó en la F₁ a través de una marcada disminución de la tasa de crecimiento en las plantas de dicha generación (Tabla 5, Figura 7).

Tabla 5. Contraste mediante el test de LSD para la tasa de crecimiento

Genotipo	Tasa de crecimiento media \pm DE
M	9,96 \pm 2,86 a
P	10,24 \pm 2,44 a
F ₁	5,95 \pm 2,34 b

DE: desvío estándar. Grupos homogéneos, $\alpha = 0,05$.

La misma letra indica similitud

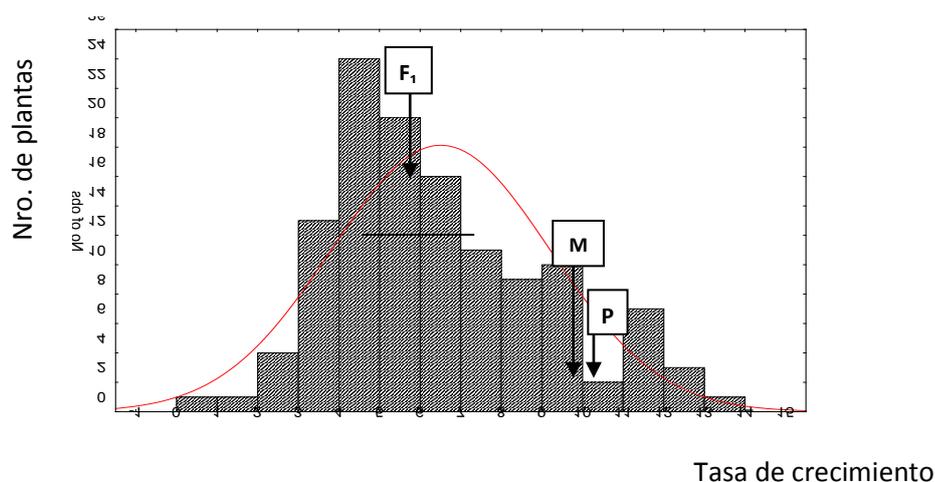


Figura 7. Distribución de la tasa de crecimiento en las plantas F₁ respecto de M y P.

3- Estriado y enrollamiento

Analizando mediante el test de t (Student) el estriado y el enrollamiento de las hojas en plantas F_1 , principales daños causados por el pulgón ruso, se encontraron diferencias significativas para ambas mediciones por efecto del insecto (Tabla 6).

Tabla 6. Test de t para el estriado y enrollamiento de las hojas en plantas F_1

Determinación	Media \pm DE	t	p
Estriado	0,948 \pm 0,24	40,58	0,001
Enrollamiento	1,279 \pm 0,15	89,97	0,001

DE: desvío estándar. Diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$.

Se indican los valores normalizados de la media

En el caso del estriado, el valor de 4 fue el más frecuente y 6 el máximo valor encontrado a las 48 h desde la infestación con pulgón ruso (Figura 8). Por lo tanto, un valor medio de 4 en la escala de evaluación al daño provocado por el pulgón ruso indica un grado intermedio de resistencia hallado, en promedio, en las plantas F_1 .

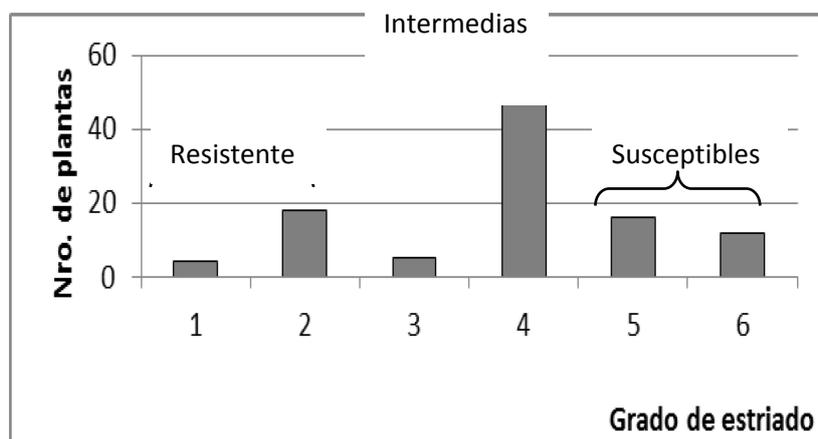


Figura 8. Distribución del estriado en las hojas de las F_1 infestadas con pulgón ruso, según una escala preestablecida (1: sin estriado; 6: máximo estriado)

En la escala del enrollamiento, la mayoría de las plantas F_1 mostró un valor de 2, lo que corresponde con la categoría de plantas resistentes a pulgón ruso. Un grupo de cuatro plantas evidenciaron un comportamiento intermedio,

con valores de 3 en la escala utilizada (Figura 9). Aunque el enrollamiento se midió con valores entre 1 y 6, no se observaron plantas que tuvieran valores mayores a 3 en esta escala.

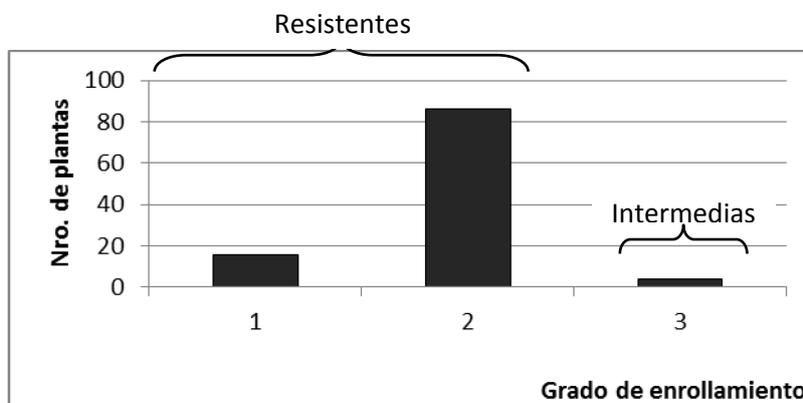


Figura 9. Distribución del enrollamiento en las hojas de las F₁ infestadas con pulgón ruso

Mediante las correlaciones entre la totalidad de las determinaciones realizadas en plantas F₁ se observó que el contenido de clorofila medido en unidades SPAD estuvo significativamente correlacionado con la tasa de crecimiento, con el estriado y con el enrollamiento de las hojas causados por la acción del pulgón ruso (Tabla 7). Sin embargo, aunque significativas, estas correlaciones fueron de baja magnitud.

Tabla 7. Correlación entre las determinaciones realizadas en plantas F₁

	SPAD _f	Estriado	Enrollamiento
Alt _f - Alt _i	0,27 **	-,0315	0,1038 ns
SPAD _f		0,2671 **	0,2334 *
Estriado			0,1573 ns

*: diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$

** : diferencias altamente significativas ($p < 0,001$)

ns: diferencias no significativas

4- Área foliar, peso fresco y peso seco

En las determinaciones del área foliar, el peso fresco y el peso seco realizadas en plantas F₂, sólo se encontraron diferencias significativas para el

peso fresco. En cambio, en el caso del área foliar y del peso seco, sus diferencias no fueron significativas (Tabla 8).

Tabla 8. ANOVA de las determinaciones de área foliar, peso fresco y peso seco en plantas F₂

Fuente de variación	Área foliar			Peso fresco			Peso seco		
	CM	F	p	CM	F	p	CM	F	p
Genotipos	155,18	1,781 ns	0,188	0,8822	5,77*	0,0198	0,1855	2,426 ns	0,125
Error	87,11			0,1529			0,0765		

*: diferencias significativas ($p < 0,05$); ns: diferencias no significativas

Analizando el **peso fresco** de este grupo de plantas F₂, el contraste de Fisher de diferencias mínimas significativas (LSD) mostró dos grupos independientes de plantas, aquellas tratadas con pulgón por un lado y sus respectivos testigos, por el otro (Tabla 9). La distribución de los pesos frescos de plantas F₂ testigo e infestadas con pulgón puede observarse en la figura 10.

Tabla 9. Contraste mediante el test de LSD para el peso fresco

Genotipo	Peso fresco medio \pm DE
Testigo	1,83 \pm 0,19 a
Pulgón ruso	2,39 \pm 0,27 b

DE: desvío estándar; Grupos homogéneos, $\alpha = 0,05$.

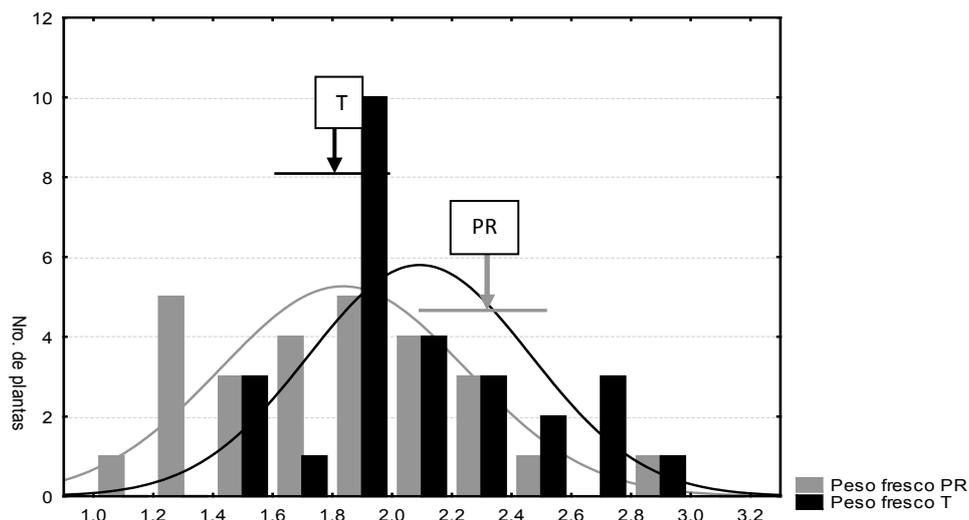


Figura 10. Distribución de las plantas F_2 según su peso fresco.

Las flechas indican el valor medio y las barras horizontales, los desvíos estándar. **T** indica peso fresco promedio de las plantas testigo. **PR** indica peso fresco promedio de las plantas infestadas con pulgón ruso.

Discusión

Existe suficiente evidencia como para afirmar que las plantas y los insectos han co-evolucionado (Ehrlich & Raven, 1964; Agrawal, 2007). La estrecha asociación planta- insecto se fundamenta en los beneficios que ambos organismos obtienen, sirviendo las plantas de refugio para la alimentación y oviposición, mientras que los insectos colaboran con la defensa y polinización de aquellas (Panda & Khush, 1995). Por otro lado, esta dinámica relación está lejos de ser equilibrada y armónica, sino que está sujeta a continuos cambios. En este sentido, las plantas han desarrollado mecanismos de protección contra la herbivoría, mientras que los insectos han logrado evitar los efectos negativos, consecuencia de aquellos (Agrawal, 2007).

Según sea el grado de infestación, el daño puede tornarse extremadamente grave para una planta e inclusive causar su muerte. Se conoce que varios herbívoros crecen más lentamente o que disminuyen su preferencia por plantas que se encuentran dañadas, a diferencia de lo que

ocurre en aquellas no afectadas (Agrawal *et al.*, 2002) en las que sus defensas no fueron previamente inducidas. Además, una planta que fue previamente infestada con un insecto permanece en estado de alerta y activa con mayor celeridad y más exitosamente su sistema de defensas ante una nueva situación de estrés biótico o abiótico (Goellner & Conrath, 2008). Este mecanismo, denominado 'priming', está conservado en monocotiledóneas (Conrath *et al.*, 2006). Inclusive las plantas son capaces de heredar de sus progenitores la capacidad de tolerar el estrés, mediante la inducción de epialelos alternativos (Mirouze & Paszkowski, 2011) que modifican la expresión génica y las características fenotípicas de los individuos (Pecinka & Mittelsten Scheid, 2012).

Analizando líneas de sustitución de la totalidad de los cromosomas del trigo, Castro *et al.* (2005) postularon que el cromosoma 6A porta genes relacionados con las defensas constitutivas que afectan a la fotosíntesis y, consecuentemente, reducen la biomasa aérea de las plantas. En consecuencia, este genotipo se vuelve menos atractivo para la alimentación del pulgón verde (*Schizaphis graminum*) o directamente se induce su repelencia. Salas (1991) concluyó que las plantas de cebada infestadas con pulgón ruso y *Rhopalosiphum padi* presentaron valores menores del contenido de clorofila, de intercambio de CO₂ y potencial hídrico, respecto de las no infestadas. Golawska *et al.* (2010), registraron la pérdida de clorofila a y b, en unidades SPAD, ocurrida en plantas leguminosas infestadas con el pulgón *Acyrtosiphon pisum*. En la población analizada en el presente capítulo se observaron diferencias significativas entre las líneas progenitoras, las filiales F₁ y F₂, resultados similares a los encontrados en cebada (Tocho *et al.*, 2012), donde el contenido de clorofila resultó ser uno de los parámetros más afectados por la infestación. Las líneas progenitoras M y P y las plantas correspondientes a la F₁ se comportaron de forma similar, agrupándose según sus diferencias mínimas significativas. En la siguiente generación (F₂) se observó la disminución en el contenido de clorofila, encontrándose valores medios menores a los de sus progenitores. Al tratarse el contenido de clorofila de un carácter cuantitativo, era esperable la manifestación de la herencia transgresiva del carácter, en sentido negativo en este caso. De todos modos, la inclusión de pocos

individuos F_2 relativiza lo que se pueda concluir a partir de datos obtenidos en esta segunda filial.

Resulta interesante destacar que una elevada proporción de plantas que había sido caracterizada como susceptible ante la infestación con pulgón, evidenció un lento crecimiento y aún murió al poco tiempo de ser transplantada a suelo, sin dejar descendencia. Aunque en un primer momento este fenómeno pareció azaroso y/o debido al estrés post-transplante, la reiterada muerte de plantas ocurrida con mayor frecuencia en la generación F_2 podría deberse a la manifestación en homocigosis de alelos letales enmascarados en las generaciones parentales (Rick & Smith, 1953), o deberse a la presencia de la selección de un carácter umbral, por debajo del cual la vida de los genotipos más sensibles no sería posible.

Rick & Smith (1953) propusieron tres posibles explicaciones para la existencia de vigor híbrido interespecífico: (1)- mutación de novo inducida por el cruzamiento amplio en sí mismo, (2)- interacción de los genes provenientes de ambas especies progenitoras, (3)- desenmascaramiento de alelos recesivos que se encuentran en estado de heterocigosis normalmente presentes en especies silvestres. Si bien los padres utilizados en este trabajo son completamente homocigotas, habiendo variación genética sólo en un pequeño fragmento del cromosoma 6AS comprendido entre los microsatélites Xgwm459 y Xgwm334a, las tres explicaciones detalladas serían factibles para la población de plantas estudiadas.

En lo que respecta al crecimiento de las plantas en condiciones de infestación, se observaron tasas de crecimiento similares entre ambos padres y un menor valor medio en la generación F_1 . Se deduce que la herencia de este parámetro también fue transgresiva en sentido negativo, presentando valores menores respecto de las líneas M y P.

La herencia transgresiva observada para el contenido de clorofila y la tasa de crecimiento podría explicarse por nuevas combinaciones alélicas que produjeron otros fenotipos, los cuales excedieron el rango de los progenitores, habiendo presentado valores menores respecto de ellos para ambas determinaciones.

Debido a que los parámetros en los que se basa la selección de materiales tolerantes son la persistencia de la clorofila y el mantenimiento del crecimiento en términos de peso seco y área foliar (Voothuluru *et al.*, 2006), se buscó alguna asociación entre ellos. Así, algunas plantas mostraron valores mayores o menores tanto en el contenido de clorofila como en la tasa de crecimiento, respecto de la media. Sin embargo, en la F₁ se observó una correlación baja significativa entre el contenido de clorofila, con el estriado y con el enrollamiento de las hojas, lo que puede dar cuenta de que la asociación lineal entre estas variables es baja.

El daño causado por el pulgón ruso en el tejido foliar puede deberse a la completa destrucción fisiológica de las células, acompañada de una rápida disminución de la presión y del sellado de los vasos xilemáticos, como así también la lesión de las células acompañantes del floema generada por algunos componentes presentes en la saliva (Saheed *et al.*, 2007). En el presente trabajo, la evaluación del grado de estriado y enrollamiento observado en las hojas de las plantas F₁ mostró diferencias significativas entre ellas como consecuencia del daño ocasionado por el pulgón ruso. Por lo tanto, estos síntomas estarían indicando que la acción del insecto puede producir el aislamiento apoplástico y simplástico del xilema y del floema. En consecuencia, puede suponerse un intercambio nutricional limitado desde estos tejidos hacia las células adyacentes, lo cual provocaría estrías y enrollado de las hojas por la acción del áfido.

Por otro lado, el menor plegado de las hojas sobre sí mismas se convierte en una barrera para la infestación de los áfidos al permitir su efectivo control biológico y químico. Además, las plantas que no enrollan sus hojas ante la infestación no sufren mermas en su nivel fotosintético, como tampoco en su crecimiento (Voothuluru *et al.*, 2006). En consecuencia, la selección de aquellas plantas que mantienen sus hojas planas, en lugar de enrolladas por la acción del pulgón, sería ventajosa en pos de buscar una óptima arquitectura del canopeo que dificulte el establecimiento del pulgón.

En líneas de sustitución de trigo (Castro *et al.*, 2007), se estableció que los menores pesos obtenidos en las plantas pertenecientes a la línea 6A, infestadas con pulgón verde, pueden deberse al elevado costo de la síntesis

constitutiva de metabolitos secundarios (Martín *et al.*, 2003), reasignando recursos destinados al crecimiento y producción de las plantas para hacer frente al daño provocado por un insecto (Cipollini, 2002). Esto podría explicar las diferencias significativas encontradas en el peso fresco de las plantas F₂ evaluadas.

La clasificación de las plantas F₁ como de resistencia intermedia (grado 4) según su valor medio de estriado y como resistentes (grado 2) según su grado de enrollamiento, debe ser considerada relativa debido al corto tiempo de infestación al que fueron sometidas dichas plantas para su evaluación. Para caracterizar a las plantas por su grado de resistencia, debieron evaluarse a lo largo de un mayor período de infestación. De igual manera, esta pudo haber sido la causa de la baja correlación encontrada entre el contenido de clorofila, la tasa de crecimiento y los daños visuales de estriado y enrollamiento.

Conclusiones

- El índice de verdor, y por ende el contenido de clorofila medido en unidades SPAD, disminuyó en la segunda filial (F₂), mostrando valores menores respecto de las líneas M, P y la F₁. Por lo tanto, puede afirmarse que hubo herencia transgresiva del contenido de clorofila.
- Al ser infestadas con pulgón ruso, las plantas F₂ reflejaron el efecto del estrés biótico a través del aumento en el peso fresco. Sin embargo, el peso seco y el área foliar no mostraron esas diferencias en plantas F₂ infestadas respecto de las testigos.

Bibliografía

- Agrawal, A.A., J.K. Conner, M.T. Johnson & R. Wallsgrave. 2002. Ecological genetics of an induced plant defense against herbivores: additive genetic variance and costs of phenotypic plasticity. *Evolution* 56: 2206-2213.
- Agrawal, A.A. 2007. Macroevolution of plant defense strategies. *TRENDS in Ecology and Evolution* 22: 103-109.

- Alvarez-Venegas, R. 2014. Bacterial SET domain proteins and their role in eukaryotic chromatin modification. *Frontiers in Genetics* 5: 65.
- Anderson, G.M., D. Papa, J. Peng, M. Tahir & N.L.V. Lapitan. 2003. Genetic mapping of Dn7, a rye gene conferring resistance to the Russian wheat aphid in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1297-1303.
- Anstead, J., P. Samuel, N. Song, C. Wu, G.A. Thompson & F. Goggin. 2010. Activation of ethylene-related genes in response to aphid feeding on resistant and susceptible melon and tomato plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 134: 170-181.
- Argandoña, V.H., H.M. Niemeyer & L.J. Corcuera. 1981. Effect of content and distribution hidroxamic acids in wheat on infestation by the aphid *Schizaphis graminum*. *Phytochemistry* 20: 673-676.
- Bahlmann, L., P. Govender & A.M. Botha. 2003. The leaf epicuticular wax ultrastructure and trichome presence on Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*) resistant and susceptible leaves. *African Entomology* 11: 59-64.
- Balch, R.E. 1952. Studies on the balsam woolly aphid, *Adelges piceae* (Ratz) and its effects on balsam fir, *Abies balsamea* (L.) Mill. Canadian Department of Agriculture, Ottawa, Publications 867: 76.
- Botha, A.M., Y. Li & L.V. Lapitan. 2005. Cereal host interactions with Russian wheat aphid: A review. *Journal of Plant Interactions* 1: 211-222.
- Botha, A.M., L. Lacock, C.M. van Niekerk, T. Matsioloko, F.B. du Preez, S. Loots, E. Venter, K.J. Kunert & C.A. Cullis. 2006. Is photosynthetic transcriptional regulation in *Triticum aestivum* L. cv. 'TugelaDN' a contributing factor for tolerance to *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae)? *Plant Cell Reports* 25: 41-54.
- Botha, A.M., Z.H. Swanevelder & N.L.V. Lapitan. 2010. Transcript profiling of wheat genes expressed during feeding by two different biotypes of *Diuraphis noxia*. *Environmental Entomology* 39: 1206-1231.
- Botha, A.M., L. van Eck, N.F.V. Burger & Z.H. Swanevelder. 2014. Near-isogenic lines of *Triticum aestivum* with distinct modes of resistance exhibit dissimilar transcriptional regulation during *Diuraphis noxia* feeding. *Biology Open* 000: 1–11 doi:10.1242/bio.201410280.
- Burd, J.D. & N.C. Elliott. 1996. Changes in chlorophyll a fluorescence induction kinetics in cereals infested with Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 89: 1332-1337.

- Castro, A.M., S. Ramos, A. Vasicek, A. Worland, D. Giménez, A.A. Clúa & E. Suárez. 2001. Identification of wheat chromosomes involved with different types of resistance against greenbug and Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*, Mordvilko) Euphytica 118: 321-330.
- Castro, A.M., A. Vasicek, M. Manifesto, D. Giménez, M.S. Tacaliti, O. Dobrovolskaya, M.S. Röeder, J.W. Snape & A. Börner. 2005. Mapping resistance genes to greenbug and RWA on chromosome 6A of wheat Plant Breeding 124: 229-233.
- Castro, A.M., A. Clúa, D.O. Giménez, E. Tocho, M.S. Tacaliti, M. Collado, A. Worland, R. Bottini & J. Snape. 2005. Greenbug resistance in wheat substitution lines, determined by their endogenous concentration of non-structural carbohydrates and proteins. En: Wheat Production in Stressed Environments. Proceedings of the 7th International Wheat Conference, Mar del Plata, Argentina.
- Castro, A.M., A. Clúa, D. Giménez, E. Tocho, M.S. Tacaliti, M. Collado, A. Worland, R. Bottini & J. Snape. 2007. Greenbug resistance in wheat substitution lines, determined by their endogenous concentration of non-structural carbohydrates and proteins. In H. Buck, R. J. E. Nissi and N. Salomón, Título del libro: Wheat Production in Stressed Environments. Series in Plant Science XXI, Developments in Plant Breeding. Editorial: Springer Verlag, Dordrech Holanda 12: 139-148.
- Campbell, B.C., D.L. Mc Lean, M.G. Kinsey, K.C. Jones & D.L. Dreyer. 1982. Probing behavior of the greenbug (*Schizaphis graminum* Biotype C) on resistant and susceptible varieties of Sorghum. Entomologia Experimentalis et Applicata 34: 134-138.
- Cipollini, D. 2002. Does competition magnify the fitness costs of induced responses in *Arabidopsis thaliana*? a manipulative approach. Oecologia 131: 514-520.
- Clúa, A., A.M. Castro, S. Ramos, D.O. Giménez, A. Vasicek, H. Chidichimo & A.F.G. Dixon. 2004. The biological characteristics and distribution of *Schizaphis graminum* and *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Aphididae) in Argentina and Chile. European Journal of Entomology 101: 193-198.
- Conrath, U., J.M. Beckers, V. Flors, P. García Agustín, G. Jakab, F. Mauch, M.A. Newman, C.M.J. Pieterse, B. Poinssot, M.J. Pozo, A. Pugin, U. Schaffrath, J. Ton, D. Wendehenne, L. Zimmerli & B. Mauch-Mani. 2006. Priming: Getting Ready for Battle. Molecular Plant-Microbe Interactions 19: 1062-1071.

- Costa, C., L.M. Dwyer, P. Dutilleul, D.W. Stewart, L.B. Ma & D.L. Smith. 2001. Inter-relationships of applied nitrogen, SPAD, and yield of leafy and non-leafy maize genotypes. *Journal of Plant Nutrition* 24: 1173-1194.
- Damsteegt, V.D., F.E. Gildow, A.D. Hewings & T.W. Carroll. 1992. A clone of the Russian Wheat Aphid (*Diuraphis noxia*) as a vector of the Barley Yellow Dwarf, Barley Stripe Mosaic and Brome Mosaic Viruses. *Plant Disease* 76: 1155-1160.
- Davis, G.K. 2012. Cyclical parthenogenesis and viviparity in aphids as evolutionary novelties. *Journal of Experimental Zoology Part B* 318: 448-459.
- Devonshire, A.L. & L.M. Field. 1991. Gene amplification and insecticide resistance. *Annual Review of Entomology* 36:1-23.
- Dughetti, A.C. 2012. Pulgones. Clave para identificar las formas ápteras que atacan a los cereales. Red de Información Agropecuaria Nacional (RIAN), EEA-INTA Hilario Ascasubi. <http://rian.inta.gov.ar/agronomia/libropulgones/main.swf>.
- Du Toit, E. 1987. Resistance in wheat (*Triticum aestivum*) to *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Aphididae). *Cereal Res. Commun.* 16: 105-106.
- Ehrlich, P.R. & P.H. Raven. 1964. Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution* 18: 586-608.
- Ekstrom, G. & B. Ekbom. 2011. Pest control in agro-ecosystems: an ecological approach. *Critical Reviews in Plant Science* 30: 74-94.
- Fanizza, G., L. Ricciardi & C. Bagnulo. 1991. Leaf greenness measurements to evaluate water stressed genotypes in *Vitis vitifera*. *Euphytica* 55: 27-32.
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gen for gen concept. *Ann. Review of Phytopathology* 9: 275-296.
- Franzen, L.D., A.R. Gutsche & T.M. Heng-Moss. 2007. Physiological and biochemical responses of resistant and susceptible wheat to injury by the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko). *Journal of Economical Entomology* 100: 1692-1703.
- Girma, M., K.D. Kofoid & J.C. Reese. 1998. *Sorghum* germplasm tolerant to greenbug (Homoptera: Aphididae) feeding damages measured by reduced chlorophyll loss. *Journal of the Kansas Entomological Society* 71: 108-115.
- Goellner, K. & U. Conrath. 2008. Priming: it's all the world to induced disease resistance. *Eur J Plant Pathol* 121: 233-242.

- Goławska, S., R. Krzyżanowski & I. Lukasik. 2010. Relationship between aphid infestation and chlorophyll content in fabaceae species. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 52: 76-80.
- Graybosch, R.A. 2001. Uneasy unions: quality effects of rye chromatin transfer to wheat. *Journal of Cereal Science* 33: 3-16.
- Graybosch, R.A., C.J. Peterson, L.E. Hansen, D. Worrall, D.R. Shelton & A. Lukaszewski. 1993. Comparative flour quality and protein characteristics of 1BL/1RS and 1AL/1RS wheat-rye translocation lines. *Journal of Cereal Science* 17: 95-106.
- Heng-Moss, T.M., X. Ni, T. Macedo, J.P. Markwell, F.P. Baxendale, S.S. Quisenberry & V. Tolmay. 2003. Comparison of chlorophyll and carotenoid concentrations among Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae)-infested wheat isolines. *Journal of Economical Entomology* 96: 475-481.
- Imwinkelried, J.M., F.D. Fava & E.V. Trumper. 2004. Pulgones que atacan el cultivo de trigo. Ediciones Instituto de Tecnología Agropecuaria. Boletín N°7, 6 pp.
- Kennedy, J.S. & A. Ibbotson. 1950. The distribution of aphid infestations in relation to leaf age II. The process of *Aphis fabae* infestations on pot sugar beets. *Annals of Applied Biology* 37: 690-696.
- Kumlay, A.M., P.S. Baenziger, K.S. Gill, D.R. Shelton, R.A. Graybosch, A.J. Lukaszewski & D.M. Wesenberg. 2003. Understanding the effect of rye chromatin in bread wheat. *Crop Science* 43: 1643-1651.
- Lacock, L., C. Van Niekerk, S. Loots, F. Du Preez & A.M. Botha. 2003. Functional and comparative analysis of expressed sequences from *Diuraphis noxia* infested wheat obtained utilizing the conserved nucleotide binding site. *African Journal of Biotechnology* 2: 75-81.
- Lapitan, N.L.V., Y.C. Li, J. Peng & A.M. Botha. 2007. Fractionated extracts of Russian wheat aphid eliciting defense responses in wheat. *Journal of Economical Entomology* 100: 990-999.
- Lawson, T., J. Craigon, A.M. Tulloch, C.R. Black, J.J. Colls & G. Landon. 2001. Photosynthetic responses to elevated CO₂ and ozone in field-grown potato (*Solanum tuberosum*). *Journal of Plant Physiology* 158: 309-323.
- Liu, X.M., C.M. Smith, B.S. Gill & V. Tolmay. 2001. Microsatellite markers linked to six Russian wheat aphid resistance genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 504-510.

- Ma, Z.Q., A. Saidi, J.S. Quick & N.L.V. Lapitan. 1998. Genetic mapping of Russian wheat aphid resistance genes Dn2 and Dn4 in wheat. *Genome* 41:303-306.
- Martin, G., A. Bogdanove & G. Sessa. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology* 54: 23-61.
- Mater, Y., S. Baenziger, K. Gill, R. Graybosch, L. Witcher, C. Baker, J. Specht & I. Dweikat. 2004. Linkage mapping of powdery mildew and greenbug resistance genes on recombinant 1RS from 'Amigo' and 'Kavkaz' wheat-rye translocations of chromosome 1RS.1AL. *Genome* 47: 292-298.
- McKendry, A.L., D.N. Tague, P.L. Finney & K.E. Miskin. 1996. Effect of 1BL.1RS on milling and baking quality of soft red winter wheat. *Crop Science* 36: 848-851.
- Mc Murtry, J.A. & E.H. Stanford. 1960. Observations of feeding habits of the spotted alfalfa aphid on resistant and susceptible alfalfa plants. *Journal of Economical Entomology* 53: 714-717.
- Miller, H., D.R. Porter, J.D. Burd, Q.W. Mornhinweg & R.L. Burton. 1994. Physiological effects of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) on resistant and susceptible barley. *Journal of Economical Entomology* 87: 493-499.
- Miller, C.A., A. Altinkut & N.L.V. Lapitan. 2001. A microsatellite marker for tagging Dn2, a wheat gene conferring resistance to the Russian wheat aphid. *Crop Science* 41: 1584-1589.
- Mirouze, M. & P. Paszkowski. 2011. Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 1-8.
- Myburg, A.A., M. Cawood, B.D. Wingfield & A.M. Botha. 1998. Development of RAPD and SCAR markers linked to the Russian wheat aphid resistance gene in Dn2 in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 96:1162-1169.
- Navarro, L., C. Zipfel, O. Rowland, I. Keller, S. Robatzek, T. Boller & J.D. Jones. 2004. The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiology* 135: 1113-1128.
- Ni, X., S.S. Quisenberry, J. Markwell, T. Heng-Moss, L. Higley, F. Baxendale, G. Sarath & R. Klucas. 2001. In vitro enzymatic chlorophyll catabolism in wheat elicited by cereal aphid feeding. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 101: 159-166.

- Ni, X., S.S. Quisenberry, T. Heng-Moss, J. Markwell, L. Higley, F. Baxendale, G. Sarath & R. Klucas. 2002. Dynamic change in photosynthetic pigments and chlorophyll degradation elicited by cereal aphid feeding. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 105: 43-53.
- Nieto Nafría, J., M.A. Delfino & M.P. Mier Durante. 1994. La afidofauna de la Argentina, su conocimiento en 1992. Universidad de León, España, 235 pp.
- Panda, N. & G.S. Khush. 1995. Host plant resistance to insects. CAB International Rice Research Institute, Wallingford.
- Pecinka, A. & O. Mittelsten Scheid. 2012. Stress-Induced chromatin changes: a critical view on their heritability. *Plant Cell Physiol.* 53: 801-808.
- Qiu, Y., J. Xi, L. Du, J.C. Suttle & B.W. Poovaiah. 2012. Coupling calcium/calmodulin-mediated signaling and herbivore-induced plant response through calmodulin-binding transcription factor AtSR1/CAMTA3. *Plant Mol Biol* 79: 89-99.
- Ricci, M., E. Tocho, A.F.G. Dixon & A.M. Castro. 2011. *Diuraphis noxia*: reproductive behaviour in Argentina. *Bulletin of Insectology* 64: 235-241.
- Ricci, M., M. Cakir & A.M. Castro. 2012. *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Aphididae): Identificación de los biotipos presentes en poblaciones argentinas. *Revista Sociedad Entomológica Argentina* 71: 1-2.
- Ricciardi, M., E. Tocho, M.S. Tacaliti, A. Vasicek, D.O. Giménez, A. Paglione, J. Simmonds, J.W. Snape & A.M. Castro. 2010. Mapping quantitative trait loci for resistance against Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*) in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop & Pasture Science* 61: 1-8.
- Richardson, P. 1982. Cereal aphid honeydew production. En: JH Visser y AK Minks (ed.). *Proceedings 5th International Symposium on Insect-Plant Relationships*. Wageningen. Pp 413-414.
- Rick, C.M. & P.G. Smith. 1953. Novel variation in tomato species hybrids. *American Naturalist* 88: 359-373.
- Riedell, W.E. 1989. Effects of Russian wheat aphid infestation on barley plant response to drought stress. *Physiologia Plantarum* 77: 587-592.
- Riedell, W.E. & T.M. Blackmer. 1999. Leaf reflectance spectra of cereal aphid-damaged wheat. *Crop Science* 39: 1835-1840.
- Robinson, J. 1994. Identification and Characterization of Resistance to the Russian Wheat Aphid in Small-Grain Cereals: Investigations at CIMMYT, 1990-92. CIMMYT Research Report No.3. 44 pp. Mexico, D.E: CIMMYT.

- Saheed, S.A., C.E.J. Botha, L. Liu & L. Jonsson. 2007. Comparison of structural damage caused by Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia* Mordvilko) and Bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi* L.) in a susceptible barley cultivar, *Hordeum vulgare* L. cv Clipper. *Physiologia Plantarum* 129: 429-435.
- Salas, M.L., V. Argandoña & L. Corcuera. 1991. Conducta alimentaria del pulgón ruso del trigo, *Diuraphis noxia* (Mordvilko) y de pulgón de la avena *Rhopalosiphum padi* L. (Homoptera: Aphididae) y efecto del contenido de gramina en cebada. *Agricultura técnica (Chile)* 51: 356-361.
- Salto, C. & J. Imwinkelried. 1997. Pulgón ruso del trigo, una plaga de reciente aparición en Argentina. Información Técnica N° 215. Agronomía, INTA, E.E.A. Rafaela. 4 págs.
- Samdur, M.Y., A.L. Singh, R.K. Mathur, P. Manivel, B.M. Chikani, H.K. Gor & M.A. Khan. 2000. Field evaluation of chlorophyll meter for screening groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes tolerant to iron-deficiency chlorosis. *Current Science Bangalore* 79: 211-214.
- Saulescu, N.N., G. Iltu, M. Ciuca, M. Iltu, G. Serban & P. Mustatea. 2011. Transferring useful rye genes to wheat, using Triticale as a bridge. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 47(Special Issue): S56-S62. Proc. 8th Int. Wheat Conference and BGRI 2010 Technical Workshop, 2010, St. Petersburg, Russia.
- Saxena, P.N. & H.L. Chada. 1971. The greenbug *Schizaphis graminum*. I. Mouthparts and feeding habits. *Annals of Entomology Society of America* 64: 897-904.
- Schepers, J., T. Blackmer & D. Francis. 1992. Predicting N fertilizer needs for corn in humid regions: Using chlorophyll meters. En B. Bock y K. Kelly (ed). *Predicting fertilizer needs for corn in humid regions*. NFERC, Bull. Y-226. Muscle Shoals, AL, EE.UU. pp. 105 - 114.
- Sebesta, E.E., E.A. Wood, D. Porter, J.A. Webster & E.L. Smith. 1994. Registration of Amigo wheat germplasm resistant to greenbug modified to show title as actually published. *Crop Science* 35: 293.
- Smith, C.M., D.J. Schotzko, R.S. Zemetra & E.J. Souza. 1992. Categories of resistance in plant introductions of wheat resistant to the Russian wheat aphid (Homoptera Aphididae). *Journal of Economical Entomology* 85: 1480-1484.
- Smith, C.M. 1989. *Plant Resistance to Insects: A Fundamental Approach*. Wiley, New York.

- Smith, C.M. 2005. *Plant Resistance to Arthropods: Molecular and Conventional Approaches*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Smith, C.M. & E.V. Boyko. 2006. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 122: 1-16.
- Smith, C.M., X. Liu, L.J. Wang, X. Liu, M.S. Chen, S. Starkey & J. Bai. 2010. Aphid feeding activates expression of a transcriptome of oxylipin-based defense signals in wheat involved in resistance to herbivory. *Journal of Chemical Ecology* 36: 260-276.
- StatSoft, Inc. 2005. *Statistica (data analysis software system)*, version 7.1. www.statsoft.com.
- Stotz, U., B.R. Pittendrigh, J. Kroymann, K. Weniger, J. Fritsche, A. Bauke & T. Mitchell-Olds. 2000. Induced Plant Defense Responses against Chewing Insects. Ethylene Signaling Reduces Resistance of Arabidopsis against egyptian cotton worm but not diamondback moth1. *Plant Physiology* 124: 1007-1017.
- Stout, M.J. 2013. Reevaluating the conceptual framework for applied research on host-plant resistance. *Insect Science* 20: 263–272.
- Tocho, E., M. Ricci, M.S. Tacaliti, D. Giménez, A. Acevedo, U. Lohwasser, A. Börner & A.M. Castro. 2012. Mapping resistance genes conferring tolerance to RWA (*Diuraphis noxia*) in barley (*Hordeum vulgare*). *Euphytica* 188: 239-251.
- Van der Westhuizen, A.J., X.M. Qian & A.M. Botha. 1998a. Differential induction of apoplastic peroxidase and chitinase activities in susceptible and resistant wheat cultivars by Russian wheat aphid infestation. *Plant Cell Reports* 8: 132-137.
- Van der Westhuizen, A.J., X.M. Qian & A.M. Botha. 1998b. β -1,3-glucanases in wheat and resistance to the Russian wheat aphid. *Physiologia Plantarum* 103: 125-131.
- Venter, E. & A.M. Botha. 2000. Development of markers linked to *Diuraphis noxia* resistance in wheat using a novel PCR RFLP approach. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 965-970.
- Voothuluru, P., J. Meng, C. Khajuria, J. Louis, L. Zhu, S. Starkey, G.E. Wilde, C.A. Baker & M. Smith. 2006. Categories and Inheritance of Resistance to Russian Wheat Aphid (Homoptera: Aphididae) Biotype 2 in a Selection from Wheat Cereal Introduction 2401. *Journal of Economical Entomology* 99: 1854-1861.

- Walters, M.C., F. Penn, F. du Toit, T.C. Botha, K. Aalbersberg, P.H. Mewitt & S.W. Broodryk. 1980. The Russian wheat aphid. Farming in South Africa. Leaflet Series, Wheat G3: 1-6.
- Wang, T., S.S. Quisenberry, X. Ni & V. Tolmay. 2004. Enzymatic chlorophyll degradation in wheat near-isogenic lines elicited by cereal aphid (Homoptera: Aphididae) feeding. *Journal of Economical Entomology* 97: 661-667.
- Wu, C., C.A. Avila & F.L. Goggin. 2014. The ethylene response factor Pti5 contributes to potato aphid resistance in tomato independent of ethylene signaling. *Journal of Experimental Botany*. Advance Access published December 11, 2014.

CAPÍTULO 5.

Estudio de la tolerancia al ácido jasmónico y al ácido abscísico en plantas F₃

Contenido

<u>Introducción</u>	130
<u>El ácido jasmónico</u>	134
<u>El ácido abscísico</u>	136
<u>Contenido de clorofila y tolerancia al estrés</u>	137
<u>Materiales y métodos</u>	138
<u>Material vegetal</u>	138
<u>Separación de macollos de las plantas F₃</u>	138
<u>Tratamientos hormonales</u>	139
<u>Determinación del contenido de clorofila</u>	139
<u>Determinación del peso seco</u>	140
<u>Determinación de la altura del rebrote</u>	140
<u>Análisis estadístico</u>	140
<u>Correlación entre tratamientos y determinaciones</u>	140
<u>Resultados</u>	141
<u>Discusión</u>	156
<u>Conclusiones</u>	159
<u>Bibliografía</u>	160

Introducción

Una planta sometida a un estímulo activa un amplio espectro de respuestas mediante varias rutas metabólicas de señalización, conformadas por intrincadas redes con frecuentes intercepciones o interferencias (Anderson *et al.*, 2004). Esto conlleva a la producción de proteínas cuyos roles se relacionan con el alivio de los efectos dañinos del estrés (Anderson *et al.*, 2004). El reconocimiento de una situación de estrés induce cascadas de señalización que activan canales iónicos, kinasas, la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la acumulación de hormonas tales como ácido salicílico (AS), etileno (ET), ácido jasmónico (AJ) y ácido abscísico (ABA) (Fujita *et al.*, 2006). Estas señales inducen la expresión de genes de defensa específicos y, por ende, establecen reacciones de defensa mediante mecanismos sinérgicos o antagónicos (Lee & Choi, 2013). La interconexión existente entre las diversas rutas metabólicas específicas de cada hormona, permiten suponer la complejidad de los sistemas de defensas. El término ‘*crosstalk*’ define esta idea como la influencia de una vía metabólica sobre otra u otras (Kuppusamy *et al.*, 2009). Esta interacción entre hormonas se caracteriza por ser compleja en cuanto a la biosíntesis, por implicar numerosos compuestos intermediarios y por la amplitud en la gama de respuestas pleiotrópicas elicidadas a través de sofisticados mecanismos moleculares (Kumar, 2013).

Existe amplia evidencia de que las vías metabólicas de defensa mediadas por el AS, el AJ y el ET son mutuamente afectadas, en sentido positivo o negativo. La interconexión entre ellas provee a las plantas de un importante potencial regulatorio para activar múltiples mecanismos de resistencia, otorgando prioridad a una vía de defensa por sobre otra con la finalidad de enfrentar al agente invasor en cuestión (Pieterse *et al.*, 2001).

Es ampliamente aceptado que las plantas son capaces de reconocer y responder a los distintos estímulos bióticos y abióticos provenientes del medio ambiente, como así también que manifiestan una serie de respuestas generalistas o específicas ante una amplia variedad de agentes patógenos y de herbívoros. Dichas respuestas se manifiestan a nivel biológico, molecular y bioquímico (Walling, 2000; Pandey *et al.*, 2008; Bari & Jones, 2009; Schmelz *et*

al., 2009). Además, los cambios morfológicos y químicos que ocurren en la planta como consecuencia de las condiciones nutricionales o de luminosidad existentes en el medio, están generalmente asociados a cambios en la expresión génica (Moreno *et al.*, 2009). Estudios transcriptómicos han logrado identificar genes y procesos involucrados en el control de las respuestas en las plantas ante múltiples estreses bióticos y abióticos, así como establecer objetivos para la mejora de la tolerancia al estrés. En plantas de pimienta inducidas mediante aplicaciones exógenas de ABA, ET, AJ y AS, se identificaron cientos de genes regulados por cada una de estas hormonas, aunque sólo un número reducido de estos fue regulado en forma coordinada por más de una de ellas. Así, se deduce que no existe un único regulón operando ante la aplicación exógena de las cuatro fitohormonas (Lee & Choi, 2013).

Desde hace más de veinte años que se sabe que el AS, el ET y el AJ constituyen moléculas de señalización, implicadas en los mecanismos de regulación de las respuestas primarias de resistencia (Dong, 1998; Reymond & Farmer, 1998; Bostock, 1999; Glazebrook, 1999; Maleck & Dietrich, 1999; Pieterse & Van Loon, 1999; Feys & Parker, 2000; Glazebrook, 2005). Estudios genéticos y moleculares con mutantes y plantas transgénicas alteradas en su resistencia a patógenos o insectos, revelaron que dichos compuestos cumplen un rol fundamental en las defensas de las plantas (Pieterse *et al.*, 2001). En numerosos casos, la infección por parte de un microorganismo patógeno o el ataque de un insecto está asociada a la producción de estas fitohormonas, con la consiguiente activación de distintos sets de genes de defensa (Maleck *et al.*, 2000; Reymond *et al.*, 2000; Schenk *et al.*, 2000). Además, las aplicaciones exógenas de estos compuestos intensifican los niveles de resistencia (Pieterse *et al.*, 2001), al activar genes de defensa con antelación al estrés.

A pesar de que se sabe que las moléculas de señalización interactúan mediante la modulación de sus diferentes vías metabólicas (Pieterse *et al.*, 2001), no es completamente conocido el mecanismo por medio del cual las plantas integran las señales generadas por los diversos inductores de resistencia en las respuestas específicas de defensa. Así, las defensas dependientes del AS se activan mayoritariamente en respuesta a organismos patógenos biotróficos y aquellas dependientes del AJ y del ET hacen lo propio

ante la acción de insectos necrotróficos y herbívoros (Reymond & Farmer, 1998; Pieterse & Van Loon, 1999; Kessler & Baldwin, 2002; Glazebrook, 2005; Van Loon *et al.*, 2006). Mediante las rutas del AJ/ ET se inducen defensas directas que derivan en la producción de volátiles atrayentes de predadores y parasitoides de los herbívoros (Kessler & Baldwin, 2002).

Está demostrado que estreses bióticos y abióticos influyen activando elementos transponibles en las plantas en general (Mansour, 2007) y en el trigo en particular (Hirochika, 1995). Esto es de especial relevancia dado que la zona del cromosoma 6A de trigo objeto de esta tesis se ubica próximo a la zona telomérica, región que se caracteriza por ser muy rica en transposones (Devos *et al.*, 2005).

La forma en que las plantas logren reconocer y responder ante los cambios suscitados en el medio ambiente, influirá en su habilidad competitiva en un ecosistema dado y redundará en una importante consecuencia adaptativa de la especie en cuestión (Broz *et al.*, 2010). A lo largo de la evolución, las plantas han logrado reunir la información recogida de las intrincadas redes de señalización activadas por la acción de los herbívoros, los organismos patógenos y por los agentes abióticos propios de su ambiente, para intentar repartir sus limitados recursos con discreción (Browse, 2009). Por lo tanto, la interconexión entre las vías metabólicas dependientes del AJ, del ET y del AS podría constituirse en un sistema regulatorio potencial, por medio del cual se activarían en la planta una vía por sobre alguna otra, según cuál fuera el organismo invasor (Pieterse *et al.*, 2001; Koornneef & Pieterse, 2008). En consecuencia, esta interacción ayudaría a las plantas a minimizar el costo energético involucrado en su defensa y a flexibilizar sus redes de señalización, redundando en el ajuste final de los sistemas de defensa implicados (Pieterse *et al.*, 2001; Bostock, 2005).

Mediante varios estudios realizados con mutantes de *Arabidopsis*, se demostró ampliamente que el AJ contribuye a incrementar la resistencia basal de la planta contra diferentes microorganismos patógenos (Pieterse *et al.*, 2001; Thomma *et al.*, 1998; Norman-Setterblad *et al.*, 2000). Además, se conoce que esta fitohormona cumple un importante rol de defensa primaria ante el ataque de insectos herbívoros (Browse, 2009).

El MeJA actúa como inductor bajo condiciones de estrés biótico (De Vos *et al.*, 2005; Hermsmeier *et al.*, 2001). Mediante una combinación de factores desencadenantes de estrés, tales como la proximidad de las plantas vecinas o la acción de herbívoros especialistas, se ha estudiado el efecto de la aplicación del metil- jasmonato (MeJA) como inductor de defensas, simulando la acción de un insecto herbívoro sobre plantas de una maleza exótica *Centaurea maculosa* (Broz *et al.*, 2010). Se comprobó que el MeJA es un compuesto volátil capaz de alertar a las plantas vecinas sobre la presencia de herbívoros, además de incrementar la producción de compuestos de defensa relacionados (Baldwin *et al.*, 2002; Karban *et al.*, 2006). Estudios recientes han avanzado en la comprensión de las funciones del regulador transcripcional MYC2, que cumple un rol central en las rutas de señalización propias del AJ, mediando en la integración de varias señales endógenas y exógenas relativas al crecimiento y desarrollo de las plantas (Kazan & Manners, 2013).

Por otro lado, se conoce que el ABA cumple importantes roles en varios aspectos relativos al desarrollo de una planta, en la regulación de la apertura estomática y en la iniciación de las respuestas adaptativas a varias condiciones ambientales. Mediante la combinación de las vías de señalización relativas al ABA, la planta regula su adaptación ante condiciones de sequía, bajas temperaturas y salinidad. Por el contrario, el AS, el AJ y el ET juegan importantes roles en la resistencia a enfermedades (Mauch- Mani & Mauch, 2005). No obstante, estas hormonas no controlan vías de señalización lineales sino que son parte de una compleja red de interacciones sinérgicas y antagónicas (Thomma *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2002). Sin embargo, a pesar de que los procesos de señalización relativos al estrés biótico y aquellos en los que actúa el ABA tienen varios elementos en común, no es del todo claro el rol de esta fitohormona en la resistencia a enfermedades (Mauch- Mani & Mauch, 2005).

Existe evidencia acerca de la interacción entre el ABA y el ET, de modo que altas concentraciones de ABA inhiben la producción de ET (Le Noble *et al.*, 2004). A su vez, las vías metabólicas del ET y del ABA interactúan de manera antagónica en el desarrollo (Beaudoin *et al.*, 2000; Ghassemian *et al.*, 2000) y en el crecimiento vegetativo de las plantas (Anderson *et al.*, 2004). Estudios con mutantes insensibles al ET o con una intensificada respuesta al ABA

conllevar a la identificación de un mismo gen denominado EIN2 (Ethylene Insensitive2) o ERA3 (Enhanced response to ABA3), que identifican a la misma proteína como punto de convergencia entre las rutas metabólicas de ambas hormonas (Ghassemian *et al.*, 2000).

En la interacción entre las rutas metabólicas relativas al ABA y al AJ se han reportado tanto efectos sinérgicos como antagónicos. En este sentido, en *Arabidopsis* altas concentraciones de ABA redujeron marcadamente los niveles de transcripción de los genes de defensa relativos al AJ y al ET, mientras que los mutantes de dicha especie deficientes en ABA mostraron un incremento de los transcriptos en cuestión (Anderson *et al.*, 2004). Sin embargo, mediante la aplicación de metil- jasmónico o ET no se pudo superar el efecto inhibitorio del ABA. Esto consolida la idea de que una molécula como es el ABA, más reconocida por su participación en eventos de estrés abiótico, tiene el potencial de anular la señalización propia del estrés biótico en circunstancias en las que ambas situaciones ocurran simultáneamente (Mauch- Mani & Mauch, 2005).

Varios autores indican que existe un efecto antagónico en la expresión génica entre el AS y el MeJA, forma volátil del AJ (Koornneef *et al.*, 2008; Koornneef and Pieterse, 2008; Van der Does *et al.*, 2013). Se conoce el antagonismo entre los sistemas de defensas dependientes del AS y del AJ/ET, a nivel de la síntesis y de la traducción de señales (Dong, 1998; Pieterse *et al.*, 2001). Por el contrario, al menos 35 genes fueron regulados en forma coordinada por el AS y el MeJA a nivel de su expresión génica diferencial (Lee & Choi, 2013), lo cual corroboraría la idea de interacción sinérgica entre ambas hormonas, variando inclusive según la concentración relativa de ambos tratamientos (Mur *et al.*, 2006).

El ácido jasmónico

Bajo la denominación de jasmonatos se conoce a un grupo de moléculas hormonales derivadas de lípidos que incluye al **ácido jasmónico (AJ)**, al metil jasmonato (MeAJ), así como también conjugados del ácido jasmónico con diversos aminoácidos, como leucina e isoleucina. Todos estos compuestos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y participan en procesos

cruciales que involucran las respuestas defensivas directas e indirectas, el metabolismo secundario, procesos reproductivos, senescencia, desarrollo de los frutos e interacciones tritróficas (Seo *et al.*, 2001; Arimura *et al.*, 2005; Liechti & Farmer, 2006; Wasternack, 2007). Su función consiste en regular varios aspectos de la biología de las plantas, desde el desarrollo hasta las respuestas ante los estreses bióticos y abióticos, en particular en la defensa de las plantas ante herbívoros y patógenos necrotróficos (Devoto & Turner, 2003; Browse, 2009).

La acción hormonal propia del AJ está integrada con procesos de señalización, los cuales incluyen la interacción con otras hormonas, cascadas de proteínas activadas por mitógeno (MAP), otras proteínas kinasas, enzimas fosfatasas y sistemas de calcio/ calmodulinas (Browse, 2009).

Estudios recientes han avanzado en la comprensión de las funciones del regulador transcripcional MYC2, compuesto cuyo rol central en las rutas de señalización propias del AJ consiste en la integración de varias señales endógenas y exógenas relativas al crecimiento y desarrollo de las plantas (Kazan & Manners, 2013).

En relación a los aspectos del desarrollo en los que están involucrados los jasmonatos, estos generalmente promueven los procesos defensivos y reproductivos, mientras que inhiben el crecimiento y fotosíntesis de los tejidos vegetales, proceso denominado por Howe y Jander (2008) como 'el dilema de las plantas: crecer o defenderse' y comúnmente observado ante cambios abruptos en el medio o ante ambientes hostiles.

Es ampliamente conocido el rol central desempeñado por el AJ y los jasmonatos en la promoción de la resistencia a insectos (Howe & Jander, 2008). Así, la síntesis de jasmonatos inducida mediante un insecto herbívoro promueve la reprogramación global de la expresión de los genes de defensa. Numerosos estudios con mutantes demostraron que los jasmonatos están comprometidos en la resistencia a un amplio rango de artrópodos herbívoros, de los órdenes lepidópteros, coleópteros, tisanópteros, homópteros, ácaros, dípteros y heterópteros (Howe & Jander, 2008; Browse, 2009). En mutantes de *Arabidopsis*, se demostró ampliamente que el AJ contribuye a incrementar la resistencia basal de la planta contra diferentes microorganismos patógenos (Pieterse *et al.*, 2001; Thomma *et al.*, 1998; Norman-Setterblad *et al.*, 2000).

Por otro lado, mediante estudios basados en microarreglos, se conoce que los jasmonatos cumplen roles en la regulación global de la expresión génica en respuesta al daño mecánico y a la herbivoría (Howe & Jander, 2008).

Cientos de genes regulados o corregulados por el AJ han sido identificados (Browse, 2009). El análisis de los mecanismos moleculares elicitados como consecuencia de la alimentación por parte de dos insectos herbívoros, uno generalista y otro especialista, estableció que ambos mostraron respuestas similares sobre *Arabidopsis* e indujeron la expresión de los mismos genes de forma significativa, todos ellos de importancia en la vía del AJ (Reymond *et al.*, 2004).

En plantas de *Centaurea maculosa*, aplicaciones exógenas de MeAJ fueron capaces de simular la acción de un insecto herbívoro (Broz *et al.*, 2010), por lo que se concluye que los mecanismos defensivos desencadenados fueron similares a la propia acción del insecto. Además de actuar el MeAJ como un compuesto volátil capaz de alertar a las plantas vecinas sobre la presencia de herbívoros, resulta incrementada la producción de otros compuestos de defensa relacionados (Baldwin *et al.*, 2002; Karban *et al.*, 2006). Por otro lado, la aplicación de AJ intensificó la resistencia de plantas de *Brassica rapa* a trips, la cual se evidenció por su restricción en la oviposición y la menor densidad poblacional de su descendencia (Abe *et al.*, 2009).

En su rol de elicitor, se probó que el pretratamiento con AJ seguido de la infestación con insectos indujeron mayores niveles de defensa en las plantas de maní, de modo tal que las plantas en cuestión fueron menos dañadas, así como las larvas disminuyeron su peso y supervivencia (War *et al.*, 2011).

El ácido abscísico

Se conoce que el **ácido abscísico (ABA)** desempeña importantes roles en varios aspectos relativos al desarrollo de una planta, en la regulación de la apertura estomática y en la iniciación de las respuestas adaptativas a varias condiciones ambientales, como sequía, bajas temperaturas y salinidad. Sin embargo, a pesar de que los procesos de señalización relativos al estrés

biótico y aquellos en los que actúa el ABA tienen varios elementos en común, no es del todo claro el rol de esta fitohormona en la resistencia a enfermedades (Mauch- Mani & Mauch, 2005).

Existe evidencia acerca de que el ABA interactúa con el ET. Así, se sabe que altas concentraciones de ABA inhiben la producción de ET (Le Noble *et al.*, 2004). A su vez, las vías metabólicas del ET y del ABA interactúan de manera antagónica en el desarrollo (Beaudoin *et al.*, 2000; Ghassemian *et al.*, 2000) y en el crecimiento vegetativo de las plantas (Anderson *et al.*, 2004). Estudios con mutantes insensibles al ET o con una intensificada respuesta al ABA permitieron la identificación de dos genes denominados EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE2) y ERA3 (ENHANCED RESPONSE TO ABA3), los cuales identifican a la misma proteína como punto de convergencia entre las rutas metabólicas de ambas hormonas (Ghassemian *et al.*, 2000).

Contenido de clorofila y tolerancia al estrés

Las plantas manifiestan respuestas generalistas o específicas ante una amplia variedad de patógenos y herbívoros, las cuales son evidenciadas a nivel biológico, molecular y bioquímico (Walling, 2000; Pandey *et al.*, 2008; Bari & Jones, 2009; Schmelz *et al.*, 2009). Debido a que la fotosíntesis es un proceso esencial para el crecimiento y desarrollo de un cultivo, la cuantificación en las hojas del contenido de clorofila – principal pigmento cloroplástico - tiene una relación positiva con la tasa fotosintética del cultivo (Guo & Li, 1996). En este sentido, la mayor productividad de los cultivos está ligada, entre otras cosas, a la capacidad de las plantas de sostener su contenido de clorofila en el tiempo aún cuando las condiciones ambientales disten de ser óptimas, como por ejemplo en condiciones de estrés.

La determinación del índice de verdor, y por ende del contenido de clorofila, es un indicador de la tasa fotosintética y de la producción de biomasa, así como de la concentración de nitrógeno en hoja. En arroz, cereal filogenéticamente muy próximo al trigo, se vieron afectadas las concentraciones de nitrógeno y clorofila en condiciones de estrés abiótico (Haefele *et al.*, 2010). En trigo, el contenido de clorofila evidenció una correlación positiva con la tasa fotosintética y tuvo un significativo impacto

sobre el crecimiento y la productividad del cultivo (Thomas *et al.*, 2005; Ahmed *et al.*, 2012).

Por todo lo expuesto, los materiales que muestren un comportamiento diferencial ante situaciones de estrés podrían ser portadoras de alelos que contribuyan a otorgar tolerancia a múltiples factores de estrés. Por ello, el **objetivo** del presente capítulo fue caracterizar un grupo de plantas F_3 de acuerdo a su crecimiento compensatorio inducido por tratamientos exógenos con las hormonas AJ y ABA, obtenidas a partir de la autofecundación de plantas F_2 selectas por su crecimiento diferencial ante aplicaciones de ET.

Materiales y métodos

Material vegetal. Se pre-germinaron semillas F_3 resultantes de la autofecundación de las plantas F_2 que se habían manifestado como tolerantes o susceptibles ante aplicaciones exógenas de ET, tal como fuera descrito en el capítulo 3 de la presente tesis. Para ello se utilizaron cajas de Petri que contenían discos de papel absorbente previamente humedecido. Fueron conservadas en completa oscuridad hasta su germinación.

Una vez germinadas, las plántulas se trasplantaron al suelo previamente laboreado, individualizando cada una de ellas con una estaca de madera. Se realizó una siembra temprana, a principios del mes de abril para permitir que el macollaje sea profuso. Durante todo el ciclo del cultivo las plantas se regaron y se desmalezó manualmente.

Separación de macollos de las plantas F_3 . La separación manual de los macollos de las plantas F_3 a partir del tallo principal se realizó cuando estos tenían entre 3 y 4 hojas, momento en el que los macollos de trigo logran una capacidad de abastecimiento independiente. En todo momento la manipulación fue realizada con la precaución de no dañar excesivamente al tejido vegetal y comprobando que cada macollo portara una raíz adventicia proveniente del tallo principal. Los macollos así extraídos fueron plantados de a pares, en bandejas de plástico de 70 x 50 x 8 cm, sobre un sustrato de tierra fértil. Cada

par de macollos de idéntica constitución genética fue individualizado con estacas de madera (Figura 1).



Figura 1. Bandejas conteniendo los macollos F_3 tratados

Tratamientos hormonales. Una vez establecido un par de macollos en cada una de las tres bandejas (una por cada tratamiento y una tercera para los testigos) se esperó a que transcurrieran entre 10 y 14 días desde su extracción a fin de otorgarle a las plantas un tiempo de recuperación. Los tratamientos hormonales se realizaron mediante aspersiones con ácido abscísico (ABA) 10 μ M y ácido jasmónico (AJ) 100 mM, en bandejas separadas. Una tercera bandeja conteniendo un tercer par de macollos del mismo genotipo fue reservada como testigo y sólo recibió agua junto con el tensioactivo Tween20® (Polietilenglicol sorbitano monolaurato). En total se trataron 150 familias F_3 .

El número de macollos obtenido por planta F_2 sólo permitió contar con dos sub-muestras por cada tratamiento y genotipo, ubicados en las tres bandejas independientes.

De igual manera se analizaron las líneas progenitoras que dieron origen a la población evaluada en este trabajo, de manera tal que en cada bandeja se repitieron los padres (líneas M y P).

Determinación del índice de verdor y, por su directa relación, del contenido de clorofila. Esta determinación se realizó en la primera hoja expandida de cada macollo, previamente a la aplicación del tratamiento hormonal. Se utilizó para

ello un medidor automático SPAD-502 (Minolta). Durante el mismo día, se realizó el tratamiento hormonal. Transcurridas 72 h, se determinó nuevamente el contenido de clorofila en cada genotipo. Tanto antes como después del tratamiento, se realizaron tres determinaciones en cada hoja a fin de contar con una medición en la base, una en la parte media y otra en el extremo de la hoja. Finalmente, los tres valores se promediaron.

Determinación del peso seco. Para cada genotipo se determinó su peso seco (PS). Finalizado el período de 72 h bajo tratamiento, se cortó la planta al nivel de la base y se colocó dentro de un sobre de papel a fin de someterla al secado en estufa (60°C). Se comparó cada genotipo con sus respectivos testigos, en relación a los macollos que sólo recibieron agua y tensioactivo como tratamiento.

Determinación de la altura del rebrote post-corte. Luego de 7 días desde el momento de corte de los macollos para la determinación de su peso seco, se midió la altura del rebrote de cada genotipo. Con la ayuda de una regla, se determinó el crecimiento de cada planta post-corte. Se referenció cada genotipo a sus respectivos testigos, por comparación entre los macollos tratados y los que sólo recibieron agua y tensioactivo como tratamiento.

Análisis estadístico. Los datos se analizaron mediante análisis de la varianza, empleando el Modelo General Linear (GLM) y en los casos en que se encontraron diferencias significativas se realizaron las pruebas de medias múltiples empleando el test LSD de diferencias mínimas significativas. Para la totalidad de los análisis se empleó el programa Statistica (StatSoft Inc, 2005). En la totalidad de los datos presentados se cumplieron los supuestos de aleatoriedad, normalidad y homocedasticidad requeridos por el modelo.

Correlación entre los tratamientos y las determinaciones realizadas. Para conocer si existió correlación entre el contenido de clorofila, el PS y el rebrote post-corte en las plantas tratadas con hormonas y los testigos, se calculó el coeficiente de correlación (r) en la descendencia F_3 respecto de la tasa de crecimiento del coleoptilo de sus progenitores F_2 . El coeficiente r se calculó en

base a los valores de covarianza para cada tratamiento hormonal en F_3 , respecto de los valores de varianza de la F_2 tratada con ET y para cada una de las tres determinaciones realizadas. Se analizó por separado cada familia, considerando como tal a la totalidad de las plantas F_3 descendientes de una única F_2 .

Resultados

1- Contenido de clorofila

El análisis de la varianza mostró que existen diferencias altamente significativas en el **contenido de clorofila** entre los genotipos F_3 estudiados para los distintos tratamientos hormonales, y en la interacción entre genotipos y tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de la varianza del contenido de clorofila en las plantas F_3

Fuente de variación	Contenido de clorofila		
	CM	F	p
Genotipos	179,74	10753 **	0,0001
Tratamientos	11,41	682 **	0,0001
Genotipos * Tratamientos	50,34	3011 **	0,0001
Error	0,0167		

CM: cuadrado medio; **: diferencias altamente significativas ($p < 0,001$)

Para el total de los genotipos evaluados, el análisis de las diferencias mínimas significativas entre tratamientos mediante el test de Fisher, permitió observar que en el caso del contenido de clorofila, los tratamientos pudieron separarse en dos grupos (Tabla 2). El tratamiento con AJ provocó una disminución del contenido de clorofila en las plantas F_3 analizadas. Por el contrario, las aplicaciones con ABA no mostraron diferencias en el contenido de clorofila respecto de los testigos.

Tabla 2. Test de diferencias mínimas significativas (LSD) para el contenido de clorofila

Tratamiento	Media Spad	
AJ	28,44	a
ABA	28,84	b
T	28,93	b

Distinta letra indica diferencias altamente significativas ($p < 0,001$)

La misma letra indica diferencias no significativas ($p > 0,05$)

2- **Peso seco**

El ANOVA para el **peso seco** evidenció que existen diferencias altamente significativas entre los genotipos F_3 analizados, como así también en la interacción entre los distintos genotipos y tratamientos. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos hormonales (ABA, AJ) respecto de sus testigos (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de la varianza del peso seco en las plantas F_3

Fuente de variación	Peso seco		
	CM	F	p
Genotipos	0,55	8,12 **	0,0001
Tratamientos	0,03	0,43 ^{ns}	0,6500
Genotipos * Tratamientos	0,12	1,78 **	0,0001
Error	0,07		

CM: cuadrado medio; ns: diferencias no significativas;

** : diferencias altamente significativas ($p < 0,001$)

Habiendo resultado no significativas las diferencias entre los pesos secos para los tratamientos estudiados, no pueden separarse estadísticamente los efectos de los mismos. La significativa interacción entre los genotipos F_3 y los tratamientos (AJ, ABA y T) permite identificar genotipos para los cuales los pesos secos aumentaron por efecto de uno u otro tratamiento hormonal (AJ o ABA) respecto de su testigo (líneas ascendentes, Figura 2) y otros genotipos en los cuales se observa el efecto inverso, o sea, la disminución del peso seco

debido a los tratamientos con AJ y ABA respecto de los testigos (líneas descendentes, Figura 2).

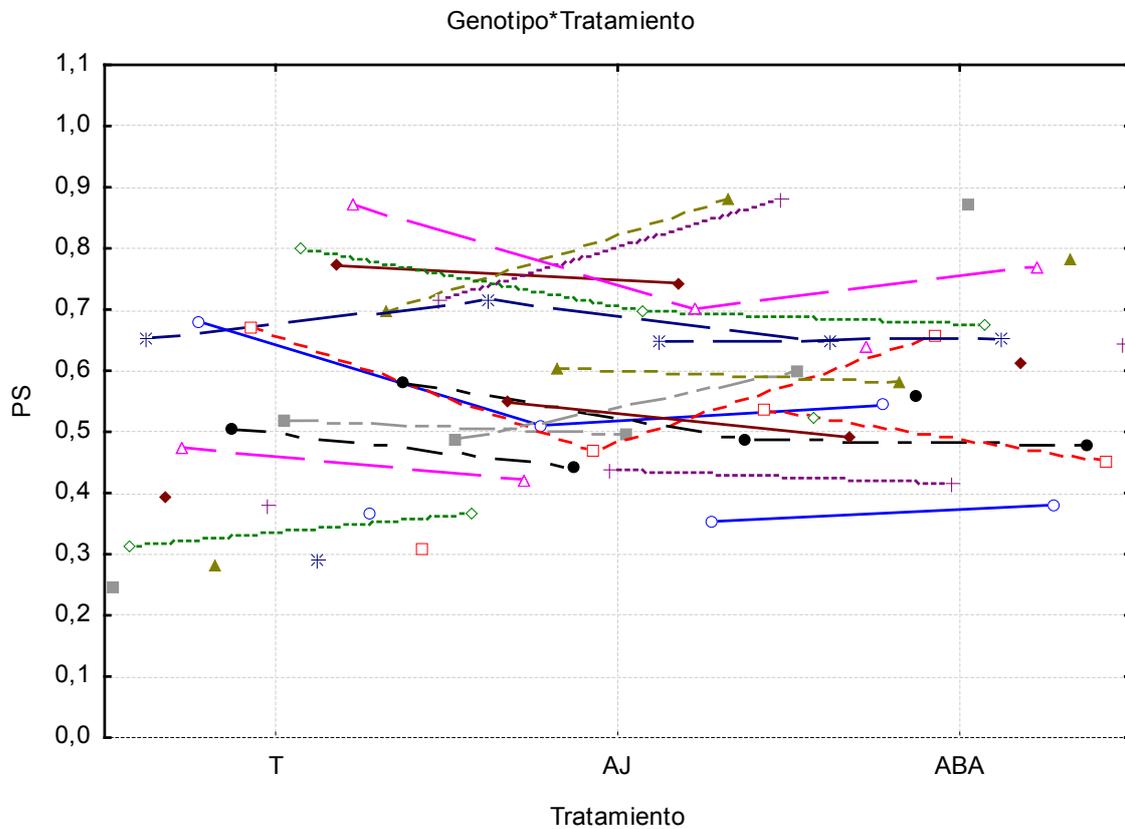


Figura 2. Interacción entre los genotipos F₃ y los tratamientos (T, AJ y ABA)
Cada color indica un genotipo F₃ diferente.

3- Rebote post-corte

El ANOVA de las determinaciones del **rebote post-corte** mostró que se hallaron diferencias altamente significativas entre los genotipos, los tratamientos hormonales y en la interacción entre ambos (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de la varianza del rebote post-corte en las plantas F₃

Fuente de variación	Rebote		
	CM	F	P
Genotipos	2,39	145,33 **	0,0001
Tratamientos	2,31	145,48 **	0,0001
Genotipos * Tratamientos	2,33	141,19 **	0,0001
Error	0,02		

CM: cuadrado medio; **: diferencias altamente significativas ($p < 0,001$)

En el caso del rebrote post-corte, el Test de Fisher permitió diferenciar a las plantas en dos grupos, separando a la acción del tratamientos con AJ, por un lado, de las asperjadas con ABA y las plantas testigo, por el otro (Tabla 5). Por lo tanto, el AJ determinó un rebrote menor respecto del obtenido luego del corte de plantas que habían sido tratadas con ABA y de aquellas reservadas como testigos.

Tabla 5. Test de diferencias mínimas significativas (LSD) para el rebrote post-corte

Tratamiento	Media Rebrote	
AJ	4,28	a
T	5,29	b
ABA	5,52	b

En la tercera columna, distinta letra indica diferencias altamente significativas ($p < 0,001$)

La misma letra indica diferencias no significativas ($p > 0,05$)

4- Correlaciones entre las determinaciones efectuadas

Por otro lado, se estudiaron las correlaciones entre la tasa de crecimiento del coleoptilo de las plantas F_2 tratadas con ET con el contenido de clorofila y el peso seco. De igual modo se evaluó el rebrote en las plantas F_3 y las tasas de crecimiento del coleoptilo de las madres F_2 . El análisis se hizo dentro de familias de plantas descendientes de F_2 tolerantes y susceptibles, en forma separada para uno u otro grupo.

Entre las plantas descendientes de madres tolerantes, se encontró una correlación muy significativa, aunque de valor medio, entre el contenido de clorofila y el peso seco (Tabla 6). Se observó que el contenido de clorofila está significativamente correlacionado con el peso seco. Así, en las plantas tolerantes que mostraron pesos secos superiores también se evidenciaron mayores valores de su contenido de clorofila. El resto de las correlaciones no fueron significativas o resultaron de baja magnitud (Tabla 6).

Tabla 6. Correlaciones entre el contenido de clorofila, peso seco y rebrote de plantas F₃ tratadas y el crecimiento de sus progenitoras F₂ tolerantes

	F ₃ Trat	Clorofila	PS	Rebrote
F ₂ ET	0,0513	0,0879	0,0029	-0,0954
F ₃ Trat		0,0878	0,0340	-0,0079
Clorofila			0,4759 **	0,0017
PS				-0,0092

F₂ ET: F₂ tratadas con ET; F₃ Trat: F₃ tratadas (AJ, ABA y T); PS: peso seco
 **: correlación altamente significativa

En el caso de las plantas F₂ hijas de progenitoras susceptibles, se observó un coeficiente de correlación muy significativo aunque de valor medio, entre el contenido de clorofila y el peso seco, similar al observado en plantas descendientes de F₂ tolerantes (Tabla 7). Además, se encontró una correlación negativa muy significativa entre el contenido de clorofila y la tasa de crecimiento del coleoptilo de las plantas F₂ progenitoras de valor medio también (Tabla 7).

Los valores de los coeficientes de correlación entre el contenido de clorofila, peso seco y rebrote en las plantas F₃ tratadas con hormonas y sus testigos, fueron cercanos a cero, tanto en los descendientes de plantas tolerantes como susceptibles. Esto indica la independencia que existe entre el rebrote, el PS y el contenido de clorofila (Tablas 6 y 7).

Tabla 7. Correlaciones entre los contenidos de clorofila, peso seco y rebrote de plantas F₃ tratadas y el crecimiento de sus progenitoras F₂ susceptibles

	F ₃ Trat	Clorofila	PS	Rebrote
F ₂ ET	-0,1148	-0,4318 **	-0,2297	0,1446
F ₃ Trat		0,0603	0,1476	-0,1617
Clorofila			0,4130 **	-0,1409
PS				0,0523

F₂ ET: F₂ tratadas con ET; F₃ Trat: F₃ tratadas (AJ, ABA y T); PS: peso seco
 **: correlación altamente significativa

Se analizó la correlación entre el contenido de clorofila, peso seco y rebrote post-corte por familia F₃ y la tasa de crecimiento a nivel del coleoptilo de su respectiva progenitora F₂ (Tablas 8, 9 y 10). Las familias F₃ se separaron

según hubieran sido tolerantes o susceptibles al ET sus respectivos progenitores F_2 . Se consideró el valor medio de cada familia F_3 , comparando en todos los casos con la tasa de crecimiento del coleoptilo de sus respectivas progenitoras F_2 .

Tabla 8. Correlación entre el contenido de clorofila en plantas F_3 tratadas y testigos con la tasa de crecimiento de las progenitoras F_2 , caracterizadas como tolerantes o susceptibles al ET

Clorofila	F_2 ET- TOLERANTES	F_2 ET- SUSCEPTIBLES
F_3 T	0,262	-0,295
F_3 AJ	0,295	-0,280
F_3 ABA	0,263	-0,335

F_3 T: testigo; F_3 AJ: tratadas con AJ; F_3 ABA: tratadas con ABA

Tabla 9. Correlación entre el PS en plantas F_3 tratadas y testigos con la tasa de crecimiento de las progenitoras F_2 , caracterizadas como tolerantes o susceptibles al ET

PS	F_2 ET- TOLERANTES	F_2 ET- SUSCEPTIBLES
F_3 T	0,279	0,055
F_3 AJ	0,246	-0,285
F_3 ABA	0,254	-0,053

F_3 T: testigo; F_3 AJ: tratadas con AJ; F_3 ABA: tratadas con ABA

Tabla 10. Correlación entre el rebrote post-corte en plantas F_3 tratadas y testigos con la tasa de crecimiento de las progenitoras F_2 , caracterizadas como tolerantes o susceptibles al ET

Rebrote	F_2 ET- TOLERANTES	F_2 ET- SUSCEPTIBLES
F_3 T	-0,353	0,215
F_3 AJ	0,455	-0,188
F_3 ABA	0,399	-0,428

F_3 T: testigo; F_3 AJ: tratadas con AJ; F_3 ABA: tratadas con ABA

En negrita se señalan los valores destacados.

Tanto para el contenido de clorofila como para el peso seco, se observaron valores medios a bajos de coeficiente de correlación. Sin embargo, en el caso del rebrote post-corte de las plantas F_3 y la tasa de crecimiento del coleoptilo de sus progenitoras F_2 tolerantes, se observaron valores levemente más elevados. Se aprecia en este caso que los tratamientos hormonales invirtieron el signo de la correlación respecto de los testigos.

Por otro lado, se estudió cada parámetro de crecimiento luego del tratamiento con AJ y ABA respecto de los testigos, en las plantas F_3 agrupadas en familias por descender de un mismo progenitor F_2 . Así, se observó un grupo de familias descendientes de un progenitor tolerante y otro que provino de uno susceptible bajo tratamiento con ET. Las familias F_3 descendientes de plantas F_2 tolerantes se encuentran representadas en una nube de puntos ubicados en la zona superior. Por el contrario, las familias que surgieron de plantas F_2 susceptibles, se hallan en la parte inferior de las gráficas (Figuras 3, 4 y 5).

Además, en comparación con las líneas progenitoras (madre y padre) que dieron origen a la población involucrada en este estudio y al haber seleccionado plantas de mejor y peor comportamiento que el promedio de las plantas F_2 , se observa que los progenitores se ubican en la parte media del gráfico. En el caso de los testigos, la línea madre supera al padre en cuanto a su contenido de clorofila (Figura 3A). Con la aplicación de AJ cambia la situación, asemejándose ambos progenitores en cuanto a su contenido de clorofila y en su comportamiento con ET (Figura 3B). Ante aplicaciones con ABA se invierte el contenido de clorofila de ambos progenitores y resulta la línea paterna de mayor contenido respecto de la materna (Figura 3C).

Figura 3A. Testigos

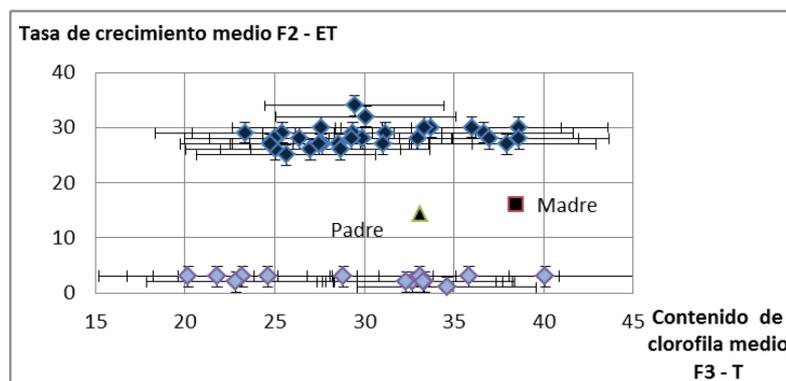


Figura 3B. AJ

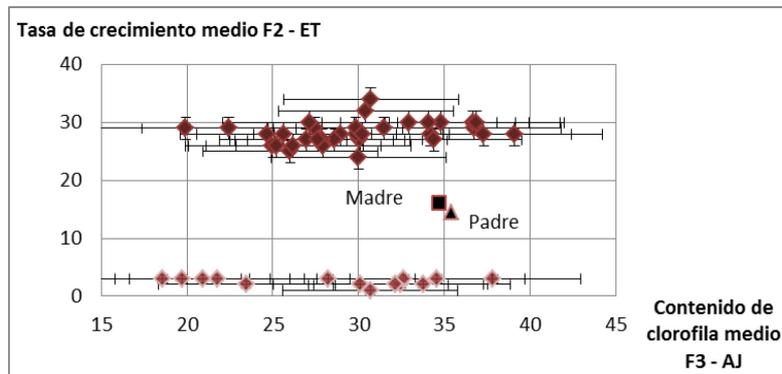


Figura 3C. ABA

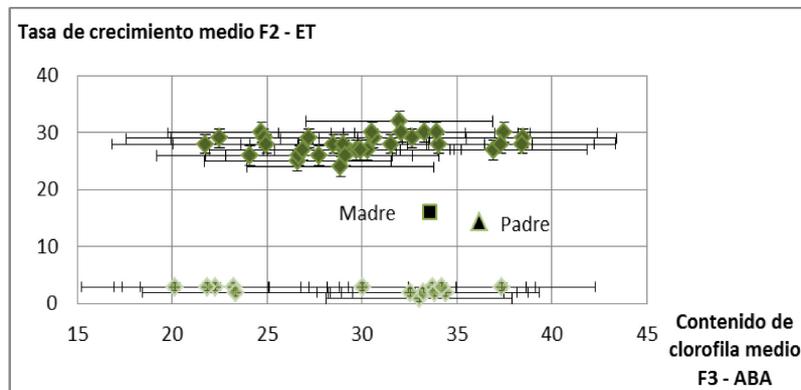


Figura 3. Diagrama de dispersión del contenido de clorofila de plantas F_3 testigos, tratadas con AJ y con ABA, respecto de las plantas F_2 progenitoras

Rombos oscuros: plantas tolerantes. Rombos claros: plantas susceptibles

Para las determinaciones de peso seco, las líneas progenitoras se ubicaron también en la parte media de la nube de puntos. Ambos adoptaron valores similares en cuanto a su peso seco como testigos sin tratamiento y a su comportamiento ante ET (Figura 4A). Como consecuencia de las aplicaciones de AJ y ABA, ambos padres mostraron diferencias entre sí y mantuvieron similar comportamiento ante ambos tratamientos hormonales, por cuanto el padre superó en peso seco a la madre (Figuras 4B y 4C).

Figura 4A. Testigos

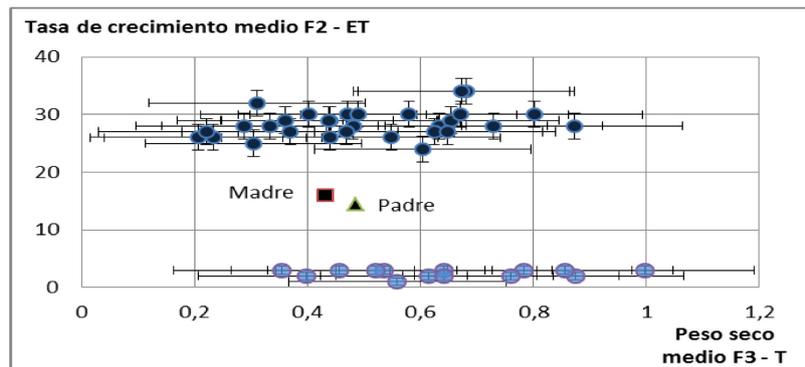


Figura 4B. AJ

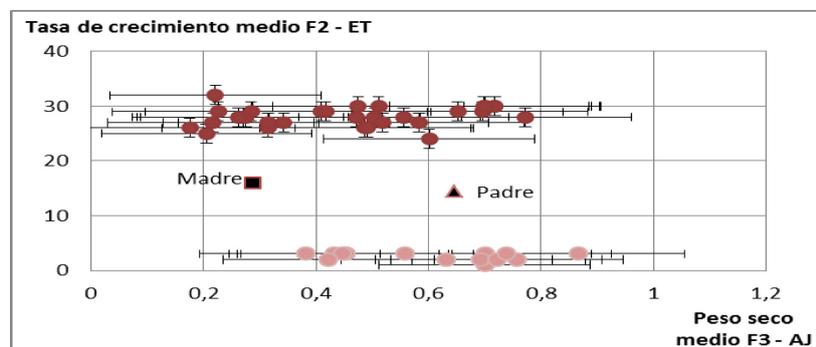


Figura 4C. ABA

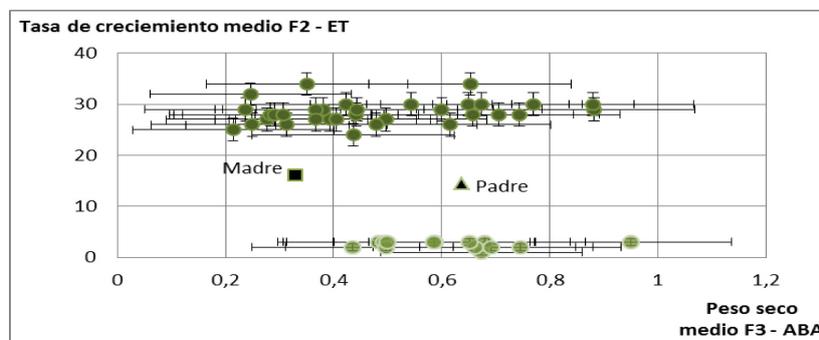


Figura 4. Diagrama de dispersión del peso seco de plantas F₃ testigos, tratadas con AJ y con ABA, respecto de las plantas F₂ progenitoras
Círculos oscuros: plantas tolerantes. Círculos claros: plantas susceptibles

En cuanto al rebrote post-corte, las plantas tratadas con AJ mostraron una menor dispersión (Figura 5B) respecto del comportamiento de las testigo (Figura 5A), tanto en familias tolerantes como susceptibles. Las líneas progenitoras, además de ubicarse en la parte central de los gráficos de dispersión, mostraron valores de rebrote similares entre sí en el caso de los

testigos y ante la acción de ET. Ambas líneas progenitoras se encuentran muy próximas en cuanto a la longitud de su rebrote post-corte sin tratamientos hormonales y a su comportamiento con ET (Figura 5A). Al ser tratadas con AJ, la línea madre presentó valores mayores y la línea padre valores inferiores a sus testigos (Figura 5B). Por el contrario, en el caso del tratamiento con ABA se invierte el comportamiento de ambos progenitores, al desplazar hacia valores mayores de crecimiento post-corte a la línea paterna respecto de la materna (Figura 5C).

Figura 5A. Testigos

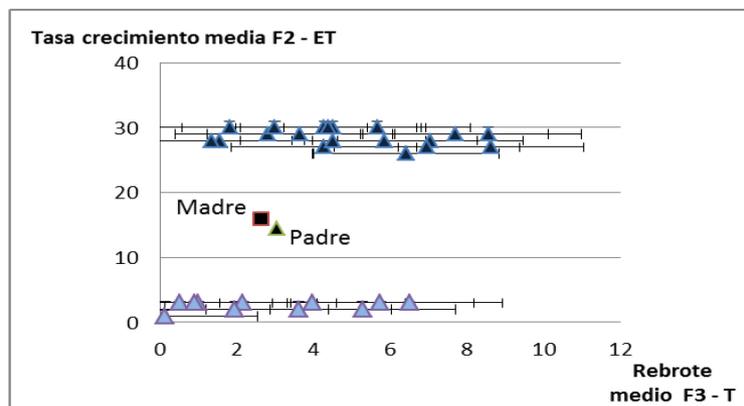


Figura 5B. AJ

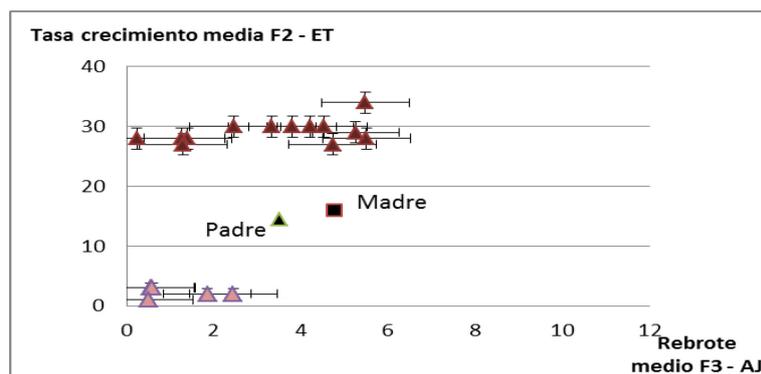


Figura 5C. ABA

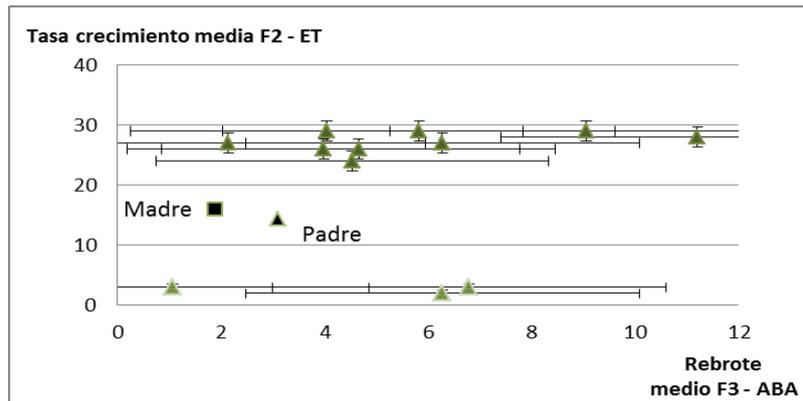


Figura 5. Diagrama de dispersión del rebrote post-corte de plantas F₃ testigos, tratadas con AJ y con ABA, respecto de las plantas F₂ progenitoras
 Triángulos oscuros: plantas tolerantes. Triángulos claros: plantas susceptibles

Por otro lado, se estudió el contenido de clorofila luego de las aplicaciones hormonales y en los testigos, para cada familia F₃ en particular (Figura 6). Se observó una mayor fluctuación de los valores debido al tratamiento con ABA respecto de los testigos. El contenido de este pigmento fue similar en el caso de las plantas tratadas con AJ y en los testigos, con excepción de la familia F₃ número 35, en la que se observó un menor contenido de clorofila por efecto del tratamiento con AJ. Un patrón similar ocurrió en otras tres familias (números 32, 33 y 41, representadas con óvalos en la Figura 6). Es importante destacar que no hay diferencias significativas entre las tres tratamientos aplicados en cada familia, aunque si las hay entre familias F₃.

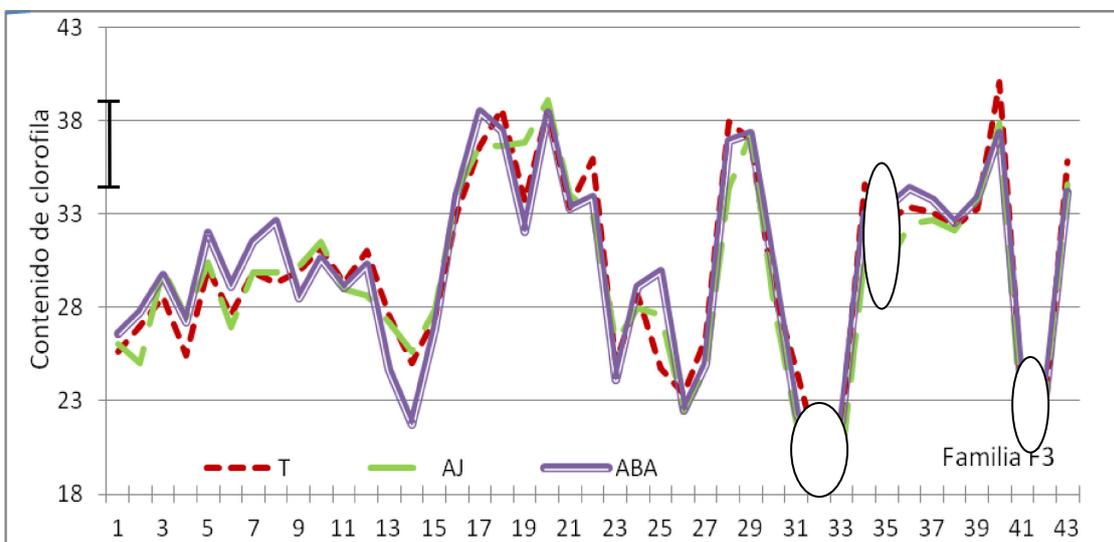


Figura 6. Representación del contenido de clorofila (unidades Spad) por familia de plantas F_3

El óvalo indica familias F_3 con divergencia del contenido de clorofila según el tratamiento recibido.

Si bien en el análisis del peso seco de la totalidad de genotipos F_3 no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos hormonales respecto de sus testigos, al considerar individualmente a cada familia, se observó que varias de estas superaron o disminuyeron su peso seco respecto de los controles, tanto debido al tratamiento con ABA como con AJ (Figura 7).

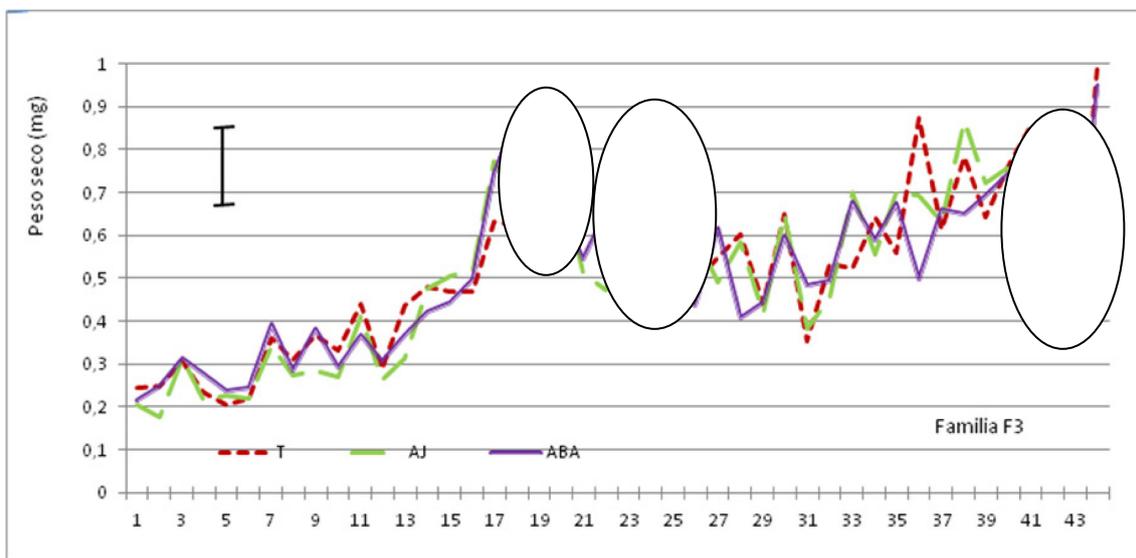


Figura 7. Representación del peso seco por familia de plantas F_3

El óvalo indica familias F_3 con divergencia del peso seco según el tratamiento recibido.

En el caso del rebrote post-corte se encontró que los tratamientos hormonales con AJ y ABA causaron la disminución del rebrote en comparación con sus testigos, para la mayoría de las familias F_3 que habían sido tratadas (Figura 8). A pesar de haber hecho este análisis en un menor número de familias F_3 , resultan muy marcadas las diferencias encontradas entre plantas testigo y tratadas.

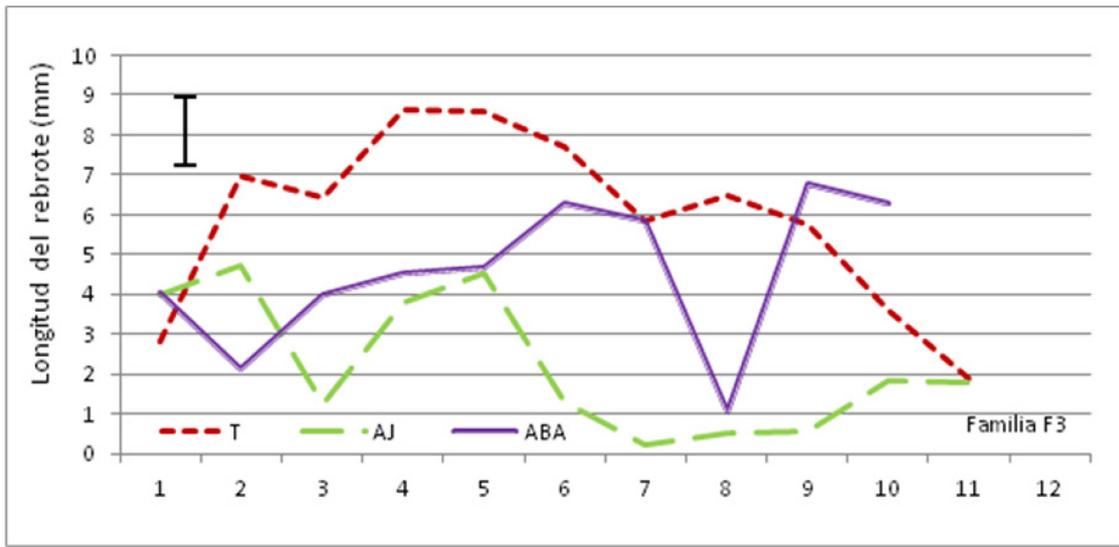


Figura 8. Representación del rebrote post-corte por familia de plantas F₃

Además, se realizaron comparaciones individuales acerca de las respuestas observadas en las plantas F₃ por efecto de los tratamientos hormonales, respecto de sus testigos. Se agrupó en tres categorías la totalidad de las plantas F₃ en cuanto a sus valores de contenido de clorofila, PS y rebrote diario post-corte. Se consideraron plantas tolerantes aquellas que mostraron valores mayores al de las medias de cada tratamiento hormonal, más el valor de un desvío estándar. Las plantas susceptibles fueron aquellas con valores menores a las medias correspondientes a cada tratamiento, menos el valor de un desvío estándar. Las plantas pertenecientes al grupo medio representaron aquellas cuyos valores para cada determinación tuvieron valores comprendidos entre las tolerantes y las susceptibles (Figura 9).

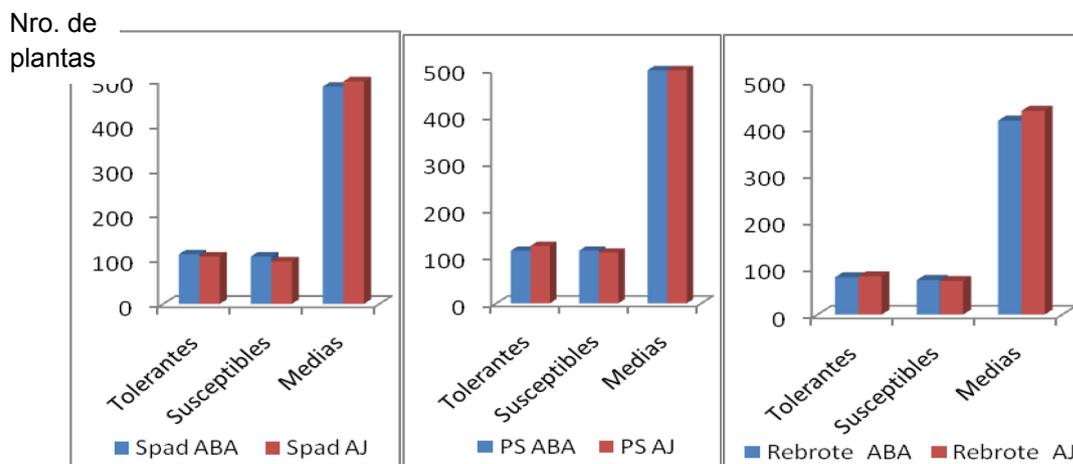


Figura 9. Distribución de las plantas caracterizadas según el comportamiento ante los tratamientos hormonales, en comparación con el testigo

Por último, se individualizó una sola planta F_3 tolerante cuyo comportamiento fue superior para ambos tratamientos hormonales, en las determinaciones del contenido de clorofila, PS y rebrote diario. Es de destacar que, si bien esta planta mostró los mayores valores, tuvo la particularidad de ser descendiente de una planta F_2 susceptible. Por el contrario, otra planta F_3 se caracterizó como susceptible dado que todas las determinaciones evidenciaron valores bajos para ambos tratamientos hormonales, respecto de los testigos. A su vez, este genotipo descendió de una planta F_2 que había sido caracterizada previamente como muy tolerante. En ambos casos, esta mayor variabilidad en F_3 respecto de las plantas progenitoras F_2 sólo puede provenir de la expresión del/de los gen/genes localizados en el fragmento comprendido por los marcadores *Xgwm 334a* y *Xgm 459*, en el gen 6A del trigo.

Finalmente, un tercer grupo de setenta plantas fue agrupado por mostrar valores medios en la totalidad de los parámetros, tanto para el tratamiento con ABA como con AJ.

Observando en forma conjunta a la totalidad de los descendientes de cada planta F_2 , se realizó el análisis de los valores de Spad para ambos tratamientos en referencia a sus testigos y en comparación con los primeros progenitores que dieron origen a la población abarcada en este estudio, las líneas M y P. Se observó que algunas líneas fueron muy superiores en cuanto a su contenido de clorofila respecto del resto, como así también respecto de ambos progenitores.

A modo de ejemplo, se observa en la figura 10 el comportamiento de la totalidad de las F_3 descendientes de un único genotipo F_2 , sometidos a los tratamientos hormonales con ABA y AJ.

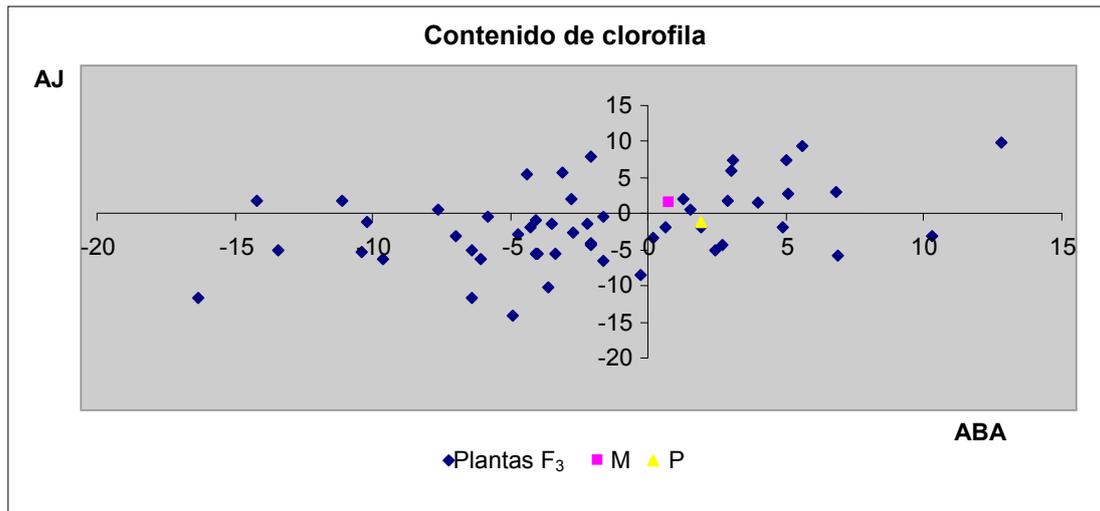


Figura 10. Dispersión del contenido de clorofila en la totalidad de las plantas F_3 descendientes de una única planta F_2 , para ambos tratamientos hormonales respecto del testigo y en comparación con las líneas M y P

En el caso del mismo genotipo F_2 , el PS de la totalidad de los descendientes F_3 para ambos tratamientos hormonales respecto de sus testigos mostraron un comportamiento similar, existiendo líneas que superaron a ambos padres, líneas de comportamiento similar y líneas de menor peso que ambos, tanto con aplicaciones de AJ como de ABA (Figura 11).

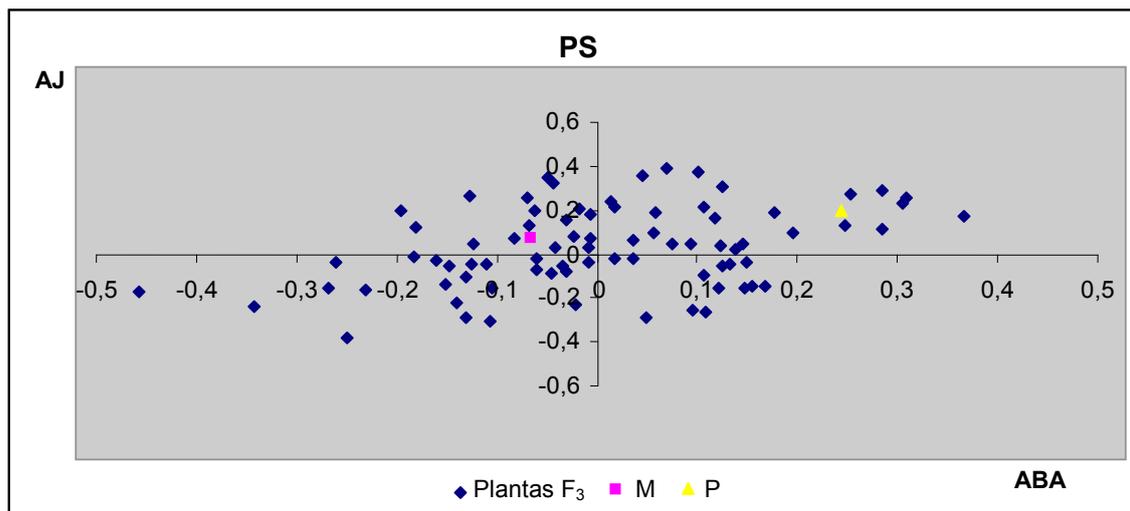


Figura 11. Dispersión del peso seco (PS) en la totalidad de las plantas F_3 descendientes de una planta F_2 , para ambos tratamientos hormonales respecto del testigo y en comparación con las líneas M y P

Discusión

Existe amplia evidencia de que las defensas inducidas ante el ataque de un microorganismo patógeno o de un insecto herbívoro son reguladas por una red interconectada de vías de señalización, donde tienen un rol dominante las moléculas de AS, AJ y ET. Esta red metabólica intrincada redundante en beneficios para la planta, desde el punto de vista del costo metabólico y del ajuste fino de sus defensas (Koornneef & Pieterse, 2008). Más de 30 genes de defensa fueron alineados en las complejas cascadas que integran las vías de señalización relativas al AS, AJ y al ET, así como otros han sido identificados aunque sin la completa determinación de su rol o ubicación en dichas rutas (Zarate *et al.*, 2007). De esta manera, resulta interesante el estudio de los sistemas hormonales ABA y AJ en forma conjunta y en relación con el ET, todos ellos entendidos como participantes que orquestan la mejor respuesta defensiva de la planta (Zarate *et al.*, 2007).

Actualmente, numerosos estudios genómicos y moleculares se proponen dilucidar las complejas redes concernientes a la inducción de las defensas de las plantas. Interacciones entre AS y ET, entre AJ y ABA y entre AJ y ET funcionan como respuestas adaptativas de la planta ante la acción de herbívoros y organismos patógenos, tanto necrótrofos como biótrofos (Koornneef & Pieterse, 2008). Uno de los casos más complejos es la interacción entre las respuestas al AJ y al AS, entendidos como procesos antagonistas o sinergistas por distintos autores (Koornneef & Pieterse, 2008). Además, se encontró que las aplicaciones exógenas con ABA reprimen la transcripción de los genes inducidos por AJ, y los transcriptos de los genes inducidos por el AJ fueron incrementados en los mutantes de la ruta biosintética del ABA (Anderson *et al.*, 2004). De aquí se desprende que el ABA regula los genes de respuesta propios del AJ, y viceversa. A su vez, los factores de transcripción MYC2 y ERF1 (factor de respuesta al ET- Ethylene response factor1) constituyen importantes nodos de señalización en las vías integradas por el AJ, el ABA y el ET (Koornneef & Pieterse, 2008), por lo que quedaría demostrada la interrelación entre estas tres hormonas.

En el presente estudio, se encontraron diferencias altamente significativas en el comportamiento de los distintos genotipos ante la aplicación

de las hormonas ABA y AJ, tanto en las determinaciones del contenido de clorofila como del rebrote post-corte. Las diferencias muy significativas observadas tanto entre genotipos como en la interacción entre genotipos y tratamientos hormonales, permite concluir que existen genotipos de comportamiento diferencial ante la acción de ambas fitohormonas. En particular, y corroborando la idea de Anderson *et al.* (2004), el tratamiento con AJ determinó en las plantas tanto un menor contenido de clorofila como un bajo rebrote post-corte, mientras que el ABA no modificó ninguno de esos parámetros, respecto de los testigos.

Al igual que lo planteado por varios autores (Walling, 2000; Pandey *et al.*, 2008; Bari & Jones, 2009; Schmelz *et al.*, 2009) se pudo corroborar que las plantas expresaron sus diferencias a nivel bioquímico y fisiológico como respuesta ante la acción de algún agente causante de estrés, específicamente las plantas respondieron ante la aplicación exógena de ABA y de AJ (De Vos *et al.*, 2005; Hermsmeier *et al.*, 2001; Baldwin *et al.*, 2002; Karban *et al.*, 2006) al verse modificado el contenido de clorofila y el rebrote post-corte respecto de los mismos genotipos mantenidos como testigos.

La totalidad de las plantas F₃ mostraron una amplia variabilidad en los tres parámetros estudiados, propia de una población segregante en la que existe variabilidad genotípica. Si bien se habían encontrado diferencias significativas en el contenido de clorofila en la totalidad de genotipos F₃ y entre los tratamientos, en un análisis más detallado que muestra cada grupo familiar en forma independiente se encontró que el ABA resulta ser el tratamiento que modifica el contenido de clorofila en mayor proporción, respecto de los valores determinados en los testigos.

A nivel del cultivo agrícola, un elevado contenido de clorofila tiene implicancias directas en su mayor productividad (Guo *et al.*, 2008). La estrecha relación entre la concentración de clorofila y el contenido de nitrógeno en tejidos foliares, aún en condiciones de estrés abiótico (Haefele *et al.*, 2010), demuestra que el metabolismo de este macronutriente se encuentra afectado por las situaciones estresantes generadas por los tratamientos fitohormonales.

En base a la estrecha relación que existe entre la producción de biomasa y el contenido de clorofila, un genotipo que no modifica la concentración de este pigmento ante la aplicación exógena de ABA o AJ,

puede ser considerado tolerante. Así como ante la alimentación por parte de ciertos insectos como los áfidos, una planta que no sufre una excesiva pérdida de clorofila puede considerarse tolerante (Lage *et al.*, 2003), este concepto podría aplicarse a la inducción mediada por el tratamiento hormonal.

En el análisis del comportamiento individual de las plantas F_3 se pudo identificar una planta tolerante, cuyas determinaciones relativas al crecimiento aquí evaluadas fueron superiores en los tratamientos hormonales con ABA y AJ respecto de sus testigos. Es interesante destacar que esta planta descendió de una F_2 caracterizada como susceptible ante la aplicación exógena de ET, otra fitohormona relacionada con el estrés. Existe evidencia sobre la interacción entre el ABA y el ET, más aún, se sabe que altas concentraciones de ABA inhiben la producción de ET (Le Noble *et al.*, 2004). Si bien se trata de plantas F_2 tratadas con ET, cuya descendencia F_3 se sometió a la acción del ABA y del AJ, con la consiguiente manifestación de la variabilidad fenotípica propia de estas generaciones, se destaca el comportamiento antagónico entre el ABA y el ET anteriormente evidenciado por numerosos autores (Beaudoin *et al.*, 2000; Ghassemian *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2004). Se sabe que las respuestas al estrés pueden generar modificaciones, directa o indirectamente, en la regulación epigenética y a nivel de la cromatina. Algunos cambios en la cromatina son estables, originando epialelos heredables en casos extremos (Soppe *et al.*, 2000, Manning *et al.*, 2006). Por lo tanto, es aceptada la idea de que el estrés induce modificaciones persistentes y heredables de la cromatina, las cuales redundan en cambios a nivel de la expresión génica y de las características fenotípicas (Pecinka & Mittelsten Scheid, 2012). Las modificaciones epigenéticas heredables podrían otorgar una memoria del estrés a nivel generacional y transgeneracional (Chinnusamy & Zhu, 2009).

La correlación negativa encontrada entre el crecimiento del coleoptilo en las plantas progenitoras F_2 susceptibles y en el contenido de clorofila en la descendencia (F_3), podría explicarse por la ocurrencia de algún evento de regulación epigenética por medio del cual la planta conservaría en su genoma la memoria del estrés sufrido. Algún paso metabólico estaría modificándose en una planta estresada de modo tal que estos cambios físicos pueden evidenciarse.

Además de que la zona del cromosoma 6A objeto de este estudio cuenta con abundantes transposones, el estrés al que fueron sometidos estos materiales pudo haber promovido su expresión. Esta afirmación se basa en el hecho de que el estrés influye incrementando la expresión de varios retrotransposones en las plantas, cuando fueron sometidas tanto a estreses bióticos como abióticos (Mansour, 2007). Dado que las semillas F_3 fueron obtenidas a partir de plantas F_2 que habían sido tratadas con ET, podría existir alguna regulación epigénica inducida por el tratamiento hormonal en la planta madre (F_2).

Por otro lado, la comparación entre el comportamiento de las plantas F_3 descendientes de una única planta F_2 , muestra que algunas superaron inclusive a las líneas progenitoras de esta población (líneas M y P). La identificación de plantas F_3 que superaron los valores de Spad propios de ambas líneas progenitoras, permite suponer una combinación exitosa de alelos de diferentes genes, caracterizados por ser numerosos y de efecto menor por tratarse de un carácter de herencia cuantitativa como es el contenido de clorofila.

Conclusiones

La inducción de defensas quedó demostrada mediante cambios en el contenido de clorofila y en el rebrote post-corte. Aquellas plantas que evidenciaron valores superadores en estos parámetros serían las que lograron encender sus sistemas de defensa eficientemente, sobreponerse al mayor costo metabólico que implica el mantenimiento de dicho sistema y, en consecuencia, crecer diferencialmente. Finalmente, se comprueba la hipótesis formulada, en tanto puede afirmarse que algún gen/ algunos genes fueron inducidos por la aplicación externa de AJ.

Bibliografía

- Abe, H., T. Shimoda, J. Ohnishi, S. Kugimiya, M. Narusaka, S. Seo, Y. Narusaka, S. Tsuda & M. Kobayashi. 2009. Jasmonate-dependent plant defense restricts thrips performance and preference. *BMC Plant Biology* 9: 97.
- Ahmed, M. M. Asif, Fayyaz-ul-Hassan, Z. Iqbal Ahmed & A. Nawaz Chaudhry. 2012. Resilience of physiological attributes of wheat (*Triticum aestivum* L.) to abiotic stresses. *Scientific Research and Essays* 7: 3099-3106.
- Anderson, J.P., E. Badruzsaufari, P.M. Schenk, J.M. Manners, O.J. Desmond, C. Ehlert, D.J. Maclean, P.R. Ebert & K. Kazan. 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 3460-3479.
- Arimura, G., C. Kost & W. Boland. 2005. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta* 1734: 91-111.
- Baldwin, I.T., A. Kessler & R. Halitschke. 2002. Volatile signaling in plant-plant-herbivore interactions: what is real? *Current Opinion in Plant Biology* 5: 351-354.
- Bari, R. & J. Jones. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69: 473-488.
- Beaudoin, N., C. Serizet, F. Gosti & J. Giraudat. 2000. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12: 1103-1115.
- Bleecker, A.B. & H. Kende. 2000. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16: 1-18.
- Bostock, R.M. 1999. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 99-109.
- Bostock, R.M. 2005. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annual Review Phytopathology* 43: 545-580.
- Browse, J. 2009. Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. *Annual Review Plant Biology* 60: 183-205.
- Broz, A.K., C.D. Broeckling, C. De la Peña, M.R. Lewis, E. Greene, R.M. Callaway, L.W. Sumner & J.M. Vivanco. 2010. Plant neighbor identity influences plant biochemistry and physiology related to defense. *BMC Plant Biology* 10: 115.
- Cheong, Y.H., H.S. Chang, R. Gupta, X. Wang, T. Zhu & S. Luan. 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129: 661-677.
- Chinnusamy, V. & J.K. Zhu. 2009. Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion Plant Biology* 12: 133-139.
- De Vos, M., V.R. Van Oosten, R.M.P. Van Poecke, J.A. Van Pelt, M.J. Pozo, M.J. Mueller, A.J. Buchala, J.P. Métraux, L.C. Van Loon, M. Dicke &

- C.M.J. Pieterse. 2005. Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 923-937.
- Devos, K.M., J. Ma, A.C. Pontaroli, L.H. Pratt & J.L. Bennetzen. 2005. Analysis and mapping of randomly chosen bacterial artificial chromosome clones for hexaploid bread wheat. *Proceedings National Academy Sciences* 102: 19243-19248.
- Devoto, A. & J.G. Turner. 2003. Regulation of Jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Annals of Botany* 92: 329-337.
- Dong, X. 1998. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 316-323.
- Feys, B.J. & J.E. Parker. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics* 16: 449-455.
- Fujita, M., Y. Fujita, Y. Noutoshi, F. Takahashi, Y. Narusaka, K. Yamaguchi-Shinozaki & K. Shinozaki. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion Plant Biology* 9: 436-442.
- Ghassemian, M., E. Nambara, S. Cutler, H. Kawaide, Y. Kamiya & P. McCourt 2000. Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 1117-1126.
- Glazebrook, J. 1999. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 280-286.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review Phytopathology* 43: 205-27.
- Guo, P. & M. Li. 1996. Studies on photosynthetic characteristics in rice hybrid progenies and their parents I. chlorophyll content, chlorophyll- protein complex and chlorophyll fluorescence kinetics. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* 4: 60-65.
- Guo, P., M. Baum, R.K. Varshney, A. Graner, S. Grandó & S. Ceccarelli. 2008. QTLs for chlorophyll and chlorophyll fluorescence parameters in barley under post-flowering drought. *Euphytica* 163: 203-214.
- Haefele, S.M., J.D.L. Siopongco, S.T. Amarante & T.P. Tuong. 2010. Effect of abiotic stresses on the nondestructive estimation of rice leaf nitrogen concentration. *International Journal of Agronomy* Volume 2010, Article ID 863605.
- Hermesmeier, D., U. Schittko & I.T. Baldwin. 2001. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. *Plant Physiology* 125: 683-700.
- Hirochika, H. 1995. Activation of plant retrotransposons by stress. In *Modification of gene expression and non-mendelian inheritance*. Japan: NIAR, 15-21.
- Howe, G.A. & G. Jander. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review Plant Biology* 59: 41-66.

- Karban, R., K. Shiojiri, M. Huntzinger & A.C. McCall. 2006. Damage-induced resistance in sagebrush: Volatiles are key to intra- and interplant communication. *Ecology* 87: 922-930.
- Kazan, K. & J.M. Manners. 2013. MYC2: The Master in Action. *Molecular Plant* 6: 686-703.
- Kessler, A. & I.T. Baldwin. 2002. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecules analysis. *Annual Review Plant Biology* 53: 299-328.
- Koornneef, A. & C.M.J. Pieterse. 2008. Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology* 146: 839-844.
- Koornneef, A., A. Leon-Reyes, T. Ritsema, A. Verhage, F.C. Den Otter, L.C. Van Loon & C.M.J. Pieterse. 2008. Kinetics of Salicylate-Mediated Suppression of Jasmonate Signaling Reveal a Role for Redox Modulation. *Plant Physiology* 147: 1358-1368.
- Kumar, P.P. 2013. Plant hormones and their intricate signaling networks: unraveling the nexus. *Plant Cell Reports* 32: 731-732.
- Kuppusamy, K.T., C.L. Walcher & J.L. Nemhauser. 2009. Cross-regulatory mechanisms in hormone signaling. *Plant Molecular Biology* 69: 375-381.
- Lage, J., B. Skovmand & S.B. Andersen. 2003. Expression and suppression of resistance to greenbug (Homoptera: Aphididae) in synthetic hexaploid wheats derived from *Triticum dicoccum* x *Aegilops tauschii* crosses. *Journal of Economic Entomology* 96: 20-206.
- Le Noble, M.E., W.G. Spollen & R.E. Sharp. 2004. Maintenance of shoot growth by endogenous ABA: genetic assessment of the involvement of ethylene suppression. *Journal of Experimental Botany* 55: 237-245.
- Lee, S. & D. Choi. 2013. Comparative transcriptome analysis of pepper (*Capsicum annuum*) revealed common regulons in multiple stress conditions and hormone treatments. *Plant Cell Rep* 32: 1351-1359.
- Liechti, R. & E.E. Farmer. 2006. Jasmonate biochemical pathway. *Science STKE*. 322.
- Lorenzo, O. & R. Solano. 2005. Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion Plant Biology* 8: 532-540.
- Maleck, K. & R.A. Dietrich. 1999. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends in plant science* 4: 215-219.
- Manning, K., M. Tor, M. Poole, Y. Hong, A.J. Thompson, G.J. King, J.J. Giovannoni & G.B. Seymour. 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics* 38: 948-52.
- Mansour, A. 2007. Epigenetic activation of genomic retrotransposones. *Journal of Cell and Molecular Biology* 6: 99-107.
- Mauch- Mani, B. & F. Mauch. 2005. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 409-414.
- Moreno, J.E., Y. Tao, J. Chory & C.L. Ballaré. 2009. Ecological modulation of plant defense via phytochrome control of jasmonate sensitivity.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106: 4935-4940.
- Mur, L.A.J., P. Kenton, R. Atzorn, O. Miersch & C. Wasternack. 2006. The Outcomes of Concentration-Specific Interactions between Salicylate and Jasmonate Signaling Include Synergy, Antagonism, and Oxidative Stress Leading to Cell Death. *Plant Physiology* 140: 249-262.
- Norman-Setterblad, C., S. Vidal & T.E. Palva. 2000. Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 430-438.
- Pandey, S.P., P. Shahi, K. Gase & I.T. Baldwin. 2008. Herbivory-induced changes in the small-RNA transcriptome and phytohormone signaling in *Nicotiana attenuata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 4559-4564.
- Pecinka, A. & O. Mittelsten Scheid. 2012. Stress-Induced chromatin changes: a critical view on their heritability. *Plant Cell Physiology* 53: 801-808.
- Pieterse, C.M.J. & L.C. Van Loon. 1999. Salicylic acid- independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* 4: 52-58.
- Pieterse, C.M.J., J. Ton & L.C. Van Loon. 2001. Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden? *AgBiotechNet* 3 June, ABN 068.
- Reymond, P. & E.E. Farmer. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 404-411.
- Reymond, P., N. Bodenhausen, R.M. Van Poecke, V. Krishnamurthy, M. Dicke & E.E. Farmer. 2004. A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell* 16: 3132-3147.
- Schmelz, E.A., J. Engelberth, H.T. Alborn, J.H. Tumlinson & P.E.A. Teal. 2009. Phytohormone-based activity mapping of insect herbivore-produced elicitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 653-657.
- Seo, H.S., J.T. Song, J. Cheong, Y. Lee, I. Hwang, J.S. Lee & Y.D. Choi. 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Science* 98: 4788-4793.
- Soppe, W.J., S.E. Jacobsen, C. Alonso-Blanco, J.P. Jackson, T. Kakutani, M. Koornneef & A.J.M. Peeters. 2000. The Late Flowering Phenotype of *fwa* Mutants Is Caused by Gain-of-Function Epigenetic Alleles of a Homeodomain Gene. *Molecular Cell* 6, 791-802.
- StatSoft, Inc. 2005. STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com.
- Thomas, J.A., A.C. Jaffrey, K. Atsuko & M.K. David. 2005. Regulating the proton budget of higher plant photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Science* 102: 9709-9713.
- Thomma, B.P.H.J., K. Eggermont, I.A.M.A Penninckx., B. Mauch-Mani, B.P.A. Cammue & W.F. Broekaert. 1998. Seperate jasmonatedependent and

- salicylic acid-dependent defense response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 15107-15111.
- Thomma, B.P., I.A. Penninckx, W.F. Broekaert & B.P. Cammue. 2001. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology* 13: 63-68.
- Turner, J.G., C. Ellis & A. Devoto. 2002. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14: S153-S164.
- Van der Does, D., A. Leon-Reyes, A. Koornneef, M.C. Van Verk, N. Rodenburg, L. Pauwels, A. Goossens, A.P. Körbes, J. Memelink, T. Ritsema, S.C.M. Van Wees & C.M.J. Pieterse. 2013. Salicylic Acid Suppresses Jasmonic Acid Signaling Downstream of SCFCO11-JAZ by Targeting GCC Promoter Motifs via Transcription Factor ORA59. *The Plant Cell* 25: 744-761.
- Van Loon, L.C., B.P.J. Geraats & H.J.M. Linthorst. 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Science* 11: 184-191.
- Wasternack, C. 2007. Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development *Annals of Botany* 100: 681-697.
- Walling, L.L. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 195-216.
- War, A.R., M.G. Paulraj, M.Y. War & S. Ignacimuthu. 2011. Jasmonic acid-mediated induced resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Plant Growth Regulation* 30: 512-523.
- Yang, D.L., Y. Yang & Z. He. 2013. Roles of plant hormones and their interplay in rice immunity. *Molecular Plant* 6: 675-685.
- Zarate, S.I., L.A. Kempema & L.L. Walling. 2007. Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant Physiology* 143: 866-875.

CAPÍTULO 6.

Estudio de la expresión del gen *NAC2* en dos líneas de trigo tratadas con ABA, ET e infestadas con pulgón ruso del trigo

Contenido

<u>Introducción</u>	166
<u>PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)</u>	169
<u>Materiales y métodos</u>	171
<u>Tratamientos</u>	171
<u>Extracción de ARN</u>	172
<u>Síntesis del ADNc mediante transcripción inversa</u>	173
<u>Determinación del gen candidato</u>	173
<u>Estudio de la expresión del gen NAC2 mediante RT-qPCR</u>	178
<u>Normalización de resultados</u>	180
<u>Resultados</u>	181
<u>RT-qPCR</u>	182
<u>Discusión</u>	188
<u>Conclusiones</u>	192
<u>Bibliografía</u>	192

Introducción

La regulación de la expresión génica a nivel de la transcripción influye sobre varios procesos biológicos en la vida de un organismo, y entre ellos sobre la adaptación de las plantas a diversos ambientes. La comprensión acabada de las respuestas que se desencadenan en una planta ante una situación de estrés, y por consiguiente el nivel de tolerancia o susceptibilidad que ésta manifieste, permitirá clarificar aún más los mecanismos por medio de los cuales un ataque es percibido y compensado satisfactoriamente (Riechmann *et al.*, 2000).

La interacción entre las plantas y los organismos patógenos e insectos constituye un sistema dinámico y de alta complejidad. Luego del ataque sufrido por una planta, ocurren una serie de eventos de señalización que activan respuestas celulares específicas. Intrincadas cascadas de señalización comprenden varios factores de transcripción y acarrear, como consecuencia, la activación transcripcional de los mecanismos de defensa (Cantu *et al.*, 2013). Tanto los estreses abióticos como bióticos, desafían un amplio rango de respuestas propias de las plantas, desde la alteración de la expresión génica y cambios en el metabolismo celular, hasta modificaciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas, con la consiguiente variación en el rendimiento de los cultivos (Nuruzzaman *et al.*, 2013).

Se ha reportado que diferentes tratamientos que generan estrés, como la infección con *Phytophthora infestans* y el daño mecánico, pueden inducir respuestas similares (Baron & Zambryski, 1995; Collinge & Boller, 2001). Esto se debe a que las plantas responden a un abanico de efectores/ inductores cuando son atacadas por un patógeno, algunos de los cuales derivan de la acción misma del patógeno sobre los componentes estructurales o sobre el metabolismo del hospedante (Collinge & Boller, 2001).

La expresión de los genes relacionados con el estrés se basa en factores de transcripción específicos y de otros elementos actuantes en *cis* que modulan la estructura del ADN en las regiones promotoras (Nuruzzaman *et al.*, 2013), lo cual afecta directamente el inicio de la transcripción. Bajo condiciones de estrés biótico o abiótico, los genes relacionados con las defensas de las plantas presentan un patrón de expresión específico en concordancia con su

funcionalidad (Nuruzzaman *et al.*, 2012a), de modo que su sobreexpresión o supresión pueden incrementar la tolerancia de las plantas a ambos tipos de estrés (Nuruzzaman *et al.*, 2013). Por lo tanto, la identificación de estos genes resulta de importancia a fin de asociar patrones de expresión específicos a tejidos u órganos en particular (Nuruzzaman *et al.*, 2012b).

La familia de proteínas que poseen dominios NAC son estructuras de gran tamaño, que se caracterizan por tener dominios funcionales altamente conservados como el sitio N- terminal, acompañado de numerosos dominios C-terminales muy divergentes (Ooka *et al.*, 2003; Ernst *et al.*, 2004) que propician la amplia actividad transcripcional específica de las proteínas NAC (Xie *et al.*, 2000; Yamaguchi *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2010). La sigla NAC se corresponde con el acrónimo proveniente de los nombres de los primeros tres genes que fueron descritos por contener estos dominios, a saber: **NAM** (del inglés, *n*o *a*pical *m*eristem), **ATAF 1,2** (del inglés, *A*rabidopsis *t*ranscriptor *a*ctivation *f*actor) y **CUC2** (del inglés, *c*up-shaped *c*otyledon) (Souer *et al.*, 1996; Aida *et al.*, 1997). El primero de ellos fue identificado en petunia (*Petunia hybrida*) y determina la posición del meristema apical; CUC2 pertenece a *Arabidopsis* y participa en el desarrollo de embriones y flores.

Las proteínas NAC cumplen importantes funciones en el crecimiento, desarrollo y en la respuesta al estrés (Kikuchi *et al.*, 2000; Ooka *et al.*, 2003). Su rol en la senescencia, en procesos relacionados con el estrés y las defensas de las plantas fue dilucidándose en los últimos 20 años, aunque actualmente se continúan identificando funciones de los genes NAC relacionadas con varios aspectos de la vida de las plantas (Collinge & Boller, 2001; Hegedus *et al.*, 2003; Voitsik *et al.*, 2013).

Los genes *NAC* son específicos y muy abundantes en las plantas. Constituyen una de las mayores familias de factores de transcripción que funcionan en las regiones promotoras de diferentes genes relacionados con el estrés (Nuruzzaman *et al.*, 2013). Su participación en diversos procesos fue ampliamente demostrada. En particular, se relacionan con el desarrollo del meristema apical del tallo (Souer *et al.*, 1996; Aida *et al.*, 1997), la formación de raíces laterales (Xie *et al.*, 2000), la especificidad del desarrollo del órgano floral (Sablowski & Meyerowitz, 1998), la respuesta a la infección viral (Collinge & Boller, 2001) y al estrés abiótico (Hegedus *et al.*, 2003; Fujita *et al.*, 2006;

Tran *et al.*, 2004). Participan, además, en procesos relacionados con el estrés biótico, como es el caso de los genes GRAB1 y GRAB2 de trigo pan que interactúan con la proteína RepA propia del virus del enanismo (Xie *et al.*, 1999).

En *Arabidopsis*, los genes *ATAF1* y *ATAF2* fueron inducidos en respuesta al daño mecánico (Collinge & Boller, 2001), mientras que un subgrupo de los genes *ATAF* (*ANAC019*, *ANAC055* y *ANAC072*) lo fueron en respuesta a la deshidratación, elevada salinidad y aplicaciones de ácido abscísico (Fujita *et al.*, 2006; Tran *et al.*, 2004). En relación a los procesos de defensa, las proteínas NAC han sido parcialmente estudiadas (Olsen *et al.*, 2005). En particular, *ANAC072* participa en la señalización del estrés mediado por ABA e inducido en respuesta a especies reactivas de oxígeno. Otros genes que son inducidos tanto por factores de estrés biótico como abiótico, son el *StNAC* en papa (*Solanum tuberosum*) y varios genes *NAC* inducidos por insectos herbívoros y hongos en colza (Collinge & Boller, 2001; Hegedus *et al.*, 2003). Además, se destaca que la expresión de varios de esos genes fue inducida también por factores de estrés abiótico, como el daño mecánico, el frío y la deshidratación (Collinge & Boller, 2001; Hegedus *et al.*, 2003).

Numerosas investigaciones basadas en la secuenciación completa de algunas especies han permitido identificar 117 genes *NAC* en *Arabidopsis*, 151 en arroz, 79 en vid, 26 en Citrus, 163 en álamo, 152 tanto en soja como en tabaco (Rushton *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2010; Nuruzzaman *et al.*, 2010, 2012a; Le *et al.*, 2011). Aún se han encontrado pocos genes *NAC* en los cereales. Específicamente, en el trigo (*Triticum aestivum*) el análisis de la expresión de los genes *NAC* permitió conocer la participación de estos en su aclimatación al frío (Monroy *et al.*, 2007). Estudios sobre la divergencia funcional de homólogos de genes *NAC* en trigo y en arroz sugieren que las funciones de los factores de transcripción ortólogos en ambas especies serían divergentes (Distelfeld *et al.*, 2012). Por otro lado, la sobreexpresión del gen *TaNAC-S* en el fenotipo 'stay-green' de trigos transgénicos indicó que este es un regulador negativo de la senescencia del cultivo, sobreexpresión que estuvo a su vez relacionada con una mayor concentración de nitrógeno en el grano respecto de trigos silvestres (Podzimska-Sroka *et al.*, 2015). Además, existen numerosos genes *NAC* ubicados en el cromosoma 6AS de trigo, región donde se ubican los

microsatélites *Xgwm459* y *Xgwm334a*, entre ellos, el gen NAC2 (GenBank HQ630372.1).

Varias proteínas NAC relacionadas con la traducción de señales hormonales fueron también identificadas (Greve *et al.*, 2003). Estudios en base a microarreglos específicos para el arroz revelaron que los genes *OsNAC* se activaron diferencialmente según el estado de desarrollo (vegetativo o reproductivo) del tejido analizado. Además, en plántulas de 3 semanas tratadas con fitohormonas, cuatro genes fueron sobre-expresados luego de la aplicación de ABA (100 μ M) en comparación con el control, mientras que un solo gen (*Os06g04090*) fue activado diferencialmente por acción del AJ (500 μ M) (Nuruzzaman *et al.*, 2012b).

PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

La reacción de **PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)**, del inglés *real time quantitative PCR*) es ampliamente utilizada para cuantificar la expresión génica. A diferencia de la técnica convencional de PCR cuyos resultados se obtienen en el punto final de la reacción, la RT-qPCR cuantifica los cambios en el nivel de expresión de manera instantánea, a partir de un amplio rango dinámico (Brunner *et al.*, 2004). Además, resulta de utilidad en experimentos cuya cantidad de ARN es limitante (Brunner *et al.*, 2004), cuando se dispone de poca muestra o cuando se pretende discriminar pequeños cambios en la expresión génica (Schmittgen *et al.*, 2000).

La RT-qPCR es una técnica cinética (Higuchi *et al.*, 1993) que emplea reactivos convencionales de PCR junto a un compuesto marcado con un fluorocromo que permite la emisión de fluorescencia detectable en un termociclador, con la capacidad de excitarlo convenientemente. Este compuesto puede ser de dos tipos: aquel que se une a un oligonucleótido específico que hibride con el producto de PCR a monitorizar o bien un compuesto que se una inespecíficamente y de forma dependiente del número de copias a todo ácido nucleico de doble cadena de la mezcla, como por ejemplo el SYBR- Green (Morrison *et al.*, 1998). Cualquiera sea la técnica de detección, la cuantificación mediante RT-qPCR se basa en el valor del *Ct* (del

inglés *cycle threshold*, ciclo umbral), valor que representa el incremento significativo del producto de PCR medido a través del aumento de su fluorescencia, momento que coincide con el punto medio de la fase exponencial de amplificación (Brunner *et al.*, 2004).

La cuantificación mediante qPCR puede ser absoluta, es decir, se determina el número exacto de moléculas para lo cual se requiere de una curva de calibración que permita cotejar la señal de amplificación obtenida con el contenido en ADN (Livak & Schmittgen, 2001). Por el contrario, la cuantificación relativa de la expresión de un gen mediante RT-qPCR se fundamenta en la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudiar (target o de interés) respecto de un gen control (también llamado de referencia, interno, normalizador o, en inglés, *housekeeping gene*). La normalización mediante el uso de un gen de control interno permite evaluar la expresión diferencial entre un gen de interés y el gen de referencia en una situación control (o testigo). Además, debe considerarse que ambos genes, target y control, pueden tener diferentes eficiencias de amplificación mediante PCR debido a sus distintas secuencias y tamaños de amplicón (Chini *et al.*, 2007).

La selección de un gen control incide directamente sobre el éxito de la metodología (Livak & Schmittgen, 2001; Van Guilder *et al.*, 2008). Como características fundamentales que este debe reunir es importante que su expresión no se vea afectada por el tratamiento a evaluar, así como que su nivel de expresión y su eficiencia de amplificación sean similares a los del gen target o candidato. El gen 18S ARNr es uno de los genes comúnmente utilizados en los análisis de expresión en monocotiledóneas. A pesar de que algunos autores cuestionan la eficiencia de los genes control clásicos como los de actina, beta-globulina, 18S ARNr en estudios de expresión génica debido a su insuficiente estabilidad ante diversos tratamientos (Thellin *et al.*, 1999; Paolacci *et al.*, 2009), no existe el gen de referencia universal que se exprese en igual nivel en la totalidad de los tejidos vegetales y con independencia de los tratamientos recibidos (Tenea *et al.*, 2011).

Para medir los cambios en el nivel de expresión relativa de un gen, existen dos métodos matemáticos. El primero se basa en el cálculo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) y se caracteriza por ser menos laborioso, más económico y por no requerir curva de calibración previa. El método del $\Delta\Delta Ct$ o

ddCt (delta delta Ct) fue uno de los primeros utilizados para calcular los resultados obtenidos por RT-PCR. En su metodología de cálculo lleva implícita una serie de supuestos (Livak & Shmittgen, 2001), como por ejemplo que las eficiencias del gen de control interno y del gen blanco (o candidato) son similares. Por otro lado, la eficiencia de la reacción pone a prueba el balance que existe entre la enzima, dNTPs, *primers* y el cDNA molde.

El segundo modelo para cuantificar la expresión relativa de un gen responde a un método diseñado por Pfaffl (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002), el cual requiere de una corrección definida por la eficiencia cinética de la reacción de PCR y toma en consideración las distintas eficiencias de amplificación que puedan hallarse entre el gen control y el target o de interés. Aún en el caso de que las eficiencias de amplificación de ambos genes sean muy similares, algunos autores sugieren la preferencia de este método por ser más preciso y confiable (Chini *et al.*, 2007).

Las diferencias encontradas en la respuesta a los tratamientos hormonales y ante infestaciones con el pulgón ruso en las plantas descendientes de las dos líneas recombinantes dihaploides de trigo, que comparten exactamente el mismo fondo genético a excepción de una pequeña región en el cromosoma 6A, desencadenó la pregunta: *el gen NAC2 localizado en dicha región ¿está relacionado con las respuestas contrastantes entre las líneas progenitoras?* Así, el **objetivo** del presente capítulo fue conocer la expresión diferencial del gen NAC2 en dos líneas de trigo (M y P) tratadas en forma exógena con las hormonas ET y ABA, así como también infestadas con el pulgón ruso.

Materiales y métodos

El estudio de la expresión del gen NAC2 se realizó en dos líneas de trigo pan (*Triticum aestivum* L.), líneas madre (M) y padre (P) de la totalidad de los descendientes (F₁, F₂ y F₃) analizadas en los capítulos precedentes.

Tratamientos. Siete plantas de las líneas progenitoras M (madre) y P (padre) en el estado de tercera hoja expandida se asperjaron hasta el punto de chorreo con etileno (Ethrel®) 50 mM o con ácido abscísico (ABA) 10 µM,

independientemente. Otro grupo de plantas de ambas líneas fue reservado como testigo (T) y sólo recibieron una solución de agua y Tween20® (Polietilenglicol sorbitano monolaurato). Asimismo, se infestó a un cuarto grupo de plantas de ambas líneas con pulgón ruso (*Diuraphis noxia*, Rondani), infestación que consistió en colocar entre 7 y 10 adultos por planta, con la ayuda de un pincel.

Luego de 72 h desde la aplicación de los tratamientos, la parte aérea de todas las plantas se cosechó y almacenó en nitrógeno líquido (-80 °C). Así, las ocho muestras obtenidas se denominaron según la línea progenitora de la cual fue cosechada (M, línea madre; P, línea padre) y según el tratamiento recibido (T, testigo; E, etileno; A, ácido abscísico y P, pulgón ruso), a saber: MT, PT, ME, PE, MA, PA, MP, PP.

Extracción de ARN. Se utilizó TRI Reagent (Sigma Aldrich) para el aislamiento del ARN a partir de tejido foliar previamente almacenado en nitrógeno líquido. Por cada 100 mg de tejido, se agregó 1 mL de TRI Reagent y se homogeneizó en nitrógeno líquido. Para la separación de fases, se procedió a agregar 0,2 mL de cloroformo por cada muestra y se agitó cada una por 15 seg. Luego de la incubación a temperatura ambiente, por 2 - 3 minutos, se realizó una centrifugación a 12.000 g a 4 °C, por 15 min. Se retiró la fase acuosa a un nuevo set de tubos, al que se agregaron 0,5 mL de isopropanol 100% por muestra. Se incubaron a temperatura ambiente por 10 min y se efectuó una segunda centrifugación en iguales condiciones que la anterior, por 10 min. Una vez eliminado el sobrenadante, el pellet obtenido se lavó con etanol 75%, los tubos recibieron un vortex suave y se centrifugaron a 7500 g a 4 °C por 5 min. El pellet se dejó secar al aire por 15 min y luego se re-suspendió cada muestra en 27 µl de agua libre de RNasas. Por último, se incubó la totalidad de las muestras a 60 °C por 15 min para su posterior almacenamiento a - 80 °C.

La cuantificación del ARN se realizó en el cuantificador Nano Vue (General Electric). Se colocó una cantidad de 3 µl por cada muestra en la celda de lectura para determinar la concentración de ARN y la relación de absorbancia 260/280 en cada muestra. Dicha relación debe evidenciar valores entre 1,9 y 2,1 para garantizar que las muestras están libres de contaminación proteica (Liu *et al.*, 2013). Además, la integridad del ARN se verificó a través de

una corrida electroforética a 80 voltios por 30 min, en un gel de agarosa (1%). Se utilizó bromuro de etidio para la tinción del ARN y se observó en transiluminador de UV.

Las muestras se trataron con ADNasa a fin de eliminar los restos de ADN que pudieran haber persistido luego de la extracción. Por cada alícuota de 8 µl de ARN, se agregó 1 µl del buffer RQ1 RNasa- free DNasa 10X (Promega) y 1 µl de RQ1 RNasa (Promega). Las muestras se incubaron a 37 °C por 30 min en el termociclador y luego se agregó 1 µl de ARNasa- ADNasa STOP para terminar la reacción. Por último, se llevaron a 65 °C por 10 min.

Síntesis del ADNc mediante transcripción inversa. En cada muestra proveniente de la reacción anterior, se agregaron 0,25 µl de *primer* oligo dT y se llevó a 70 °C por 5 min con el objetivo de romper la estructura secundaria. Se enfrió en hielo inmediatamente al finalizar la incubación y luego se agregaron 14 µl por muestra de un mix conformado por:

- 5 µl del buffer M-MLV 5X (Promega),
- 5µl de dNTPs 10 mM,
- 0,625 µl de RNasin ribonuclease inhibitor,
- 1 µl de M-MLV retrotranscriptasa (Promega),
- 2,375 µl de agua libre de nucleasas.

Las muestras se llevaron a 42 °C por 60 min y se conservaron a -20 °C para su posterior utilización. Al finalizar este proceso el ARNm (mensajero) se copió en ADN complementario (ADNc).

Determinación del gen candidato

Para conocer si la región comprendida entre los microsatélites *Xgwm459* y *Xgwm334a* del cromosoma 6A de las líneas progenitoras es portadora de genes NAC, se efectuaron búsquedas en bases de datos disponibles on-line. Se utilizó la base de datos URGI (<http://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository>), plataforma bioinformática que pertenece a la unidad de investigación del Departamento de Mejoramiento Vegetal del INRA, Francia.

Dado que existen varios genes NAC alineados con el fragmento del cromosoma 6AS comprendido entre los marcadores *Xgwm459* y *Xgwm334a*, se buscó una secuencia consenso mediante BLAST en la base de datos URGI. Se encontró una secuencia homóloga al gen NAC consenso dentro de uno de los contigs (segmentos contiguos solapados) correspondientes al cromosoma 6AS (>gnl|IWGSC_6AS|IWGSC_chr6AS_ab_k71_contigs_longerthan_200_4397602).

Se comprobó que la secuencia consenso obtenida corresponde a un gen expresado en trigo, mediante la herramienta BLAST (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*), en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*: www.ncbi.nlm.nih.gov), específicamente dentro de las secuencias reportadas de ESTs y ARN. Así, se identificaron varias secuencias expresadas en trigo con un 100% de homología con la encontrada en el cromosoma 6AS. Por lo tanto, con la certeza de que los genes encontrados se expresan, el estudio se focalizó en el análisis de la expresión de estos genes mediante RT-qPCR.

El gen candidato con el que se inició este estudio, corresponde a un regulador denominado **NAC2** que fue identificado en *Triticum aestivum* cultivar *Triticale 76* (Gen Bank HQ630372.1).

Para el diseño de los primers o cebadores se utilizó la herramienta Primer-BLAST del NCBI que utiliza el programa Primer3 para su diseño y luego los somete a una búsqueda en la base de datos de secuencias seleccionada utilizando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul *et al.*, 1990), con el objetivo de verificar la amplificación únicamente del fragmento deseado. Como blanco de la búsqueda se utilizó a la secuencia del genoma completo de *Triticum aestivum*.

Se estableció que los *primers* debían reunir las siguientes condiciones: 1) longitud entre 17 y 28 nucleótidos, 2) contenido de G-C entre 40 y 60%, 3) temperatura de fusión (*T_m*) entre 55 y 80 °C, 4) terminaciones 3' no complementarias para evitar la formación de dímeros y 5) sin secuencias auto-complementarias para evitar la formación de estructuras secundarias. Bajo estos requisitos se hallaron diez juegos de *primers* o cebadores compatibles

que podrían amplificar en la región flanqueante a los microsatélites *Xgwm459* y *Xgwm334a* (Figura 1).

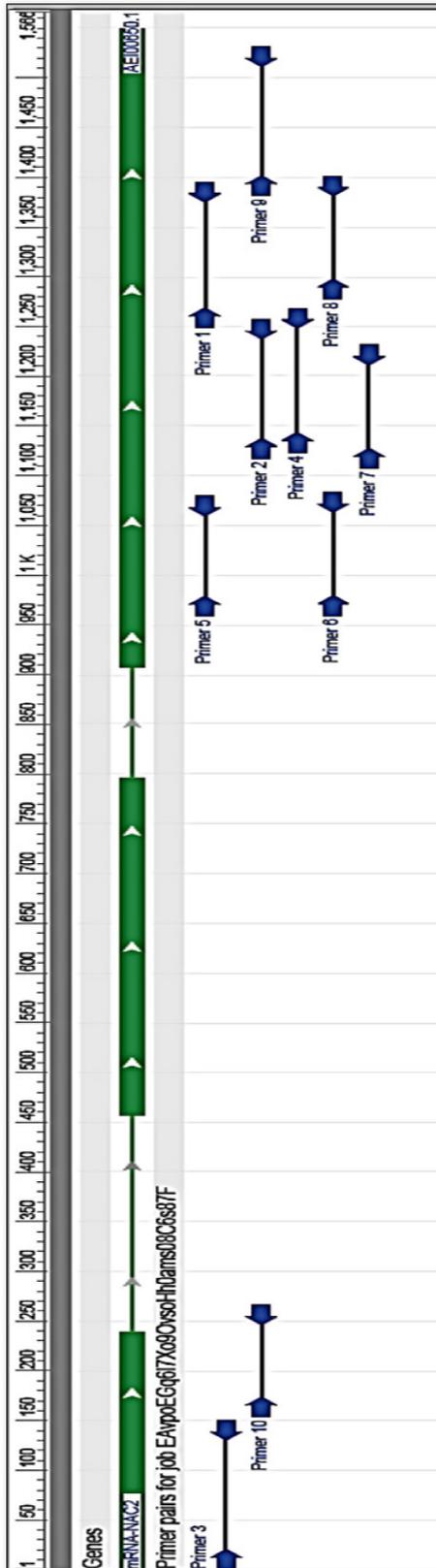


Figura 1. Posibles diez juegos de primers que amplifican el gen NAC2.

Como control interno se seleccionó el gen **18S ARNr**, cuya homología con el trigo fue del 100% (Figura 2) y cuyos *primers* fueron:

Primer F: TGCAACAAACCCCGACTTCT

Primer R: CCTTGGATGTGGTAGCCGTT

a. *Primer F*.

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 8

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Accession
Chain d, Model Of The Small Subunit Rna Based On A 5.5 A Cryo-em Map Of Triticum Aestivum Translatina 80s Ribosome	34.2	34.2	85%	0.17	3J5Z_DD
Triticum aestivum 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	85%	0.17	AY049040.1
Triticum aestivum 18S ribosomal RNA (18S rRNA) bp 137 to 223 in mature rRNA	34.2	34.2	85%	0.17	M82354.1
Triticum aestivum 18S rRNA gene for 18S ribosomal RNA, strain MV-15	34.2	34.2	85%	0.17	AJ272181.1
Triticum aestivum gene for 18S rRNA, partial sequence	34.2	34.2	85%	0.17	AB016660.1

NCBI Home PubMed GenBank BLAST Sequence Viewer 3.4

ic|22481 [Link To This Page](#) [Feedback](#)

22481: 1..20 (20bp) Find:

Sequence

AGCTTGTGGGGCTGAAAGA

BLAST Results for: Nucleotide Sequence (20 letters)

BLAST Results for: Nucleotide Sequence (20 letters)_U0148668779000_nucleotide (1775 aligns, 8 ids)

Cleaned Alignments - BLAST Results for: Nucleotide Sequence (20 letters)

3306.1 AY049040.1

HA670306.1

A A C A A A C > C C G A C T T C T

b. *Primer R.*

) Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Chain d, Model Of The Small Subunit Rna Based On A 5.5 A Cryo-em Map Of Triticum Aestivum Translating 80s Ribosome	40.1	40.1	100%	0.003		3J5Z_DD
Triticum aestivum 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.003		AY049040.1
Triticum aestivum 18S ribosomal RNA (18S rRNA) bp 315 to 543 in mature rRNA	40.1	40.1	100%	0.003		M82356.1
Triticum aestivum 18S rRNA gene for 18S ribosomal RNA, strain MV-15	40.1	40.1	100%	0.003		AJ272181.1
Wheat rDNA 25S-18S intergenic region EcoRI-BamHI fragment	40.1	40.1	100%	0.003		X07841.1
Triticum aestivum chromosome 6B, genomic coordinates, Chinese Patent	34.2	54671	100%	0.17		U667026.1

NCBI Home PubMed GenBank BLAST Sequence Viewer 3.4

lc|151867

151867: 1..20 (20bp) Find:

Sequence

C C T T G G A T G T G G T A G C C G T T

G G A A C C T A C A C C A T C G G C A A

BLAST Results for: Nucleotide Sequence (20 letters)

Cleaned Alignments - BLAST Results for: Nucleotide Sequence (20 letters)

H6670306.1
C C T T G G A T G > T C C T A G C C G T T

AY049040.1
C C T T G G A T G < G G T A G C C G T T

M82356.1
C C T T G G A T G < G G T A G C C G T T

AJ272181.1
C C T T G G A T G < G G T A G C C G T T

Figura 2. Búsqueda de *primers* para amplificar el gen 18S ARNr en trigo. Las letras F y R al final de la denominación del *primer* indican su ubicación en la posición “forward” (directa) o “reverse” (inversa) sobre la secuencia a amplificar.

Estudio de la expresión del gen NAC2 mediante RT-qPCR

A partir de la secuencia consenso determinada a partir de la búsqueda de genes NAC en trigo (Figura 3), se alineó ésta en el cromosoma 6AS de la misma especie. Luego se construyeron los primers necesarios para amplificar esta secuencia en los genotipos analizados (M y P).

```

>consenso_nacs
ACTGCGGNCANGTCGATGCCGGCGGCGACGCGGGGAGAGGGGCGCGGGGGCGGAGCTCAACCTGCCGCGGGCTTC
CGGTTCCACCCACGGACGAGGAGCTNGTCGCGCACTACCTCTGCCGCAAGCCGCGCGGAGCCATCCCGTCCCC
ATCATCGCCGAGGTTCGACCTCTACAAGTTCGACCCCTGGGAGCTCCCGACAGGGCCCTNTTCGGCGANAAGGAGTGGT
ACTTCTTACCCCGCGNGACCGCAAGTACCCCAACGGCTCCCGCCCCAACCGCGCCGCGGGTCCGGTACTGGAAGG
CCACCGGCGCGACAAGCCCGTGTGCCCCCGGGCGGGAGGACNTNGGCATCAAGAAGGCGCTCGTCTTCTACGC
CGGCAAGGCGCCCAAGGGCGTNAAGACCGACTGGATCATGCACGAGTACCGCTCGCCGACGCGACCCGCGCCGCGC
CGCAAGAAGNCTCCCTCAGGTGGACGACTGGGTGCTTGC GCGGTGCACCCCGGGCGGTGGACTCGACAACCCCTCG
TTGGAGGACGACCTGCTTACCCCTCCCTCTTCAACANGACCGGGCGGAGGGGAGGCAGCCCGCGCGCCGCGCAAG
CCGCGCCCTTTGAGCCGCGACGGGGACCGTCCGCGCCATGNCGAGNTCGACGGAGGTGGAGNNGCCGACGTCATG

```

>gnl|IWGSC_6AS|IWGSC_chr6AS_ab_k71_contigs_longerthan_200_4397602

Figura 3. Secuencia consenso de los genes NAC del cromosoma 6AS del trigo.

De los diez juegos de *primers* diseñados (Figura 1), el *primer 2* permitió llevar adelante la amplificación exitosamente (Tabla 1).

Tabla 1. Características del *primer* utilizado para amplificar el gen candidato. Secuencia 5'-3', cantidad de bases, temperatura de fusión (T°m) y porcentaje de bases G-C (% GC)

	Secuencia (5' - 3')	Cantidad de bases	T°m	% GC
<i>Primer 2F</i> *	GAGGGCCTGTTCACAGCAGA	20	62.12	60.00
<i>Primer 2R</i>	AGCCAGTTGAACGGGGTTGA	20	61.99	55.00
Longitud del producto		140		

* Las letras F y R al final de la denominación del *primer* indican su ubicación en la posición "forward" o "reverse" de la secuencia a amplificar.

Las reacciones de RT-qPCR se realizaron en el equipo Stratagene Mx3000P (Qiagen) perteneciente a la Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

Para la reacción se trabajó con el kit Q-MixGreen¹ siguiendo el protocolo recomendado. Para un volumen final de 25 µl, se agregaron 10 µl de Q-MixGreen, 0,5 U de ADN Taq Polimerasa (Kapa Biosystems), 1 µl de cada primer (F y R, stock 10 µM), 2 µl de ADNc y H₂O hasta completar el volumen indicado.

¹ Gentilmente provisto por el Dr. Martín Abba, Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

Las condiciones de amplificación fueron 10 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 30 seg a 95 °C, 30 seg a 60 °C y 30 seg a 72 °C, con una extensión final de 10 min a 72 °C. A continuación, se generaron las curvas de disociación o *melting* mediante la adición de un ciclo de 70 °C hasta 95 °C, con incrementos de 1 °C cada 30 seg. Se realizó un control negativo en cada mezcla de reacción, utilizando agua destilada en lugar de ADNc. Cada reacción se realizó por triplicado.

Normalización de resultados

Los resultados de la amplificación mediante RT-qPCR se obtuvieron luego de la estandarización de diluciones seriadas de un mix de las muestras de ADNc, el cual reunía la totalidad de tratamientos aplicados en cada línea. La eficiencia de la reacción de amplificación se calculó según la medición del Ct de cada dilución del ADNc, este último valor correlacionado linealmente con el logaritmo de la cantidad de ADNc (curva estándar).

Luego, en base a la pendiente de esta curva se calculó la eficiencia de amplificación (E) del gen en cuestión, según la fórmula (Higuchi *et al.*, 1993):

$$E = 10^{(-1 / \text{pendiente})}$$

El método elegido para el cálculo de la expresión diferencial fue el de Pfaffl (Pfaffl, 2001) debido a que, aún en el caso de que las eficiencias de amplificación del gen candidato (NAC2) y del gen de referencia (18S) fueran similares, este método resulta más preciso. El mismo consiste en el cálculo de la proporción de expresión relativa (R) de ambas eficiencias afectadas por el diferencial de Ct entre los controles y las muestras problema, según:

$$R = \frac{(E_{\text{candidato}})^{\Delta Ct_{\text{candidato}} (\text{control-muestra})}}{(E_{\text{referencia}})^{\Delta Ct_{\text{referencia}} (\text{control-muestra})}}$$

(Pfaffl, 2001)

donde E es la eficiencia de la amplificación del gen candidato y del de referencia, ΔC_t la diferencia entre el valor de C_t del tratamiento control o testigo y las muestras de cada tratamiento en particular.

De este modo, la corrección en relación al gen de control interno (gen de referencia) permite eliminar variaciones debidas a errores de pipeteo, degradación parcial del ARN o diferencias en la eficiencia de la retrotranscripción a ADNc.

El cálculo de R para cada tratamiento y por cada genotipo (M y P) se realizó por triplicado. Se efectuó el análisis de la varianza (ANOVA) en cada línea para comprobar si existían diferencias significativas entre los tratamientos. Luego se realizó el test de Fisher de diferencias mínimas significativas (LSD) para determinar entre qué tratamientos se encontraban esas diferencias, con un nivel de significancia del 0,05. Para la totalidad de los análisis se empleó el programa Statistica (StatSoft Inc, 2005).

Resultados

La calidad y cantidad del ARN fue corroborada en un gel de agarosa (1%) y el revelado fue realizado con bromuro de etidio. Además, el rendimiento en ARN fue cuantificado según su concentración (ng/ μ l), mientras que la relación de absorbancia 260/280 permitió apreciar valores óptimos de este último parámetro de entre 1,8 y 2,1 en la totalidad de las muestras (Tabla 2). Luego por transcripción inversa se obtuvo el ADNc de cada muestra para iniciar el estudio de expresión del gen NAC2.

Tabla 2. Concentración (ng/ μ l) y relación de absorbancia 260/280 del ARN total por muestra.

Muestra N°	Descripción	Concentración (ng/ μ l)	Relación de Abs. (260/280)
1	PE	1074	2,097
2	ME	1018	2,094
3	PA	805	2,079
4	MA	1202	2,088
5	PP	734	2,02
6	MP	564	2,026
7	PT	334	1,861
8	MT	605	2,038

PE, PA, PP, PT: línea P con ET, con ABA, con pulgón, testigo, respectivamente; ME, MA, MP, MT: línea M con E, con ABA, con pulgón, testigo, respectivamente.

RT-qPCR

La curva de disociación de la RT-qPCR mostró que la totalidad de las muestras analizadas dieron un único pico, lo cual indica que se obtuvo un solo producto puro y que no se formaron dímeros (Li *et al.*, 2012). Esto pudo observarse en las curvas de disociación del gen control (18S) (Figura 4) como en la correspondiente al gen de interés o candidato (NAC2). En el caso del gen NAC2 se realizó una corrida preliminar con la totalidad de las muestras reunidas en un mix (Figura 5) y luego se corrió cada muestra en forma independiente. Por último, fueron consideradas válidas aquellas curvas de amplificación que mostraron valores de Ct muy próximos para las tres réplicas de la misma muestra (Figura 6).

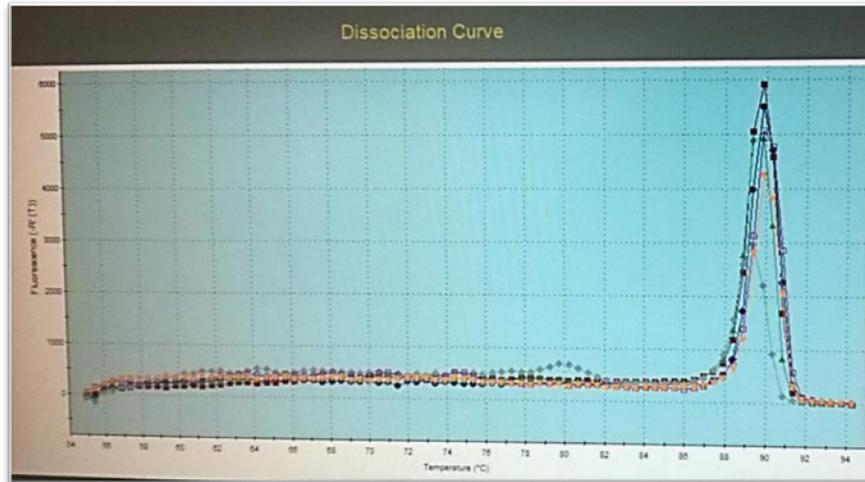


Figura 4. Curva de disociación del gen 18S. La totalidad de las muestras se observan por separado, una por línea graficada.

Eje de las abscisas indica Temperatura (°C). Eje de las ordenadas indica Fluorescencia.

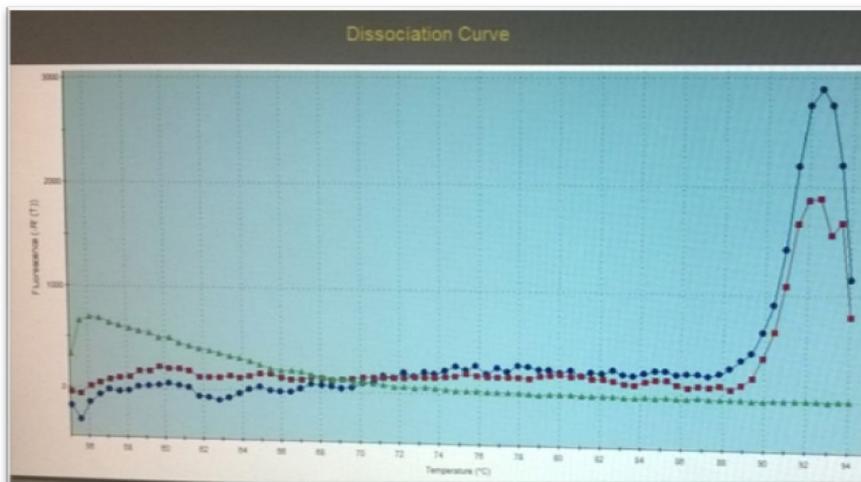


Figura 5. Curva de disociación del gen NAC2 para la totalidad de las muestras de cADN reunidas en un mix.

La línea *azul* muestra la curva correspondiente a un mix de cADN que reunió a las 8 muestras en estudio. La línea *roja* muestra una dilución 10^{-1} de dicho mix. La línea *verde* corresponde al blanco del ensayo (agua en lugar de cADN). Eje de las abscisas indica Temperatura (°C). Eje de las ordenadas indica Fluorescencia.

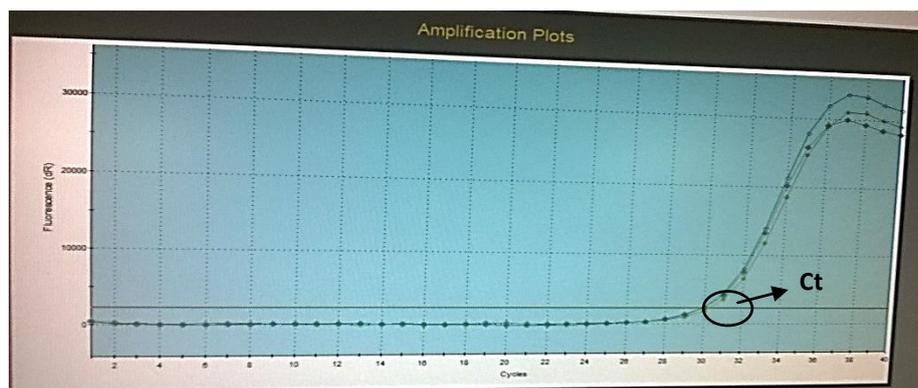


Figura 6. Curva de amplificación del gen NAC2 en la línea M, tratada con ET.

Las tres líneas se corresponden con las tres réplicas de idéntica muestra (ME). Eje de las abscisas indica el número de ciclos. Eje de las ordenadas indica Fluorescencia.

Los valores del Ct de cada muestra y tratamiento fueron obtenidos por triplicado y luego promediados. Se calculó el coeficiente de variación (CV%) y el diferencial del valor de cada Ct promedio en relación con los respectivos testigos (Ct) (Tabla 3).

Tanto en el caso del gen control (18S) como del gen candidato (NAC2), pudo observarse que todos los tratamientos hicieron disminuir los valores del Ct respecto de los testigos, en ambas líneas (M y P). Como excepción se destaca una mayor expresión ($\Delta Ct = 1,15$) del gen NAC2 cuando la línea M fue tratada con etileno (Tabla 3).

Tabla 3. Ct promedio, coeficiente de variación (CV%) y diferencial de Ct de los tratamientos respecto de los testigos, para el gen control (18S) y el gen de interés (NAC2), en las líneas M y P.

<u>Línea M</u>	Ct promedio (n = 3)	CV %	ΔCt
Gen 18S			
Testigo	23,86	0,24	
ET	13,25	2,72	-10,61
ABA	13,56	0,62	-10,3
Pulgón	17,15	1,24	-6,71
Gen NAC2			
Testigo	27,93	0,10	
ET	29,08	0,39	1,15
ABA	18,23	1,78	-9,7
Pulgón	28,875	0,17	0,945

(CONTINUACIÓN)			
<u>Línea P</u>			
<i>Gen 18S</i>			
Testigo	23,085	6,77	
ET	11,5	6,15	-11,585
ABA	16,095	0,57	-6,99
Pulgón	15,785	4,08	-7,3
<i>Gen NAC2</i>			
Testigo	28,67	0,88	
ET	16,64	1,78	-12,03
ABA	22,01	0,06	-6,66
Pulgón	28,57	0,15	-0,1

Mediante el trazado de la curva estándar de los valores del Ct respecto del contenido de ADNc (expresado en forma logarítmica) se obtuvieron coeficientes de determinación (R^2) de 0,9872 y 0,9281 para los genes 18S y NAC2, respectivamente (Figura 7). Ambos valores indican un buen ajuste del modelo.

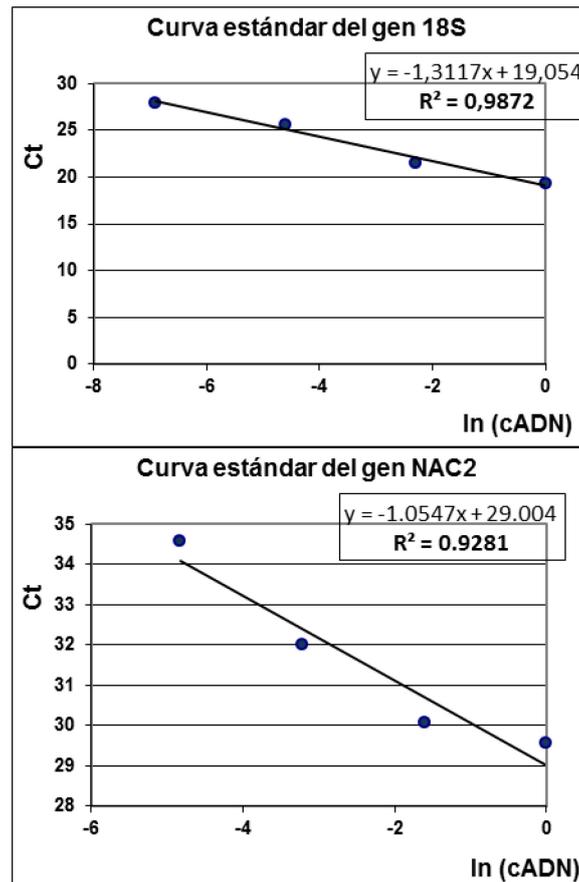


Figura 7. Curva estándar del Ct de los genes control (18S) y candidato (NAC2) respecto del contenido de cADN (expresado en forma logarítmica).

Luego, a partir de las curvas estándar obtenidas para cada gen, se dedujeron las respectivas eficiencias de amplificación (E) en base a la pendiente de la recta obtenida:

Gen 18S	E = 2,14
Gen NAC2	E = 2,58

Ambos valores indican que, en cada ciclo de amplificación, la cantidad de ADNc aumentó en más del doble respecto del ciclo anterior, concretamente 2,14 y 2,58 veces para los genes 18S y NAC2 respectivamente. Debido a que las eficiencias de amplificación del gen candidato (NAC2) y del gen de referencia (18S) fueron diferentes, se corrobora que en este caso el método de Pfaffl fue el adecuado para el cálculo de la expresión diferencial del gen NAC2.

Según los análisis de la varianza (ANOVA) se encontraron diferencias muy significativas entre los tratamientos hormonales y con pulgones, tanto en la línea M (Tabla 4) como en la línea P (Tabla 5).

Tabla 4. ANOVA de los tratamientos hormonales y con pulgón en la línea M.

Fuente de variación	CM	F	p
Tratamientos	7,24	27,09***	0,004
Error	0,27		

CM: cuadrado medio

***: $p < 0,001$

Tabla 5. ANOVA de los tratamientos hormonales y con pulgón en la línea P.

Fuente de variación	CM	F	p
Tratamientos	72,24	24,82***	0,005
Error	2,91		

CM: cuadrado medio

***: $p < 0,001$

Luego, según el test de diferencias mínimas significativas (LSD) de Fisher, la expresión relativa (R) del gen NAC2 mostró diferencias significativas en el caso del tratamiento con ABA en la línea M, con una sobreexpresión relativa respecto de su testigo. Por el contrario, ni el tratamiento con ET ni la infestación con pulgón se diferenciaron estadísticamente del testigo para la línea M (Figura 8). En el caso de la línea P tratada con ET, el gen NAC2 se sobre-expresó significativamente respecto de su testigo, según el test de Fisher. Los tratamientos con ABA y pulgón no evidenciaron diferencias significativas respecto del testigo (Figura 8).

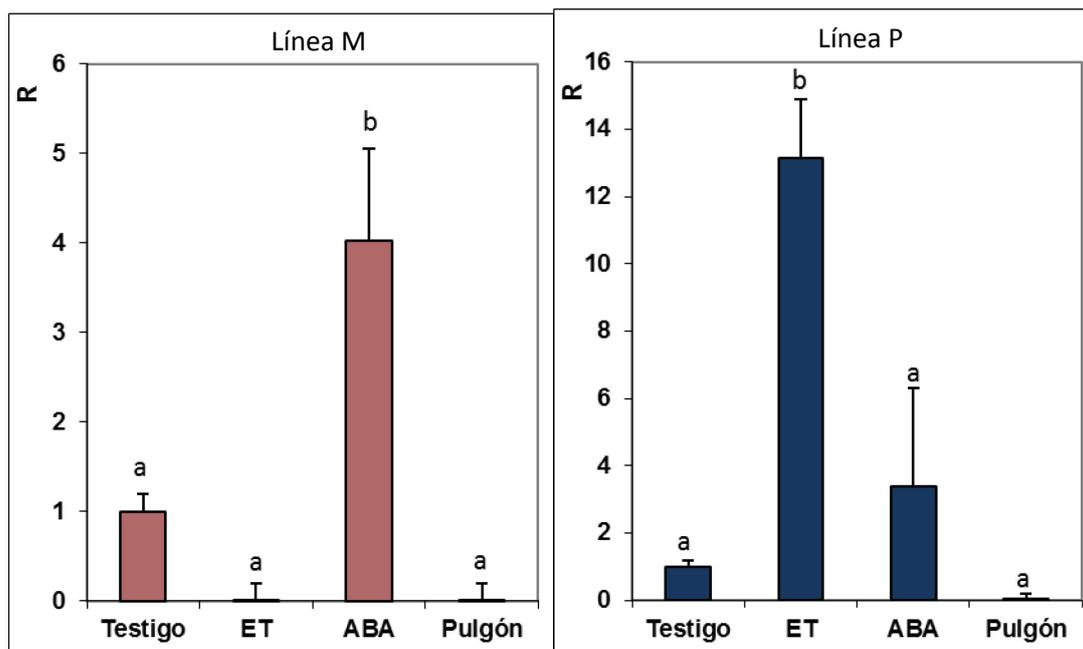


Figura 8. Expresión diferencial (R) del gen NAC2 en las líneas M y P sometidas a los tratamientos con ET, ABA, pulgones y en los testigos.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en la expresión relativa del gen NAC2, según el test de diferencias mínimas significativas de Fisher.

El tratamiento con pulgón ruso no generó expresión diferencial del gen NAC2 en ninguna de las líneas analizadas. En ambos genotipos infestados la expresión de este gen fue similar a los respectivos testigos (Figura 8).

Por último, los resultados encontrados permiten distinguir a ambos genotipos ante la expresión de un gen que se relaciona con la transcripción en situaciones de estrés. Es así como el ABA afecta la expresión del gen NAC2 en la línea M, aunque no así en la línea P. Por el contrario, el tratamiento con ET sólo generó expresión diferencial en la línea P, pero no en la M.

Discusión

Es conocida la relación que existe entre los genes NAC y la resistencia al estrés. Varios autores reafirman el rol de los factores de transcripción NAC en las respuestas defensivas de las plantas, ante la acción de diferentes organismos patógenos e insectos picadores (Nuruzzaman *et al.*, 2013). Por otro lado, aplicaciones exógenas con fitohormonas como AJ, AS y ET han

demostrado ser también inductoras de genes NAC en varias especies (Tran *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2006; Sindhu *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2007; Nakashima *et al.*, 2007; Yokotani *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2010a y 2010b; Yoshii *et al.*, 2010; Nuruzzaman *et al.*, 2012b).

Existen numerosos ejemplos de la relación de las fitohormonas sobre la expresión de los genes NAC, como es el caso del gen *AtNAC2* afectado por auxinas y ET (Xie *et al.*, 2000; He *et al.*, 2005) o el gen *OsNAC5* influenciado por aplicaciones de ABA (Sperotto *et al.*, 2009). Además, el gen *Os05g34830* fue activado por el tratamiento con ABA a nivel de las raíces, en una línea tolerante de arroz sometida a inundación (Nuruzzaman *et al.*, 2012a).

En trigo, el gen *TaNAC4* se comporta como un activador de la transcripción relacionado con la respuesta al estrés, tanto biótico como abiótico (Xia *et al.*, 2010a). Además, se encontró que los transcriptos del gen *SiNAC*, acumulados principalmente en espigas/ espiguillas jóvenes de trigo y arroz, fueron inducidos por deshidratación, salinidad, tratamientos con etileno y metil jasmonato (Distelfeld *et al.*, 2012). Por otro lado, el complejo grupo de factores de transcripción constituido por los genes NAC incide sobre las respuestas de señalización y colaboran en el mantenimiento homeostático de las células (Fujita *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2008). Por ejemplo, los genes *ANAC019* y *ANAC055* tienen que ver con la regulación mediada por ABA y AJ (Greve *et al.*, 2003; Bu *et al.*, 2008, 2009; Jensen *et al.*, 2010). Dentro de la familia de los factores de transcripción ATAF, ATAF1 actúa como regulador negativo en la señalización mediada por ABA, aunque induce genes relacionados con las defensas asociadas a la vía del AJ/ ET (Jensen *et al.*, 2008). Por el contrario, la expresión del gen ATAF2 se indujo mediante la deshidratación, así como por tratamientos con AJ y AS (Delessert *et al.*, 2005). Por lo tanto, un gen NAC puede funcionar como regulador de numerosos y diversos procesos, así como también modular la interacción entre los componentes de las rutas metabólicas implicadas (Nuruzzaman *et al.*, 2013).

Es de destacar el hecho de que un solo gen NAC sea capaz de responder a varios factores de estrés, ya que sus productos proteicos regulan positiva o negativamente numerosos procesos que modulan la tolerancia al estrés, tanto biótico como abiótico.

Al igual que la sobreexpresión diferencial de numerosos genes NAC reportada en arroz ante aplicaciones exógenas de ABA (Nakashima *et al.*, 2007; Nuruzzaman *et al.*, 2012), el tratamiento con ABA en la línea M del trigo provocó una sobreexpresión del gen *NAC2* tres veces mayor que los demás tratamientos y su testigo. Es decir, que la inducción de este gen tuvo una respuesta exclusiva en este genotipo y sólo por efecto del tratamiento hormonal con ABA, ya que las aspersiones con ET y las infestaciones con áfidos no mostraron expresión diferencial respecto de los testigos.

Esta diferencia encontrada en la línea M a nivel de la expresión génica por efecto del tratamiento con ABA no se relaciona con las determinaciones del contenido de clorofila, el peso seco y el rebrote, mediciones que no evidenciaron diferencias entre ambas líneas P y M. En la línea P tampoco varió la expresión del gen *NAC2* luego del tratamiento con ABA, respecto del testigo.

La línea P que había sido caracterizada como susceptible frente al tratamiento con ET, mostró además una marcada sobreexpresión del gen *NAC2*. Plántulas de esta línea habían demostrado una notable disminución en la tasa de crecimiento del coleoptilo por efecto del tratamiento con ET respecto del testigo (Capítulo 3), razón por la cual la línea P fue caracterizada como susceptible. Por otro lado, cuando el mismo genotipo fue tratado con ET se observó una sobreexpresión doce veces mayor del gen *NAC2* en comparación con el testigo, en el estado de segunda hoja expandida. De este modo podría concluirse que la mayor expresión del gen *NAC2* producto del tratamiento con ET es también consecuencia de su mayor susceptibilidad a este tratamiento, la cual se mantiene desde el estado de coleoptilo hasta que la planta se halla con su segunda hoja expandida. En definitiva, se destaca la importancia de relacionar los resultados de la expresión de los genes a los estados fenológicos de las plantas en cuestión, así como también con el tejido a partir del cual se extrajo el ARN objeto de estudio.

El daño provocado por el pulgón ruso sobre las líneas estudiadas no modificó la expresión del gen *NAC2*. Es así que puede concluirse que las vías metabólicas activadas en las plantas ante la acción de este insecto, en favor de encender sus sistemas defensivos, no involucran la expresión de este gen en particular. Además, los resultados obtenidos en este estudio indican que la

tolerancia al pulgón ruso no se relacionaría con los mecanismos de defensa encendidos por las plantas cuando estos genotipos son tratados con ABA y ET.

La identificación de las funciones de las proteínas NAC en los procesos de estrés bióticos y abióticos es un desafío para los próximos años, así como la individualización de la interacción proteína NAC – gen blanco que se enciende en condiciones de estrés específicas (Nuruzaman *et al.*, 2013). En este sentido, se ha demostrado que el gen *NAC2* actúa en respuesta al estrés inducido por las vías del ET y del ABA en las líneas de trigo analizadas.

Las diferencias encontradas en la expresión del gen *NAC2* en respuesta a los tratamientos hormonales, en las dos líneas recombinantes dihaploides de trigo, indican que esa pequeña porción de la región telomérica del cromosoma 6AS está relacionada con este comportamiento diferencial. El gen *NAC2* localizado en dicha región se expresa de manera diferencial, tanto entre tratamientos como en los genotipos de las líneas M y P estudiados. En definitiva, en base a los resultados obtenidos se podría afirmar que las respuestas contrastantes halladas entre los progenitores, ante los tratamientos con ABA y ET, estarían reguladas por esa estrecha porción flanqueada por los microsatélites *Xgwm459* y *Xgwm334a* que representa la única porción variable entre ambos genotipos. En conclusión, esa porción flanqueada por dichos microsatélites sobre el cromosoma 6AS, única porción que puede explicar la variabilidad entre ambos genotipos, sería la responsable de la expresión diferencial encontrada entre ambas líneas.

Queda pendiente aún conocer exactamente la posición del gen *NAC2* en el cromosoma 6A respecto de los microsatélites. El proyecto genoma del trigo que se lleva a cabo actualmente por un consorcio internacional establece que en el corto plazo se terminarán de ensamblar los fragmentos (*contigs*) del cromosoma 6A y el mapa completo del trigo estará disponible. La publicación del mapa genómico del trigo permitiría conocer qué otros genes importantes se encuentran en esta región y validar mediante estudios de expresión genética su posible influencia en las diferencias fenotípicas halladas entre las dos líneas.

Conclusiones

- La línea M evidenció la sobre-expresión del gen *NAC2* por efecto del ABA, mientras que en el caso de la línea P se observó por efecto del ET.
- El ataque del pulgón no provoca mermas ni incrementos en la expresión del gen candidato, lo que estaría poniendo en evidencia la tolerancia de estas líneas progenitoras al áfido.
- La tolerancia a pulgón ruso no estaría mediada ni por ET, ni por ABA.
- La publicación del mapa completo del trigo permitirá avanzar con la localización del gen *NAC2* en relación con los microsatélites Xgwm459 y Xgwm334a en el cromosoma 6AS del trigo. La identificación del gen *NAC2* como gen regulador involucrado con la tolerancia de ciertos individuos al estrés biótico, permitirá su empleo como marcador altamente asociado en la selección de genotipos tolerantes.

Bibliografía

- Aida, M., T. Ishida, H. Fukaki, H. Fujisawa & M. Tasaka. 1997. Genes Involved in Organ Separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon Mutant. *The Plant Cell* 9: 841-857.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers & D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Baron, C & P.C. Zambryski. 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? *Annual Review of Genetics* 29: 107-129.
- Brunner, A., I. Yakovlev & S. Strauss. 2004. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biology* 4: 14.
- Bu, Q., H. Jian, C.B. Li, Q. Zhai, J. Zhang & X. Wu. 2008. Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid signaled defense responses. *Cell Research* 18: 756-767.
- Bu, Q., H. Li, Q. Zhao, H. Jiang, Q. Zhai & J. Zhang. 2009. The *Arabidopsis* RING finger E3 ligase RHA2a is a novel positive regulator of abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. *Plant Physiology* 150: 463-481.

- Cantu, D., B. Yang, K. Li, V. Menzo, D. Fu, M. Chern, P.C. Ronald & J. Dubcovsky. 2013. Comparative analysis of protein-protein interactions in the defense response of rice and wheat. *BMC Genomics* 14:166.
- Chini, V., A. Foka, G. Dimitracopoulos & I. Spiliopoulou. 2007. Absolute and relative real-time PCR in the quantification of *tst* gene expression among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: evaluation by two mathematical models. *Letters in Applied Microbiology* 45: 479-484.
- Collinge, M. & T. Boller. 2001. Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Molecular Biology* 46: 521-529.
- Delessert, C., K. Kazan, I.W. Wilson, D. Van Der Straeten, J. Manners & E.S. Dennis. 2005. The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 43: 745-757.
- Distelfeld, A., S.P. Pearce, R. Avni, B. Scherer, C. Uauy, F. Piston, A. Slade, R. Zhao & J. Dubcovsky. 2012. Divergent functions of orthologous NAC transcription factors in wheat and rice. *Plant Molecular Biology* 78: 515-524.
- Ernst, H.A., A.N. Olsen, K. Skriver, S. Larsen & L.L. Leggio. 2004. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO reports* 5, No. 3.
- Fujita, M., Y. Fujita, Y. Noutoshi, F. Takahashi, Y. Narusaka & K. Yamaguchi-Shinozaki. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 436-442.
- Greve, K., T. La Cour, M.K. Jensen, F.M. Poulsen & K. Shriver. 2003. Interactions between plant RING-H2 and plant-specific NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) proteins: RING-H2 molecular specificity and cellular localization. *Biochemical Journal* 371: 97-108.
- He, X.J., R.L. Mu, W.H. Cao, Z.G. Zhang, J.S. Zhang & S.Y. Chen. 2005. *AtNAC2*, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *Plant Journal* 44: 903-916.
- Hegedus, D., M. Yu, D. Baldwin, M. Gruber, A. Sharpe, I. Parkin, S. Whitwill & D. Lydiate. 2003. Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant Molecular Biology* 53: 383-397.
- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger & R. Watson. 1993. Kinetic Pcr Analysis - RealTime Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Bio-Technology* 11: 1026-1030.

- Hu, H., M. Dai, J. Yao, B. Xiao, X. Li & Q. Zhang. 2006. Overexpressing a NAM, ATAF and CUC(NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings National Academy Science* 103: 12987-12992.
- Hu, R., G. Qi, Y. Kong, D. Kong, Q. Gao & G. Zhou. 2010. Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biology* 10: 145.
- Jensen, M.K., P.H. Hagedorn, M. de Torres-Zabala, M.R. Grant, J.H. Rung & D.B. Collinge. 2008. Transcriptional regulation by an NAC (NAMATAF1,2-CUC2) transcription factor attenuates ABA signaling for efficient basal defence towards *Blumeriagraminis f sp hordei* in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 56: 867-880.
- Jensen, M.K., T. Kjaersgaard, M.M. Nielsen, P. Galberg, K. Petersen, C. O'Shea & K. Skriver. 2010. The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochemical Journal* 426: 183-196.
- Kikuchi, K., M. Ueguchi-Tanaka, K.T. Yoshida, Y. Nagato, M. Matsusoka & H.Y. Hirano. 2000. Molecular analysis of the NAC gene family in rice. *Molecular and General Genetics* 262: 1047-1051.
- Le, D. T., R. Nishiyama, Y. Watanabe, K. Mochida, K. Yamaguchi-Shinozaki & K. Shinozaki. 2011. Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. *DNA Research* 18: 263-276.
- Li, Q.Q., J. Skinner & J.E. Bennett. 2012. Evaluation of reference genes for real-time quantitative PCR studies in *Candida glabrata* following azole treatment. *BMC Molecular Biology* 13: 22.
- Liu, W., X. Zhao, P. Zhang, T.T. Mar, Y. Liu, Z. Zhang, C. Han & X. Wang. 2013. A one step real-time RT-PCR assay for the quantitation of Wheat yellow mosaic virus (WYMV). *Virology Journal* 10:173.
- Livak, K.J. & T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* 25: 402-408.
- Lu, P.L., N.Z. Chen, R. An, Z. Su, B.S. Qi & F. Ren. 2007. A novel drought-inducible gene, ATAF1, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 63: 289-305.
- Miller, G., V. Shulaev & R. Mittler. 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Plant Physiology* 133: 481-489.
- Monroy, A.F., A. Dryanova, B. Malette, D.H. Oren, M. Ridha Farajalla, W. Liu, J. Danyluk, L.W.C. Ubayasena, K. Kane, G.J. Scoles, F. Sarhan & P.J. Gulick. 2007. Regulatory gene candidates and gene expression analysis

- of cold acclimation in winter and spring wheat. *Plant Molecular Biology* 64: 409-423.
- Morrison, T.B., J.J. Weiss & C. Wittwer. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24: 954-962.
- Nakashima, K., L.S. Tran, D. Van Nguyen, M. Fujita, K. Maruyama & D. Todaka. 2007. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress responsive gene expression in rice. *Plant Journal* 51: 617-630.
- Nuruzzaman, M., R. Manimekalai, A.M. Sharoni, K. Satoh, H. Kondoh & H. Ooka. 2010. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene* 465: 30-44.
- Nuruzzaman, M., A.M. Sharoni, K. Satoh, H. Kondoh, A. Hosaka & S. Kikuchi. 2012a. A genome-wide survey of the NAC transcription factor family in monocots and eudicots. En: *Introduction to Genetics– DNA Methylation, Histone Modification and Gene Regulation* (Hong Kong: iConcept Press), ISBN 978-14775549-4-4.
- Nuruzzaman, M., A.M. Sharoni, K. Satoh, A. Moumeni, R. Venuprasad, R. Serraj, A. Kumar, L. Leung, K. Attia & S. Kikuchi. 2012b. Comprehensive gene expression analysis of the NAC gene family under normal growth conditions, hormone treatment, and drought stress conditions in rice using near-isogenic lines (NILs) generated from crossing Aday Selection (drought tolerant) and IR64. *Molecular Genetics and Genomics* 287: 389-410.
- Nuruzzaman, M., A.M. Sharoni & S. Kikuchi. 2013. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Microbiology, Virology* 4: 248.
- Olsen, A.N., H.A. Ernst, L.L. Leggio & K. Skriver. 2005. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *TRENDS in Plant Science* 10: 2.
- Ooka, H., K. Satoh, K. Doi, T. Nagata, Y. Otomo, K. Murakami, K. Matsubara, N. Osato, J. Kawai, P. Carninci, Y. Hayashizaki, K. Suzuki, K. Kojima, Y. Takahara, K. Yamamoto & S. Kikuchi. 2003. Comprehensive Analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research* 10: 239-247.
- Paolacci, A., O. Tanzarella, E. Porceddu & M. Ciaffi. 2009. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology* 10: 11.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002-2007.

- Pfaffl, M.W., G.W. Horgan & L. Dempfle. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30: 1-10.
- Podzimská-Sroka, D., C. O'Shea, P.L. Gregersen & K. Skriver. 2015. NAC Transcription Factors in Senescence: From Molecular Structure to Function in Crops. *Plants* 4: 412-448.
- Riechmann, J.L., J. Heard, G. Martin, L. Reuber, C.Z. Jiang, J. Keddie, L. Adam, O. Pineda, O.J. Ratcliffe, R.R. Samaha, R. Creelman, M. Pilgrim, P. Broun, J.Z. Zhang, D. Ghandehari, B.K. Sherman & G.L. Yu. 2000. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.
- Rushton, P.J., M.T. Bokowiec, S. Han, H. Zhang, J.F. Brannock & X. Chen. 2008. Tobacco transcription factors: novel insights into transcriptional regulation in the Solanaceae. *Plant Physiology* 147: 280-295.
- Sablowski, R.W.M. & E.M. Meyerowitz. 1998. A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell* 92: 93-103.
- Schmittgen, T., B. Zakrajsek, A. Mills, V. Gorn, M. Singer & M. Reed. 2000. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Analytical Biochemistry* 285: 194-204.
- Sindhu, A., S. Chintamanani, A.S. Brandt, M. Zanis, S.R. Scofield & G.S. Johal. 2008. A guardian of grasses: specific origin and conservation of a unique disease-resistance gene in the grass lineage. *Proceedings National Academy of Science* 105: 1762-1767.
- Souer, E., A. van Houwelingen, D. Kloos, J. Mol & R. Koes. 1996. The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordial boundaries. *Cell* 85: 159-170.
- Sperotto, R.A., F.K. Ricachenevsky, G.L. Duarte, T. Boff, K.L. Lopes & E.R. Sperb. 2009. Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of *OsNAC5*, a new ABA-dependent transcription factor. *Planta* 230: 985-1002.
- StatSoft, Inc. 2005. Statistica (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com.
- Tenea, G.N., A. Peres Bota, F. Cordeiro Raposo & A. Maquet. 2011. Reference genes for gene expression studies in wheat flag leaves grown under different farming conditions. *BMC Research Notes* 4:373.
- Thellin, O., W. Zorzi, B. Lakaye, B. De Borman, B. Coumans, G. Hennen, T. Grisar, A. Igout & E. Heinen. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* 75: 291-295.

- Tran, L.S., K. Nakashima, Y. Sakuma, S.D. Simpson, Y. Fujita & K. Maruyama. 2004. Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress inducible NAC transcription factors that bind to a drought responsive *cis*-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* 16: 2481-2498.
- Van Guilder, H.D., K.E. Vrana & W.M. Freeman. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 44: 619-626.
- Voitsik, A.M., S. Muench, H.B. Deising & L.M. Voll. 2013. Two recently duplicated maize NAC transcription factor paralogs are induced in response to *Colletotrichum graminicola* infection. *BMC Plant Biology*, 13: 85.
- Xia, N., G. Zhang, X.Y. Liu, L. Deng, G.L. Cai & Y. Zhang. 2010a. Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Molecular Biology Reports* 37: 3703-3712.
- Xia, N., G. Zhang, Y.F. Sun, L. Zhua, L.S. Xub & X.M. Chen. 2010b. *TaNAC8*, a novel NAC transcription factor gene in wheat, responds to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 394-402.
- Xie, Q., A.P. Sanz-Burgos, H. Guo, J.A. García & C. Gutiérrez. 1999. GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Molecular Biology* 39: 647-56.
- Xie, Q., G. Frugis, D. Colgan & N.H. Chua. 2000. Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes and Development* 14: 3024-3036.
- Yamaguchi, M., M. Kubo, H. Fukuda & T. Demura. 2008. Vascular related NAC-DOMAIN7 is involved in the differentiation of all types of xylem vessels in Arabidopsis roots and shoots. *Plant Journal* 55: 652-664.
- Yokotani, N., T. Ichikawa, Y. Kondou, M. Matsui, H. Hirochika & M. Iwabuchi. 2009. Tolerance to various environmental stresses conferred by the salt-responsive rice gene ONAC063 in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 229: 1065-1075.
- Yoshii, M., M. Yamazaki, R. Rakwal, M. Kishi-Kaboshi, A. Miyao & H. Hirochika. 2010. The NAC transcription factor RIM1 of rice is a new regulator of jasmonate signaling. *Plant Journal* 61: 804-815.
- Zheng, X., B. Chen, G. Lu & B. Han. 2009. Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379: 985-989.

Conclusiones generales

Se lograron los objetivos propuestos, en el desarrollo de esta tesis:

- se inició la caracterización de un grupo de líneas DHR a nivel de proteínas isoenzimáticas.
- se determinó que el tratamiento con la hormona ET generó mayor variación en el patrón de estearasas reveladas en parte aérea de los materiales evaluados.
- Luego, a partir del análisis de las dos líneas de trigo (M y P) seleccionadas por ser contrastantes para los marcadores *Xgwm334a* y *Xgwm459*, ambos ubicados en el cromosoma 6AS, se estableció que la línea M fue tolerante ante el tratamiento con ET. Por el contrario, la línea P se caracterizó como susceptible al ET debido a su menor tasa de crecimiento del coleoptilo.
- Posteriormente, en las generaciones F₂ y F₃ se evidenció la variabilidad esperada en la tasa de crecimiento del coleoptilo por efecto del ET, habiéndose obtenido individuos tolerantes, medios y susceptibles.
- En la evaluación de los sistemas antioxidantes ácido ascórbico y peroxidasas, el grado de tolerancia al estrés biótico no se relacionó con una actividad diferencial del ácido ascórbico en respuesta a dicho estrés, ni por un mayor contenido intrínseco de peroxidasas para las líneas y las condiciones ensayadas.
- Además, se pudo demostrar que las defensas fueron inducidas a partir de un grupo de plantas F₃ caracterizado de acuerdo a su crecimiento diferencial luego de los tratamientos exógenos con las hormonas AJ y ABA, mediante los cambios observados en el contenido de clorofila y en el rebrote pos corte. Aquellas plantas que evidenciaron valores superiores al de sus testigos en estos parámetros serían las que lograron encender sus sistemas de defensa eficientemente, sobreponerse al mayor costo metabólico que implica el mantenimiento de dicho sistema y, en consecuencia, crecer diferencialmente.
- Finalmente, puede afirmarse que los genes responsables del crecimiento compensatorio fueron inducidos por la aplicación externa de las fitohormonas AJ y ABA.

A partir de lo expuesto, se pudo comprobar la hipótesis que planteaba que **los genes que aportan al crecimiento compensatorio son inducibles por tratamientos exógenos con fitohormonas.**

Por otro lado, la inducción de las defensas de las plantas por efecto del pulgón ruso fue evaluada a través de los cambios en el contenido de clorofila, la tasa de crecimiento, el peso fresco, el estriado y el enrollamiento de las hojas de las distintas generaciones filiales. Se pudo comprobar que la acción del pulgón ruso sobre las líneas progenitoras M y P y sobre sus descendientes F₁ y F₂ afectó diferencialmente los parámetros de crecimiento de estos genotipos. Por lo tanto, **se comprueba la hipótesis formulada en tanto que puede afirmarse que los genes responsables de crecimiento compensatorio son inducidos por la infestación con el pulgón ruso del trigo.**

Además, dado que los progenitores M y P a partir de cuyo cruzamiento se obtuvieron las filiales evaluadas sólo se diferencian en ser contrastantes para los microsatélites citados, se comprobó que **los genes que determinan el crecimiento compensatorio bajo infestación se ubican en las mismas regiones cromosómicas que aquellos genes que son elicitados por hormonas, siendo activados por estos.**

Por último, se pudo comprobar que la aplicación exógena de los tratamientos hormonales en su rol de inductores de defensas propias del estrés biótico, modificó la expresión del gen *NAC2*. La sobreexpresión de dicho gen por efecto del ABA en la línea M y por efecto del ET en la línea P permite suponer que este factor de transcripción que funciona en la región promotora del/de los gen/genes flanqueantes a los marcadores *Xgwm334a* y *Xgwm459* en el cromosoma 6AS estarían regulando el comportamiento diferencial de ambas líneas ante los tratamientos aplicados.

En definitiva, la hipótesis que planteaba que **los genes que aportan al crecimiento compensatorio pueden ser mapeados y secuenciados** se pudo probar parcialmente. A través del estudio de la expresión del gen *NAC2* se comprobó que dicha expresión se ve afectada diferencialmente por los tratamientos hormonales en las líneas M y P. Dado que el mapa del trigo no está aún disponible y que sólo se ha logrado obtener información mediante alineamientos *on line* y a través de las secuencias de los *contigs* sin ensamblar, no se tiene certeza de la secuencia exacta del gen/ de los genes flanqueados

por los marcadores *Xgwm334a* y *Xgwm459*. Sin embargo, ***se puede asegurar que un factor de transcripción NAC estaría actuando en la región reguladora del/de los gen/genes abarcados en el fragmento comprendido entre los marcadores microsatélites citados.***

Finalmente, la identificación del gen *NAC2* cercano a los microsatélites *Xgwm459* y *Xgwm334a* en el cromosoma 6AS del trigo permitirá su empleo como marcador altamente asociado para la identificación de plantas tolerantes al estrés.

La utilización de las defensas de las plantas en la mejora de los cultivos resulta promisorio desde el punto de vista ecológico. El hecho de comprender la naturaleza de la expresión de los genes relacionados con las características defensivas de las plantas será de importancia en la identificación de plantas cultivadas tolerantes a los herbívoros, con la consecuente disminución de pesticidas tóxicos empleados normalmente para el control de las plagas en los cultivos.