

Tesis Doctoral

Análisis de plantas transgénicas ATEMYB32::IPT de pasto miel (Paspalum dilatatum Poir.) una gramínea C4

Viñas, Ezequiel Santiago

2015-04-13

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Viñas, Ezequiel Santiago. (2015-04-13). Análisis de plantas transgénicas ATEMYB32::IPT de pasto miel (Paspalum dilatatum Poir.) una gramínea C4. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Viñas, Ezequiel Santiago. "Análisis de plantas transgénicas ATEMYB32::IPT de pasto miel (Paspalum dilatatum Poir.) una gramínea C4". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-04-13.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Análisis de plantas transgénicas *ATMYB32::IPT*
de pasto miel (*Paspalum dilatatum* Poir.) una
gramínea C₄**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área de Ciencias Biológicas

Lic. Ezequiel Santiago Viñas

Director de tesis: Dr. Gustavo Enrique Schrauf

Director Asistente: Dr. Sergio Claudio Ghio

Consejero de Estudios: Dr. Alejandro Néstor Mentaberry

Lugar de trabajo: Cátedra de Genética, Facultad de Agronomía, UBA

Fecha de defensa: 13/4/2015

Análisis de plantas transgénicas *ATEMYB32::IPT* de pasto miel (*Paspalum dilatatum* Poir.) una gramínea C₄.

Resumen

En plantas forrajeras como *Paspalum dilatatum* Poir, la senescencia foliar es un proceso que afecta su producción y especialmente su calidad. Una estrategia molecular para retrasar la senescencia mediante la ingeniería genética se basa en la expresión de la secuencia codificante de la isopentenil transferasa (IPT), enzima clave en la biosíntesis de citoquininas. Para lograrlo se utilizan promotores con expresión no constitutiva que permitan la producción autorregulada de citoquininas. Se analizó el efecto de la incorporación vía transgénesis de la construcción quimérica *ATEMYB32::IPT* en clones de *Paspalum dilatatum* cv “Relincho”. Se estudiaron 8 eventos obtenidos mediante transformación biolística con controles isogénicos, dos provenientes de cultivo de tejido que no incorporaron al transgén después de la transformación biolística y uno de campo. Los individuos fueron propagados vegetativamente para generar réplicas que permitieron estimar la respuesta de los eventos a diferentes condiciones de estrés abiótico (deficiencias hídricas y temperaturas bajas extremas). Se realizaron análisis moleculares, PCR para amplificar el transgén *ipt*, complementándose esta información con la medición del nivel de citocininas y auxinas por HPLC. Se caracterizaron a las líneas transgénicas desde su comportamiento germinativo, su anatomía foliar y la ultraestructura de los cloroplastos. En todas las plantas ensayadas se estimó el contenido de clorofila, azúcares, proteínas totales y actividad de la enzima SOD. Se halló un mayor nivel de citocininas y de la relación citocininas/auxinas en plantas transgénicas respecto a los controles y variabilidad entre los eventos analizados. A niveles anatómico y ultraestructural se encontraron características distintivas de las líneas transgénicas. Además algunos de los eventos obtenidos mostraron una mayor resistencia a ambas condiciones de estrés y un mejor comportamiento germinativo. Se generaron conocimientos para comprender el efecto de la incorporación del transgén *ATEMYB32::IPT* en especies C₄.

Palabras claves: *IPT*, *Paspalum*, citocininas, transgén, *ATEMYB32*.

***ATEMYB32::IPT* transgenic plants analysis of Dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.) a C₄ grass.**

Abstract

Summary:

Leaf senescence is a process that affects the production and quality of fodder plant such as *Paspalum dilatatum* Poir. In order to delay the senescence, there is a molecular strategy which consists on using genetic engineering. It uses the sequence encoding isopentenyl transferase (IPT), a key enzyme in the biosynthesis of cytokinins. Promoter with expression non constitutive are used to allow the self –regulated production of cytokinin. The effect of incorporation of transgenesis via *ATEMYB32::IPT* chimeric construct was analyzed in clones of *Paspalum dilatatum* cv " Relincho ". Eight events obtained by biolistic transformation and isogenic controls were studied. Two of them came from tissue culture with transformation biolistic which they did not incorporate to the transgenic after the biolistic conversion and also a third coming from field. The individuals were spread in a vegetative way to obtain replicates for estimating the response of different events under abiotic stress conditions (water deficits and frost). In addition, molecular analyzes were performed PCR to amplify the ipt transgene. This information was complemented with measures of cytokinins and auxins by HPLC. Transgenic Lines were characterized considering the germination behaviour, leaf anatomy and chloroplast ultrastructure. Content of chlorophyll, sugars, total protein and SOD enzyme activity was estimated in all plants under analysis. Higher levels of cytokinins were found in transgenic plants compared to the controls and variation in the analyzed events. Distinctive features of the transgenic lines were found in the anatomic and ultrastructural level. Furthermore some of the obtained events showed a higher resistance to stress conditions and a better germination behavior. Knowledge was developed in order to understand the effect produced by the incorporation of the transgene *ATEMYB32::IPT* in C₄ specie.

Key Words: *IPT*, *Paspalum*, cytokinins, transgene, *ATEMYB32*.

Agradecimientos

A mi esposa Gaby y a mis hijas, Belén y Camila, por su paciencia, tiempo y colaboración.

A mi codirector Sergio Ghio y mi director Gustavo Schrauf por la paciencia y el apoyo todos estos años.

A mi tutor, por sus aportes invaluableles.

A Mirta Arriaga por su permanente colaboración y buena voluntad.

A Beatriz Galati y Sonia Rosenfeld por su colaboración y asesoramiento.

A Pablo Prystupa por su colaboración.

A mi hermana Melanie y mi mamá por su apoyo desde siempre en lo que elegí.

A mi papá que me acompaña desde el cielo en todo momento.

A mis suegros, por su apoyo y compañía.

A mis cuñados y sobrinos, por estar siempre presentes.

A mis amigos que siempre me apoyaron y “cuestionaron” a las transgénicas, en especial; Esteban, Nadia, Federico, Guillermina, María, Mariano, Lorena, Sol, Noelia, Martín, Ariel, Mariano, Giselle.

A mis compañeros de la Cátedra, por el tiempo compartido.

Dedicada a mis tres soles

Índice

Resumen en castellano	1
Resumen en inglés	2
Agradecimientos	3
Dedicatoria	4
Introducción	7
1. Antecedentes	9
1.1 Hormonas relacionadas con el gen <i>IPT</i> : Citocininas	9
1.2 Biosíntesis de citocininas	9
1.3 La senescencia vegetal	11
1.4 Bases moleculares de la senescencia foliar	14
1.5 El comportamiento stay green	15
1.6 El gen <i>ipt</i> de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en la biosíntesis de Citocininas	17
1.7 Funcionamiento del promotor <i>ATMYB32</i>	22
1.8 La anatomía en relación con el estrés abiótico y las hormonas	22
1.9 Glucosa y su relación con la senescencia	23
1.10 Relación entre senescencia vegetal y proteínas	24
1.11 Relación entre senescencia vegetal y la enzima superóxido dismutasa (SOD)	25
2.1 Hipótesis	26
2.2 Objetivos	26
3. Materiales y métodos	27
3.1 Generación de material vegetal	27
3.2 Transformación de material vegetal	29
3.3 Extracción de ADN de material vegetal	33
3.4 Análisis por PCR	35
3.5 Extracción de azúcares solubles de tejidos vegetales	35
3.6 Medición de glucosa en hojas	36
3.7 Extracción de proteínas de tejidos vegetales	36
3.8 Determinación de la concentración de proteínas	36
3.9 Anatomía	36
3.10 Ensayo de Germinación	38
3.11 Medición de citoquininas y auxinas	38
3.12 Estimación de concentración de clorofila	39
3.13 Determinación de actividad de superóxido dismutasa (SOD)	39
3.14 Ultraestructura del cloroplasto	39
3.15 Ensayo de frío	40
3.16 Ensayo de tolerancia a sequía	42
4. Resultados	44
4.1 Resultado bombardeo	44
4.2 Contenido de citocininas	44
4.3 Germinación	46
4.3.1 Curva de germinación	46
4.3.2 Velocidad inicial de germinación	50
4.3.3 Porcentaje de germinación	52
4.4 Anatomía	54
4.4.1 Anatomía Foliar	54
4.4.2 Caracteres exomorfológicos	57

4.4.3 Ultraestructura del cloroplasto	58
4.5 Clorofila en ensayo de sequía	60
4.6 Resultados proteína sequía	61
4.7 Resultados glucosa sequía	62
4.8 Resultados SOD sequía	63
4.9 Resultados macollos vivos ensayo de sequía	64
4.10 Resultados macollos senescentes y en senescencia	65
4.11 Clorofila ensayo de heladas	67
4.12 Resultados proteína ensayo de heladas	68
4.13 Resultados glucosa ensayo de heladas	69
4.14 Resultados SOD ensayo de heladas	70
4.15 Resultados mortandad foliar	71
4.16 Resultados hojas senescentes y porcentaje daño foliar	71
5. Discusión	72
6. Conclusiones	79
7. Bibliografía	82

INTRODUCCIÓN

El género *Paspalum* L. pertenece, dentro de la familia Poaceae, a la subfamilia Panicoideae y a la tribu Paspaleae; comprende un alto número de especies, principalmente de regiones tropicales y subtropicales del continente americano, con algunas en el viejo mundo. (Clayton y Renvoize, 1986). Su importancia radica, no sólo por su abundancia de especies, sino también por su amplia distribución, su relevancia en diversos ecosistemas y fundamentalmente por el interés económico que tienen muchas de sus especies. América del Sur tiene una alta concentración de especies en Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina. En nuestro país, se presenta mayor diversidad específica en las regiones del NE y NOA. Este género comprende hierbas perennes, rara vez anuales, cespitosas, bajas a muy robustas, a veces rastreras, estoloníferas o rizomatosas, de hojas tiernas a muy duras. Se diferencia de otros miembros de la tribu por presentar inflorescencias con racimos espiciformes, unilaterales; articulación de la espiguilla en la base junto al pedicelo; espiguillas solitarias o apareadas en 2 a 4 hileras, abaxiales, plano convexas, a veces biconvexas o cóncavo-convexas; gluma inferior usualmente ausente y antecio superior endurecido, orbicular, obovoide a lanceolado. Numerosas especies de este género son consideradas excelentes forrajeras naturales, algunos ejemplos son: *P. dilatatum* Poir (“pasto miel”), *P. notatum* Flügge (“pasto horqueta”) y *P. guenoarum* Arechav. (“pasto rojas”), también cultivadas para formar pasturas perennes. También algunas especies como *P. nicorae* Parodi y *P. sauriae* (Parodi) Parodi son apreciadas por prosperar en suelos arenosos (Aliscioni, 1999).

Zuloaga y Morrone (2005), realizaron una revisión taxonómica completa para las especies de América del Sur Austral estimándose su número en 330-350 para todo el género (Zuloaga & Morrone, 2005; Rua et al. 2010; Scataglini et al. 2014), Para el género *Paspalum*, se han propuesto clasificaciones infragenéricas formando grupos de especies con límites confusos; fundamentalmente los caracteres usados fueron exomorfológicos a nivel de la inflorescencia y la espiguilla (Aliscioni, 1999).

Paspalum dilatatum es una especie forrajera nativa estival de alto valor productivo (Fig.1 A-C). Su inclusión en pasturas cultivadas con especies templadas, implica incrementos de alrededor del 30% en la producción (Acosta et al., 1994). En pastizales de la Depresión del Salado un incremento de 5 al 15% en su frecuencia, implicaría un aumento del 100% en la producción de forraje (Schlichter et al., 1982). El

pasto miel presenta un sistema reproductivo apomíctico, la descendencia de una planta no presenta variación para combinar características. Esta desventaja para el mejoramiento clásico es una ventaja para la transgénesis, porque una vez hallado un material sobresaliente el mismo no segrega, además sería un modo de controlar el flujo génico. La ingeniería genética permite el acceso a genes de utilidad agronómica probada, la generación de nuevas variantes, y la modificación de ciertos rasgos a través del control de la expresión de estos genes (Spangenberg *et al.*, 1998). La regeneración de plantas de *P. dilatatum* y *P. notatum* ha sido lograda a partir de diferentes explantos (Bovo y Mroginski, 1989; Akashi y Adachi, 1992; Burson y Tischeler, 1993). Schrauf y colaboradores (2000), lograron ajustar un protocolo robusto de regeneración, aplicable a un número alto de genotipos, a partir de embriones maduros. Además, en estudios siguientes, se obtuvo un protocolo eficiente de transformación biolística (Schrauf *et al.*, 2001; 2002). Al ajustar un protocolo de transformación, es posible acceder a probar la construcción *ATMYB32::IPT* que contiene al promotor *ATMYB32* y el gen de la isopentenil transferasa (*IPT*) que es la primera enzima de la biosíntesis de citoquininas. Estudiar su expresión y consecuencias fisiológicas y anatómicas en estas gramíneas C₄ permitirá conocer el efecto de la sobreproducción de estas fitohormonas en plantas con este metabolismo particular y con respecto a la tolerancia a estrés hídrico y bajas temperaturas, se cuenta con escasa información tanto de su proceso de senescencia como del efecto de la introducción del gen a nivel anatómico, morfológico y fisiológico por lo que este estudio implica relevantes aportes al conocimiento de estas plantas con esta adaptación en la fotosíntesis.



Figura 1. A. Ejemplares de *Paspalum dilatatum* Poir. B. Lote de *P. dilatatum* para producción de semillas. C. Pastura de *P. dilatatum* (“Pasto miel”).

1-Antecedentes sobre el tema

1.1 Hormonas relacionadas con el gen *IPT*: Citocininas

Históricamente, el término citocinina surgió como nombre genérico de una serie de sustancias, naturales o sintéticas, capaces de estimular la división celular en presencia de auxinas. Actualmente sabemos que las citocininas, como las restantes hormonas vegetales, ejercen un amplio abanico de efectos sobre el desarrollo de las plantas. Desde 1882, se creía que la división celular en las plantas estaba controlada por factores químicos endógenos. En 1913, Haberlandt obtuvo las primeras comprobaciones experimentales de esta hipótesis, siendo en 1956 el descubrimiento definitivo de estas hormonas, cuando Miller y colaboradores (perteneía al grupo de Skoog) aislaron la quinentina (6-furfurilaminopurina) a partir del ADN de esperma de arenque sometido a autoclave. El nombre asignado a esta sustancia se basó en su capacidad para promover la división celular (citocinesis) en tejidos vegetales.

La quinentina fue descubierta como resultado de las investigaciones realizadas para identificar factores químicos capaces de estimular la proliferación celular en explantos de médula de tabaco cultivados *in vitro*. El grupo de Skoog comprobó que si estos explantos se cultivaban en un medio enriquecido con auxina, sólo se producía elongación celular. La inducción de división celular únicamente tenía lugar cuando se cultivaba junto con el tejido vascular adyacente, o el medio de cultivo se suplementaba con extractos de tejidos vegetales. En las preparaciones de ADN sometidas a autoclave, la formación de quinentina se produce por una reorganización interna de la desoxiadenosina.

También existe otra hormona sintética llamada BAP (bencil aminopurina)

Muchas evidencias indican que las citocininas están activas a través de todos los estadios de la planta, controlando procesos tan diversos como dominancia apical, formación de raíces, senescencia foliar, comportamiento estomático y desarrollo de los cloroplastos.

1.2 Biosíntesis de citocininas

Hay tres tipos principales de familias de citocininas naturales: la zeatina, isopentenil adenina y dihidrozeatina (Figura 2). Todas ellas derivados de adenina N6-sustituida y

difieren solamente en la composición de la cadena lateral la cual confiere su actividad biológica. Interconversiones con y entre familias pueden ocurrir, e.g., ribotida \Leftrightarrow ribosida \Leftrightarrow bases libres con cada familia, y tipos isopentenil adenina \rightarrow tipos zeatina \rightarrow tipos dihidrozeatina entre familias (Mac Gaw *et al.*, 1988). Tales modificaciones pueden proporcionar la regulación del nivel de actividad biológica de las citocininas porque las bases libres pueden ser las formas más activas de citocininas de cada familia (Laloue y Pathe, 1982).

El paso inicial en la biosíntesis involucra la adición de una cadena lateral de isopentenil a 5'-AMP en la reacción isopentenil pirofosfato + 5'-AMP \rightarrow isopentenil adenina ribótida + pirofosfato (Chen y Melitz, 1979). Estos mismos sustratos que participan en la reacción inicial de la síntesis de citocininas para *Agrobacterium tumefaciens*, se han reportado en *Arabidopsis thaliana*, junto con ATP y ADP, sustratos para los cuales se han determinado 6 enzimas: IPT1, IPT3, IPT4, IPT5, IPT7 e IPT8. Todas estas enzimas IPT tienen en común un sustrato, el isopentenil y afinidad por uno o varios sustratos de adenina, estas reacciones generan una amplia variedad de citocininas (entre ellas la isopentenil adenina) que son precursoras finalmente de la trans-zeatina (Fig.2).

Cuando las hojas alcanzan el máximo desarrollo las citocininas son glicosiladas, y luego exportadas vía floema a otros órganos, como los frutos. También las citocininas pueden degradarse a adeninas y sus derivados por acción de la citocinina oxidasa que remueve la cadena lateral responsable de su actividad (Schmülling, Thomas, et al, 2003)

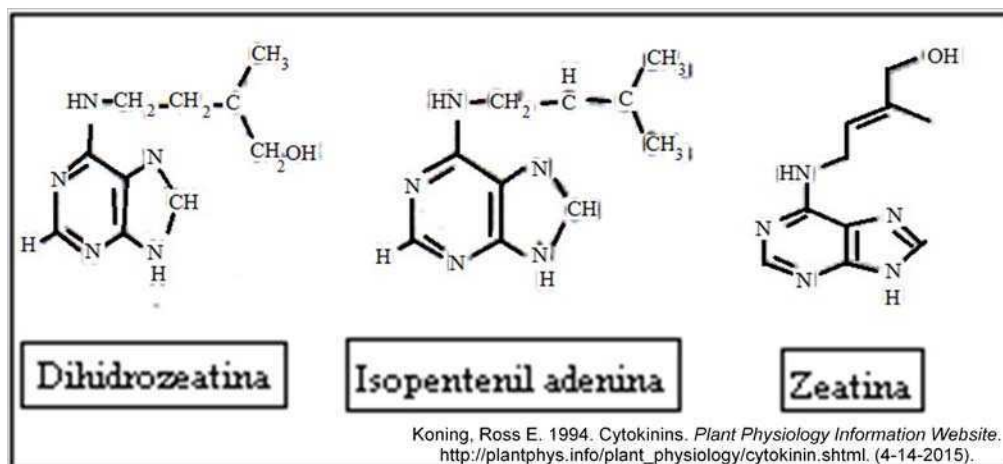


Figura 2. Formas activas de las principales citocininas naturales: dihidrozeatina, isopentenil adenina y zeatina.

1.3-La senescencia vegetal

La senescencia vegetal es la fase final del desarrollo reproductivo y/o vegetativo de un órgano o de la planta completa, y es esencial para el desarrollo normal reproductivo y vegetativo, como también para responder al estrés ambiental. La senescencia es un tipo de muerte celular programada, o universalmente conocida como “programmed cell death” (PCD) o apoptosis, es un proceso dependiente de energía y altamente regulado por distintos genes (Van Doorn. *et al.*, 2004; Gutierrez *et al.*, 2006). Incluye aquellos procesos fisiológicos, bioquímicos y estructurales genéticamente regulados de la muerte de células no deseadas que afecta todos los tejidos vegetales y termina con la muerte de éstos o la abscisión de órganos. Aunque el comienzo de la senescencia está bajo el control de genes específicos, su origen también puede tener causas en: la relación establecida entre órganos de una misma planta, bien sea compitiendo éstos por luz, espacio, translocación de nutrientes y reguladores de crecimiento. También depende de los factores externos o ambientales como la luz recibida (calidad y duración de la radiación), el régimen de temperaturas (temperaturas extremas causan un daño estructural o metabólico), el estado hídrico del entorno (por inundaciones o sequías) (Chavez *et al.*, 1991), el estado nutricional de la planta (la carencia o toxicidad de algunos elementos, principalmente aquellos móviles, pueden provocar senescencia y abscisión de órganos) y la presencia de patógenos (hongos tipo mildiús de cereales) pueden retardar o acelerar la senescencia localizada de los tejidos (Thomas y Stoddart, 1980). La muerte selectiva de las células, tejidos y órganos es un aspecto del desarrollo y supervivencia de la planta; por ejemplo, la senescencia remueve células reciclando parte del carbono, nitrógeno y fósforo. También es importante al contribuir a la formación de tejidos como el aerénquima (en condiciones de hipoxia o anoxia) que permite la difusión más rápida de oxígeno de los brotes hacia las raíces (Salisbury y Ross, 1992).

En cereales las células del endosperma mueren reteniendo su contenido, las células de la aleurona mueren una vez hayan cumplido con su función secretora de enzimas hidrolíticas para digerir el endosperma durante la germinación (Yeung y Meinke, 1993), en la eliminación de las células primordiales de estambres en flores femeninas (Dellaporta y Calderon, 1994), en la eliminación de tres de las cuatro megasporas previo a la formación del saco embrionario (Bell *et al.*, 1996), en la muerte de las sinérgidas y antípodas durante la doble fecundación, también en procesos de adaptación como la

formación de lóbulos, en la diferenciación de elementos traqueales del xilema (xilogénesis) (Fukuda *et al.*, 1997), la cubierta de células de la epidermis de la raíz que protegen al meristema apical durante la germinación (Gattuso y Gattuso) . Existen factores ambientales tanto bióticos como abióticos que pueden desencadenar la senescencia, como la respuesta hiper-sensible al ataque de patógenos (Gutierrez, 2001; Levine *et al.*, 1996), causando muerte celular.

La senescencia es un concepto de gran importancia en la producción vegetal, en cuanto a que una mayor duración de los órganos puede traer potenciales beneficios, antes o después de la cosecha, por ejemplo: menor precocidad en la maduración postcosecha de los frutos climatéricos reduce el comienzo de la senescencia por acumulación de etileno, lo que prolonga su tiempo de mercadeo (Klee *et al.*, 1991), o un retraso en la senescencia de las hojas puede prolongar la vida postcosecha de muchas hortalizas de hoja (McCabe *et al.*, 2001), manteniendo una mayor área fotosintética e incrementando la acumulación de materia seca, en especies forrajeras pueden aumentar la cantidad y calidad nutricional del forraje (Kingston *et al.*, 2002).

La senescencia foliar es el último estadio en el desarrollo ontogénico de una hoja y está bajo el control conjunto de genes específicos, tanto nucleares como plastídicos, asimismo los factores ambientales como la temperatura, estrés hídrico, fotoperiodo y otros pueden alterar este proceso (Thomas y Stoddart, 1980; Gepstein *et al.*, 2004; Zapata *et al.*, 2005; Baruch y Fisher, 1991). Muchos de los “genes asociados a la senescencia” codifican hidrolasas, o enzimas involucradas en la síntesis de aminoácidos exportables (v.g., asparagina), pero otros tienen un rol regulador.

El primer síntoma distintivo de la senescencia foliar es la pérdida gradual del color verde del follaje y su capacidad fotosintética, debido al desmantelamiento de los cloroplastos, acompañado de la degradación de las proteínas incluyendo muchas enzimas, de la clorofila, reducción de síntesis de ARN y transporte de nutrientes hacia las hojas. El proceso de la senescencia foliar comprende básicamente un período inicial donde se reciclan o redistribuyen los nutrientes, e implica principalmente la degradación de los cloroplastos y la exportación del N y otros nutrientes liberados hacia otros órganos de reserva y un proceso final de muerte celular una vez que la redistribución de nutrientes ha sido completada. (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999).

La senescencia foliar está regulada por un balance hormonal entre los niveles de citocininas y etileno, y se caracteriza por la transición entre la asimilación de nutrientes y la movilización de éstos. Es por ello que las citocininas se usan comercialmente para mantener más tiempo el color verde de las hojas de hortalizas hasta que se consuman.

El ácido abscísico, ABA, también participa en la respuesta de las plantas al estrés hídrico, promoviendo el cierre estomático, y bajo estrés severo la senescencia de las hojas, bien sea por efecto propio o favoreciendo la biosíntesis de etileno. Además de cumplir con funciones regulatorias en la iniciación y mantenimiento de la dormición de semillas (promoviendo la tolerancia a la desecación del embrión y acumulación de reservas) y botones florales, influye en otros aspectos del desarrollo vegetal por interacción, usualmente antagonista, con auxinas, citocininas y giberelinas. El etileno es el principal regulador de la abscisión de hojas y frutos, estimulando la síntesis y secreción de enzimas hidrolizantes de polisacáridos que degradan la pared celular tales como celulasas y pectinasas, este proceso se ve favorecido cuando el etileno está en mayor proporción que las auxinas (Rivero *et al.*, 2010).

Aunque la característica de senescencia foliar puede tener un origen genético (*stay green*) (Thomas y Smart, 1993), la longevidad o tiempo de duración de una hoja con un patrón normal de senescencia, puede ser alterada por las condiciones ambientales tanto bióticas como abióticas durante el ciclo de la planta. Un ejemplo es el estado de la nutrición nitrogenada de la planta; en cereales el nitrógeno del grano es obtenido del tejido vegetativo como hojas y tallo, cuyo estado depende del nitrógeno tomado por la planta (Crafts-Brandner *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1986; Borrell *et al.*, 2001). Las hojas basales de las plantas en cultivo, generalmente senescen y se desprenden cuando éstas son sombreadas por las hojas superiores del dosel, esta reacción de la planta se debe a que estas hojas aportan poco o nada de fotosintatos, por el contrario necesitan consumir fotosintatos para respirar y además transpiran agua, por lo que la planta se adapta al medio, reciclando sus nutrientes y desprendiendo estas hojas (Monsi *et al.*, 1973).

No obstante el proceso de la senescencia puede ser reversible en vegetales mediante tratamientos como: eliminación de flores o frutos, (Salisbury *et al.*, 2000), aplicación exógena de citocininas (Badenoch-Jones *et al.*, 1996), aspersión del follaje con nitrato de amonio y manejo de la cantidad de luz que reciben las hojas (Vonshak y Richmond, 1975).

1.4-Bases moleculares de la senescencia foliar

La expresión de muchos genes asociados a la actividad fotosintética y otros procesos anabólicos son atenuados durante la senescencia, mientras que otros son intensamente expresados. Estos genes sobreexpresados se han clonado a partir de sus ARNs mensajeros y son llamados comúnmente como genes asociados a la senescencia o SAGs, ellos codifican proteínas tales como proteasas, nucleasas, enzimas movilizadoras de lípidos, carbohidratos y nitrógeno, proteínas de respuesta a estrés y reguladores transcripcionales (Buchanan-Wollaston *et al*, 1997; Gepstein *et al.*, 2003).



Figura 3. Secuencia de senescencia de la lamina foliar de *P. dilatatum* en 19 días.

Sin embargo no se puede asumir que todos los genes SAGs responderán a la senescencia inducida por estrés u hormonas, porque la senescencia inducida de esta forma no es idéntica a la senescencia mediada por la edad. Tampoco se puede asumir que todos los genes clonados como SAGs están involucrados en la regulación o procesos catabólicos del síndrome de la senescencia, porque la senescencia regularmente se piensa como estrés celular y algunos SAGs pueden funcionar inicialmente en la protección de las células senescente contra el estrés (Weaver *et al.*, 1998).

La senescencia foliar es un proceso altamente regulado y es influenciado por varios factores internos y externos, incluido la oscuridad. Fujiki y colaboradores (.2001), en *A. thaliana* clonaron cinco ADNc (*DIN2*, *DIN6*, *DIN9*, *DIN10* Y *DIN11*), correspondientes a genes transcritos en hojas mantenidas en la oscuridad. Estos ADNc codifican para proteínas similares a β -Glucosidasa(*DIN2*), asparagina sintetasa (*DIN6*), fosfomanosa isomerasa (*DIN9*), proteína de imbibición de semilla (*DIN10*) y 2-oxoacido dependiente

dioxigenasa (*DIN11*), para los cuales se determinaron que su expresión dependía parcialmente del nivel de azúcar en la células, la cual en las concentraciones presentadas en hojas verdes funcionales, suprime la acumulación de transcritos *DIN*. Resultados similares se encontraron con el gen asociado a la senescencia *SENI*, el cual también es fuertemente transcrito en la oscuridad por estímulo del ácido abscísico, la transcripción y la expresión de su promotor fue altamente suprimida por la adición de sacarosa, glucosa o fructuosa a concentraciones fisiológicas (Chull *et al.*,1997).

1.5-El comportamiento stay green

Stay green es el término general dado a una variante en la cual la senescencia es retardada comparado con un genotipo estándar de referencia. Existen cinco formas de fenotipos stay green: en el tipo A de comportamiento stay green la senescencia es iniciada tarde, pero entonces sucede a una tasa normal, en este tipo hay una correlación muy estrecha entre contenido de clorofila y capacidad fotosintética. En el tipo B, la senescencia se inicia de manera normal en el tiempo pero a una tasa reducida o más lentamente. Los tipos A y B son funcionalmente stay green y puede presentarse después de la alteración de genes involucrados en el tiempo de iniciación de la senescencia y la regulación de su tasa de progreso, respectivamente. En estos dos tipos de comportamiento stay green se continúa fotosintetizando y los cultivos pueden experimentar un incremento en sus rendimientos. En el tipo C el tejido retiene la clorofila más o menos indefinidamente, probablemente por alteración de los genes reguladores del catabolismo de la clorofila como el gen *SID* (Hauck *et al.*, 1997; Macduff *et al.*, 2002), pero la fotosíntesis tiene un patrón normal de reducción, probablemente porque la degradación de Rubisco y otras proteínas solubles del estroma suceden normalmente. Los tipos A, B y C corresponden al comportamiento en tejidos viables, comparado con el tipo D de comportamiento *stay green*, que corresponde a especímenes de herbario o alimentos congelados, los cuales se conservan verdes por ser rápidamente muertos en cosecha. Últimamente, un quinto tipo de comportamiento *stay green* fue reportado, tipo E, donde el contenido de clorofila es más alto de lo normal, siendo el tejido, de color verde intenso aún en la madurez, pero la capacidad fotosintética puede seguir el patrón normal (Fig. 4) (Thomas y Smart, 2000). De los cinco tipos de comportamiento *stay green*, solo los Tipo A y B son funcionales y que pudieran tener potenciales beneficios en el mejoramiento de la cantidad y calidad de los productos agrícolas.

Este tipo de variación natural en la característica de retardo en la senescencia foliar ha sido asociada a la reducción en ataques de patógenos y a un mejor llenado y rendimiento de granos bajo estrés. En sorgo se han obtenido correlaciones positivas significativas ($r=0.75$) entre la característica *stay green* de plantas sometidas a sequía post-floración y rendimiento en grano. Por lo tanto, la característica *stay green* es explotada en los programas de mejoramiento de los cultivos como sorgo (Mahalakshmi y Bidinger, 2002), en el que es una característica valiosa para mejorar la adaptación de genotipos a condiciones de estrés por sequía postfloración en el llenado y la madurez del grano.

Una mayor duración de la hoja verde durante el llenado de granos en sorgo, parece ser producto de la combinación de tres distintos factores: área verde de la hoja durante la floración, tiempo de comienzo de la senescencia y la tasa a la que transcurre la senescencia. Los genotipos *stay green* continúan el llenado de granos normalmente bajo sequía y exhiben un incremento en la resistencia a la pudrición por carbón, además contienen más citocininas y azúcares en los tallos que los genotipos senescentes. Esta mayor acumulación de azúcares solubles en los genotipos *stay green* está asociada con una mayor área de hoja funcional durante el llenado de grano, por lo tanto reducen su dependencia de los asimilados del tallo para el llenado de grano. Sin embargo este comportamiento *stay green* funcional, depende en gran medida del estado de la nutrición nitrogenada de la planta, durante la senescencia las proteínas son degradadas y los aminoácidos son transportados fuera de la hoja hacia otra parte de la planta (Van Oosterom *et al.*, 1996; Borrell *et al.*, 2000).

La característica *stay green* también puede modificar la distribución temporal de la actividad reproductiva. Gwathmey y colaboradores (1992), determinaron en genotipos de frijol caupí, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., con la característica de retardo en la senescencia foliar DLS (delayed-leaf-senescence), que estos genotipos producían por dos temporadas legumbres comparados con la típica distribución reproductiva monomodal de los genotipos senescentes. Después de la primer temporada de producción de legumbres se lograba una alta tasa de supervivencia foliar de 53 a 98%, con lo que las plantas podrían entrar en producción por segunda vez, generando estas dos temporadas de fructificación, un mayor rendimiento final.

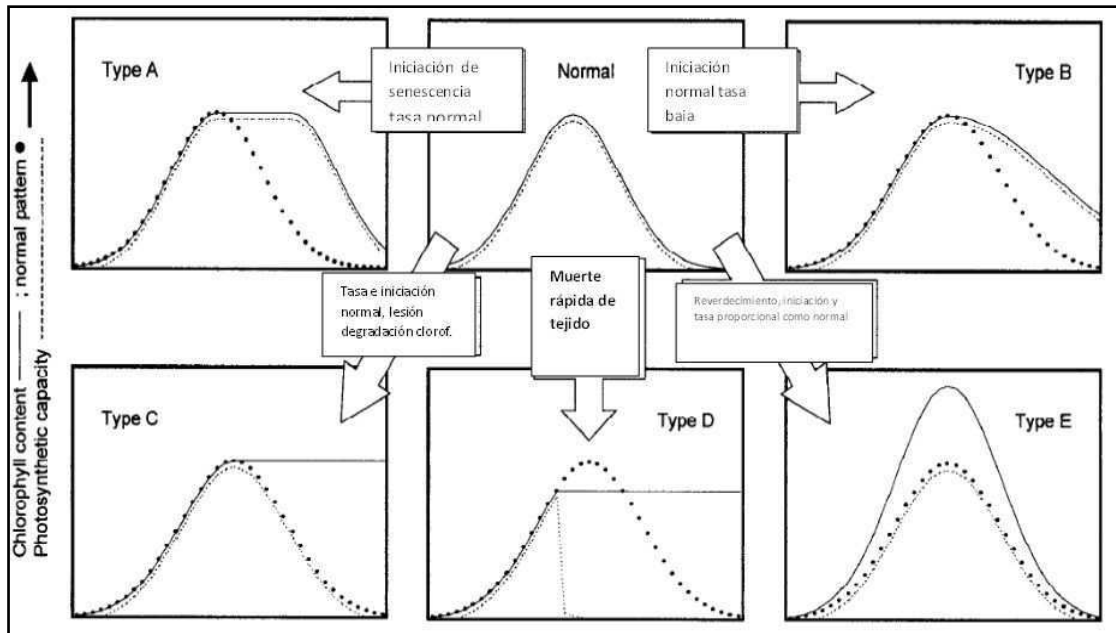


Figura 4. Clasificación de las diferentes formas de comportamiento stay green del follaje, en función del contenido de clorofila y la actividad fotosintética (Thomas y Smart, 2000)

1.6 El gen *IPT* de *Agrobacterium tumefaciens* en la biosíntesis de citocininas

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria patógena de un amplio rango de plantas dicotiledóneas y es causante de la enfermedad agalla de la corona, (De Cleene y De Le, 1976; Escobar y Dandekar, 2003), esta bacteria lleva a cabo la infección mediante la transferencia de un fragmento de ADN (ADN-T) de un plásmido virulento llamado Ti al genoma vegetal. El ADN-T insertado contiene principalmente genes que codifican para la síntesis de fitohormonas tipo citocininas y auxinas (Fig. 5), y genes codificadores de enzimas que causan que la planta produzca aminoácidos especializados llamados opinas, que son una fuente de energía específica para *A. tumefaciens*. De los genes de la síntesis de fitohormonas se han identificado los loci *TMR*, *TMS* Y *TML*, que afectan la morfología del tumor (Ream *et al.*, 1983).

Posteriormente se determinó que el locus *TMR* codifica para la enzima de 27-kDa llamada Δ^2 -isopentenyl pyrophosphate:5'-AMP Δ^2 isopentenyltransferase, conocida como isopentenyl transferasa (*ipt*), la cual cataliza el paso inicial en la biosíntesis de citocininas, el producto de esta reacción es isopentenyladenosina 5' monofosfato (iPMP), la cual por defosforilación es rápidamente convertida a citocininas tipo Isopentenyl como la isopentenyladenina (iP), (Barry, 1984; Akiyoshi *et al.*, 1984; Golberg *et al.*, 1984) la cual es precursor de la citocinina trans-zeatina (Fig. 6).

Desde que se establecieron las bases (Akiyoshi *et al.*, 1983) y se determinó el producto de la expresión del gen *IPT*, éste se ha utilizado para varios propósitos ligándose a varios tipos de promotores inducibles por factores físicos (temperatura, luz), químicos (antibióticos) o propios de eventos fisiológicos de la planta (senescencia) (Walden *et al.*, 1997). Uno de los promotores más estudiado ligado al gen *IPT* ha sido el de un gen asociado a la senescencia *SAG12*, de *Arabidopsis thaliana* (L.), el cual es responsable de la regulación específica de la senescencia, transcribiéndose abundantemente en hojas senescentes (Lohman *et al.*, 1994), este promotor contiene al menos dos regiones que son importantes para su completa actividad (Sun-Noh y Amasino, 1999).

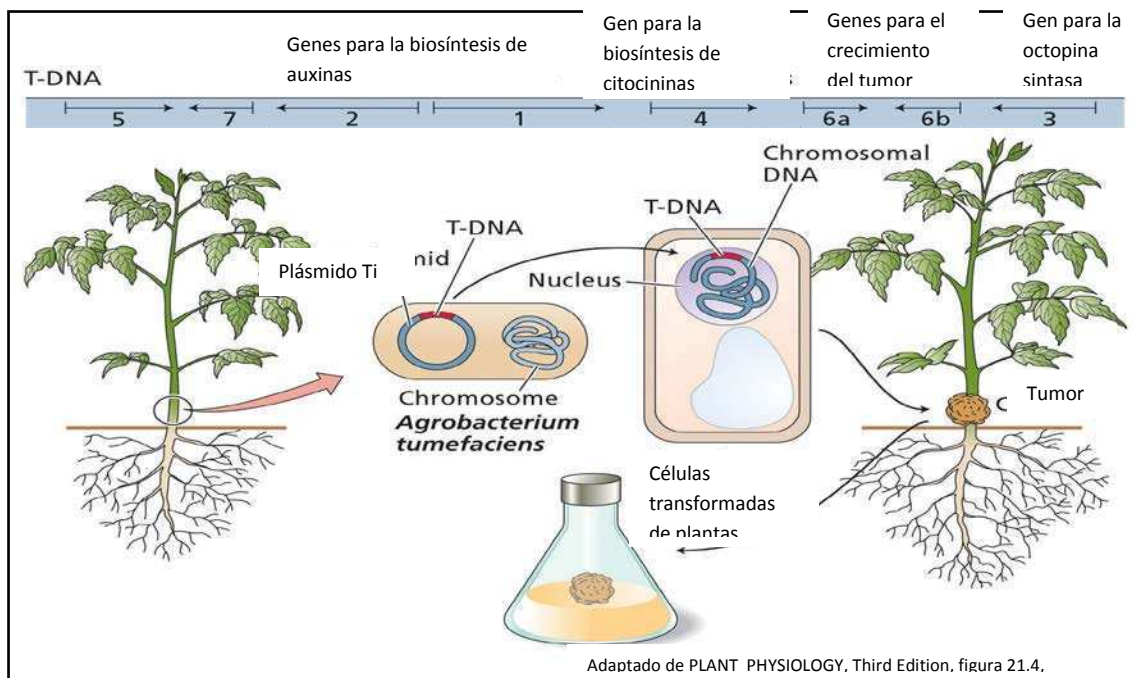


Figura 5. Transferencia de genes de síntesis a una planta por infección bacteriana

Dado los efectos fisiológicos de las citocininas, se ha hecho intentos de incorporar el gen *IPT* a especies comerciales, en las cuales la senescencia producida por factores externos o propios de la planta, es considerada como un factor limitante. Gan y Amasino (1995) probaron la construcción *SAG12::IPT*, en transformación genética de tabaco y establecieron un sistema autoregulatorio activado, en el comienzo de la senescencia. El promotor *SAG12*, altamente específico de la senescencia, puede activar la expresión del gen *IPT* cuyo producto es la enzima isopenteniltransferasa, la cual incrementa el contenido de la citocinina isopentenil adenina a un nivel que previene la senescencia de las hojas, luego sin estímulo de la senescencia se atenúa la expresión del

promotor *SAG12* para prevenir la sobreproducción de citocininas (Fig. 7). Los efectos de la expresión regulada del gen *IPT* se reflejaron en un significativo retraso en la senescencia foliar acompañado de una prolonga actividad fotosintética, lo que produjo un incremento del 50% en el peso seco de la planta y en la producción de semillas, como también un mayor número de flores. Además se estableció por medio de injertos recíprocos entre plantas *SAG12::IPT* y plantas control que no hubo translocación de la enzima isopenteniltransferasa y/o de sus productos sintetizados.

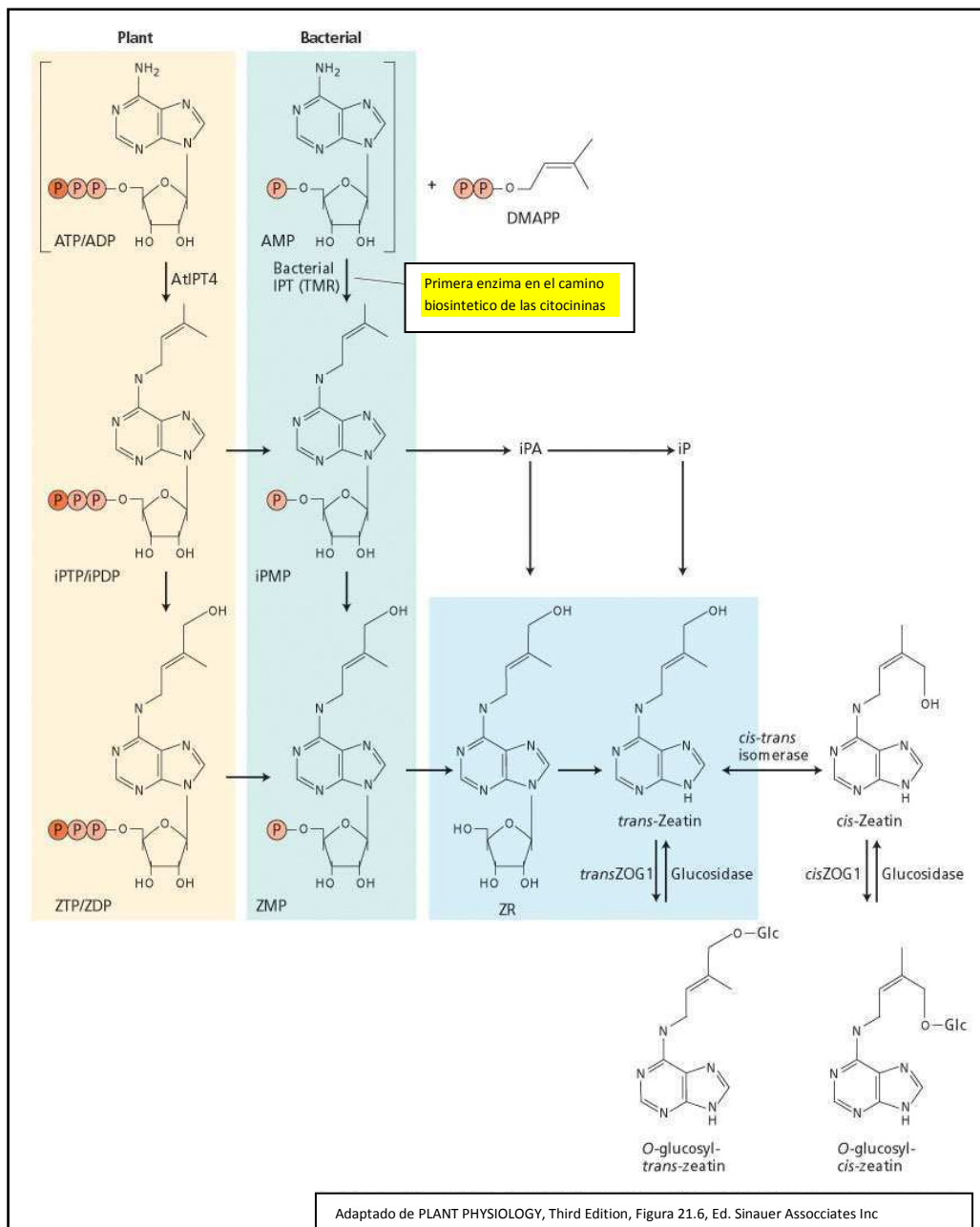


Figura 6. Rutas de síntesis de citocininas

Swartzberg y colaboradores (2008), transformaron plantas de tomate con la construcción *SAG12::IPT* y *SAG13::IPT*, y luego de determinar que el patógeno *Botrytis cinerea* como parte de su modo de acción induce la senescencia de las hojas al producir ABA, y de modo acentuado en hojas senescentes. Encontraron que el patógeno al inducir la senescencia, induce la expresión de los promotores *SAG12* y *SAG13* y estos controlan la expresión del gen *IPT*, produciendo citocininas y retardando la senescencia de las hojas, de este modo se reducen los síntomas de la enfermedad.

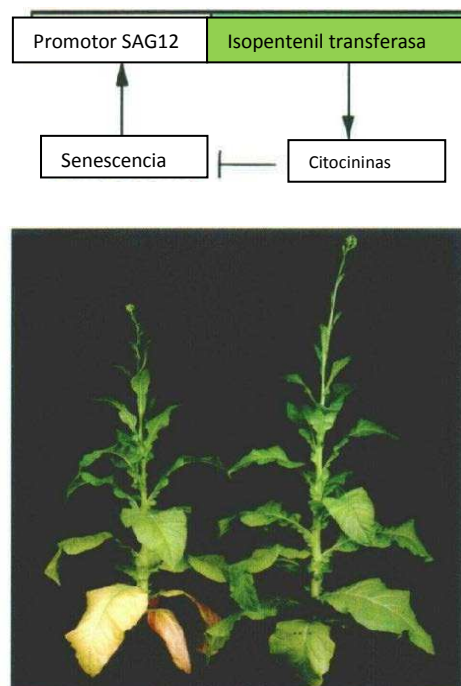


Figura 7. Sistema autoregulatorio de inhibición de la senescencia, conformado por el promotor *SAG12* de *A. thaliana* y el gen *IPT* de *A. tumefaciens* que codifica para la enzima Isopentenil transferasa, involucrada en la síntesis de citocininas (Gan y Amasino, 1995).

Mc Cabe y colaboradores (2001), utilizó la construcción *SAG12::IPT* en transformación genética de lechuga, en la cual el deterioro postcosecha de sus hojas es un factor crítico en la calidad del producto, encontrando diferencias significativas en plantas T1 (homocigóticas para el transgén) en el retardo de la senescencia de las hojas y en la retención de clorofila de las hojas basales 60 días post siembra y aún después de 7 días de cosechadas las plantas.

Chang y colaboradores (2003), insertaron también la construcción *SAG12::IPT* en la especie ornamental *Petunia x hybrida* cv 26, encontrando un retraso significativo de la

senescencia de las flores luego de la polinización, producto de una reducción considerable en la expresión del gen *PHACOI* relacionado con la biosíntesis del etileno, una reducción en los niveles de ABA, (fitohormonas relacionadas con la senescencia de los tejidos) acompañado de un incremento en la acumulación de citocininas.

Estudios fisiológicos de las citocininas se han llevado a cabo con este transgén. Smart y colaboradores (1991), utilizando el gen *IPT* ligado a un promotor de soja HS6871 inducible por choque térmico, observó en plantas de tabaco el efecto de las citocininas en el mantenimiento de la longevidad de las hojas y en el rompimiento de la dominancia apical. Guivarc'h y colaboradores (2002), utilizando el promotor específico de yemas axilares *BICK62*, logró expresar el gen *IPT* en plantas de tabaco observando significativas alteraciones morfológicas como la tuberización de las yemas axilares.

También se han obtenido otras respuestas morfogénicas de interés con la expresión de este gen cuando este se ha ligado a promotores específicos del ciclo celular. Sobre la base de que las citocininas en la planta se producen también en órganos aéreos (Faiss *et al.*, 1997), y actúan en etapas específicas del ciclo celular, se determinaron en plantas de *Arabidopsis* transformadas con el gen *IPT*, los efectos del control de los promotores de *Arabidopsis CycB* y *CycD3* específicos del ciclo celular. Entre los efectos encontrados en las plantas se determinó que estas tuvieron un desarrollo normal pero con un incremento en el crecimiento y tamaño final de algunos órganos como raíces, flores y hojas, caracterizados por tener un mayor número de células, lo que podría ser de utilidad en mejoramiento vegetal.

También se ha encontrado que otorga resistencia a estrés por bajas temperaturas en *Festuca arundinacea* con un gen *IPT* con un promotor de ubiquitina de maíz (Hu *et al.*, 2005).

La formación de semillas ha sido estudiada en plantas *ipt* con promotores específicos de semillas encontrándose mayor cantidad de proteínas solubles y peso seco (Ma *et al.*, 2008; Daskalova *et al.*, 2007)

El gen *IPT* ha sido de utilidad en estudios de los aspectos de la biosíntesis de citocininas relacionados con las rutas de síntesis, tipos de citocininas creadas e inactivación de estas sustancias (Åstot *et al.*, 2000; Redig *et al.*, 1996; Motika *et al.*, 1996).

1.7 Funcionamiento del promotor Atmyb32

Se utilizó el transgén *ATMYB32::IPT* que contiene la secuencia codificante *ipt* bajo control del promotor *MYB32*. Éste proviene del gen *MYB32* de *A. thaliana*, miembro de la familia de los genes *MYB* que codifican para factores de transcripción que tienen como función coordinar la expresión de conjuntos de genes durante el desarrollo (Li y Parish *et al.*, 1995). Su producto contiene dominios de unión al ADN típicos de genes *MYB* con repeticiones R2 y R3 exclusivas de plantas y un posible dominio activador (Martin y Paz Ares, 1997).

En el trabajo realizado por Beltrán y colaboradores (2011) se transformaron plantas con la construcción *ATMYB32::GUS* y se encontró que su activación es al azar, incluso con un daño mecánico controlado dado que este promotor responde a defoliación.

1.8 La anatomía en relación con el estrés abiótico y las hormonas

Türpe *et al.* (1967) considera a *Paspalum* como un género muy homogéneo en cuanto a sus características anatómicas, concluyendo que los caracteres de la lámina foliar reflejan las condiciones ecológicas del medio en el cual habitan las especies.

Muchos caracteres morfológicos y anatómicos, tanto vegetativos como reproductivos están claramente relacionados con condiciones ambientales determinadas, siendo éstos caracteres adaptativos, aunque tal relación es en muchos casos dudosa o difícil de establecer (Ehrendorfer *et al.*, 1973). Reeve y Sherman *et al.* (1993) definen a la adaptación como una variante fenotípica que resulta en el más alto éxito reproductivo entre un conjunto específico de variantes en un determinado ambiente. A pesar de ello, el término adaptativo ha sido ampliamente utilizado en anatomía vegetal para describir a ciertos caracteres anatómicos asociados a determinadas condiciones ambientales. (Aliscioni, 1999)

Se ha encontrado en poblaciones de algunas especies sometidas a algún estrés abiótico como pueden ser baja disponibilidad de agua o altas temperaturas, muestran algún rasgo anatómico modificado asociado a la tolerancia, por ejemplo poblaciones de *Cenchrus ciliaris* (L.) sometidas a estrés hídrico desarrollan células buliformes más grandes y estomas de menor tamaño (Nawazish *et al.*, 2006); También poblaciones de *Brachiaria riziensis* en diferentes ambientes muestran variaciones en células buliformes, diámetro de xilema y otros caracteres (Santos y colaboradores, 2013).

El mecanismo fundamental en la formación de los órganos vegetales involucra un balance de contenido de citocinina y auxina, un contenido relativamente bajo en auxinas y alto en citocininas promueven la formación de la parte aérea mientras que la relación inversa promueve la iniciación de raíces. Esto pudo ser demostrado en plantas con un metabolismo de citocininas alterado y también en plantas transgénicas con el gen de isopentil transferasa bajo diferentes promotores sobre todo constitutivos como algunos inducibles por diversos factores. Estas se caracterizaban por un alto contenido endógeno de citocininas tenían mucha mayor capacidad de generación de la parte aérea que de la parte subterránea de la planta que no pudo ser revertido por el tratamiento con auxinas exógenas, además, las plantas transgénicas para el gen *PSSU::IPT* con el contenido endógeno de citocininas 10 veces mayor no podían formar raíces durante el cultivo *in vitro* (Schnablová y colaboradores, 2006).

Se ha estudiado el efecto de las hormonas sobre el tamaño de las hojas, , generalmente por medio de la aplicación de hormonas (Ueda *et al.*, 1994). Generalmente las citocininas incrementan el tamaño de la hoja a través del aumento del tamaño celular (Kuraishi y Okumura, 1956; Letham *et al.*, 1971). En contraste, con las giberelinas este incremento en hojas jóvenes se produce por mayor número de células mientras que en hojas maduras resulta ser del aumento del tamaño de las células (Graebe *et al.*, 1978; Goodwin, 1978).

1.9 Glucosa y su relación con la senescencia

La principal función de los azúcares en el metabolismo es obviamente la de transporte de energía y carbono pero no es la única, se puede mencionar también la del mantenimiento del potencial osmótico (Herrera y colaboradores, 2012).

Al menos tres vías de censo han sido descubiertas en levaduras, cada una de las cuales desemboca en una regulación coordinada de expresión genética. El grado de regulación es más complejo en organismos pluricelulares; en plantas los cambios diurnos en actividad enzimática, fijación de carbono, glucólisis y metabolismo glucosa-fosfato son parcialmente regulados a través de señales por azúcares (Bläsing *et al.*, 2005). Además tienen una comunicación y una coordinación estricta entre los órganos fuente y destino. Actividades generadoras como fotosíntesis, pero también movilización de nutrientes, son generalmente estimuladas cuando se censa un bajo contenido de

azúcares, en contraste, actividades que consumen como crecimiento o almacenamiento están estimuladas con alto contenido de azúcares.

Los niveles de glucosa son continuamente censados por Hexosa Kinasas (HXKs), aunque esto en algunos casos también puede ocurrir por vías independientes. Específicamente las HXKs están asociadas con mitocondria, cloroplasto, el citoplasma y el núcleo celular, y además se encontró una compleja interacción entre las señales de glucosa y la señal de transducción a través de hormonas como ABA, auxinas, citocininas y etileno (las citocininas interactúan negativamente con las señales de HXK_s). Por ejemplo, HKX1 está presente en complejos de alto peso molecular en el núcleo celular, donde está el control de transcripción y degradación del factor de transcripción EIN3, contrarrestando los efectos del etileno (Rolland *et al.*, 2006). Se encontró que el aumento del nivel de glucosa inducían dos genes asociados a la senescencia: factores de transcripción *MYB*, *PAP1* y *PAP2* (Portau *et al.*, 2005).

Mutantes del gen *GIN2* en *Arabidopsis thaliana* que muestran una lesión en HKX1 son insensibles a la glucosa y muestran retardo en la senescencia (Moore *et al.*, 2003).

1.10 Relación entre senescencia vegetal y proteínas

En la hoja, los procesos de deterioro empiezan a observarse una vez que se alcanza la máxima expansión con la aparición de un amarillamiento gradual de la lámina, pérdida de turgencia de los tejidos, marchitez progresiva y necrosis. Estos cambios son una manifestación de la actividad metabólica de las células, genéticamente determinada y expresada en cambios en la actividad de ciertas enzimas, síntesis y degradación de compuestos tales como proteínas, pigmentos, fenoles y otros (Thomas y Stoddart, 1977).

La degradación de proteínas es un evento muy relacionado con el envejecimiento foliar; la concentración de proteína disminuye a medida que progresa la senescencia (Thomas y Stoddart, 1980; De Lucca y Trippi, 1982a), habiéndose observado que la disminución rápida del contenido de proteína en plántulas de avena estaba asociada con los cambios en la actividad de proteasas (Drivdahl y Thimann, 1997) y con variaciones en factores ambientales tales como la relación luz-oscuridad (De Lucca y Trippi, 1982b).

Un punto importante en la senescencia de la planta, es como la proteína de la hoja, hasta el 75% de la que se encuentra dentro del cloroplasto, es degradada y movilizada. Muchos genes que codifican para proteasas muestran expresión inducida durante la senescencia, pero como codificarían enzimas localizadas en la vacuola, entonces no estarían en contacto con las proteínas de las membranas del cloroplasto hasta finales de la senescencia. Por otro lado, existen informes que indican que la degradación de las proteínas del estroma como la Rubisco y la glutamina sintetasa puede ser iniciado no enzimáticamente por las especies reactivas del oxígeno (ROS) cuando los cloroplastos se incuban en condiciones de estrés foto-oxidativo (Ishida *et al.* 1999, 2002; Roulin y Feller, 1998). Sin embargo, no está claro si un aumento de las ROS, podría iniciar la degradación temprana de Rubisco durante la senescencia.

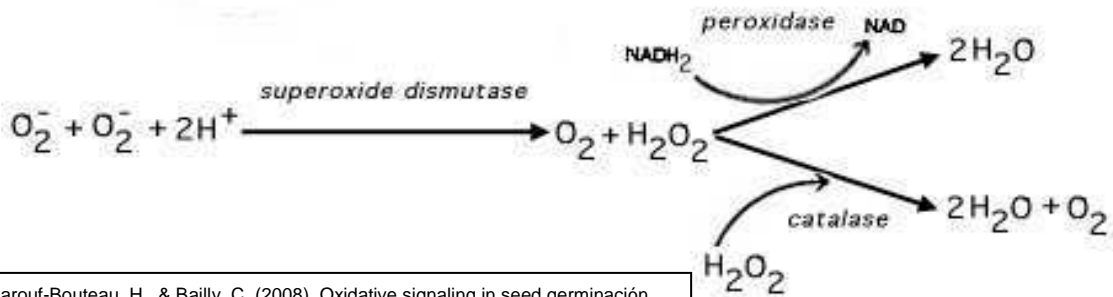
Aunque los niveles de ROS se incrementan durante la senescencia, es probable que sea resultado de los procesos de degradación de macromoléculas, por lo tanto se producen después de iniciada la degradación de proteínas y lípidos. Hay informes de la actividad de Aminopeptidasas y Metaloendopeptidasas en el cloroplasto y también la localización de los cloroplastos como miembro de la familia de las proteasas CLP (Roulin y Feller, 1998). Estas enzimas pueden tener un papel en la renovación de las proteínas durante el desarrollo foliar, pero no hay pruebas claras que demuestren que controlen la degradación de proteínas durante la senescencia (Shikanai *et al.*, 2001).

1.11 Relación entre senescencia vegetal y la enzima superóxido dismutasa (SOD)

La enzima superóxido dismutasa cataliza la reacción de superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno, es parte de un sistema de enzimas antioxidantes que protegen a la célula del daño producido por los radicales libres dado que su interacción con los componentes celulares es nociva.

Se ha observado un aumento en la actividad de la enzima superóxido dismutasa ante diversos factores de estrés abiótico como estrés salino, metales y otros (Holley *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012). En el caso particular de las bajas temperaturas, provocan un aporte menor de CO₂ en las plantas C₄ por la parálisis de enzimas fijadoras de este (Liu *et al.*, 2008) y también crea estrés hídrico por la formación de hielo del agua disponible para la fotosíntesis. Tanto con sequía como con bajas temperaturas un menor aporte de agua o CO₂ al proceso de fotosíntesis hacen que el fotosistema II reduzca más oxígenos

que los que se utilizan en la fotosíntesis creando radicales libres y en consecuencia favoreciendo la senescencia foliar (Fig. 8).



El-Maarouf-Bouteau, H., & Bailly, C. (2008). Oxidative signaling in seed germinación and dormancy. *Plant Signaling & Behavior*, 3(3), 175-182.

Figura 8. Sistema de defensa celular ante los radicales libres por enzimas antioxidantes

2.1 HIPÓTESIS

- A- La expresión del gen *IPT* regulada a través del promotor *ATMYB32* provoca la sobreproducción de citocininas.
- B- Esta sobreproducción hace que las plantas muestren una mayor resistencia a factores de estrés abiótico como bajas temperaturas y sequía, así también una mejor recuperación ante la restauración de las condiciones ideales.
- C- Esta resistencia se refleja en los parámetros de senescencia como el nivel de azúcares, proteínas y el nivel de clorofila.
- D- Esta sobreproducción también afecta el crecimiento celular creando diferencias anatómicas, ultraestructurales y morfofisiológicas que pueden ser útiles como respuestas adaptativas.

2.2 OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar el comportamiento de plantas de *Paspalum dilatatum* con la construcción *ATMYB32::IPT* ante diferentes condiciones ambientales incluyendo estreses hídricos y por bajas temperaturas.

Objetivos Particulares

- A- Obtener plantas transgénicas de *Paspalum dilatatum* que contengan el transgén *ATMYB32::IPT* y que expresen un mayor nivel de citocininas
- B- Evaluar diferencias anatómicas y morfofisiológicas en plantas que expresen el transgén *ATMYB32::IPT*.
- C- Evaluar la senescencia ante deficiencias hídricas y bajas temperaturas en plantas que expresen el transgén *ATMYB32::IPT*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Generación de material vegetal blanco de transformación

Se utilizó el cultivo de callos embriogénicos (CE), se usaron embriones maduros de los cuales se removió el cariopse para eliminar una de las principales causas de dormición en *Paspalum* (Burton *et al.*, 1939), permitiendo una mayor inducción.

Se reemplazó la sacarosa por maltosa en el medio de cultivo menos en el medio MSK dado que acarrea un mejoramiento de la respuesta al cultivo *in vitro* en diferentes especies (Sharma *et al.* 2005). A partir del uso de embriones maduros como explantos y maltosa como modificación a los medios sugeridos por Wang *et al.* (1987), se logró ajustar un protocolo robusto, eficiente y válido para una amplia gama de genotipos de *Paspalum dilatatum*. Es decir se cumple con una de las etapas necesarias para el mejoramiento molecular de Pasto miel a través de la transgénesis.

Se uso este protocolo para la obtención de callos embriogénicos que fueron transformados por bombardeo génico.

M5: medio de inducción, cuando se modificó la fuente de energía de sacarosa (sucrose) por maltosa se denominó al medio M5M, contiene 5 mM de 2,4-D (ácido 2,4 diclofenoxiacético) que estimula la desdiferenciación del embrión, estos son puestos durante 30 días en oscuridad.

M1: medio de proliferación, cuando se modificó la fuente de energía de sacarosa por maltosa se denominó al medio M3, se baja la concentración a 1.5 mM de 2,4-D para estimular la proliferación del callo.

MSK: medio de regeneración, no contenía antibióticos.

AP2: es el medio al que se someten los microcallos de las suspensiones como tratamiento osmótico previo al bombardeo.

Los tiempos en que permanecieron los materiales en cada medio de cultivo variaron de 15 días a un mes bajo condiciones óptimas.

La temperatura a la que se ajustó el protocolo fue de 24°C, al variar la temperatura dentro de ciertos límites (+/-6°C) significó tendencias a acelerar el crecimiento de los callos a mayores temperaturas y las frecuencias de regeneración a más bajas temperaturas. La condición lumínica de los medios fue en oscuridad excepto los callos colocados a regenerar en MSK que tuvieron un fotoperiodo de 16 horas de luz (43μE/m²) y 8hs de oscuridad (modificaciones de fotoperíodo de 12-12hs, y en el enriquecimiento de la relación R/RL mediante filtros, no implicaron diferencias significativas en la frecuencia de regenerantes-datos no mostrados).

Tabla tomada de los protocolos del PBC-Australia donde se describen las composiciones de los medios utilizados:

Tabla 1. Composiciones de los medios utilizados.

Composición de los medios de cultivos utilizados						
Componentes medio	Medio	AAF	AP2	M1	M5	MSK
Macro elementos (mg/l concentración final)						
NH ₄ NO ₃ ^a				1900	1900	1900
NH ₄ NO ₃ ^a				1650	1650	1650
CaCl ₂ x 2H ₂ O ^a		440	440	440	440	440
MgSO ₄ ^a		370	370	370	370	370
KH ₂ PO ₄ ^a		170	170	170	170	170
KCl ^a		2950	2950			
Micro elementos (mg/l concentración final)						
Na ₂ EDTA ^a		37.3	37.3	37.3	37.3	37.3
FeSO ₄ x 7H ₂ O ^a		27.8	27.8	27.8	27.8	27.8
H ₃ BO ₃ ^a		6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
KI ^a		0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
MnSO ₄ x H ₂ O ^a		16.9	16.9	16.9	16.9	16.9
ZnSO ₄ x 7H ₂ O ^a		8.6	8.6	8.6	8.6	8.6
CuSO ₄ x 5H ₂ O ^a		0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O ^a		0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
CoCl ₂ x 6H ₂ O ^a		0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Carbohidratos (g/l) concentración final						
D(+)-Glucose x H ₂ O ^c		20	108	30	30	30
D- Sorbitol ^a		20				
Hormonas (g/l) concentración final						
2,4-D ^d		1.5	1.2	1.5	5.0	
Kinetin ^b						0.2
Vitaminas (g/l) concentración final						
Pyridoxine HCl ^e		1.0	1.0	0.5	0.5	0.5
Thiamine HCl ^a		10.0	10.0	0.1	0.1	0.1
Nicotinic acid ^a		1.0	1.0	0.5	0.5	0.5
Inositol ^a		100	100	100	100	100
Otros elementos (mg/l concentración final)						
Glycine ^b		7.5	7.5	2	2	2
L-Glutamine ^d		877	877			
L-Asparagine ^c		266	266			
L-Arginine ^d		174	174			
Casein hydrolysate ^d				400	400	

a = Merck, b = Serva, c = Sigma, d = Fluka, e = Roth

3.2-Transformación del material vegetal

Cuatro horas antes del bombardeo, se repicaron aproximadamente 10 callos embriogénicos por cada placa de Petri conteniendo medio M3 con manitol 96 g/l. Se colocaron los callos formando círculos concéntricos, comenzando por el círculo más externo (cuyo diámetro era de 4 cm) y hacia el centro de la placa.

Materiales:

- Micropartículas de oro esféricas, 1,5-3,0 μm , pureza 99,9 %.
- Glicerol (a temperatura ambiente).
- Etanol absoluto (-20°C).
- Plásmido (fig.9)

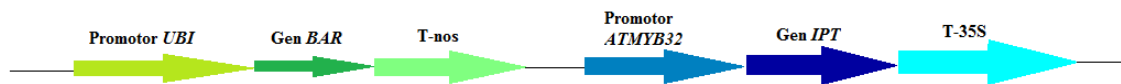


Fig 9. Construcción quimérica utilizada para el bombardeo

Procedimiento:

1. Se pesaron 50 mg de partículas de oro por tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
2. Se agregaron 1 ml de glicerol.
3. Se transfirieron las partículas a un tubo de 1,5 ml estéril.

Así quedó conformado un stock estéril de partículas en glicerol que se puede almacenar hasta el momento de su utilización.

Antes de usar:

1. Se centrifugaron durante 2 minutos a 14.000 g para precipitar las micropartículas.
2. Se extrajo el glicerol sobrenadante. Se agregó 500 μl de etanol absoluto para resuspender completamente.
3. Se repitieron los pasos (1) y (2)

4. Se centrifugaron durante 2 minutos a 14.000 g, se descartó el sobrenadante y finalmente se resuspendió en 500 µl de etanol absoluto.

Producto final 1: Micropartículas de oro suspendidas en etanol absoluto (100 µg/ µl).

-Esterilización del ADN (plásmido):

Materiales:

- Plásmido (1 µg/ µl suspendido en buffer Tris-EDTA pH=8,0 (-20°C))
- Solución 4 M de Cl₂Li mantenida a temperatura ambiente.
- Etanol 70%.
- Agua destilada estéril (ADE).

Procedimiento:

1. Se alicuotaron los volúmenes de la suspensión del plásmido a utilizar.
2. Se agregaron 1/10 parte de volumen de Cl₂Li 4 M.
3. Se agregaron 2-3 volúmenes de etanol absoluto, se mezclaron bien por inversión de los tubos y se dejaron durante la noche (ejemplo de cálculo: se utiliza un volumen de 170 µl de plásmido [1 µg/ µl por lo tanto, el peso total del plásmido es de 170 µg. Agregamos 17 µl de Cl₂Li 4 M y luego 300 µl de etanol absoluto]).
4. Se centrifugó 10 minutos a 12.000 g.
5. Se extrajo el sobrenadante con cuidado, evitando resuspender el pellet.
6. Se agregaron 500 µl de etanol al 70%.
7. Se centrifugó 5 minutos a 12.000 g.
8. Trabajando en flujo laminar, se extrajo cuidadosamente el sobrenadante evitando la pérdida del pellet.
9. Se secaron durante 10-15 minutos manteniendo el tubo de microcentrífuga abierto dentro del gabinete de flujo laminar.

10. Se llevaron a una concentración final de 1 µg/ µl agregando un volumen adecuado de ADE y se permitió que el pellet se disuelva en forma pasiva durante 30-45 minutos a temperatura ambiente (sin utilizar vórtex ni agitar).

11. Se utilizaron en el momento o se conservaron a 4°C.

Producto final 2: Plásmido suspendido en ADE (1 µg/µl).

- Precipitación de ADN sobre micropartículas:

Materiales:

- Agua destilada estéril (ADE).
- Etanol absoluto (-20°C).
- Micropartículas de oro suspendidas en etanol absoluto (100 µg/µl) (4°C) (Producto Final 1).
- Solución 100 mM de espermidina (-20°C) esterilizada por filtración (0,2 µm).
- Solución 2,5 M de Cl_2Ca autoclavada (4°C).
- Plásmido suspendido en ADE (1 µg/µl) (Producto Final 2).

Procedimiento:

1. Se homogeneizó con vortex y con movimientos arriba y abajo realizados con una micropipeta la suspensión de micropartículas.
2. Se transfirió una alícuota de 15 µl de la suspensión de micropartículas a un tubo de microcentrífuga.
3. Se centrifugó durante 3 minutos a 14.000 g y se eliminó el sobrenadante.
4. Se resuspendió el pellet en 200 µl de ADE.
5. Se centrifugó durante 3 minutos a 14.000 g y se eliminó el sobrenadante.
6. Se resuspendió el pellet en 25 µl de la suspensión de plásmido (F) (agitar la parte externa del tubo con ayuda de los dedos para homogeneizar rápidamente: 3 a 5 segundos).

7. Se agregaron 30 μ l de ADE y homogeneizar rápidamente (ídem comentario 6).
8. Se agregaron 50 μ l de Cl_2Ca 2,5 M y homogeneizar rápidamente.
9. Se agregaron 20 μ l de espermidina 0,1 M y homogeneizar rápidamente según punto 10.
10. Se agitó el tubo con ayuda de los dedos durante 10 minutos (este paso es crucial para evitar la aglutinación de las micropartículas).
11. Se centrifugó durante 5 minutos a 16.000 g.
12. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante con micropipeta.
13. Se agregaron 200 μ l de etanol absoluto, evitando que el pellet no se disgregue.
14. Se centrifugó durante 10 segundos a 15.000 g y se eliminó el sobrenadante con cuidado.
15. Se resuspendió en 36 μ l de etanol absoluto homogeneizando vigorosamente.

Producto final 3: Suspensión ADN-micropartículas en 36 μ l de etanol absoluto (listas para distribuir sobre las membranas transportadoras).

Bombardeo:

Materiales:

- Membranas de ruptura esterilizadas con isopropanol (discos de KaptonTM (Du Pont) de 13,2 mm de diámetro y 300 psi de resistencia).
- Membranas transportadoras esterilizadas con alcohol 70% (discos de KaptonTM (DuPont) de 24 mm de diámetro). Fundamental: el residuo de agua del alcohol 70% debe evaporarse por completo.
- Membranas o mallas de retención autoclavadas de acero inoxidable, 15 mesh, de 18 mm de diámetro.
- Soportes de membranas transportadoras autoclavados.
- Desecadores (cajas de Petri con sílica gel).
- Cajas de Petri estériles (para realizar los trabajos de preparación de los soportes).
- Suspensión ADN-micropartículas / etanol absoluto (Producto Final 3)

- Isopropanol.

Procedimiento:

Preparación de las membranas:

1. Se preparó 30 minutos antes del bombardeo, conjuntos de 4 membranas de ruptura (A) y se sumergieron en isopropanol hasta el momento de su utilización.
2. Se colocó con pinza estéril las membranas transportadoras (B) sobre los soportes (D).
3. Se tomó una alícuota de 10 μ l de la suspensión ADN-micropartículas/etanol absoluto (procediendo rápidamente para evitar la evaporación).
4. Se colocó la alícuota sobre la membrana transportadora: distribuyendo la gota en forma centrípeta con ayuda de la punta de la micropipeta.
5. Se llevo inmediatamente con pinza flameada el soporte al desecador (E) y se esperó unos minutos hasta que se complete la deshidratación.

En este caso se bombardeó con el plásmido pBS Atmyb32::*ipt*

3.3 Extracción de ADN de material vegetal

1. Se maceró 200-250 mg de tejido fresco (hojas jóvenes) en mortero de porcelana frío con nitrógeno líquido. Se recogió el tejido molido y se transvasó con espátula, previamente enfriada, a un tubo de 2 ml enfriado en hielo.
2. Se agregó al tejido macerado 80 μ l de buffer de extracción calentado a 65° C, se mezcló con vórtex, Se calentó la muestra a 65° C, y luego se agregó 1% de CTAB (90 μ l), se mezcló nuevamente con vórtex, se incubó a 65°C, durante 30 minutos, con agitación suave y continua.
3. Se destapó el tubo durante 5 minutos, para permitir que la temperatura descienda, y luego se agregó 450 μ l de cloroformo:octanol (24:1), se mezcló la muestra por inversión durante 10 minutos hasta obtener una emulsión.

4. Luego se centrifugó la emulsión durante 30 minutos, a 14.000 rpm, a temperatura ambiente.
5. Se transvasó la fase acuosa a un nuevo tubo de 2 ml, agregar 5µl de RNAsa (10 mg/ml). Se mezcló la solución suavemente por inversión, durante 5 minutos, y se incubó 60 minutos a 37°C.
6. Se agregó 450 µl de cloroformo:octanol (24:1). Se mezcló suavemente por inversión durante 10 minutos hasta obtener una emulsión.
7. Se centrifugó durante 30 minutos a 14.000 rpm a temperatura ambiente.
8. Se transvasó la fase acuosa a un nuevo tubo de 1,5 ml.
9. Se precipitó el ADN agregando rápidamente 600 µl de isopropanol frío (-20° C) y se mezcló suavemente por inversión.
10. Se realizó una centrifugación de 5 minutos a 4° C para precipitar el ADN.
11. Se descartó el sobrenadante y se agregó 500 µl de etanol 70% frío (-20° C), se dejó durante 30 minutos.
12. Se realizó una centrifugación de 5 minutos a 4° C para precipitar el ADN.
13. Se descartó el alcohol y se dejó secar el precipitado durante 10 minutos en flujo laminar, luego se realizó la resuspensión del ADN en 50-100 µl de agua calidad HPLC o buffer TE.
14. Se resuspendió el ADN a 4° C durante 24 horas para su posterior cuantificación (mejor 48 horas).

Buffer de extracción 1x (900 µl)

1 M Tris (pH 7,5) 100 mM 90 µl

5 M NaCl 700 mM 126 µl

0,5 M EDTA (pH 8) 50 mM 90 µl

14 M βmercaptoetanol 140 mM (1% v/v) 9 µl

Agua deionizada 495 μ l
CTAB (10%) 3 1% (v/v) 90 μ l

Buffer TE

1 M Tris-HCl pH 8,0 10 Mm

0,5 M EDTA-pH 8,0 1 mM

3.4 Análisis por PCR

La detección del gen en las plantas T₀ y T₁ se realizó mediante la técnica de PCR utilizando oligonucleótidos específicos (Cuadro 1). Para *ATMYB32::IPT* los oligonucleótidos permiten detectar parte de la secuencia codificante del gen *ipt*.

Como control positivo en plantas regeneradas de callos bombardeados con *Atmyb32::ipt* se utilizó ADN proveniente de plantas de trébol blanco con el gen *ipt* integrado y el plásmido correspondiente.

Oligonucleótido	Secuencia de bases
IPTFw	5' GGA AGA ACT GAA AGG AAC GAC G 3'
IPT Rv	5' ACC TAA TAC ATT CCG AAC GGA T 3'

Cuadro 1: *Secuencia de los oligonucleótidos usados para la identificación por PCR de la construcción Atmyb32::ipt*

Este análisis se volvió a realizar sobre las progenies T₁ y estas plantas constituyeron los materiales sobre los cuales se realizaron los ensayos de la presente tesis.

3.5-Extracción de azúcares solubles de tejidos vegetales

Se maceró 50 mg en mortero de porcelana frío con nitrógeno líquido y agregar 200 μ l de buffer Tris-HCl pH 7.5.

Previa agitación en un vórtex se hirvió 10 min.

Se dejó enfriar y se agregó 75 µl de Carrez 1 (106g de $K_4Fe(CN)_6$ 3 eq (ferrocianato 4) y agua csp 1 litro) y se agitó.

Se agregó 75 µl de Carrez 2 (238g de Acetato de Zinc 2 eq (Zn), 30 ml de ácido acético concentrado (glacial) (reactivo neutro) y agua csp 1 litro), y se agitó.

Se llevó a 1.5 ml con agua destilada, y se agitó.

Se centrifugó a 13.000 rpm x 5 min.

Se colocó en freezer -70°C hasta su determinación.

3.6 Medición de glucosa en hojas

Se realizó mediante kit de glicemia enzimática de Wiener lab (www.wienerlab.com.ar) que mide esta azúcar por la reacción de la enzima glucosa oxidasa, se colocó la muestra en la proporción pedida por el kit con el reactivo, se midió en placa y se realizó una curva de calibración con glucosa pura en la misma placa.

3.7 Extracción de proteínas de tejidos vegetales

Se pulverizó la muestra en mortero con nitrógeno líquido 0,05 gr de material vegetal y se agregó 1000 µl de buffer compuesto por Tris-HCl pH 8.0 60 mM y NaCl 500 mM, β-mercaptoetanol 30mM, EDTA 10 mM y PMSF 0,1 mM, se agitó con vórtex y se centrifugó por 5 minutos a 10000 rpm, se usó el sobrenadante para la determinación de concentración de proteínas.

3.8 Determinación de la concentración de proteínas

Se realizó mediante un método adaptado del protocolo original descrito por Bradford. A 10 µl de cada muestra se agregaron 100 µl de reactivo de Bradford (1976). Las muestras se analizaron por duplicado en placas de poliestireno de 96 pocillos y se midió la DO_{595nm} en un lector de microplacas VERSAmax[®] (Molecular Devices Corporation). Se utilizaron patrones de BSA (0,075–5 mg/ml) para la construcción de una curva de calibración y sobre la base de la misma se determinó la concentración proteica de las muestras.

3.9 Anatomía

Se seleccionaron hojas que tienen mismo largo y posición de innovaciones estériles de 3 ejemplares de cada línea, se usaron líneas transgénicos para el gen *ipt* (302, 383 y

386), líneas que resultaron no transgénicas (365) y línea salvaje (wt) de *Paspalum dilatatum*, estas líneas transgénicas fueron elegidas por características diferenciales halladas en un ensayo hecho por un integrante de la Cátedra de Genética.

Fueron luego fijadas en FAA durante 24 a 48 horas. Los transcortes de lámina foliar se realizaron en el tercio medio, utilizándose la técnica de inclusión en parafina y siguiendo el protocolo tradicional para estudios anatómico (D’Ambrogio, 1986; Zarlavsky *et al.* 2014). Para las preparaciones epidérmicas se siguió la metodología descrita en Metcalfe *et al.*, (1960). Los cortes fueron teñidos con coloración doble de “Alcian blue-safranina” en solución alcohólica y los preparados epidérmicos con Safranina en solución acuosa. Las observaciones fueron realizadas con un microscopio óptico Olympus Cx31, Se midió con la medida del microscopio óptico y comparando 15 caracteres anatómicos. Estos fueron seleccionados considerando caracteres importantes para resistencia al estrés hídrico (estomas, células buliformes) así como influidos por citoquininas como por el cultivo de tejidos (células parenquimáticas, células de la vaina de Kranz).

Se midió el diámetro celular para cuantificar el tamaño celular, los estomas se midieron sin células oclusivas.

Carácter
Tamaño de Células Buliformes
Tamaño de células parenquimáticas
Tamaño de células de la vaina de haces terciarios
Tamaño de células de la vaina de haces secundarios
Tamaño de células de la vaina de haces primarios
Ancho de estomas
Largo de estomas
Tamaño de cloroplastos de la vaina de Kranz
Tamaño de cloroplastos en células del parénquima
Distancia entre haces vasculares
Capas de esclerénquima de la cara abaxial de haces primarios
Capas de esclerénquima de la cara adaxial de haces primarios
Capas de esclerénquima de la cara abaxial de haces secundarios
Capas de esclerénquima de la cara adaxial de haces secundarios
Medida promedio de racimo

Tabla 2. Caracteres anatómicos estudiados

Los datos obtenidos se analizaron mediante ANOVA de una vía, con el programa R Versión: 2.15.1 (Roasted Marshmallows *et al.*, 2012).

3.10 Ensayo de Germinación

Se incubaron frutos de 6 líneas transgénicas, una línea como control silvestre y otra línea como control somaclonal o de cultivo de tejidos (transformadas sin el gen *ipt*) en placas de Petri variando la disponibilidad de agua mediante soluciones acuosas de polietilenglicol 8000 que dificulta la absorción de agua por parte de la semilla estando expuestas a cuatro niveles de sequía crecientes (Cornaglia *et al*, 2005):

Nivel 1(N1): agua destilada (sin estrés) (0 Mpa).

Nivel 2(N2): agua con 13,5 gr de Polyethylene glicol (-0,25 Mpa).

Nivel 3(N3): agua con 20 gr de Polyethylene glicol (-0,5 Mpa).

Nivel 4(N4): agua con 25 gr de Polyethylene glicol (-0,75 Mpa).

Se compararon 6 líneas transgénicas frente a los dos grupos control (salvaje y de cultivo de tejido), se analizó la curva de germinación (comportamiento germinativo), Velocidad inicial de germinación (Índice de Maguire=sumatoria de porcentajes de semillas germinadas en cada día dividido por el número de días desde que comienza el ensayo), Germinación Total (% a los 21 días) mediante el programa estadístico R e Infostat.

3.11 Medición de citocininas y auxinas

Se sacaron las plantas de la tierra para la medición y se colocaron en perlita.

Antes de la medición definitiva en todas las líneas previamente se cuantifico la producción de citocininas en plantas con el ápice de raíz cortado y sin cortar en la línea salvaje para determinar el tiempo adecuado de corte para evitar la interferencia de citocininas endógenas.

Para la medición general se cortaron los ápices de las raíces 24 y 48 horas antes de la extracción y dado que el promotor *Atmyb32* se podría activar por daño mecánico (Li y parish, 1995.), se indujo un daño con una aguja en la hoja para estimular la expresión del gen *IPT*.

Se tomó una muestra de hojas y se midió las concentraciones de hormonas de tipo citoquininas (zeatina y ribósido de zeatina) y de auxinas por High-performance liquid chromatography (HPLC).

Se usó el programa estadístico infostat, se graficaron las variables con error estándar y se aplicó análisis de significancia a las variables.

3.12 Estimación de concentración de clorofila

Se hizo con el medidor de clorofila Minolta 502 (SPAD), se calibró previamente al comienzo de las mediciones en los ensayos comparando que los valores obtenidos con este instrumento y la concentración de clorofila obtenidas por medición por espectrofotómetro se correspondieran a una función que permitió pasar la medición del SPAD a medida de concentración (mgr/gr).

Se determinó el valor promedio usando los valores obtenidos de ambos extremos de la hoja con el valor del punto medio en la última hoja desplegada.

3.13 Determinación de actividad de superóxido dismutasa (SOD)

De la extracción de proteínas se usaron 20 µl para determinar la actividad de la enzima superóxido dismutasa, para ello el SOD determination kit (Sigma Aldrich). Se realizó la lectura a 450 nm en un lector de microplacas según las indicaciones del fabricante.

3.14-Ultraestructura de cloroplasto

A partir de hojas provenientes de los mismos ejemplares usados para el análisis de anatomía colocadas por 24 hs en oscuridad se tomaron porciones pequeñas que se colocaron de inmediato en un medio de fijación (Glutaraldehído 3%), estas fueron incubadas durante 24 hs.

Se realizaron varios lavados en PBS y luego se colocaron en una solución de osmio 2% durante 2 hrs.

Se hicieron cortes ultradelgados y se realizaron varios lavados con agua y luego 3 lavados de 15 minutos en cada una de concentraciones crecientes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% y 100%).

Las muestras se colocaron en Spurr- Acetona 1:3 y 1:1 durante un día en cada dilución; luego Spurr puro 1 día. Las muestras se secaron en estufa 48 hs a 60°C.

Los cortes ultradelgados fueron montados a una malla metálica para ser observado en microscopio electrónico de transmisión Jeol (1200 EX II) (MET).

Los caracteres considerados fueron los mas importantes para señalar la senescencia y funcionamiento del cloroplasto como tamaño y numero de plastoglobuli así como de los granos de almidón, se usaron también otros caracteres intrínsecos de cada línea. Se midieron en células del mesófilo dado que los antecedentes de este análisis se hicieron en este tejido.

Los caracteres analizados son los siguientes:

Ultraestructura de cloroplasto
Ancho tilacoide inter-grana
Distancia inter-grana
Numero de tilacoides por grana
Tamaño de plastoglobuli
Numero de plastoglobuli por cloroplasto
Tamaño granos de almidón

Tabla 3. Caracteres analizados en cloroplastos

Se uso el programa estadístico infostat, se graficaron las variables con error estándar y se aplico análisis de significancia a las variables.

3.15 Ensayo de frío

Se utilizaron para este ensayo 5 líneas transformadas con el gen *ipt* que mostraron niveles diferentes de citocininas (muy altos y tendiendo a bajos) con respecto a los controles y de relación citocininas/auxinas diferentes también, dos líneas isogénicas como control somaclonal y una línea salvaje. Se colocaron en 5 terrinas, 1 terrina control no sometida a heladas y 4 terrinas con tratamiento de frío (Fig.9). En cada terrina se colocó un representante de cada línea transformada y de controles no transformados.

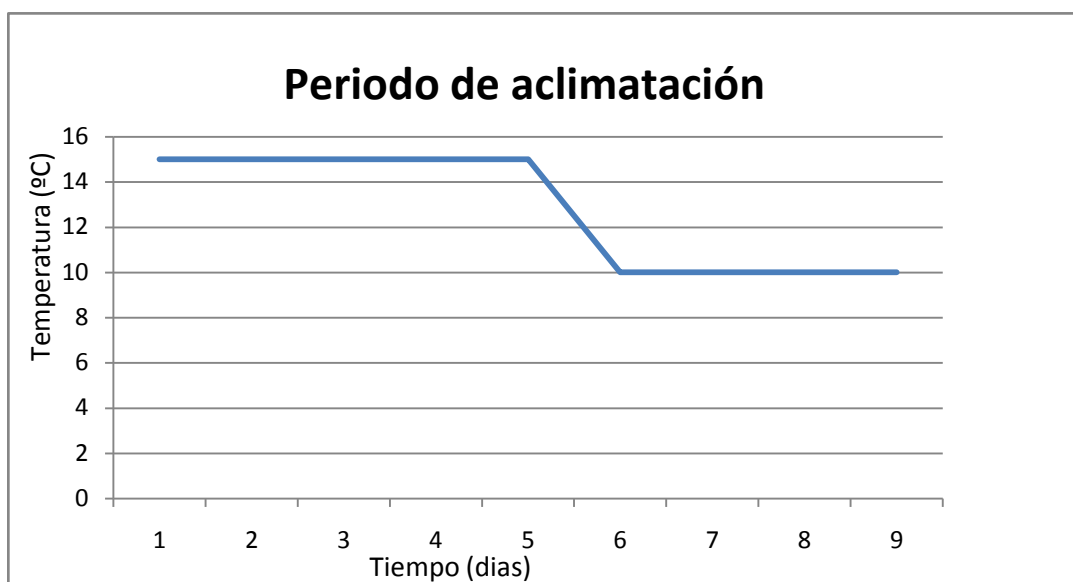
Se dejaron las plantas en cámara fría a 15° C para su aclimatación durante 4 días con un fotoperíodo de 12 horas. Luego se llevaron a una segunda etapa de aclimatación a 10° C durante 3 días con igual intensidad lumínica.

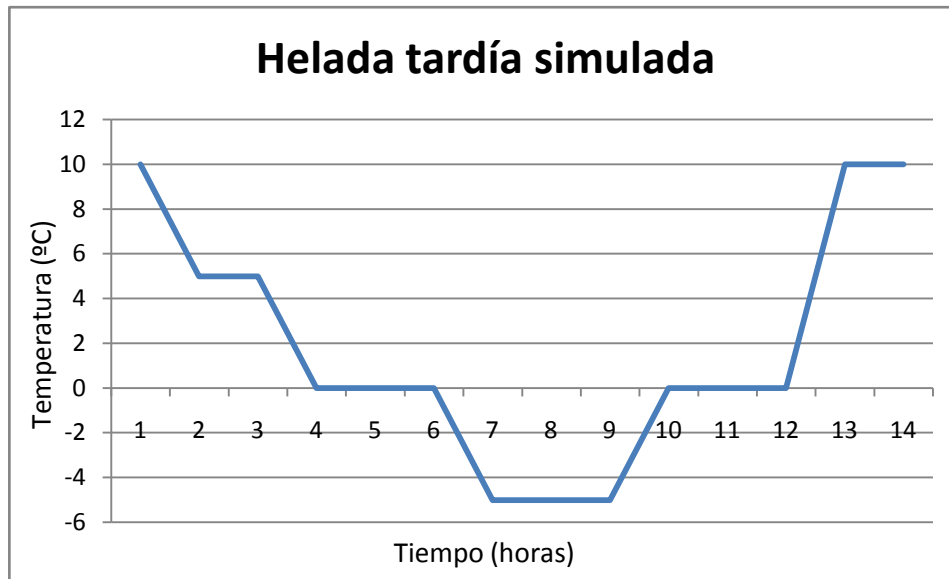
Luego del periodo de aclimatación, las plantas fueron sometidas a heladas. Se intentó simular una helada nocturna de la estación primaveral por lo cual se sometió durante 11 hs a un descenso paulatino de la temperatura. Las 2 primeras horas se descendió la temperatura gradualmente de 10° C a 5° C. Luego se mantuvo la temperatura a 5° C durante 2 horas, después se disminuyó a 0° C, la cual se mantuvo durante 3 horas para descender luego a -5° C durante 3 horas más. La temperatura fue ascendiendo a 0° C durante 3 horas para terminar a 5° C, volviendo a 10°C.

Luego las plantas, fueron expuestas a 10° C durante 4 días para aplicarle una segunda simulación de helada en los mismos términos que la anterior y con las mismas mediciones.

Las plantas recibieron un período de aclimatación para ser llevadas nuevamente a invernadero que duró 2 días a 15° C.

La toma de muestras se realizó durante 5 períodos, antes de la primera helada, inmediatamente después, inmediatamente después de la segunda helada, 9 días y 18 días después de la segunda helada.





Esquema de ciclo de helada tardía aplicado.

Se determinó concentración de clorofila en hojas mediante SPAD, daño por frío mediante los siguientes índices: hojas muertas/hojas totales, hojas senescentes/hojas totales, porcentaje de senescencia en hojas, también se determinó concentración de azúcares, proteínas y actividad de la enzima SOD (superóxido dismutasa).

Se usó el programa estadístico infostat, se graficaron las variables con error estándar y se aplicó análisis de significancia a las variables del tratamiento.

3.16 Ensayo de tolerancia a sequía

Durante este ensayo se midió la resistencia a estrés hídrico y la posterior recuperación de las plantas transgénicas versus las plantas controles.

Se utilizaron para este ensayo 5 líneas transformadas con el gen *ipt* que mostraron niveles diferentes de citocininas (muy altos y tendiendo a bajos) con respecto a los controles y de relación citocininas/auxinas diferentes también, dos líneas isogénicas como control somaclonal y una línea salvaje. Se colocaron en 5 terrinas una línea de cada genotipo. Una de las terrinas fue tomada como control del tratamiento por lo que fueron sometidas a riego cada día, y las otras 4 terrinas fueron sometidas a tratamiento de sequía. Este tratamiento consistió en la privación de riego durante 18 días y posterior rehidratación con riego diario, todo bajo luz natural en invernáculo.

La toma de muestras se realizó en 5 momentos de la experiencia, una antes del tratamiento de sequía, a la mitad y final del periodo de sequía inmediatamente, y a 10 y 25 días después de la rehidratación.

Se determinó la concentración de clorofila en hojas mediante SPAD, el daño por sequía mediante: número de macollos, proporción de macollos vivos, en senescencia y completamente senescentes, también se determinó la concentración de azúcares, proteínas y actividad de la enzima SOD (superóxido dismutasa).

Se uso el programa estadístico infostat, se graficaron las variables con error estándar y se aplico análisis de significancia a las variables del tratamiento.

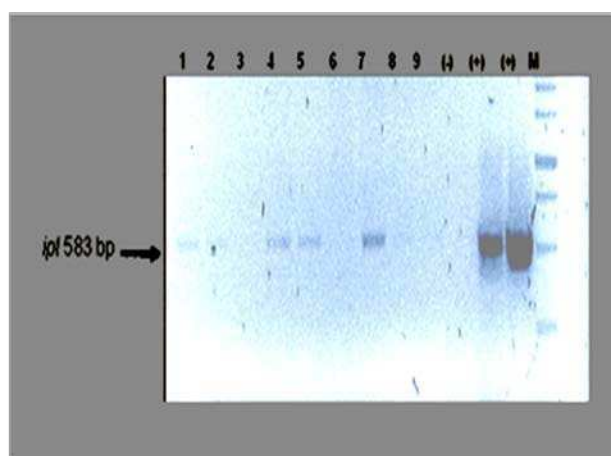
4. RESULTADOS

4.1 Resultado bombardeo

El análisis por PCR reveló que el 17 % de las plantas regeneradas a partir de callos bombardeados con *Atmyb32::ipt*, mostraron la presencia del transgén cuando no se usó selector en el medio de regeneración y 73% cuando se utilizó selector.

Además el análisis de progenies mostró la herencia del mismo y que el sistema reproductivo apomítico implicaba que el 100% o el 0% de la progenie contenía al transgén. También se sumaron al ensayo experimental eventos obtenidos y chequeados previamente por el integrante de la Cátedra de Genética Lisandro Voda.

Los eventos positivos fueron corroborados por doble análisis así como el control negativo que fue tomado como control de cultivo de tejidos (Fig. 10).



Obtención de plantas con el transgén *Atmyb32::ipt*

Figura 10. Detección del gen *IPT* por PCR. La posición del fragmento esperado es indicada con la flecha de la izquierda.

Calles	Líneas
1	302
2	311
3	319
4	370
5	381
6	365
7	383
8	386
9	391
control -	neg
control +	posit
control +	Posit
marcador	Presente

4.2 Contenido de citocininas

Para esta medición se usaron las líneas transgénicas 302, 311, 306, 381, 383, 386, 391 y se agregó la línea 388, como control de cultivo de tejidos se usó la línea 365 y como control salvaje la línea wt.

De las 8 líneas transgénicas analizadas, tres (381, 386 y 302) mostraron valores significativos mayores con respecto a las líneas control silvestre (WT) y control de cultivo de tejidos (cs) (Fig.11).

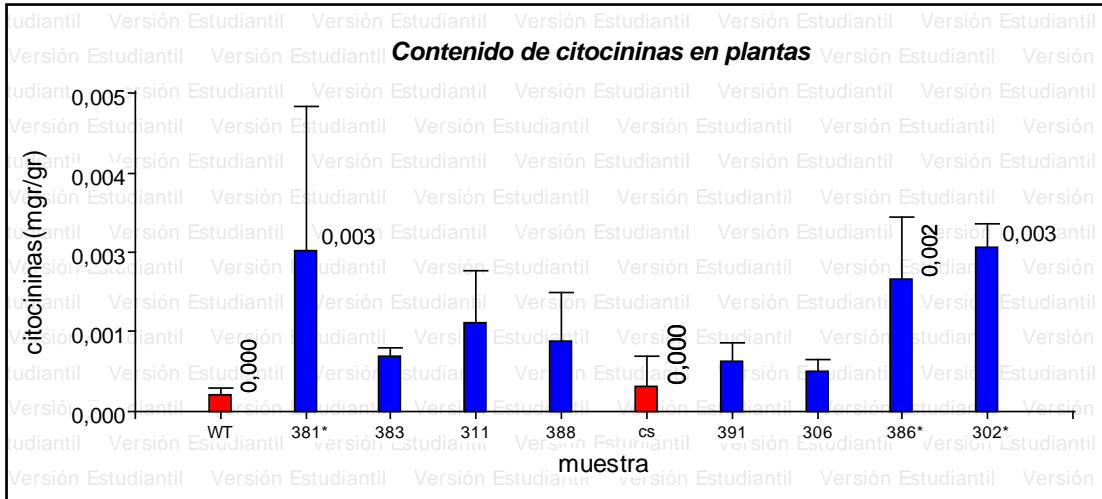


Figura 11. Contenido de citocininas en líneas transgénicas y control (WT y cs), (* valor significativo respecto a ambas líneas control) Líneas transgénicas (Barra azul), Líneas controles (Barras rojas).

Mientras que el nivel de auxinas no mostró un patrón claro, hallándose diferencias tanto entre ambos controles (WT vs 365) como entre transgénicas (381 vs 386). Esto último hizo que no se hallaran diferencias entre los promedios de las líneas transgénicas respecto del promedio de los controles (Fig.12).

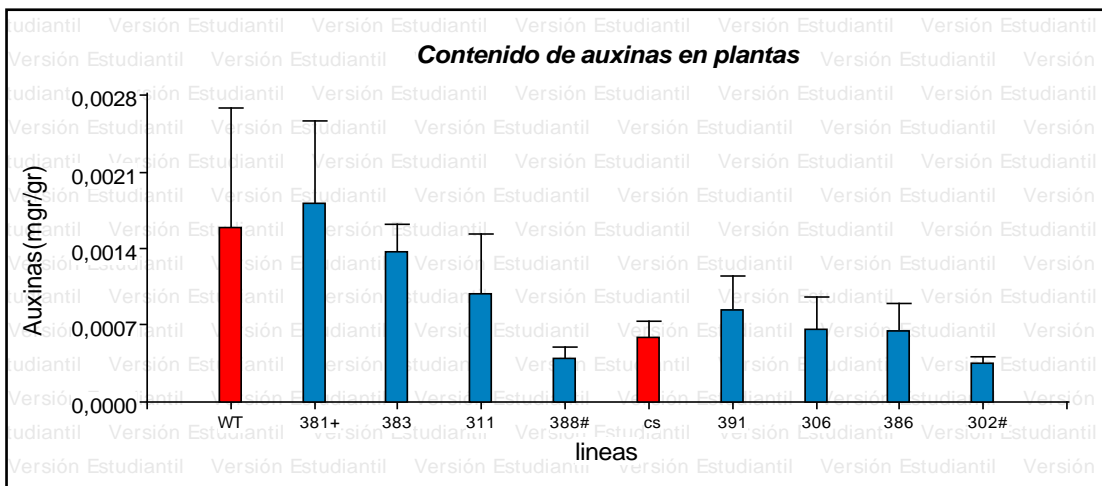


Figura 12. Contenido de auxinas en líneas transgénicas y control (WT y cs), (# significativo respecto a wt; + significativo respecto a cs) Líneas transgénicas (Barras azules), Líneas controles (Barras rojas).

También todas las líneas transgénicas menos la línea 383 tienen una relación mayor a 1 de citocininas/auxinas y las líneas control menor a 1, la línea 302 tiene una valor mayor y significativo. (Fig.13).

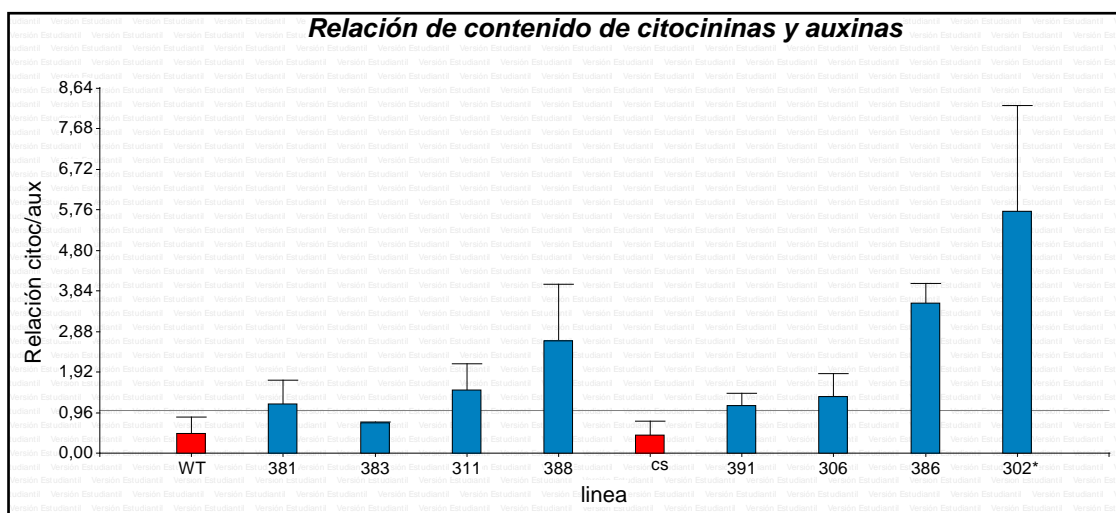


Figura 13. Comparación de contenido de citocininas y auxinas en líneas transgénicas y controles (wt y cs).

4.3 Germinación

Para este ensayo se usaron las líneas transgénicas 302, 370, 381, 383, 386 y 391, la línea 365 como control de cultivo de tejidos y la línea wt como control salvaje dado que eran las líneas con mas cantidad de frutos disponibles.

4.3.1 Curva de germinación

Se encontraron diferencias significativas en el comportamiento de la germinación en medios con diferentes concentraciones de polietilenglicol (nivel 1 = agua destilada, nivel 2 = 13.5 gr/l, nivel 3 = 20 gr/l y nivel 4 = 25 gr/l) entre líneas transgénicas t1 (302), t2 (370), t3 (381), t4 (383), t5 (386), t6 (391) y los controles salvajes (wt) y de cultivo de tejidos (cs) en los cuatro tratamientos (ver Tabla 1), las líneas con comportamiento diferencial tuvieron una pendiente mayor y su plateau fue más alto que las líneas control en la mayoría de los casos (Fig. 14-17).

Comportamiento de germinación de plantas transgénicas y no transgénicas nivel 1 (0 Mpa)						
	302	383	386	391	381	370
WT	< 2e-16 *	< 2e-16 *	4.89e-08 *	< 2e-16 *	<2e-16 *	< 2e-16 *
CS	< 2e-16 *	< 2e-16 *	0.008279 *	0.000857 *	< 2e-16 *	< 2e-16 *
Comportamiento de germinación de plantas transgénicas y no transgénicas nivel 2 (-0,25Mpa)						
	302	383	386	391	381	370
WT	0.476482	< 2e-16 ***	3.01e-09 ***	0.001649 **	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***
CS	0.082238 .	< 2e-16 ***	7.28e-07 ***	0.033095 *	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***
Comportamiento de germinación de plantas transgénicas y no transgénicas nivel 3 (-0,5 Mpa)						
	302	383	386	391	381	370
WT	4.05e-10 ***	< 2e-16 ***	2.24e-08 ***	5.45e-05 ***	3.39e-14 ***	< 2e-16 ***
CS	3.85e-12 ***	< 2e-16 ***	3.12e-10 ***	0.000939 ***	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***
Comportamiento de germinación de plantas transgénicas y no transgénicas nivel 4 (-0,75Mpa)						
	302	383	386	391	381	370
WT	7.31e-05 ***	3.99e-07 ***	0.128593	0.377	3.2e-14 ***	1.97e-05 ***
CS	0.917211	0.29888	1.49e-08 ***	8.64e-07 ***	0.000205 ***	0.835314

Tabla 4. Diferencias estadísticas entre curvas de germinación de líneas transgénicas y control.

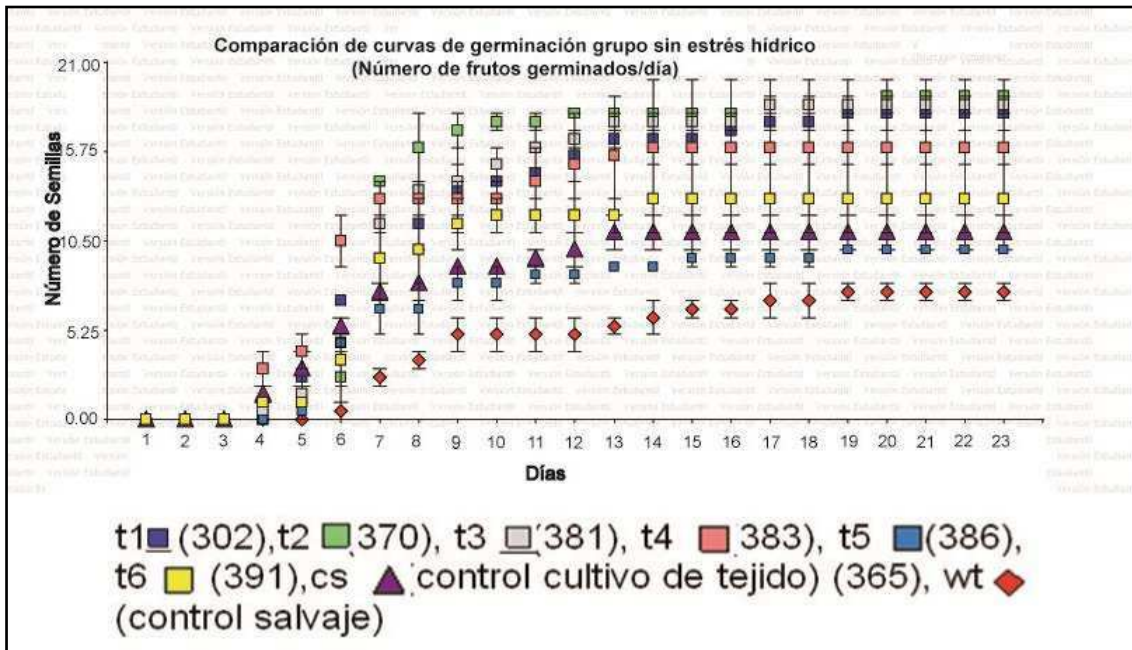


Figura 14. Comparación de curva de germinación sin déficit hídrico (0 MPa) entre líneas transgénicas t1 (302, en azul), t2 (370, en verde), t3 (381, en gris), t4 (383, en rosa), t5 (386, en violeta), t6 (391, en amarillo) y líneas control (wt, en rojo y cs, en violeta).

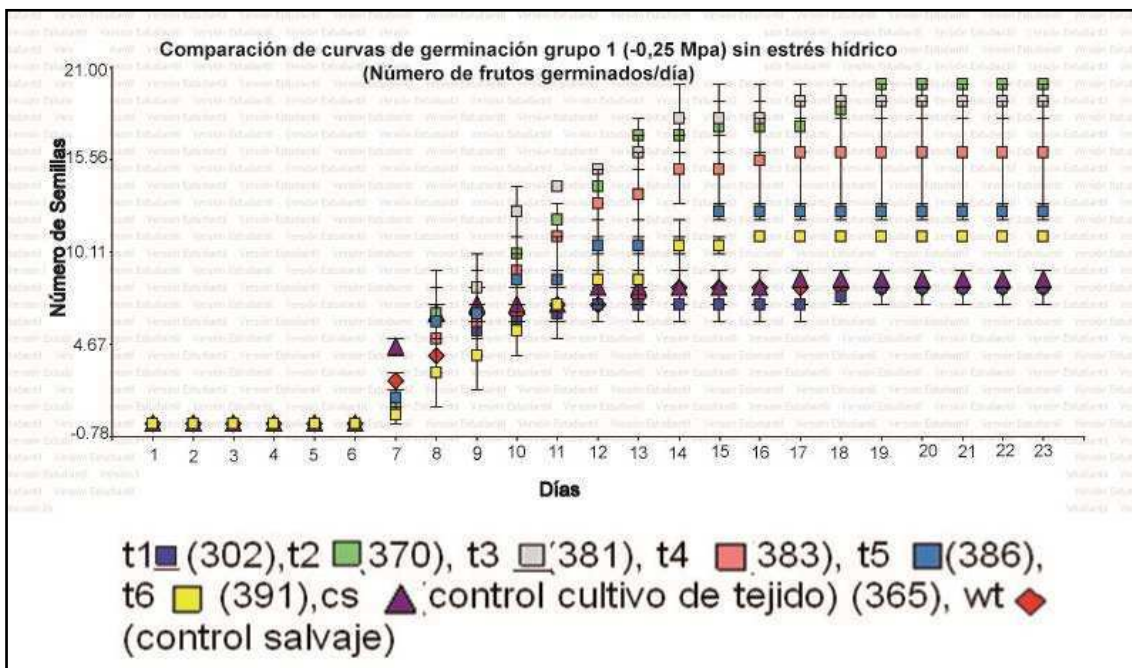


Figura 15. Comparación de curva de germinación -0,25 MPa entre líneas transgénicas t1 (302, en azul), t2 (370, en verde), t3 (381, en gris), t4 (383, en rosa), t5 (386, en violeta), t6 (391, en amarillo) y líneas control (wt, en rojo y cs, en violeta).

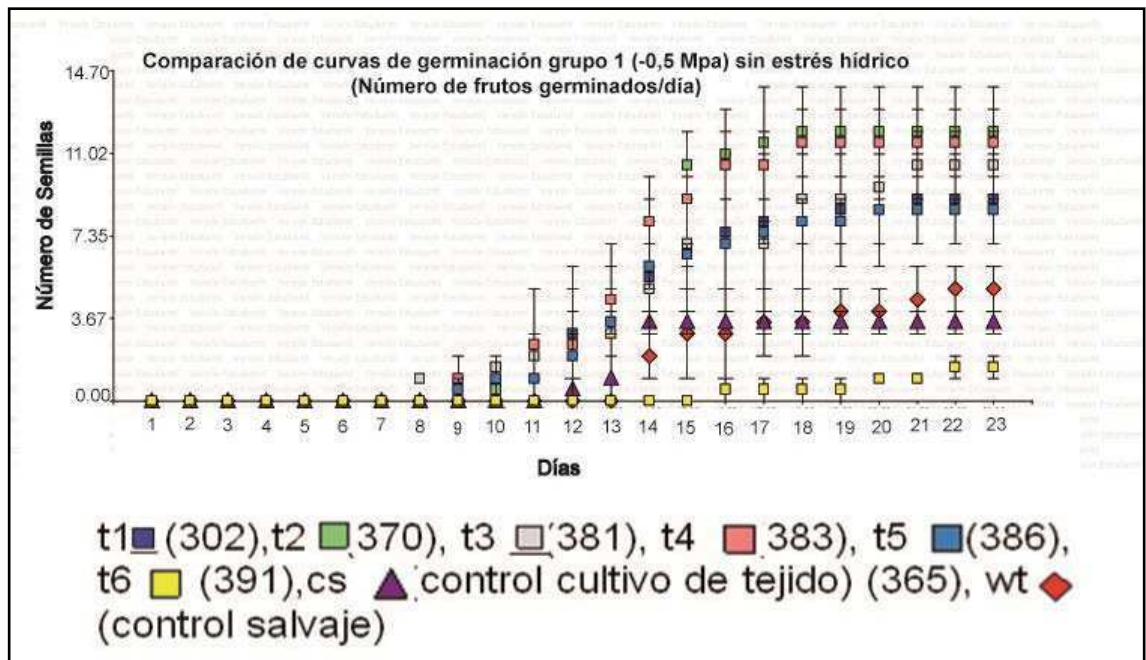


Figura 16. Comparación de curva de germinación en -0,5MPa entre líneas transgénicas t1 (302, en azul), t2 (370, en verde), t3 (381, en gris), t4 (383, en rosa), t5 (386, en violeta), t6 (391, en amarillo) y líneas control (wt, en rojo y cs, en violeta).

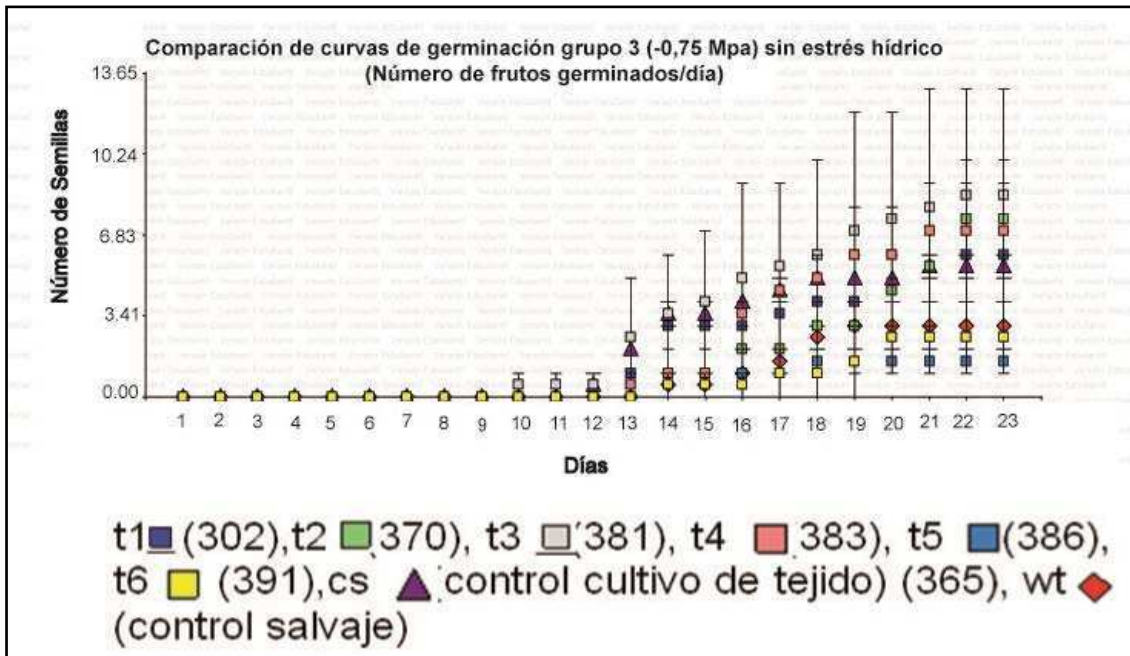


Figura 17. Comparación de curva de germinación en -0,75 MPa entre líneas transgénicas t1 (302, en azul), t2 (370, en verde), t3 (381, en gris), t4 (383, en rosa), t5 (386, en violeta), t6 (391, en amarillo) y líneas control (wt, en rojo y cs, en violeta).

4.3.2 Velocidad inicial de germinación

La línea transgénica t2 (370) ha mostrado un valor de velocidad mayor y significativo en el grupo 1 y 2 mientras que t3 (381) solo en el grupo 2, las líneas t1 (302) y t4 (383) solo fueron significativas con respecto al control wt o al control somaclonal (Fig. 18-21).

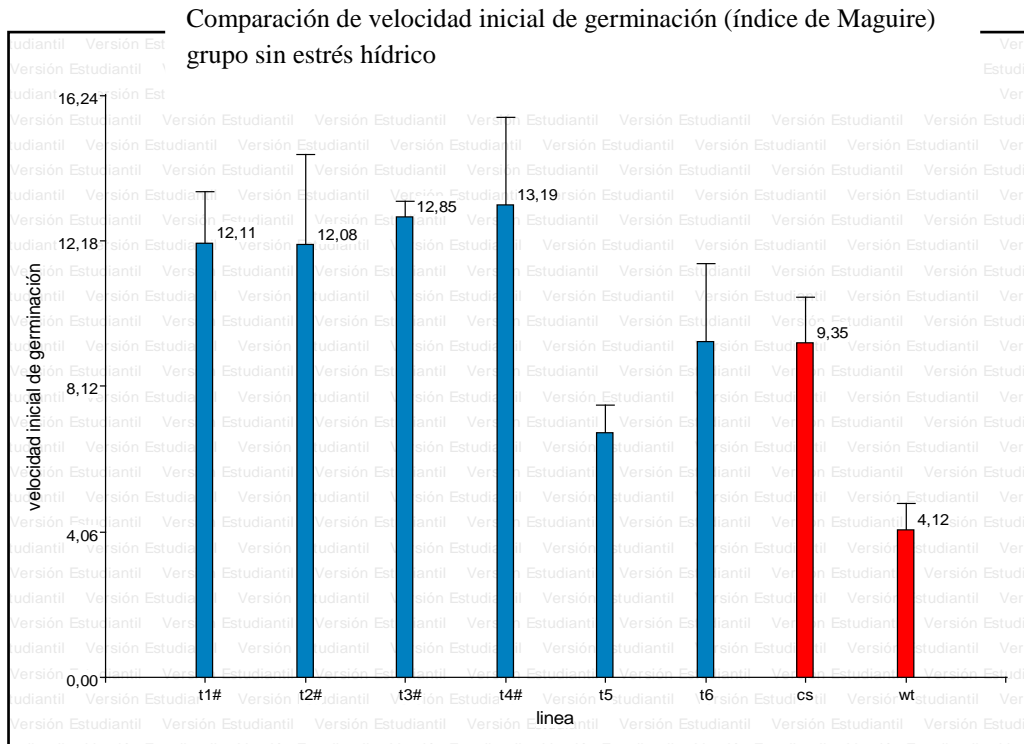


Figura 18. Comparación de velocidad inicial de germinación entre líneas transgénicas t1(302), t2 (370), t3 (381), t4 (383), t5 (386), t6 (391) y control de 0 Mpa (agua destilada), (* valor significativo respecto a ambas líneas control; # valor significativo respecto a wt; + valor significativo respecto a cs). Líneas transgénicas (barras azules), Líneas controles (barras rojas).

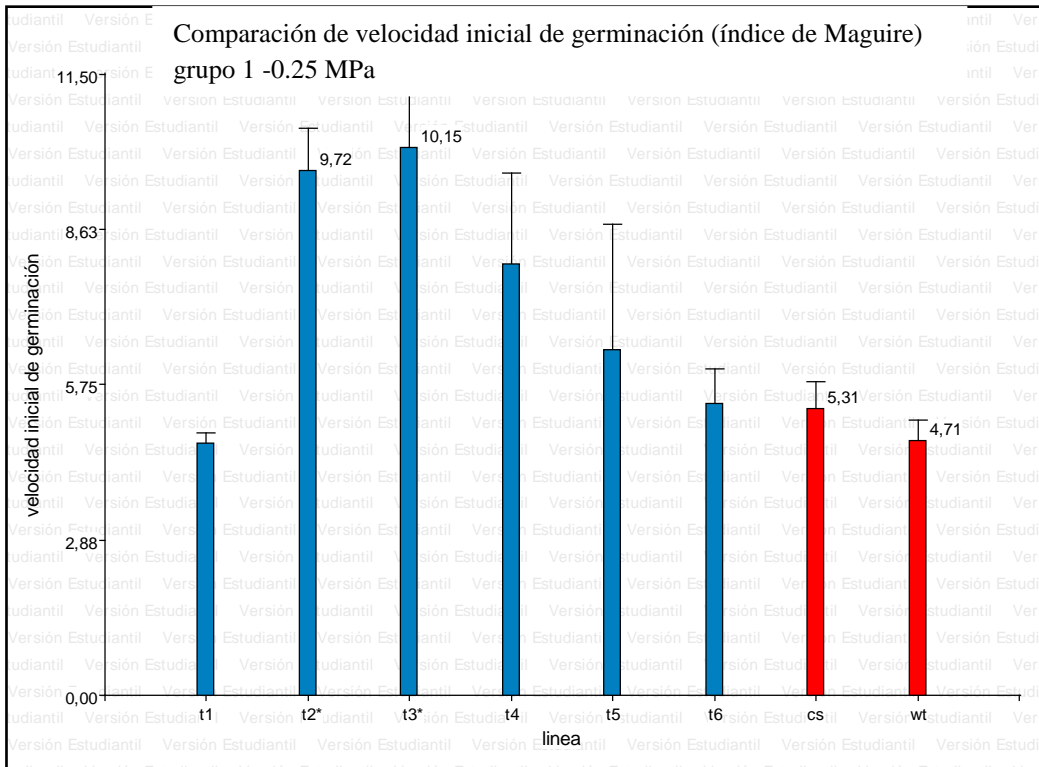


Figura 19. Comparación de velocidad inicial de germinación entre líneas transgénicas t1(302), t2 (370), t3 (381), t4 (383), t5 (386), t6 (391) y control de -0,25Mpa , (*valor significativo respecto a ambas líneas control). Líneas transgénicas (barras azules), Líneas controles (barras rojas).

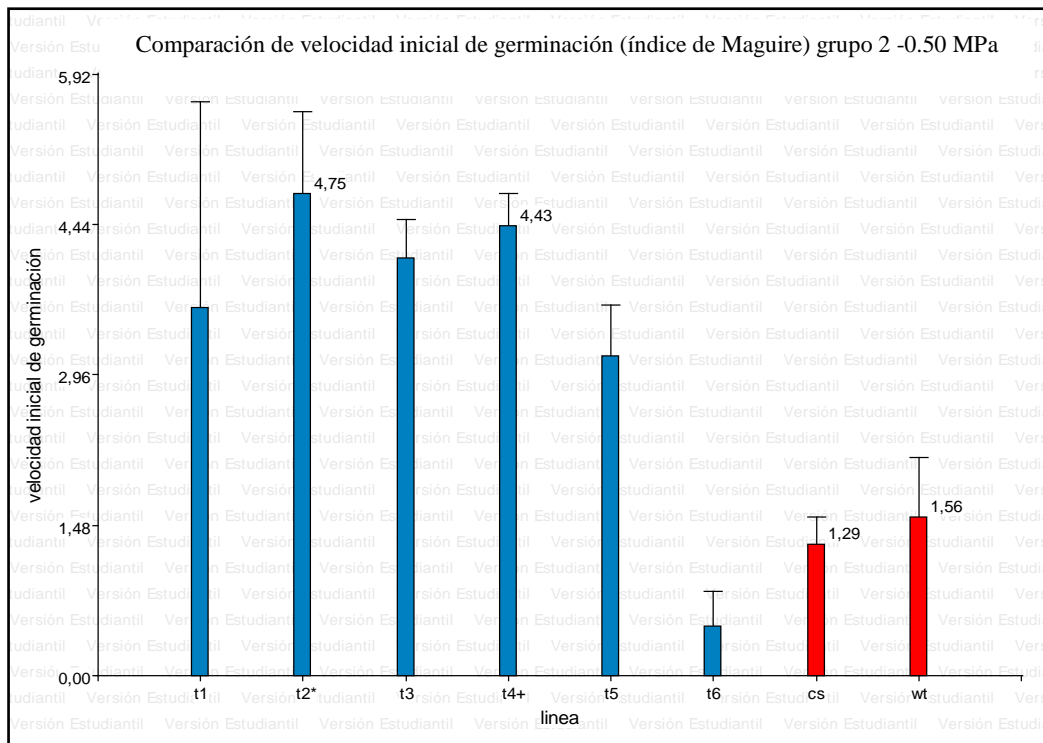


Figura 20. Comparación de velocidad inicial de germinación entre líneas transgénicas t1(302), t2 (370), t3 (381), t4 (383), t5 (386), t6 (391) y control de grupo 2 (20 gr PEG/agua), (* valor

significativo respecto a ambas líneas control; + valor significativo respecto a cs). Líneas transgénicas (barras azules), Líneas controles (barras rojas).

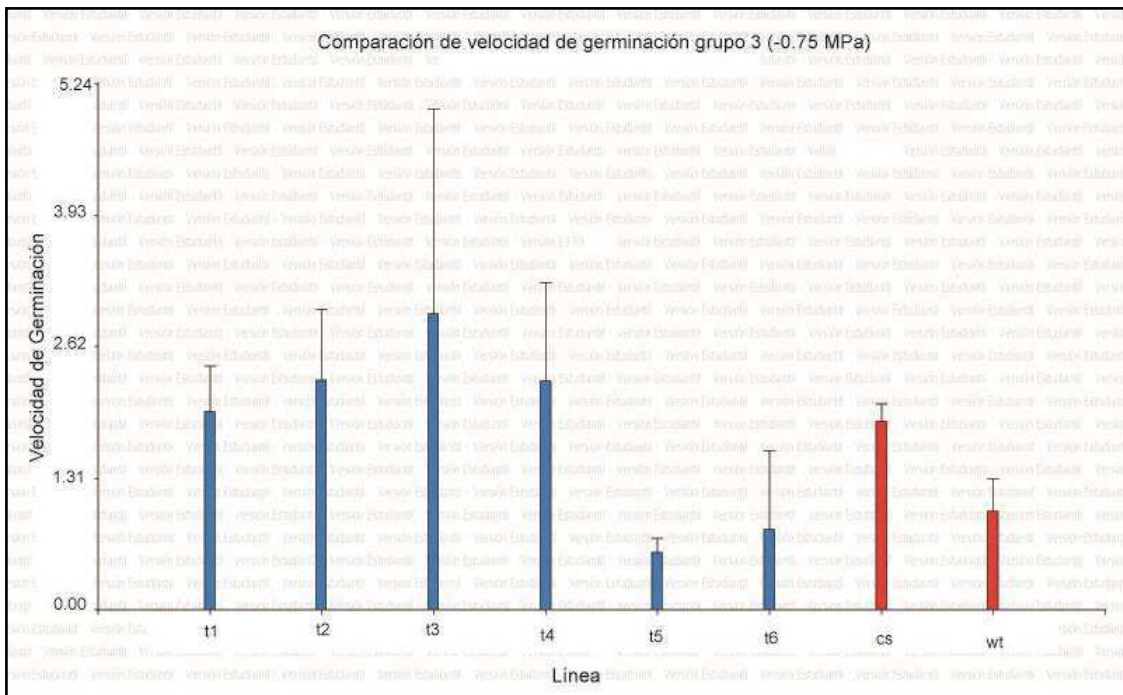


Figura 21. Comparación de velocidad inicial de germinación entre líneas transgénicas t1(302), t2 (370), t3 (381), t4 (383), t5 (386), t6 (391) y control de grupo 3 (25 gr PEG/agua). Líneas transgénicas (barras azules), Líneas controles (barras rojas).

4.3.3 Porcentaje de germinación

Las líneas t2 (370), t3 (381) y t4 (383) tienen valores significativos mayores a ambas líneas control en los grupos 1 y 2, en el grupo control las diferencias de las líneas t1, t2, t3 y t4 solo son significativas con respecto al control silvestre (wt), en el caso del grupo 3 ninguna línea muestra diferencias significativas (Fig. 22-25).

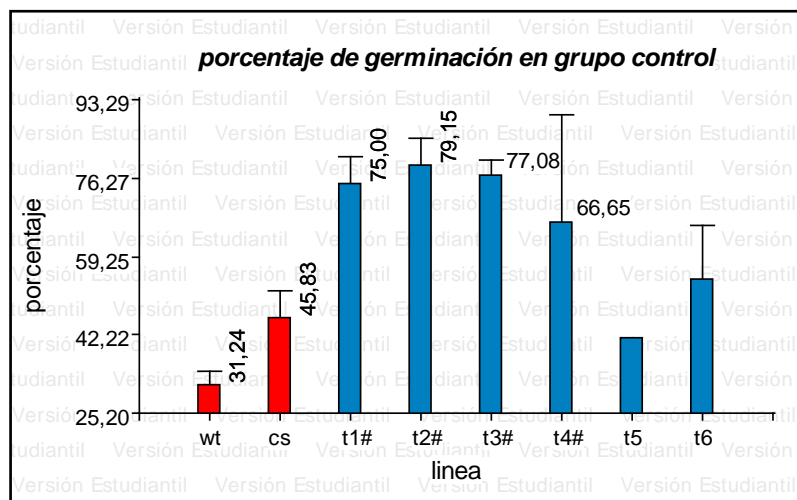


Figura 22. Comparación de porcentaje de germinación entre líneas transgénicas t1(302), t2 (370), t3 (381), t4 (383), t5 (386), t6 (391) y control, (# valor significativo respecto a wt). Líneas transgénicas (barras azules), Líneas controles (barras rojas).

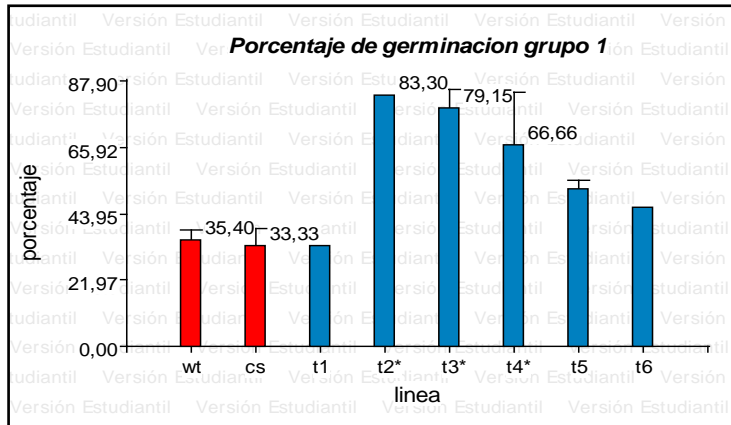


Figura 23. Comparación de porcentaje de germinación entre líneas transgénicas t1(302), t2 (370), t3 (381), t4 (383), t5 (386), t6 (391) y control en grupo 1, (*valor significativo respecto a ambas líneas control). Líneas transgénicas (barras azules), Líneas controles (barras rojas).

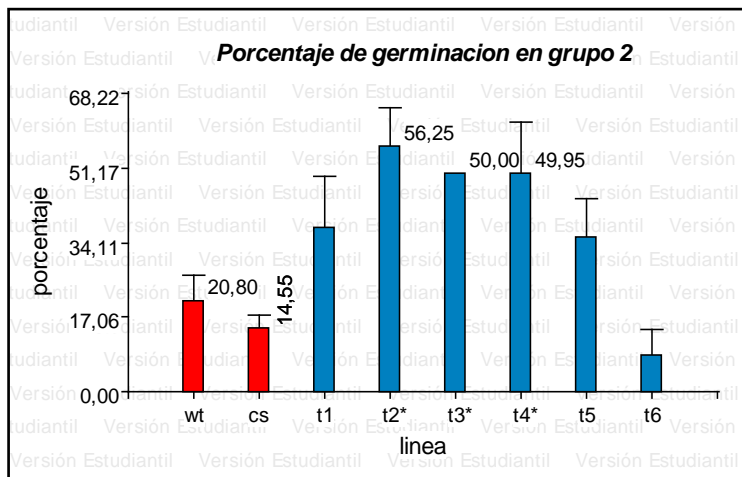


Figura 24. Comparación de porcentaje de germinación entre líneas transgénicas t1(302), t2 (370), t3 (381), t4 (383), t5 (386), t6 (391) y control en grupo 2, (*valor significativo respecto a ambas líneas control). Líneas transgénicas (barras azules), Líneas controles (barras rojas).

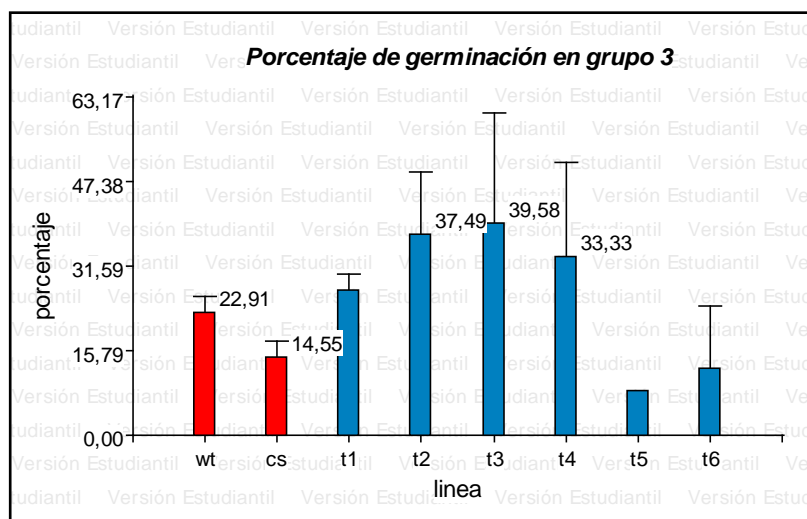


Figura 25. Comparación de porcentaje de germinación entre líneas transgénicas t1(302), t2 (370), t3 (381), t4 (383), t5 (386), t6 (391) y control en grupo 3. Líneas transgénicas (barras azules), Líneas controles (barras rojas).

4.4 Anatomía

4.4.1 Anatomía Foliar

Se midieron los siguientes caracteres:

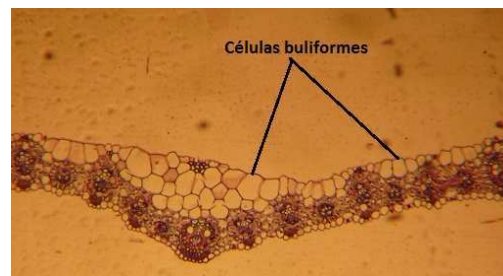
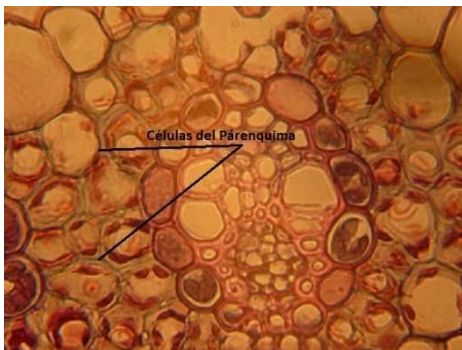
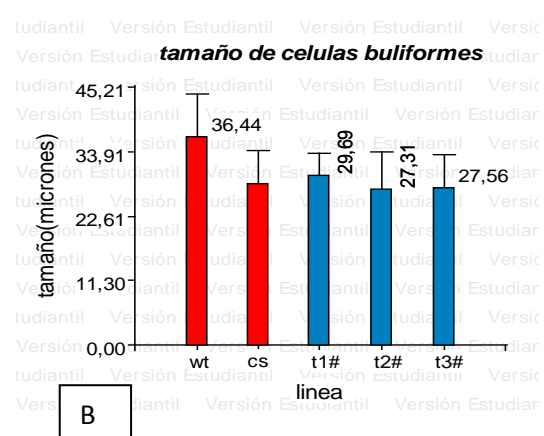
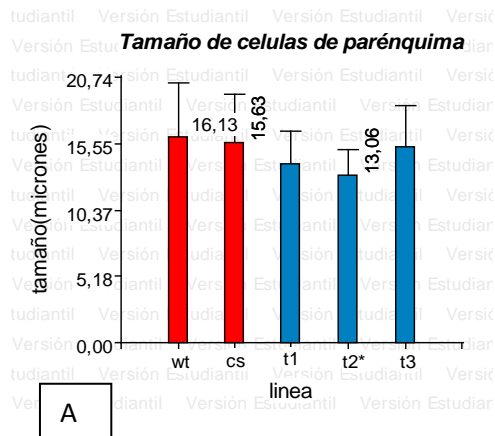
Carácter	línea 302	línea 383	línea 386
Tamaño de Células Buliformes	wt*/cs	wt*/cs	wt*/cs
Tamaño de células parenquimáticas	wt/cs	wt*/cs*	wt/cs
Tamaño de células de la vaina de haces terciarios	wt*/cs*	wt*/cs	wt*/cs
Tamaño de células de la vaina de haces secundarios	wt/cs	wt*/cs	wt*/cs
Tamaño de células de la vaina de haces primarios	wt/cs	wt/cs	wt/cs
Ancho de estomas	wt*/cs	wt*/cs	wt/cs
Largo de estomas	wt/cs	wt/cs	wt/cs
Tamaño de cloroplastos de la vaina de Kranz	wt/cs	wt*/cs*	wt/cs
Tamaño de cloroplastos en células del parénquima	wt/cs	wt*/cs*	wt/cs
Distancia entre haces vasculares	wt*/cs	wt*/cs*	wt*/cs
Capas de esclerénquima de la cara abaxial de haces primarios	wt/cs	wt/cs	wt/cs
Capas de esclerénquima de la cara adaxial de haces primarios	wt/cs	wt/cs	wt/cs
Capas de esclerénquima de la cara abaxial de haces secundarios	wt/cs	wt/cs	wt/cs
Capas de esclerénquima de la cara adaxial de haces secundarios	wt/cs	wt/cs	wt/cs

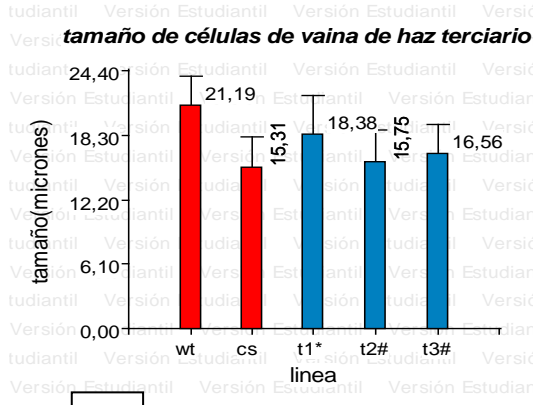
Tabla 5. Comparación de caracteres foliares de líneas transgénicas con control salvaje (wt) y cultivo de tejido (cs), *significativo.

Se encontró al menos una diferencia en un carácter foliar en las líneas transgénicas 302 y 383 (tabla 5) analizadas con respecto a los dos controles establecidos (control cultivo de tejidos y salvaje) (Fig. 26 A, C, E, F y G), también en algunos caracteres surgieron diferencias en líneas transgénicas sólo con respecto al control silvestre (Fig. 26 B, C, D, G y H).

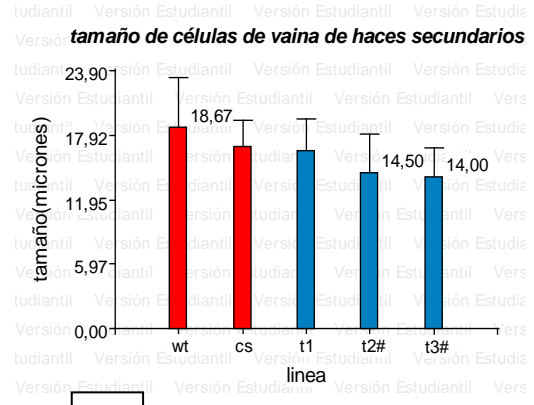
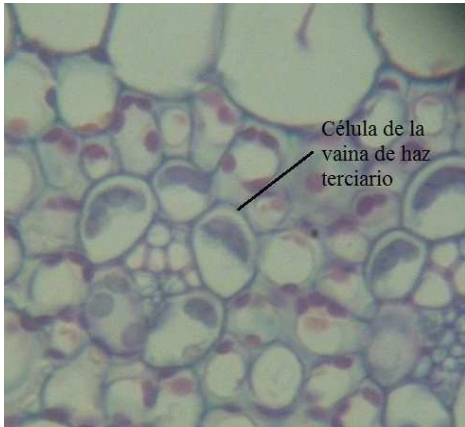
En particular, la línea transgénica 383, mostró más características diferenciales que las otras dos líneas transgénicas evaluadas (Tabla 5), así como alguna particularidad anatómica cualitativa como la de poseer menor cantidad de cloroplastos en las células de la vaina Kranz y un menor tamaño de cloroplastos (Fig. 26 E).

Las plantas transgénicas presentan las hojas más vascularizadas que las plantas control, lo que se refleja en la menor distancia entre haces vasculares. (Fig. 26 G)

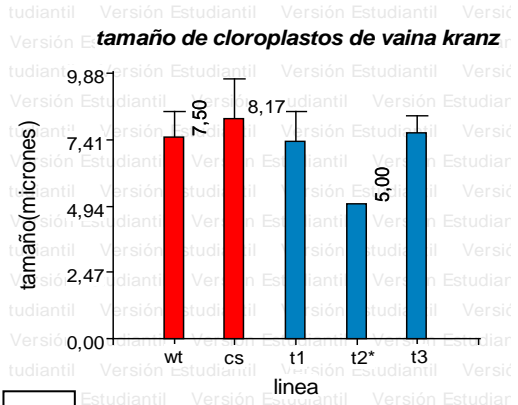
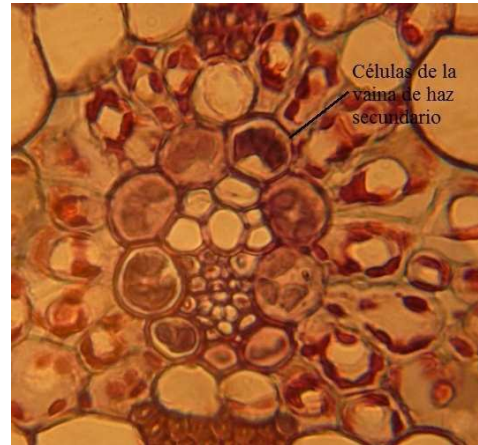




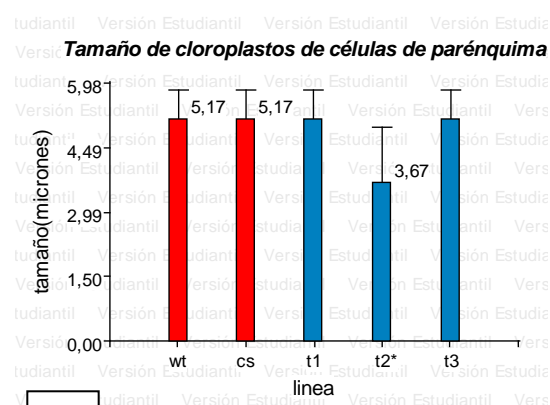
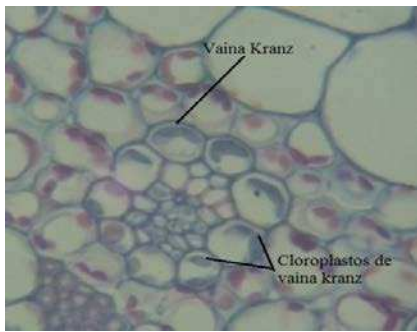
C



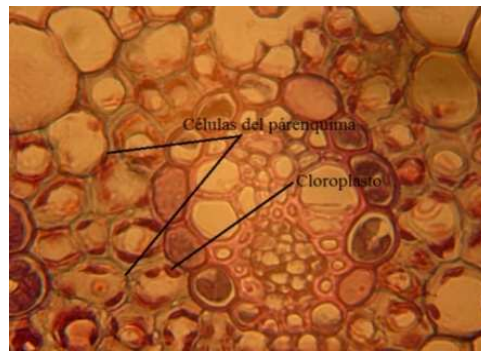
D



E



F



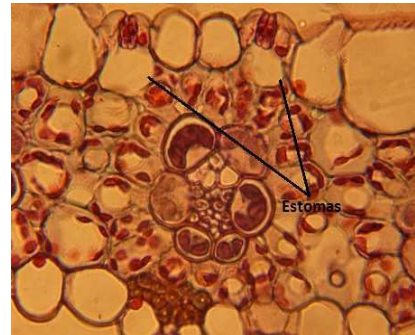
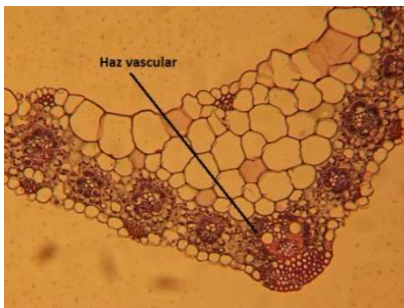
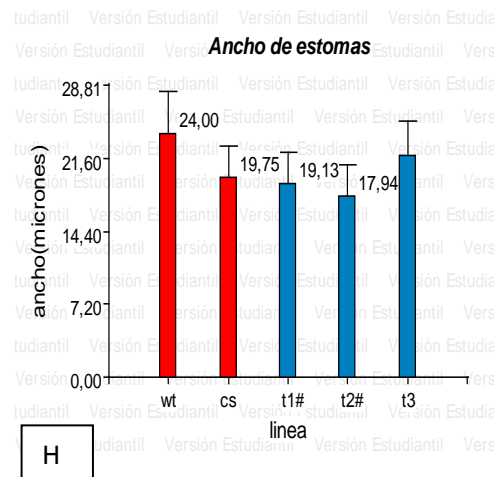
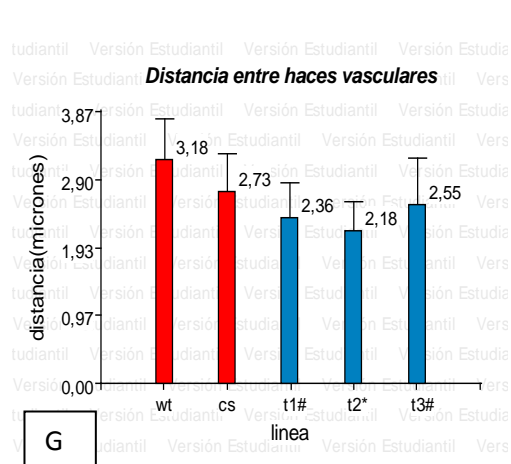


Figura 26. Comparación de características anatómicas entre líneas transgénicas t1 (302), t2 (383), t3 (386) y controles (wt y cs), (* valor significativo respecto a ambas líneas controles) (# significativo respecto a wt). Líneas transgénicas (barras azules), Líneas controles (barras rojas). Las características anatómicas representadas son: A) Tamaño de células de parénquima, B) Tamaño de células buliformes, C) Tamaño de células de haz terciario, D) Tamaño de células de vaina de haces secundarios. E) Tamaño de cloroplastos de vaina Kranz, F) Tamaño de cloroplastos de células del parénquima, G) Distancia entre haces vasculares y H) Ancho de estomas.

4.4.2 Caracteres exomorfológicos La línea 386 tiene un valor menor y significativo con respecto a las líneas control (wt y cs) en la longitud del racimo. (Fig. 27)

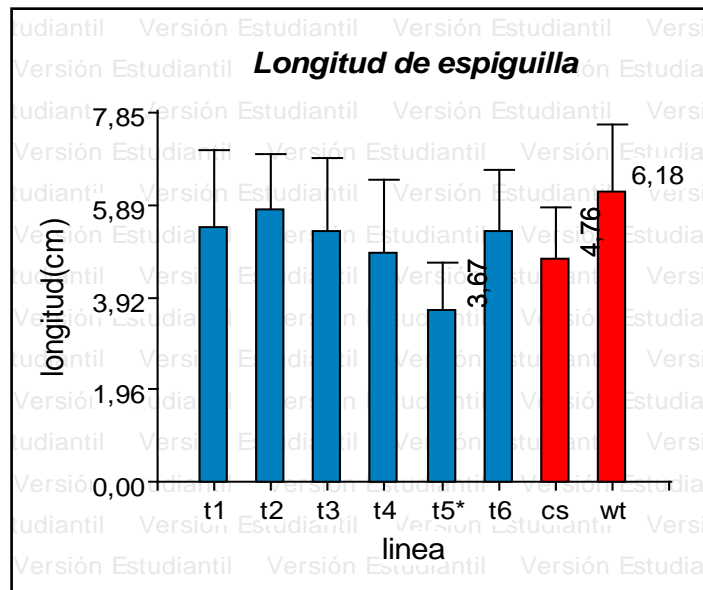


Figura 27. Longitud de la espiguilla de líneas transgénicas t1 (302), t2 (370), t3 (381), t4 (383), t5 (386), t6 (391) y líneas controles (wt y cs), (*valor significativo respecto a ambas líneas control).

Líneas transgénicas (barras azules), Líneas controles (barras rojas).

4.4.3 Ultraestructura del cloroplasto

Dos de los caracteres evaluados en los cloroplastos de las células del mesófilo mostraron diferencias significativas en las líneas transgénicas t1 (302), t3 (383) y t5 (391) con respecto a los dos controles (wt y cs) (Fig.28 A, B, D, E y F), mientras que las otras dos líneas evaluadas t2 (370) y t4 (386) presentan caracteres diferenciales con respecto al control somaclonal (cs) o silvestre (wt) (Fig. 28 A, D y E)

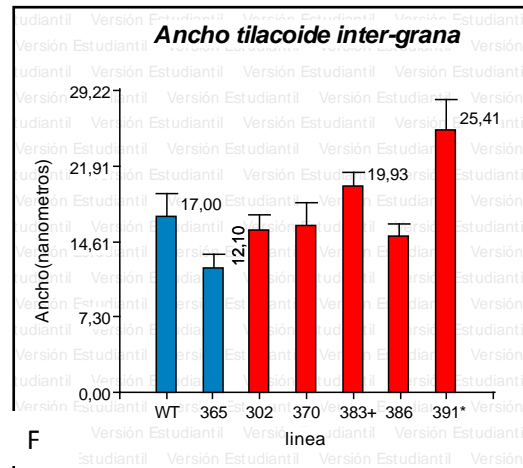
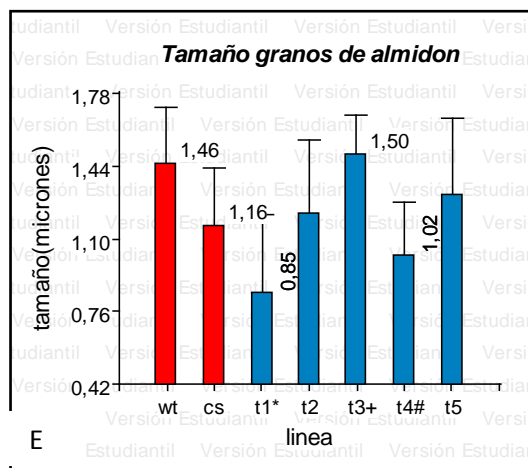
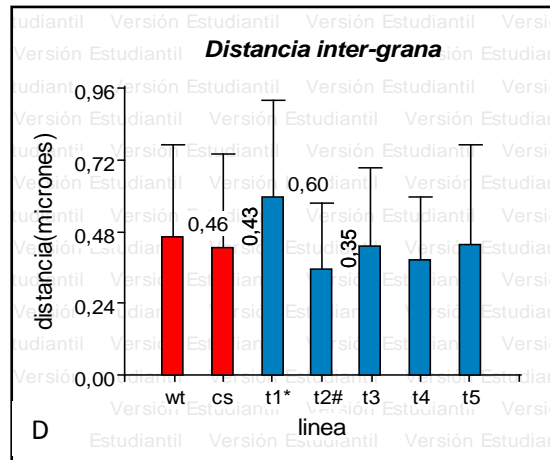
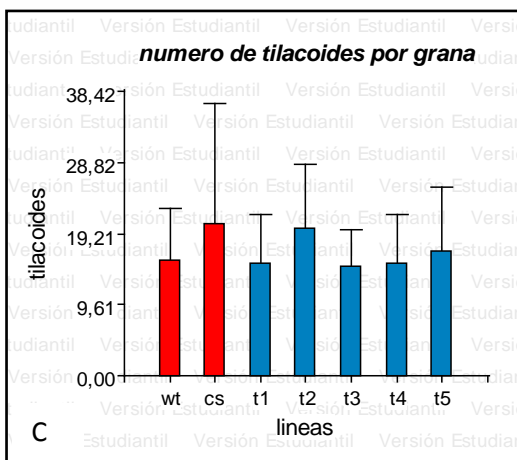
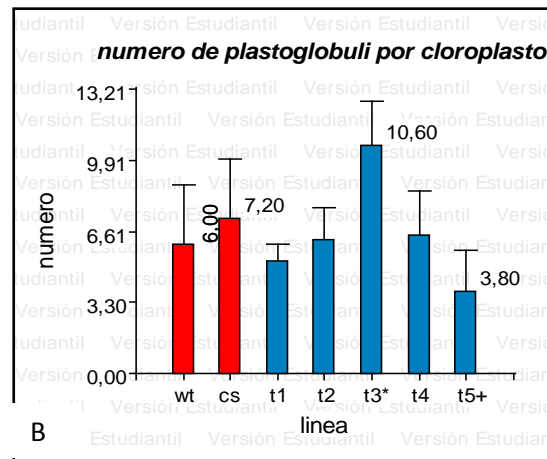
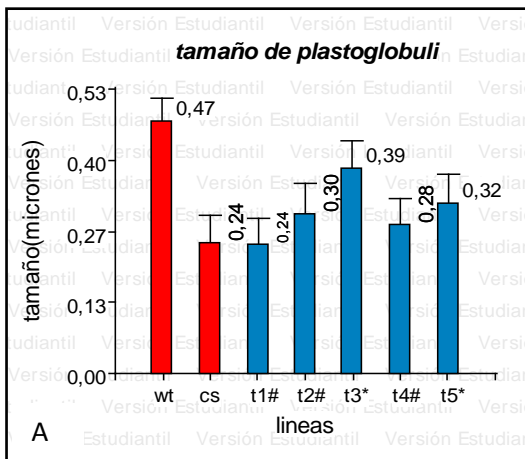


Figura 28. Comparación de caracteres de la ultraestructura de cloroplastos de células del mesófilo entre líneas transgénicas t1(302), t2(370), t3(383), t4(386), t5(391) y las líneas controles (wt y cs), (*valor significativo respecto a ambas líneas control; # valor significativo respecto a wt; + valor significativo respecto a cs). Líneas transgénicas (barras azules), Líneas controles (barras rojas).

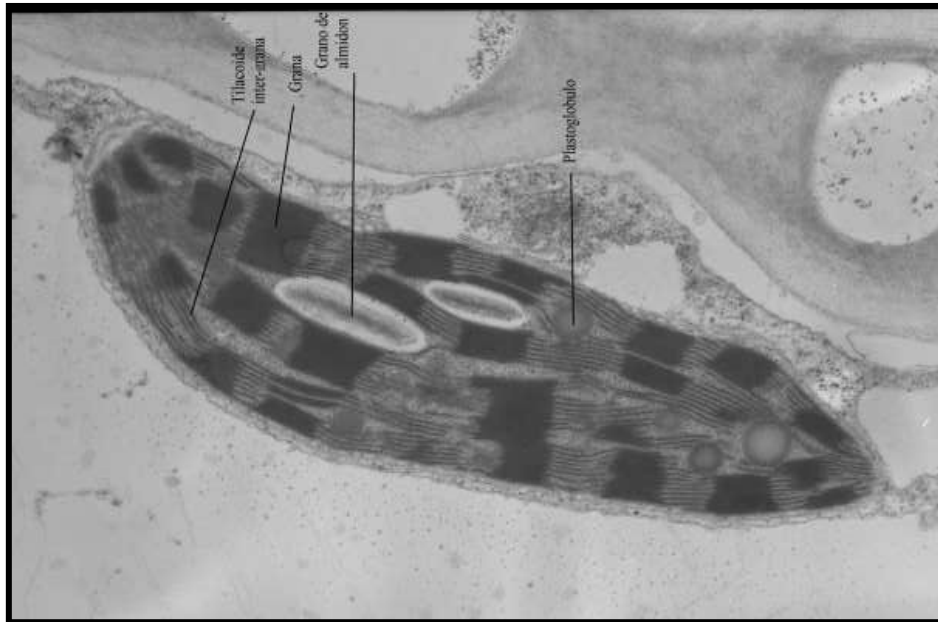


Fig. 29. Cloroplasto con Plastoglobulo, grana, granos de almidón y tilacoides.

4.5 Clorofila en ensayo de sequía

Los valores de clorofila de las líneas transgénicas t1(302), t2(311), t3(383), t4(386) y t5(391) no mostraron diferencia significativa las líneas control wt (salvaje), control somaclonal(cs) y control somaclonal 1(cs1) en ninguna de las etapas del ensayo.

Promediando las dos etapas de sequía y recuperación hay una tendencia al aumento del contenido de clorofila desde la etapa previa a la etapa de recuperación en todas las líneas transgénicas y las líneas control (Fig.30), se observa la tendencia en este gráfico y hay diferencias significativas en algunas líneas transgénicas y control con los valores de cada etapa sin promediar (Fig. 31).

Se observa un efecto de aumento o mantenimiento del contenido a pesar de los días de sequía con diferencias significativas en algunas líneas transgénicas y control.

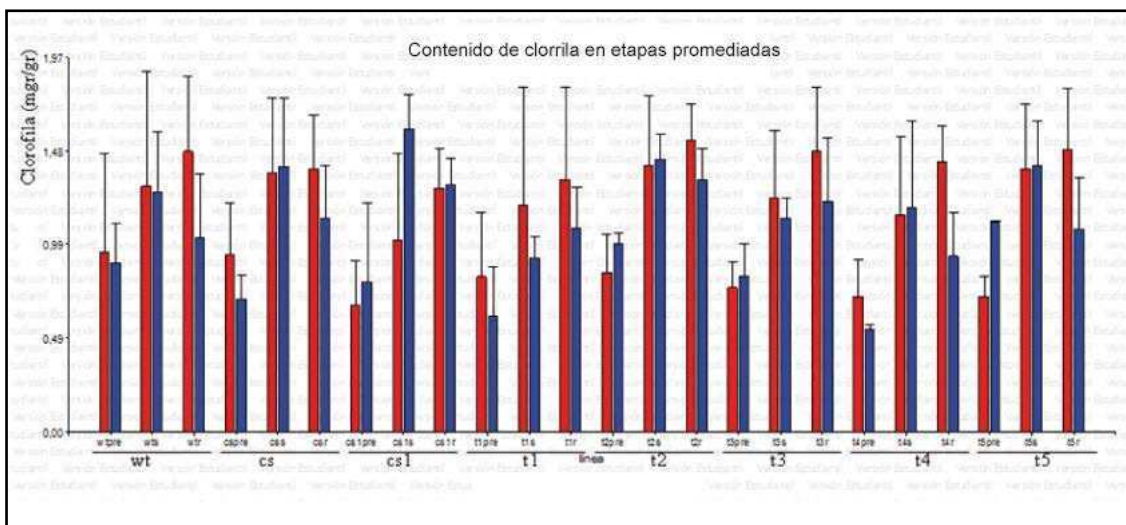


Figura 30. Contenido de clorofila en ensayo de sequía promediando las etapas de sequía (s) y de recuperación (r). Barras rojas: tratamiento, Barras azules: control.

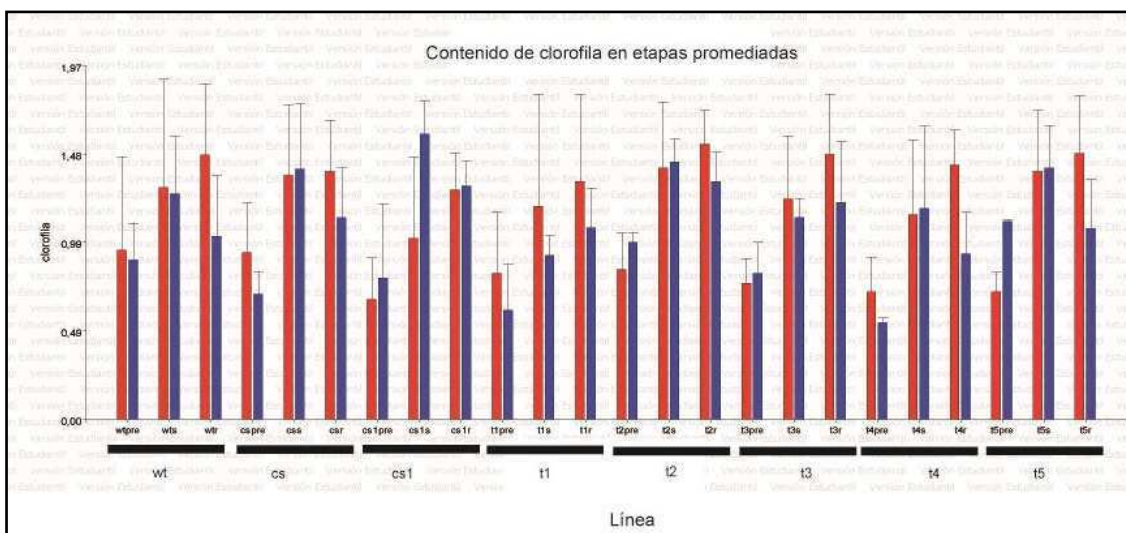


Figura 31. Contenido de clorofila en ensayo de sequía por línea; pre=previa, ms=medio sequía, fs=final sequía, rp=recuperación parcial, rt=recuperación total. Barras rojas: tratamiento, Barras azules: control.

4.6 Resultados proteína sequía

No se observaron diferencias significativas de las líneas transgénicas con respecto a las líneas control (wt) y somaclonales (cs y cs1), en general se observó un aumento en el contenido de proteína en la mitad y final del período de sequía con una

leve disminución en la etapa de recuperación (Fig. 32), hay diferencias significativas de valores entre las etapas de sequía y de recuperación.

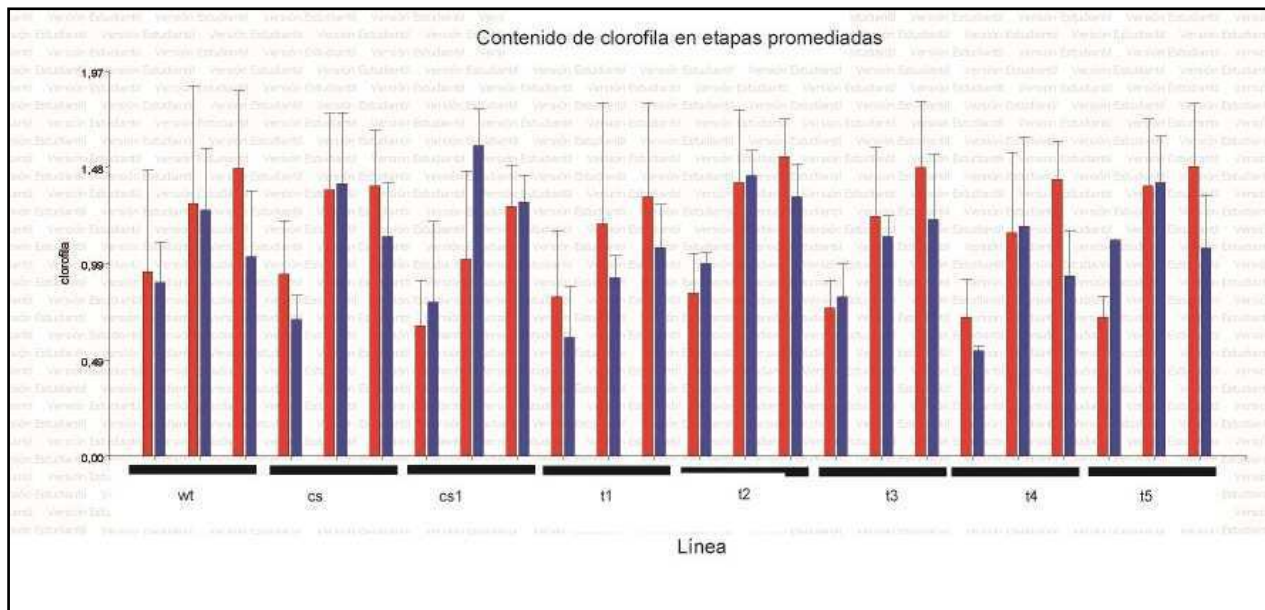


Figura 32. Contenido de proteína en ensayo de sequía en líneas transgénicas y control; pre=previa, ms=medio sequia, fs=final sequia, rp=recuperación parcial, rt=recuperación total. Barras rojas: tratamiento, Barras azules: control.

4.7 Resultados glucosa sequía

Se observaron valores mayores significativos en la etapa mitad de sequía en las líneas transgénicas t4(386) y t5(391) con respecto a las líneas control (wt) y somaclonales (cs y cs1) y son significativos (Fig.33), en general se observó un aumento en el contenido de glucosa en la mitad o final del periodo de sequía con una leve disminución en la etapa de recuperación parcial y más pronunciada en la etapa de recuperación total, hay diferencias significativas de valores entre las etapas de sequia y de recuperación (Fig. 34).

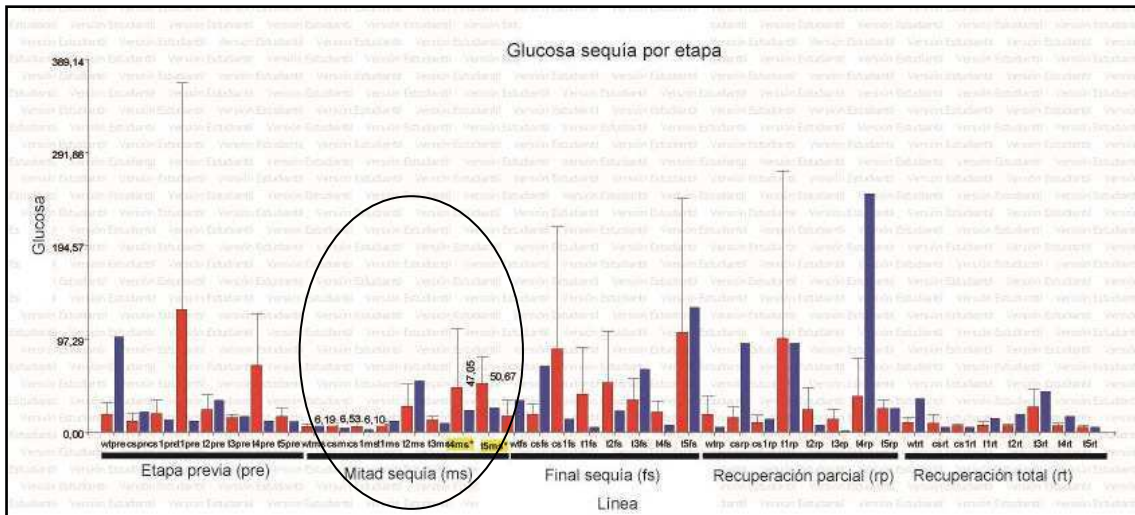


Fig 33. Contenido de glucosa en líneas transgénicas y control por etapas durante ensayo de sequea (*valor significativo respecto a ambas líneas control); pre=previa, ms=medio sequea, fs=final sequea, rp=recuperación parcial, rt=recuperación total. Eclipse señala período con diferencias significativas entre tratamiento y control. Barras rojas: tratamiento, Barras azules: control.

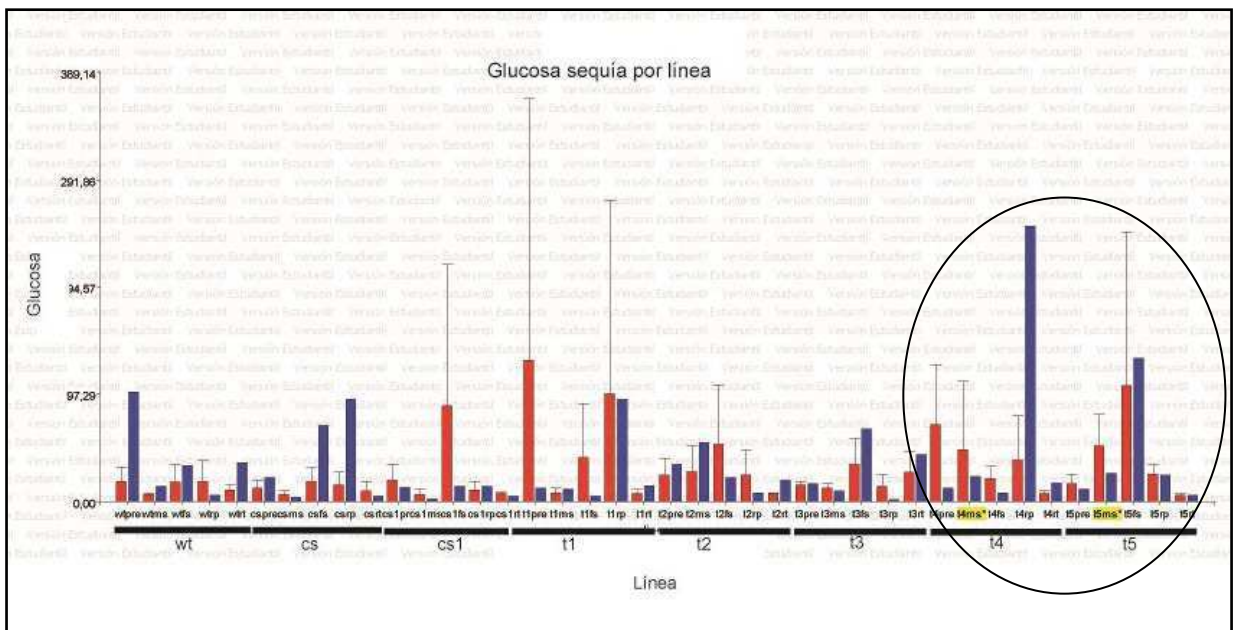


Fig 34. Contenido de glucosa en líneas transgénicas y control por línea durante ensayo de sequea. (*valor significativo respecto a ambas líneas control); pre=previa, ms=medio sequea, fs=final sequea, rp=recuperación parcial, rt=recuperación total. Eclipse señala período con diferencias significativas entre tratamiento y control. Barras rojas: tratamiento, Barras azules: control.

4.8 Resultados SOD sequea

No se observaron diferencias significativas de las líneas transgénicas con respecto a las líneas control (wt) y somaclonales (cs y cs1), en general se observó un

aumento en la actividad de SOD en la mitad del período de sequía con una leve disminución al fin de período de sequía así como una disminución de los valores en la etapa de recuperación total, hay diferencias significativas entre valores de actividad entre las etapas de sequía y de recuperación (Fig. 35).

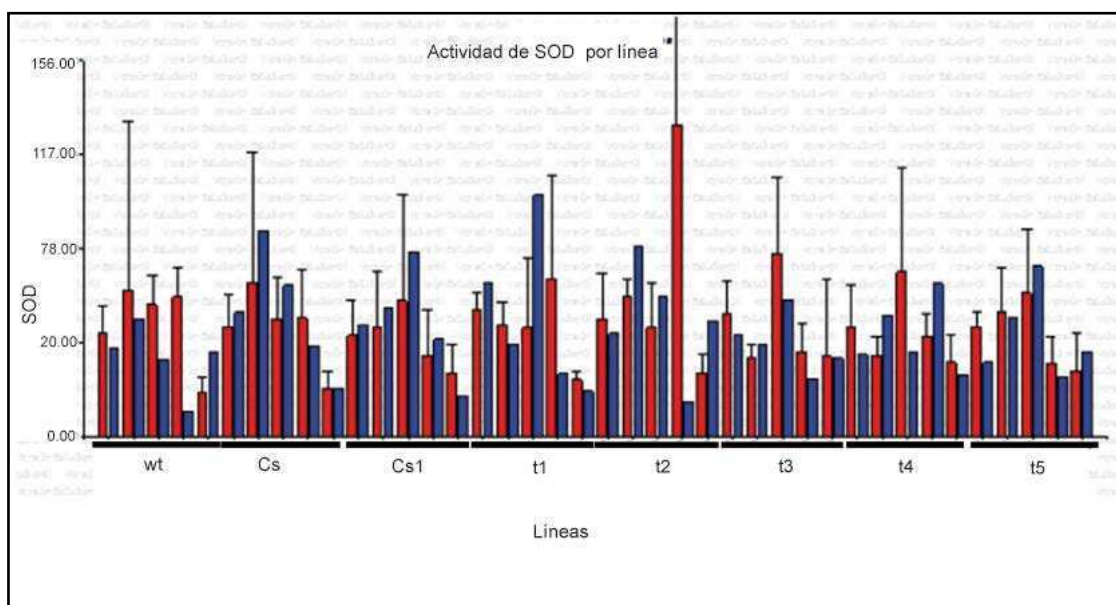


Figura 35. Actividad de la enzima súper óxido dismutasa durante ensayo de sequía de líneas transgénicas y control; pre=previa, sp=medio sequia, st=final sequia, rp=recuperación parcial, rt=recuperación total.

Barras rojas: tratamiento, Barras azules: control.

4.9 Resultados macollos vivos ensayo de sequía

Las líneas transgénicas no muestran diferencia significativa en el número de macollos vivos con respecto a los controles salvaje y somaclonales, en general se observa un aumento desde la etapa previa hasta la recuperación total manteniéndose constante este número durante la etapa de sequia y en el caso de la línea 302 (t1) se observa una mejor recuperación hasta valores levemente más altos que las demás líneas aunque no se mostraron significativos (Fig. 36).

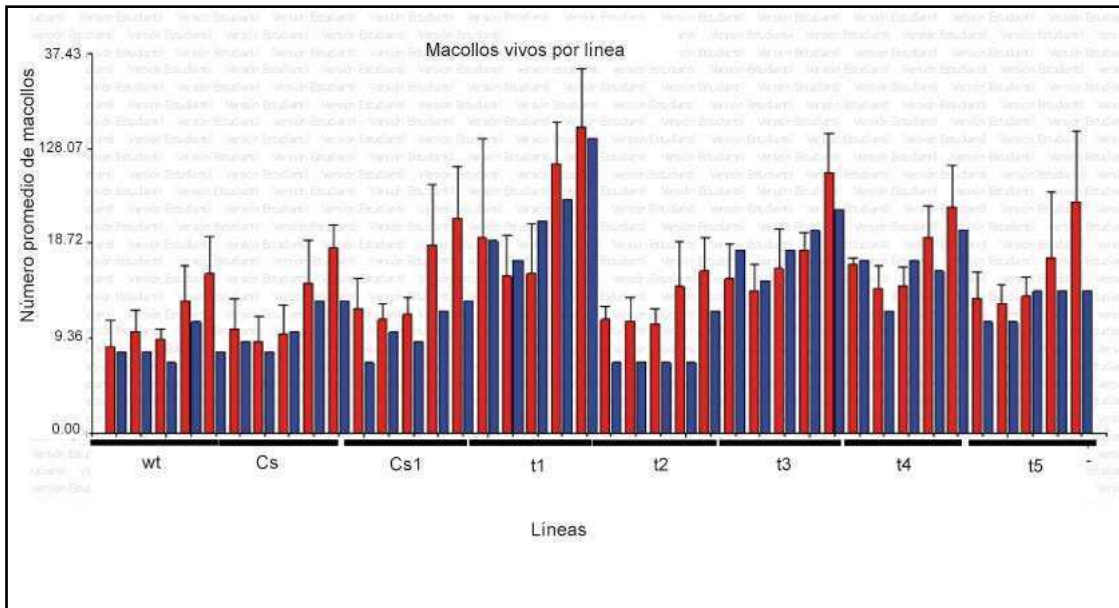


Figura 36. Número promedio de macollos en líneas transgénicas y control durante ensayo de sequía; pre=previa, s1=medio sequia, s2=final sequia, r1=recuperación parcial, r2=recuperación total. Barras rojas: tratamiento, Barras azules: control

4.10 Resultados macollos senescentes y en senescencia

No se observaron diferencias significativas de las líneas transgénicas con respecto a las líneas control (wt) y somaclonales (cs y cs1) en macollos senescentes y en senescencia, en general se observó un aumento en número de macollos senescentes y en senescencia en la etapa de de recuperación temprana, hay diferencia significativas entre valores del muestreo de fin sequía y primer muestreo de recuperación (Fig. 37-38).

Sumando el número de macollos de ambos tipos la línea t3 (383) mostró un valor mayor y significativo con respecto a las líneas control en la etapa de final de sequía y la línea t1 (302) pero en la etapa de recuperación temprana (Fig. 39).

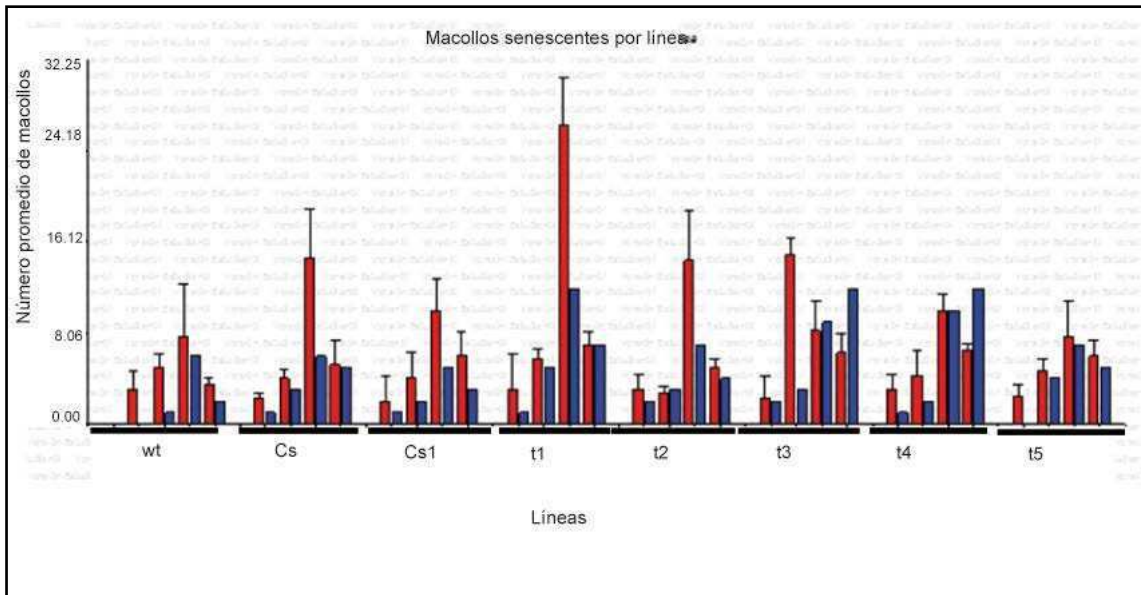


Figura 37. Número promedio de macollos senescentes en líneas transgénicas y control durante ensayo de sequía; pre=previa, s1=medio sequia, s2=final sequia, r1=recuperación parcial, rt=recuperación total.
Barras rojas: tratamiento, Barras azules: control

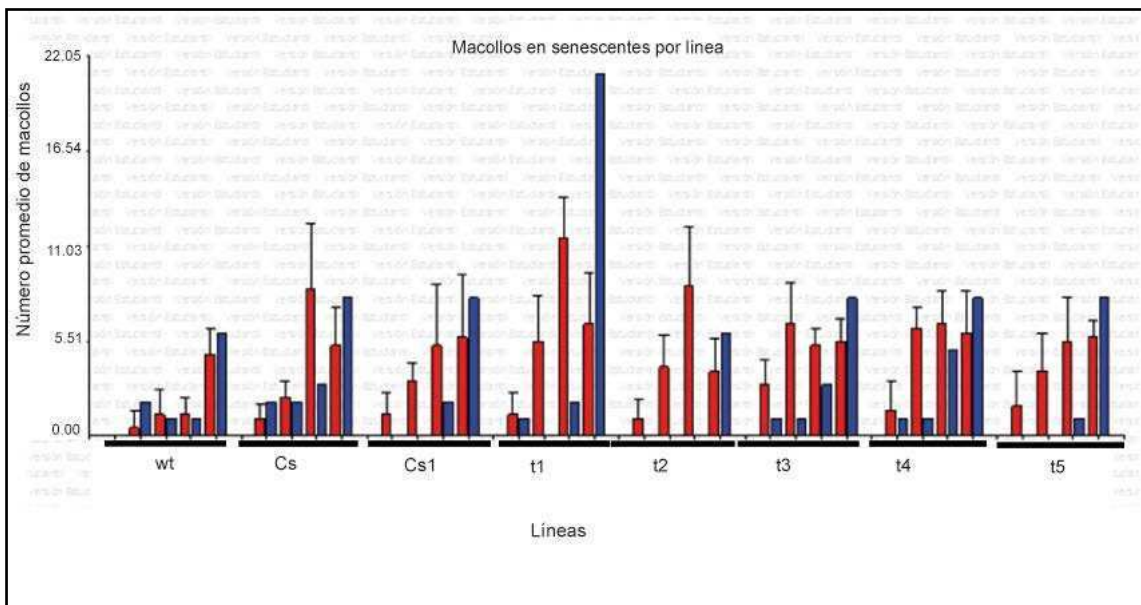


Figura 38. Número promedio de macollos en senescencia en líneas transgénicas y control durante ensayo de sequía; pre=previa, s1=medio sequia, s2=final sequia, r1=recuperación parcial, rt=recuperación total.
Barras rojas: tratamiento, Barras azules: control

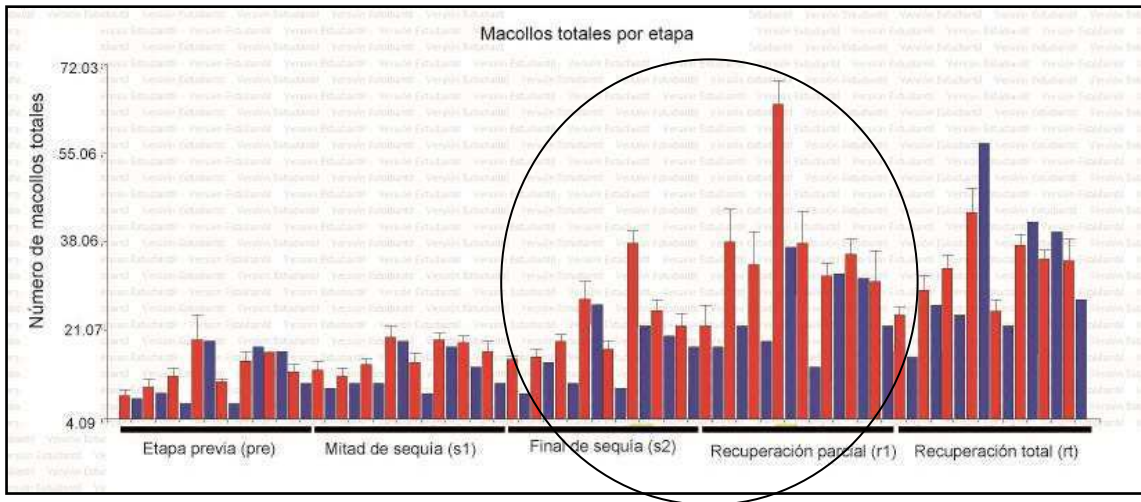


Figura 39. Número de macollos totales en líneas transgénicas y control durante ensayo de sequía pre=previa, s1=medio sequía, s2=final sequía, r1=recuperación parcial, rt=recuperación total. Eclipse señala período con diferencias significativas entre tratamiento y control. Barras rojas: tratamiento, Barras azules: control

4.11 Clorofila ensayo de heladas

La línea transgénica t1 (302) mostro diferencias significativos mayores con respecto a las líneas control salvaje (wt) y las dos líneas de control somaclonal (cs) en los valores de muestreo después de la primera helada (h1) y la línea transgénica t3 (383) en los valores post primera y segunda helada también mostró esto (Fig.40).

En general se observa una tendencia a la disminución de los valores de clorofila durante la etapa h1 y h2.

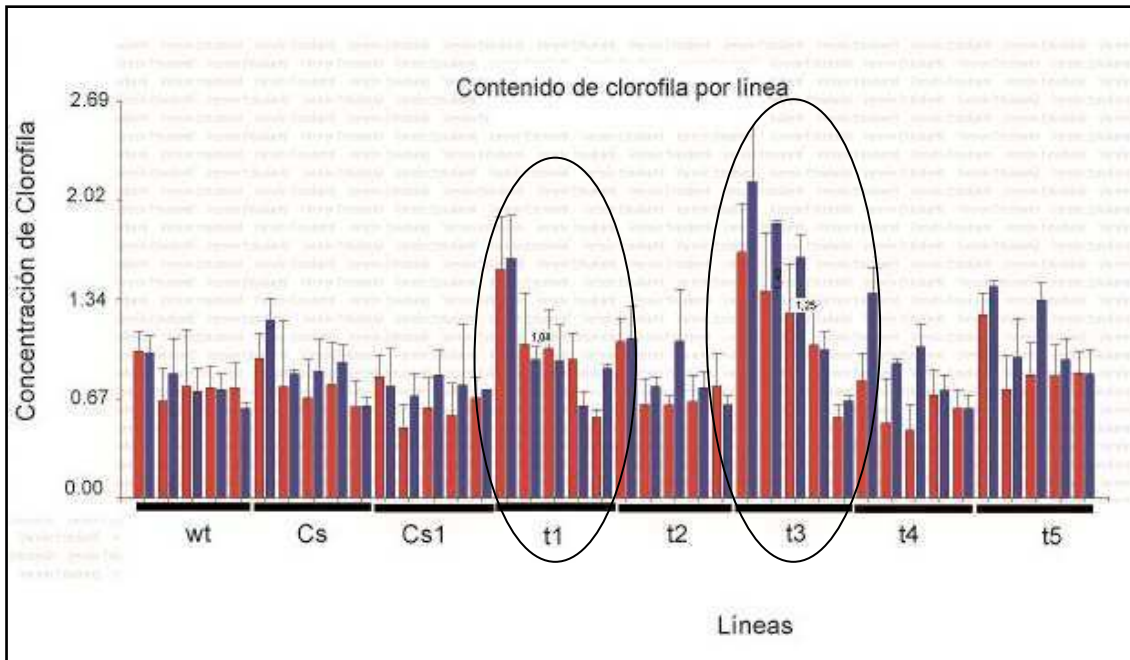


Figura 40. Contenido de clorofila en líneas transgénicas y control durante ensayo de frío; pre=previa, h1=primera helada, h2=segunda helada, r1=recuperación parcial, r2=recuperación total. Eclipse señala período con diferencias significativas entre tratamiento y control. Barras rojas: tratamiento, Barras azules: control

4.12 Resultados proteína ensayo de heladas

No se observaron diferencias significativas de las líneas transgénicas con respecto a las líneas control (wt) y somaclonales (cs y cs1), en general se observó el patrón de un leve aumento en la primera helada con una disminución en la segunda o a la inversa, con un aumento en la etapa de la recuperación, hay diferencias significativas entre valores post-helada y de recuperación (Fig. 41).

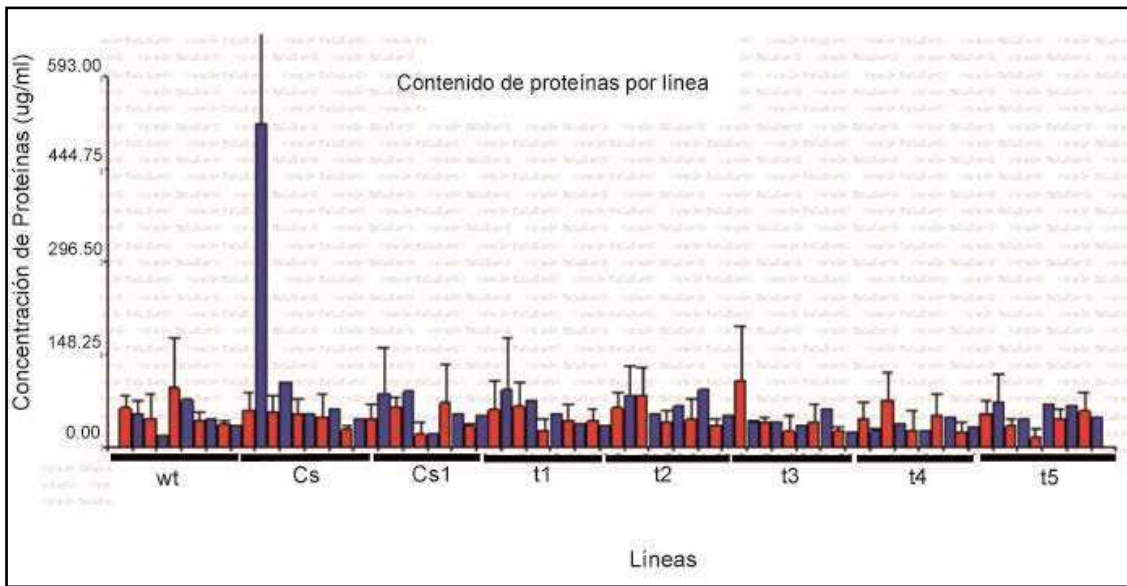


Figura 41. Contenido de proteínas en líneas transgénicas durante ensayo de helada; pre=previa, h1=primera helada, h2=segunda helada, r1=recuperación parcial, r2=recuperación total; valor control de cspre fuera de rango. Barras rojas: tratamiento, Barras azules: control.

4.13 Resultados glucosa ensayo de heladas

No se observaron simultáneamente diferencias significativas de las líneas transgénicas con respecto a las líneas control (wt) y somaclonales (cs y cs1), en general se observó una disminución en los valores de glucosa después de la primera y segunda helada con un aumento de los valores en la etapa de recuperación parcial, hay diferencias significativas entre valores post primera o segunda helada y de recuperación (Fig. 42).

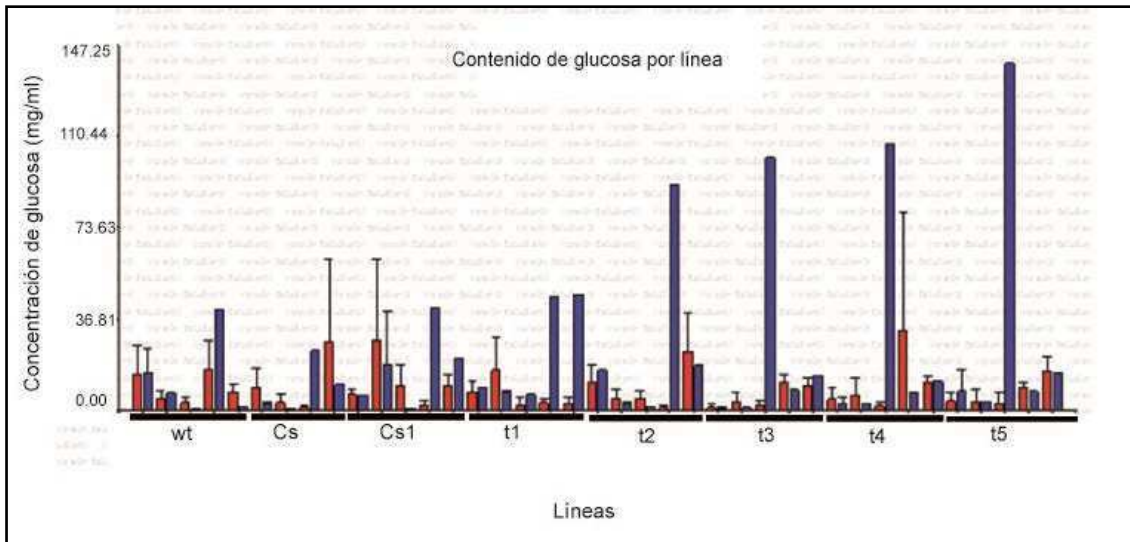


Fig. 42. Contenido de glucosa en líneas transgénicas y control durante ensayo de frío; pre=previa, h1=primera helada, h2=segunda helada, r1=recuperación parcial, r2=recuperación total. Barras rojas: tratamiento, Barras azules: control.

4.14 Resultados SOD ensayo de heladas

No se observaron diferencias significativas de las líneas transgénicas con respecto a las líneas control (wt) y somaclonales (cs y cs1), en general se observó un aumento en la actividad de SOD después de la primera o segunda helada con una disminución de los valores en la etapa de recuperación total pero no hay diferencias significativas entre valores post-helada y de recuperación (Fig. 43).

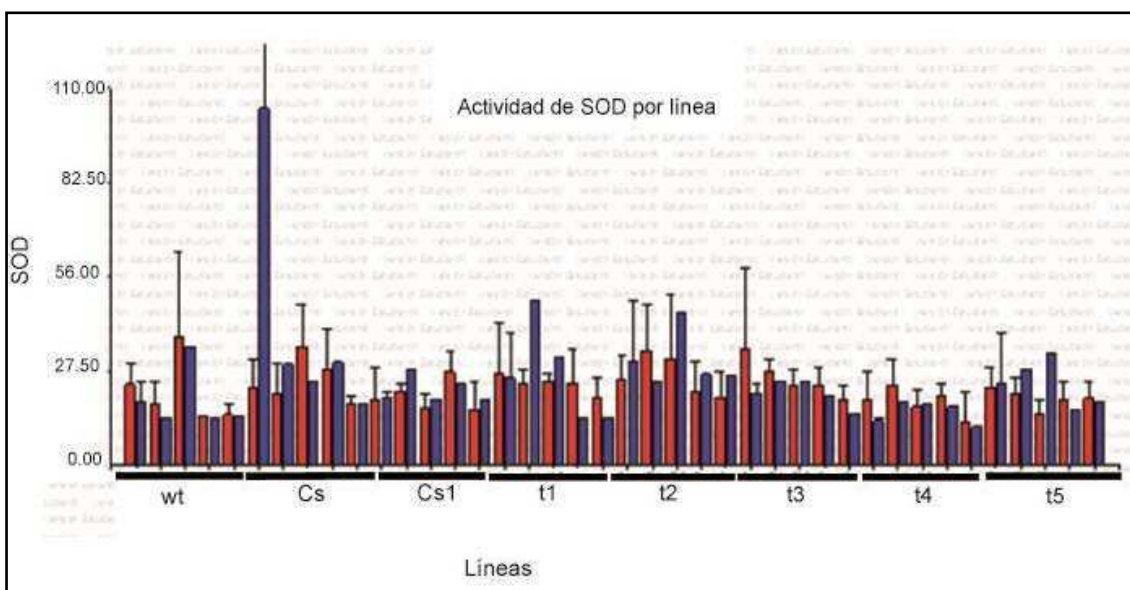


Figura 43. Actividad de la enzima superóxido dismutasa en líneas transgénicas y control durante ensayo de frío; pre=previa, h1=primera helada, h2=segunda helada, rp=recuperación parcial, rt=recuperación total. Barras rojas: tratamiento, Barras azules: control.

4.15 Resultados mortandad foliar

No se observaron diferencias significativas de las líneas transgénicas con respecto a las líneas control (wt) y somaclonales (cs y cs1), en general se observó un aumento en el número de hojas muertas después de la primera helada y más pronunciado en la etapa de recuperación total, hay diferencias significativas entre valores post-helada y de recuperación (Fig.44).

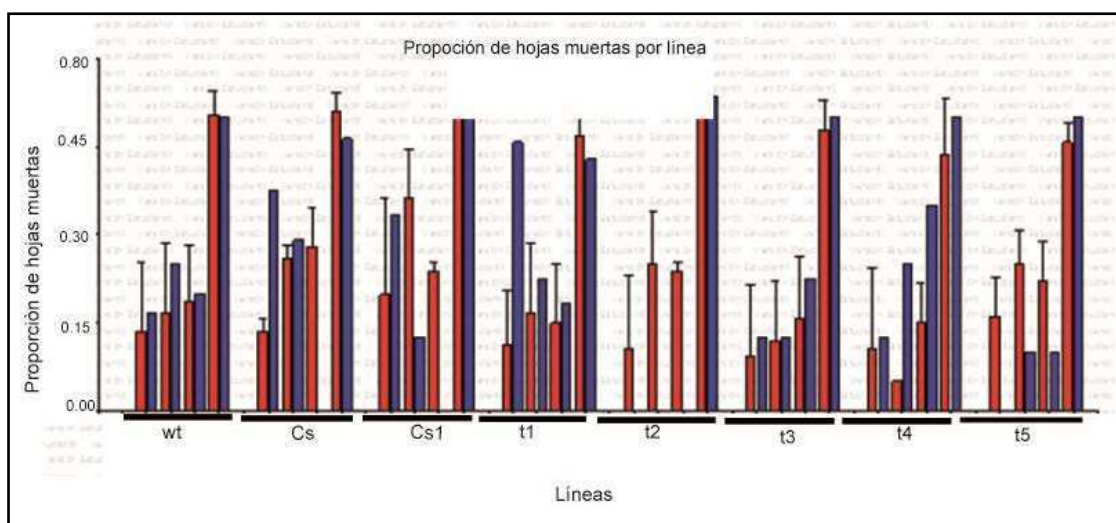


Figura 44. Proporción de hojas muertas en líneas transgénicas y control durante ensayo de frío; pre=previa, h1=primera helada, h2=segunda helada, r1=recuperación parcial, r2=recuperación total. Barras rojas: tratamiento, Barras azules: control.

4.16 Resultados hojas senescentes y porcentaje daño foliar

No se observaron diferencias significativas de las líneas transgénicas con respecto a las líneas control (wt) y somaclonales (cs y cs1), en general se observó un aumento en el número de hojas senescentes y daño foliar después de cada helada, hay diferencias significativas entre valores del muestreo de post-helada y de recuperación en los valores por línea (Fig. 45-46).

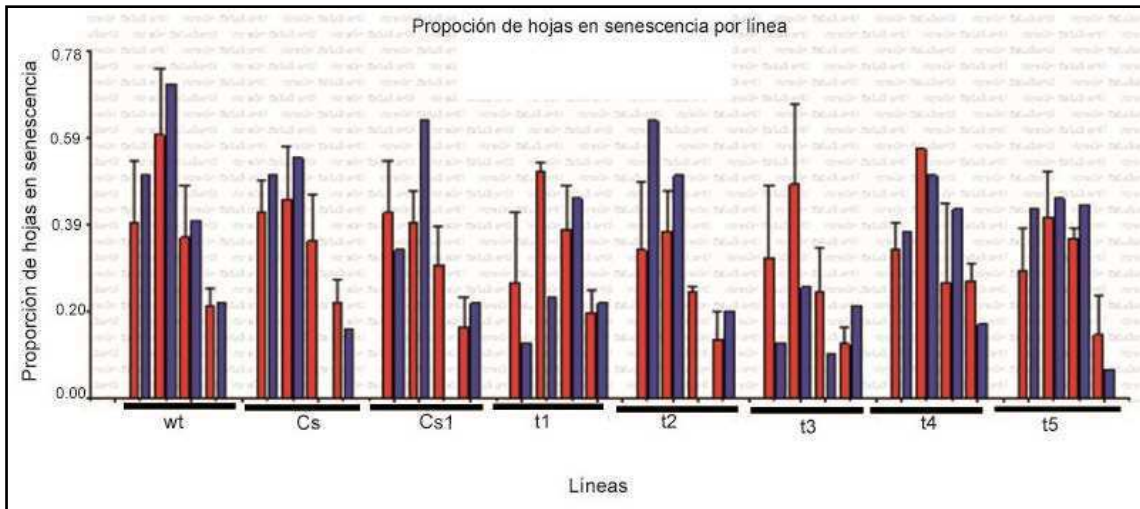


Figura 45. Proporción de hojas senescentes en líneas transgénicas y control durante ensayo de frío; pre=previa, h1=primera helada, h2=segunda helada, r1=recuperación parcial, r2=recuperación total. Barras rojas: tratamiento, Barras azules: control.

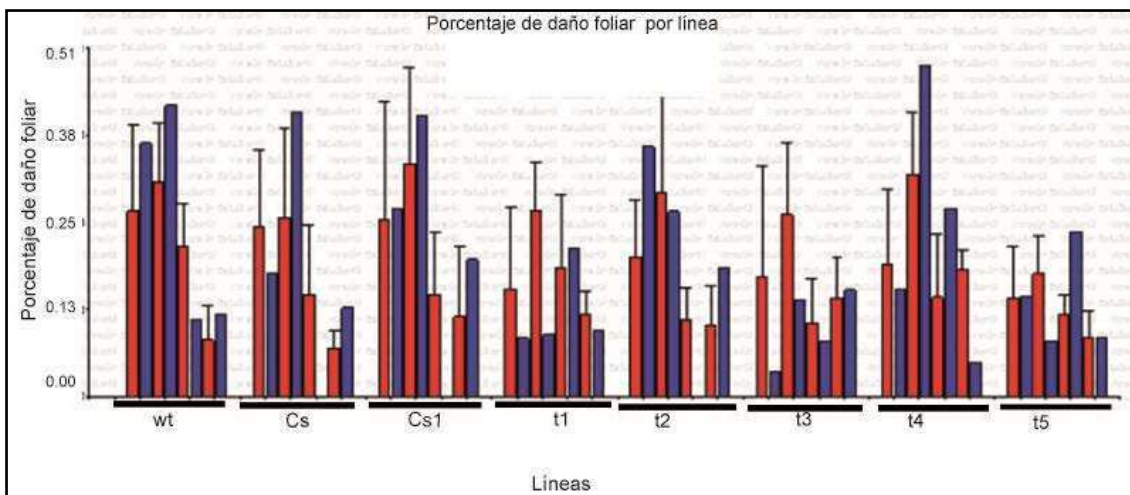


Figura 46. Porcentaje de daño foliar en líneas transgénicas y control durante ensayo de frío; pre=previa, h1=primera helada, h2=segunda helada, r1=recuperación parcial, r2=recuperación total. Barras rojas: tratamiento, Barras azules: control.

5. Discusión

La senescencia es un proceso altamente regulado en el cual algunas vías metabólicas se activan y otras se desactivan. Así, en varias especies vegetales se han clonado genes que se expresan durante la senescencia foliar y se los reconoce con la

denominación genérica de SAGs (Senescence Associated Genes). Es notoria la presencia entre los mismos de genes que codifican para enzimas proteolíticas y otros componentes del aparato de degradación de proteínas. La senescencia está regulada básicamente por las hormonas vegetales. Así, el etileno actúa como promotor de la senescencia mientras que las citoquininas se comportan como antagonistas de la misma. En consecuencia, altos niveles de citoquininas deberían producir un retraso de la senescencia (Singh y colaboradores, 1992).

Con el desarrollo de la ingeniería genética surgió la posibilidad de abordar en forma novedosa el estudio de la senescencia en plantas mediante la manipulación de la producción endógena de citoquininas. Cabe destacar, que esta aproximación experimental no sufre de las limitaciones observadas en estudios clásicos donde las aplicaciones exógenas de citoquininas se ven afectadas por la absorción, transporte y catabolismo de las mismas.

La expresión de los genes nucleares eucarióticos está controlada en varios niveles que involucran la transcripción propiamente dicha, el procesamiento, transporte y estabilidad de los transcritos y su traducibilidad así como la estabilidad, modificación y compartimentalización del producto proteico final. Existen, por lo tanto, varias alternativas para controlar el nivel de expresión de un transgén nuclear en una especie particular. Sin embargo, cabe mencionar que el nivel primario de control de la expresión génica en la célula es el transcripcional.

El protocolo desarrollado para la presente tesis para estimar el nivel de citocininas producido por el transgén permitió poner a prueba la hipótesis inicial que planteaba que “La expresión del gen *ipt* regulada a través del promotor *Atmyb32* provoca la sobreproducción de citocininas”. Es frecuente que plantas transgénicas no expresen el transgén o que los niveles de expresión no impliquen la posibilidad de detección.

Varias especies de plantas transformadas con el gen *ipt* bajo promotores inducibles por estrés han sobreproducido citocininas endógenas incrementando su resistencia; esto se observó en diferentes especies de la familia Poaceae como arroz (*Oryza sativa*) (Peleg *et al.*, 2011) o *Festuca arundinacea* (Hu *et al.*, 2005). El promotor *Atmyb32* sería inducible por estrés o por daño mecánico (defoliación) (Lin *et al.*, 2000) por lo tanto, en la presente tesis para evaluar si el gen estaba activo se provocó un daño mecánico controlado para su inducción. Tres líneas transgénicas: 381, 386 y 302 presentan valores mayores y significativos frente a los controles salvaje y

somaclonal pero igualmente todas las líneas tuvieron valores más altos que ambos controles.

La medición de auxinas mostró un patrón aleatorio, con respecto a la relación citocinina/auxina se encontró que la línea 302 tiene un mayor valor significativo pero todas las líneas transgénicas restantes menos la línea 383 tuvieron una relación citocinina/auxina mayor a 1 mientras que las líneas control una relación menor a 1. Esto es determinante para la planta dado que aunque el contenido de citocininas es importante, Smigocki y Owens (1989) encontraron que la relación citocinina/auxina es determinante con respecto a la pérdida de dominancia apical.

Se hicieron ensayos y caracterizaciones en distintos campos para establecer las diferencias entre las líneas transgénicas y las líneas salvajes y somaclonal, desde el campo anatómico hasta el fisiológico con los ensayos de estrés hídrico y de bajas temperaturas. Con respecto al ensayo de estrés hídrico, para cuantificar el daño se usaron varios parámetros bioquímicos, el contenido de clorofila es representativo del estado fotosintético de la planta y las citocininas suelen tener un efecto protector (Chernyad'ev *et al.*, 2009), en este caso no se pudo observar ni un menor daño ni una mejor recuperación en las líneas transgénicas con respecto a las líneas control. Con respecto a las proteínas podemos afirmar que las citocininas aceleran la síntesis y retardan la degradación de proteínas (Chernyad'ev *et al.*, 2009). Sin embargo, no se observaron diferencias del contenido de proteínas entre las líneas transgénicas y control. Además hay un aumento del contenido proteico en la etapa de sequía que podría ser explicado por el aumento de algunos aminoácidos sintetizados como osmoprotectores durante la sequía (Roy *et al.*, 2009). La glucosa aumentó, en general durante la etapa de sequía, en particular en las líneas 386 y 391, en las cuales se encontraron mayores niveles que resultaron significativos con respecto a las líneas control en la etapa de mitad de sequía. Esta azúcar también podría actuar como soluto compatible para aumentar el potencial osmótico (Hoeberichts *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2013).

Dentro de los parámetros morfofisiológicos el macollaje resulta una característica clave para censar la respuesta al estrés ambiental (Briske y Richards, 1995). Se midió la cantidad de macollos vivos, en senescencia y senescentes. Se observó una disminución general de macollos vivos en el período de sequía y un aumento en el período de recuperación y especialmente en la línea 302 (t1), aunque el valor no es significativo con respecto a las líneas control, similares patrones se hallaron en macollos senescentes y en senescencia. Se observó un aumento sostenido de

macollos en senescencia y senescentes hasta la etapa de sequía total y un aumento mayor en la primera recuperación y un mantenimiento o leve descenso hasta la etapa de recuperación total. Esto se puede explicar por los mecanismos de senescencia que siguen activos aunque se retome el riego. Cuando se analizaron los macollos totales las líneas transgénicas 302 y 383 mostraron valores mayores significativos con respecto a las líneas control. Esto indicaría que las plantas transgénicas modificaron su patrón de macollaje pero no su patrón de senescencia.

La mayor acumulación de macollos en plantas *Atmyb32::ipt* tiene una alta relevancia dado que el número de macollos es uno de los criterios más utilizados por mejoradores dado que implica tanto una mayor calidad forrajera como una mayor respuesta a la defoliación. Johnston y Jeffcoat (1977) habían demostrado que el nivel de citocininas influía positivamente en el macollaje de gramíneas mientras que Cui y colaboradores (2010) mostraron que la relación citocininas /auxinas eran claves para la ramificación de *Arabidopsis*.

Dado que el estrés hídrico genera el aumento de radicales libres que activan las enzimas antioxidantes como defensa celular, en este ensayo se midió superóxido dismutasa (SOD). Jebara y colaboradores (2002) reportaron que MnSODs y FeSODs fueron activadas en cloroplastos de plantas bajo estrés hídrico y salino. En nuestros ensayos se registró un aumento de la actividad de SOD en la etapa de sequía con una paulatina disminución hasta la recuperación total, aunque no se encontró que las líneas transgénicas tuvieran una respuesta diferente con respecto a las líneas control.

Otro factor importante es el estrés causado por bajas temperaturas, se evaluaron los mismos parámetros del ensayo de estrés hídrico excepto que se midió daño foliar en vez de macollos. Con respecto al parámetro de clorofila, dos líneas tienen valores mayores y significativos con respecto a las líneas control, la línea 302 en la etapa post-primer helada y la línea 383 después de las dos primeras heladas pudiéndose interpretar este resultado como un efecto del evento más que una resistencia a las bajas temperaturas, dado que los mayores contenidos se observaron previamente a los ensayos y también los valores de las plantas no sometidas a heladas. Hu y colaboradores (2005) consideraron que un mayor nivel de citocininas tendrían un efecto protector sobre la clorofila ante bajas temperaturas extremas así como Kuraiishi y colaboradores (1966) hallaron que el agregado de citocininas le otorgaba resistencia a heladas debido al retardo de la senescencia, Sin embargo O'Brien y Benkova (2013)

consideran que la relación entre citocininas y resistencia a estreses abióticos son complejas.

El contenido de proteínas analizado en plantas sometidas a heladas no presenta un patrón definido y no hubo una diferencia significativa entre líneas transgénicas y control aunque en las líneas transgénicas debería haber un nivel más alto en las etapas post heladas. Quizás estos resultados se deban a la metodología de determinación proteica que no permite separar aminoácidos de proteínas funcionales (Bradford *et al.*, 1976). Con respecto a la glucosa se observa una disminución en los valores post-heladas y un aumento significativo en la etapa de recuperación pero no hay diferencias significativas entre líneas transgénicas y control, esto muestra que la recuperación del aparato fotosintético ocurrió en ambos tipos de materiales.

Se midió el daño foliar evaluando proporción de hojas muertas, proporción de hojas senescentes y porcentaje de daño foliar. Respecto a la proporción de hojas muertas se observó un aumento en los valores post heladas y en la etapa de recuperación temprana, hay un gran aumento en la etapa de recuperación total que podría ser explicado por los mecanismos de senescencia ya disparados. La proporción de hojas senescentes y porcentaje de daño foliar aumentó significativamente post primera helada, observándose un aumento más gradual post segunda helada, y disminuyendo gradualmente hasta la recuperación total. No hay diferencias significativas entre las líneas transgénicas y controles.

En cuanto a la enzima superóxido dismutasa se observa un aumento en las etapas post helada y una disminución significativa en la etapa de recuperación, mostrando la reacción de defensa ante el aumento de radicales libres. Sinkova *et al.* (2006) hallaron que plantas transgénicas Pssu:ipt mantienen la actividad de SOD por mas tiempo que las plantas control durante la ontogenia de plantas de tabaco sin embargo las plantas atmyb32:ipt de pasto miel no mostraron diferencias significativas con los controles.

Con respecto al estudio de la anatomía Nishijima *et al.*, 2006 encontró que la aplicación exógena de citocininas provoca cambios anatómicos como también Van der Graaff (2001) encontró que plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con el gen ipt presentan cambios anatómicos. Asimismo también Aliscioni (2000) estudió cambios anatómicos en el género *Paspalum* relacionados con la característica del hábitat. Conectando estos antecedentes en el presente trabajo se evaluaron 15 caracteres anatómicos de líneas que habían mostrado características agronómicas diferenciales, se

cuantificaron y se compararon cortes de líneas transgénicas con líneas control, se encontraron características que pueden influir en la tolerancia al estrés hídrico como estomas más estrechos en plantas transgénicas que indicarían una mayor tolerancia a sequía (Strasburger *et al.*, 1986) dado que Nawazish y colaboradores (2006) encontraron que plantas de *Cenchrus Ciliaris* bajo estrés hídrico presentan estomas de menor tamaño, también la distancia entre haces que muestra a las líneas transgénicas más vascularizadas que las plantas control lo cual podría favorecer a las plantas transgénicas en el caso de sequia..

Nishijima *et al.* (2006) hallaron un aumento del tamaño de las células parenquimáticas producto del agregado de citocininas, en el presente trabajo se halló un evento (383) con menor tamaño de células parenquimáticas mientras que el tamaño de las células de vaina de haz terciario y el tamaño de las células buliformes mostraron mucha diferencia entre ambos controles, esto se debe a que el cultivo de tejido introduce cambios epigenéticos que pueden expresarse en la anatomía (Smulders y klerk, 2011) teniendo que tener un control específico en los ensayos para este efecto.

Tanto el tamaño de racimo como la morfología de cloroplastos mostraron una alteración probablemente debido a efectos del exceso de citocininas sobre la regulación de genes (Schmülling y colaboradores, 1997).

Con la referencia de que los cloroplastos sufren transformaciones durante la senescencia, como el aumento del número y del tamaño de plastoglobuli o la desorganización de tilacoides (Biswal *et al.*, 2005), se exploró el efecto del transgén sobre estas características de los cloroplastos. En las líneas transgénicas el carácter tamaño de plastoglobuli fue afectado por el cultivo de tejido mostrando ambos controles las máximas diferencias, no obstante los eventos 383 y 391 difirieron del control somaclonal además de estar relacionado positivamente con el tamaño de los granos de almidón en todas las líneas transgénicas. Según Synkova y colaboradores (2006) los cloroplastos con menos almidón y plastoglobuli más chicos estarían más activos y jóvenes, los eventos aquí analizados muestran una alta variación en el tamaño de granos de almidón como en el tamaño y número de plastoglobuli. Otros caracteres como el ancho inter-grana o distancia entre granos no estarían relacionadas con la senescencia de los cloroplastos sino con características intrínsecas de cada línea.

El agregado exógeno de citocininas en semillas promueve la germinación (Pauw *et al.*, 1994), compensa la diferencia con la temperatura ideal de germinación (Dimalla y Staden, 2012; Hassani y colaboradores, 2009) y revierte la dormición provocada por el

ácido abscísico (Khan y Downing, 1968; Subbiah y Reddy, 2010). Estos trabajos sugieren que el contenido endógeno de citocininas es importante para la estimulación de la germinación, tomando la metodología del trabajo de Cornaglia *et al.*, (2005) en la presente tesis se encontraron comportamientos distintos y significativos en todas las líneas transgénicas, con una pendiente y plateau mayores, la velocidad de germinación y porcentajes de germinación total fueron mayores y significativos en algunas líneas y en la mayoría de las disponibilidades hídricas de germinación. Estos valores se pueden explicar por la intervención directa de mayor reserva y de citocininas previas (Roedel *et al.*, 1997), y en relación a esto Daskalova *et al.* (2006) informó que las semillas de plantas con el gen *ipt* bajo un promotor específico de endosperma acumularon más carbohidratos y proteínas.

Las gramíneas estivales perennes (C4) poseen dificultades para establecerlas exitosamente debido a su dormición y la lenta germinación (Hsu y Nelson 1986ab; Aiken and Springer, 1995; Hintz y colaboradores., 1998; Evers and Parsons, 2003; Parrish and Fike, 2005). La lenta y baja implantación de plántulas de *Paspalum dilatatum* puede ser explicada por la baja viabilidad de las semillas (Burton 1942, Owen 1951) y la existencia de una porción importante de semillas con dormición. Adicionalmente, la germinación y el crecimiento inicial de las plántulas de pasto miel son muy lentos (Ray y Stewart 1937, Owen 1951, Schrauf *et al.* 1995b). De las hipótesis agronómico-fisiológicas planteadas es el mejoramiento del comportamiento germinativo una de las características donde las plantas *Atmyb32::ipt* mostraron las diferencias más claras respecto a los controles.

6. Conclusiones

En el siguiente cuadro se resume las variables que fueron estudiadas y su significancia.

Variables estudiadas	Variables significativas
Expresión de <i>atmyb32::ipt</i>	
Contenido de citocininas	Si (líneas 302, 386 y 391), demás líneas transgénicas mayores niveles que control.
Contenido de auxinas	no
Relación citocininas/auxinas	S1 (línea 302) y es menor a 1 en líneas control y mayor a 1 en líneas transgénicas menos 383.
Ensayo de helada	
Contenido de clorofila en ensayo de helada	Si, en líneas 302 y 383 con mayor contenido pero producto de evento y no de resistencia.
Contenido de proteínas en ensayo de heladas	no
Contenido de glucosa en ensayo de heladas	no
Actividad de SOD en ensayo de heladas	no
Mortandad foliar en ensayo de heladas	no
Hojas en senescencia en ensayo de heladas	no
Porcentaje de daño foliar en ensayo de heladas	no
Variables estudiadas	
Variables significativas	
Ensayo de sequía	
Contenido de clorofila en ensayo de sequía	no
Contenido de proteínas en ensayo de sequía	no
Contenido de glucosa en ensayo de sequía	Si, línea transgénica 386 y 391 en la etapa mitad de sequia.
numero de macollos vivos en	no

ensayo de sequía	
numero de macollos senescentes en ensayo de sequía	no
numero de macollos en senescencia en ensayo de sequía	no
numero de macollos totales en ensayo de sequía	Si, en líneas 302 y 383 transgénica sobre ambos controles, líneas 386 sobre wt.
Variables estudiadas	Variables significativas
Anatomía	
Distancia entre haces vasculares	Si, línea 302 y 383.
Tamaño de células del parénquima	Si, línea 383.
Tamaño de células buliformes	Si, las tres líneas sobre el wt.
Tamaño de cloroplastos de células del parénquima	Si, línea 383.
Tamaño de cloroplastos de vaina Kranz	Si, línea 383.
Tamaño de la célula de vaina Kranz de haces secundarios	Si, línea 383 y 386 sobre wt.
Tamaño de la célula de vaina Kranz de haz terciario	Si, línea 302 sobre ambos controles, líneas 383 y 386 sobre wt.
Ancho de estomas	Si, líneas 383 y 386 sobre wt.
Largo de racimo	Si, línea 386
Tamaño de células de la vaina de haces primarios	no
Largo de estomas	no
Capas de esclerénquima de la cara abaxial de haces primarios	no
Capas de esclerénquima de la cara adaxial de haces primarios	no
Capas de esclerénquima de la cara abaxial de haces secundarios	no
Capas de esclerénquima de la cara adaxial de haces secundarios	no
Variables estudiadas	Variables significativas
Ultraestructura de cloroplasto	
Ancho tilacoide inter-grana	Si, línea 391 sobre ambos controles y línea 383 sobre control cultivo de tejido
Distancia inter-grana	Si, línea 302 sobre ambos controles y línea 370 sobre wt

Numero de tilacoides por grana	no
Tamaño de plastoglobuli	Si, línea 383 y 391 sobre ambos controles. 302, 370 y 386 sobre wt
Numero de plastoglobuli por cloroplasto	Si, línea 383 sobre ambos controles y línea 391 sobre el cs
Tamaño granos de almidón	Si, línea 302 sobre ambos, línea 383 sobre cs y línea 386 sobre wt
Variables estudiadas	Variables significativas
Germinación	
Comportamiento de germinación grupo sin estres	Si, líneas 302, 370, 381, 383 y 391
Comportamiento de germinación grupo 1(-0.25 Mpa)	Si, líneas 370, 381, 383 y 391
Comportamiento de germinación grupo 2(-0.5 Mpa)	Si, líneas 302, 370, 381, 383 y 391
Comportamiento de germinación grupo 3(-0.75 Mpa)	Si, líneas 302
Velocidad inicial de germinación grupo sin estres	Si, líneas 302, 370, 381 y 383 sobre wt
Velocidad inicial de germinación grupo 1 (-0.25 Mpa)	Si, líneas 370 y 381
Velocidad inicial de germinación grupo 2 (-0.5 Mpa)	Si, línea 370 sobre ambos controles y línea 383 sobre control cultivo de tejido
Velocidad inicial de germinación grupo 3 (-0.75 Mpa)	no
Porcentaje de germinación grupo sin estres	Si, líneas 302, 370, 381 y 383 sobre wt
Porcentaje de germinación grupo 1 (-0.25 Mpa)	Si, líneas 370, 381 y 383
Porcentaje de germinación grupo 2 (-0.5 Mpa)	Si, líneas 370, 381 y 383
Porcentaje de germinación grupo 3 (-0.75 Mpa)	no

Cuadro 6. Resumen de variables estudiadas y su significancia.

A-La expresión del gen *ipt* regulada a través del promotor *Atmyb32* provoca la sobreproducción de citocininas.

Se probó la expresión de este gen y además se mostró una relación citoc/aux importante para la formación de la planta.

B-Esta sobreproducción hace que las plantas muestren una mayor resistencia a factores de estrés abiótico como bajas temperaturas y sequía, así también una mejor recuperación ante la restauración de las condiciones ideales.

C-Esta resistencia se refleja en los parámetros de senescencia como el nivel de azúcares, proteínas y el nivel de clorofila.

A pesar de algunos parámetros significativos encontrados no se pudo comprobar estas hipótesis.

El comportamiento germinativo fue mejorado en condiciones de estrés hídrico inclusive, lo cual constituye un importante aporte al mejoramiento dada la dormición y la baja germinación de esta especie.

D-Esta sobreproducción también afecta el crecimiento celular creando diferencias anatómicas, ultraestructurales y morfofisiológicas que pueden ser útiles como respuestas adaptativas.

Se hallaron cambios anatómicos influenciados por el transgén que podrían ser adaptativos para algún tipo de estrés o que muestran características constitutivas ventajosas.

Hay influencia combinada tanto del cultivo de tejidos como del transgén con respecto a algunos caracteres.

Finalmente quiero indicar que de todas las líneas evaluadas las líneas 302 y 383 mostraron características distintivas en todos los ensayos y estudios.

7. Bibliografía

- Acosta G., Deregibus V.A., Zucchini F. (1994). Inclusión del pasto miel (*Paspalum dilatatum* Poir) en pasturas: 1 Efecto sobre la producción forrajera. Revista Argentina de Producción. Animal. 14(3-4): 175-185
- Aiken, G. E., y Springer, T. L. (1995). Seed size distribution, germination, and emergence of 6 switchgrass cultivars. Journal of Range Management, 455-458.
- Aliscioni, S. S. (1999). Estudio histofoliar comparado de especies americanas del género *Paspalum* L.(*Poaceae: Panicoideae: Paniceae*) (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Naturales y Museo).

- Aliscioni S., (2000). Anatomía ecológica de algunas especies del género *Paspalum* Darwiniana 38(3-4).
- Akashi, R., y Adachi, T. (1992). Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature inflorescences of apomictic dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.). Plant Science, 82(2), 213-218.
- Akiyoshi D. E., Klee H., Amasino R. M., Nester E. W., y Gordon M. P.(1984). T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. Proceedings of National Academy of Science. 81: 5994-5998
- Akiyoshi D. E., Morris R. O., Hinz R., Sue Mischke Barbara, Kosuge T., Garfinkel D. J., Gordon M. P. y Nester E. W., (1983). Cytokinin/Auxin Balance in Crown Gall Tumors is Regulated by Specific Loci in the T-DNA. Proceedings of National Academy of Science of the United States of America, 80(2) : 407-411
- Åstot C., Dolezal K., Nordström A., Wang Q., Kunkel T., Moritz T., Chua, y Sandberg G. (2000). An alternative cytokinin biosynthesis pathway. Proceedings of National Academy of Science, 97(26): 14778–14783.
- Badenoch-Jones J., Parker C.W., Letham D.S., Singh S. (1996). Effect of cytokinins supplied via the xylem at multiples of endogenous concentrations on transpiration and senescence in de rooted seedlings of oat and wheat. Plant Cell Environment 19: 504–516.
- Barry G. F., Rogers S. G., Fraley R. T., y Brand L. (1984). Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. Proceedings of National Academy of Science 81: 4776-4780.
- Baruch, Z., y Fisher, M. (1991). Factores climáticos y de competencia que afectan el desarrollo de la planta en el establecimiento de una pastura. Establecimiento y renovación de pasturas..Centro internacional de Agricultura de tropical. Cali, Colombia, 103-142.
- Bassani M. (2003). Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. The plant Journal 36:629-642.
- Biswal, U. C., y Biswal, B. (1988). Ultrastructural modifications and biochemical changes during senescence of chloroplasts. International review of cytology, 113: 271-321.
- Blaßing O.E., Gibon Y., Günther M., Höhne M., Morcuende R., Osuna D., Thimm O., Usadel B., Scheible W.R., Stitt M. (2005). Sugars and circadian regulation make

major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17:3257–3281.

-Bell, P. R. (1996). Megaspore abortion: a consequence of selective apoptosis?. *International Journal of Plant Sciences*, 1-7.

-Beltrán, V. M. (2011). Manipulación de la senescencia de Alfalfa (*Medicago sativa* L.) por ingeniería genética, Tesis de Maestría, Universidad Nacional del nordeste, Argentina.

-Borrell, A.K., G.L. Hammer, y A.C.L. Douglas (2000). Does main-taining green leaf area in sorghum improve yield under drought? I. Leaf growth and senescence. *Crop Science* 40:1026–037.

-Bovo, O.A. y L.A. Mroginski, (1989). Tissue Culture in *Paspalum* (Gramineae): plant regeneration from cultured inflorescence. *Journal Plant Physiology* 124: 481-492.

-Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

-Briske D.D. y Richards J.H. (1995). Plant responses to defoliation: the physiological, morphological and demographic. *society range manage Denver USA*. 635-710.

-Burson, B.L y C.R. Tischler. (1993). Regeneration and somaclonal variation in apomictic *Paspalum dilatatum* Poir. *Euphytica* 67:71-78

-Burton, G. W. (1939). Scarification studies on southern grass seeds. *Journal of the American Society of Agronomy*.

-Burton, G. W. (1942). A cytological study of some species in the tribe Paniceae. *American Journal of Botany*, 355-360.

-Buchanan-Wollaston V. (1997). The molecular biology of leaf senescent. *Journal of Experimental Botany* 48(307): 181-199

-Chang H, Jones M L., Banowetz Gary M., y Clark David G., (2003). Overproduction of Cytokinins in *Petunia* Flowers Transformed with PSAG12-IPT Delays Corolla Senescence and Decreases Sensitivity to Ethylene. *Plant Physiology*, August 2003, Vol. 132: 2174–2183.

-Chavez M.M., (1991). Effects of Water Deficits on Carbon Assimilation. *Journal of experimental Botany* 42:235-241.

- Chen, C.M., y Melitz, D.K. (1979). Cytokinin biosynthesis in a cell-free system from cytokinin-autotrophic tobacco tissue cultures. *FEBS Lett.* 107: 15-20.
- Chernyad'ev, I. I. (2009). The protective action of cytokinins on the photosynthetic machinery and productivity of plants under stress (review). *Applied biochemistry and microbiology*, 45(4):351-362.
- Chull Ch, Yeb L S, Aeong O S, Hyong R T, Gil Man H y Hwan L. (1997). The promoter activity of *sen1*, a senescent-associated gene of *Arabidopsis*, is repressed by sugars. *Journal of Plant physiology* 151:339-345.
- Chase, A. (1929). The North American species of *Paspalum*. *Contributions from the United States National Herbarium*, (28):46-52.
- Clayton, W. D., y Renvoize, S. A. (1986). *Genera graminum. Grasses of the World.* Kew bulletin additional series, 13.
- Crafts-Brandner SJ, Holzner R, Feller U. (1998). Influence of nitrogen deficiency on senescence and the amounts of RNA and proteins in wheat leaves. *Physiologia Plantarum* 102:192-200.
- Cornaglia, P. S., Schrauf, G. E., Nardi, M., y Deregibus, V. A. (2005). Emergence of dallisgrass as affected by soil water availability. *Rangeland Ecology & Management*, 58(1):35-40.
- Cui, X., Ge, C., Wang, R., Wang, H., Chen, W., Fu, Z., ... & Wang, Y. (2010). The BUD2 mutation affects plant architecture through altering cytokinin and auxin responses in *Arabidopsis*. *Cell research*, 20(5): 576-586.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. (1986). *Manual de técnicas en histología vegetal*, Ana D'Ambrogio de Argüeso.
- Daskalova, S., McCormac, A., Scott, N., Van Onckelen, H., y Elliott, M. (2007). Effect of seed-specific expression of the *ipt* Gene on *Nicotiana tabacum* L. seed composition. *Plant Growth Regulation*, 51(3): 217-229.
- Dellaporta S.L. y Calderon (1994) The sex determination process in mays. *Science* 266:1501 -1505.
- De Cleene, M. y De Ley, J. (1976). The host range of crown gall. *Bot. Rev.* 42:390-466.
- De Pauw, M. A., Remphrey, W. R., y Palmer, C. E. (1995). The cytokinin preference for in vitro germination and protocorm growth of *Cypripedium candidum*. *Annals of Botany*, 75(3):267-275.

- Dimalla, G. G., y Van Staden, J. (1977). The effect of temperature on the germination and endogenous cytokinin and gibberellin levels of pecan nuts. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 82(3):274-280.
- Drivdahl, R.A. y K.V. Thimann. (1977). Proteases of senescing oat leaves I. Purification and general properties. *Plant Physiol.* 59:1059-1063.
- De Lucca, G.M. y V.S. Trippi. (1982^a). Regulación de clorofilas y proteínas solubles por cinetina y cicloheximida, en condiciones de luz y oscuridad durante la senescencia foliar en *Phaseolus vulgaris* L. Pitón. 42:73-82.
- De Lucca, G.M. y V.S. Trippi. (1982^b). Cambios en la actividad proteasa y rebonucleasa durante la senescencia foliar de *Phaseolus vulgaris* L. y su regulación por cinetina y cicloheximida en luz y oscuridad. Pitón. 42:83-92.
- Echenique, V, Pessino, S, Díaz, M, Selva, JP, Luciani, G, Zappacosta, D, Cervigni, G, Meier, M, Garbus, I, Cardone, S, Miranda, R y Spangenberg, G. 2009. Aportes de la biotecnología al mejoramiento del pasto llorón (*Eragrostis curvula*). *Revista Argentina de Producción Animal.* 28 (2).
- Ehrendorfer, F. (1973). Adaptive significance of major taxonomic characters and morphological trends in Angiosperms, 317-327, en V. H. Heywood (ed.), *Taxonomy and Ecology.* Academic Press Inc.London.
- Evers, G. W., y Parsons, M. J. (2003). Soil type and moisture level influence on Alamo switchgrass emergence and seedling growth. *Crop Science*, 43(1), 288-294.
- El-Maarouf-Bouteau, H., y Bailly, C. (2008). Oxidative signaling in seed germinación and dormancy. *Plant Signaling & Behavior*, 3(3):175-182.
- Escobar Matthew A. y Dandekar Abhaya M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science* 8(8): 380-386.
- Faiss M, Zalubilová J, Strnad M, Schmülling T (1997) Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *Plant Journal* 12: 401–415.
- Fujiki, Y., Yoshikawa, Y., Sato, T., Inada, N., Ito, M., Nishida, I. and Watanabe, A. (2001). Dark-inducible genes from *Arabidopsis thaliana* are associated whit leaf senescent and repressed by sugars. *Physiol. Plant.* 111:345-352.
- Fukuda H. (1997) Tracheary element differentiation. *Plant Cell* 9: 1147 – 1156.
- Gan, S. y Amasino, R.M. (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 270:1986-1988.
- Gattuso, M. A., y Gattuso, S. J. del cuerpo de las espermatofitas.

- Gepstein, S. (2004) Leaf senescence – not just a “wear and tear” phenomenon. *Genome Biology* 5:212.
- Gepstein, Sh, Sabehi G, Jeanne C M, Hajouj T, Nesher M Falah O, Yariv I, Dor Chand Goldberg S.B., Flick J.S. y Rogers S.G. (1984). Nucleotide sequence of the tmr locus of *Agrobacterium tumefaciens* pTi T37 T-DNA. *Nucleic Acids Research*. 12(11):4665-4677.
- González, L. M., López, R. C., Fonseca, I., y Ramírez, R. (2000). Growth, stomatal frequency, DM yield and accumulation of ions in nine species of grassland legumes grown under saline conditions. *Pastos y Forrajes*, 23(4):299-308.
- Goodwin, P. B. (1978). Phytohormones and fruit growth. *Phytohormones and related compounds: a comprehensive treatise*, 2:175-214.
- Graebe, J. E., y Ropers, H. J. (1978). Gibberellins. *Phytohormones and related compounds: A comprehensive treatise*, 1: 107-204.
- Gutierrez Camarena G., (2001). Señales entre hongos patógenos y plantas hospederas resistentes. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 7(1): 15-19.
- Gutierrez Camarena G., (2006). Muerte celular programada como respuesta al estrés ambiental. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 12(2): 93-99.
- Guivarc'h, A., Rembur, J., Goetz, M., Roitsch, T., Noin, M., Schmulling, T., Chriqui, D. (2002) "Local expression of the *ipt* gene in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. SR1) axillary buds establishes a role for cytokinins in tuberization and sink formation" *Journal of experience Botanic* 53: 621-629.
- Gwathmey C. O, Hall E. A. y Madore M. A. (1992). Adaptive Attributes of Cowpea Genotypes with Delayed Monocarpic Leaf Senescent. *Crop Science* 32:765-772 .
- Hassani, S. B., Saboor, A., Radjabian, T., y Husseini, H. F. (2009). Effects of temperature, GA3 and cytokinins on breaking seed dormancy of ferula assa-foetidal. *Iran Journal Science Technology*, 33: 75-85.
- Hauck B., Gay A.P., Macduff J., Griffiths C.M., Thomas H. (1997). Leaf senescence in a non-yellowing mutant of *Festuca pratensis*: implications of the stay-green mutation for photosynthesis, growth and nitrogen nutrition. *Plant Cell and Environment* 20(8): 1007-1018.
- Herrera Flores, T. S., Ortíz Cereceres, J., Delgado Alvarado, A., Galleros, A., y Alberto, J. (2012). Crecimiento y contenido de prolina y carbohidratos de plántulas de frijol sometidas a estrés por sequía. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(4): 713-725.

- Hintz, R. L., Harmoney, K. R., Moore, K. J., George, J. R., y Brummer, E. C. (1998). Establishment of switchgrass and big bluestem in corn with atrazine. *Agronomy Journal*, 90(5): 591-596.
- Hoeberichts FA, van Doorn WG, Vorst O, Hall RD, van Wordragen MF. (2007). Sucrose prevents up-regulation of senescence-associated genes in carnation petals. *Journal of Experimental Botany* 58: 2873–2885.
- Holley, A. K., y St Clair, D. K. (2009). Watching the watcher: regulation of p53 by mitochondria. *Future Oncology* 5: 117-130.
- Hu, Y, Fukuda H. (1997) Tracheary element differentiation. *Plant Cell* 9: 1147 – 1156.
- Hu, Y., Jia, W., Wang, J., Zhang, Y., Yang, L., y Lin, Z. (2005). Transgenic tall fescue containing the *Agrobacterium tumefaciens* ipt gene shows enhanced cold tolerance. *Plant cell reports*, 23(10-11): 705-709.
- Hsu, F. H., y Nelson, C. J. (1986). Planting date effects on seedling development of perennial warm-season forage grasses. I. Field emergence. *Agronomy journal*, 78(1): 33-38.
- Ishida, H.; Anzawa, D.; Kokubun, N.; Makino, A. y Mae, T. (2002). Direct evidence for non-enzymatic fragmentation of chloroplastic glutamine synthetase by a reactive oxygen species. *Plant Cell and Environment*. 25: 625–631.
- Ishida, H.; Makino, A. y Mae, T. (1999). Fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species occurs near Gly-329. *Journal Biology Chemical*. 274: 5222–5226.
- Jean-Prosts P., (1970). *La botánica y sus aplicaciones agrícolas*. p.163, Ediciones Mundiprensa.
- Jebara S, Jebara M, Limam F, Aouani M.E, (2005). Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 162: 929-936
- Johnston, G.F.S., y Jeffcoat, B., (1977). Effect of some growth regulators on tiller bud elongation in cereals. *New phytology*, 97:239-245.
- Khan, A. A., y Downing, R. D. (1968). Cytokinin Reversal of Abscisic Acid Inhibition of Growth and α - Amylase Synthesis in Barley Seed. *Physiologia Plantarum*, 21(6) : 1301-1307.
- Kingston-Smith, A. H. - Bollard, A. L. - Humphreys, M. O. - Theodorou, M. K. (2002). An Assessment of the Ability of the Stay-green Phenotype in *Lolium* Species to Provide an Improved Protein Supply for Ruminants. *Annals of Botany*. 89(6):731-740.

- Klee H. J., Hayford M. B., Kretzmer K. A., Barry G. F., y Kishore Ganesh M. (1991). Control of Ethylene Synthesis by Expression of a Bacterial Enzyme in Transgenic Tomato Plants. *The Plant Cell*, 3: 1187-1193.
- Kuraishi, S., y Okumura, F. S. (1956). The effect of kinetin on leaf growth. *Bot. Mag. (Tokyo)*, 69: 300-306.
- Kuraishi, S., Tezuka, T., Ushijima, T., y Tazaki, T. (1966). Effect of cytokinins on frost hardiness. *Plant and Cell Physiology*, 7(4): 705-706.
- Laloue, M., y Pethe, C. (1982). Dynamics of cytokinin metabolism in tobacco cells. In *Plant Growth Substances*, P.F. Wareing, ed (London: Academic Press), 185-195.
- Letham, D. S. (1971). Regulators of cell division in plant tissues XII. A cytokinin bioassay using excised radish cotyledons. *Physiologia plantarum*, 25(3): 391-396.
- Levine Alex, Pennell Roger I., Alvarez Maria E., Palmer Robert y Lamb Chris, (1996). Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology* 1996, 6(4):427-437
- Li, S. F., y Parish, R. W. (1995). Isolation of two novel myb-like genes from *Arabidopsis* and studies on the DNA-binding properties of their products. *The Plant Journal*, 8(6): 963-972.
- Li, L., y Yi, H. (2012). Effect of sulfur dioxide on ROS production, gene expression and antioxidant enzyme activity in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 58: 46-53.
- Lin H. (2000). Studies on cytokinins actions in stressed tomato and transgenic white clover plants. Phd tesis La Trobe University 300 pp.
- Liu, M. Z., y Osborne, C. P. (2008). Leaf cold acclimation and freezing injury in C3 and C4 grasses of the Mongolian Plateau. *Journal of experimental botany*, 59(15): 4161-4170.
- Lohman K N., Gan S, John M C., Amasino R M. (1994). Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 92 (2): 322-328.
- Ma, Q. H., Wang, X. M., y Wang, Z. M. (2008). Expression of isopentenyl transferase gene controlled by seed-specific lectin promoter in transgenic tobacco influences seed development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 27(1): 68-76.
- Macduff J, Raistrick N y Humphreys M (2002). Differences in growth and nitrogen productivity between a stay-green genotype and a wild-type of *Lolium perenne* under limiting relative addition rates of nitrate suplí. *Physiologia Plantarum* 116: 52-61.

- Mahalakshmi V y Bidinger R. F (2002). Evaluation of Stay-Green Sorghum Germplasm Lines at ICRISAT. *Crop Science* 42:965–974.
- Martin, C., y Paz-Ares, J. (1997). MYB transcription factors in plants. *Trends in Genetics*, 13(2): 67-73.
- Metcalf C.R. (1960). *Anatomy of the Monocotyledons I. Gramineae*. London: Oxford University Press. 389 pp.
- Mc Cabe MS, Garratt LC, Schepers F., Jordi W.J.R.M., Stoopen G.M., Davelaart E. A. van Rhijn JH, Power JB y Davey MR., (2001). Effects of pSAG12-ipt gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiology* 127:505-516.
- McGaw, B.A. (1988). Cytokinin biosynthesis and metabolism. In *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*, P.J. Davies, ed (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), 76-93.
- Miller CO, Skoog F, Okumura FS, von Saltza MH, Strong FM (1956) Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *Journal of American Chemical Society* 78: 1375–1380
- Monsi M, Uchijima Z, Oikawa T., (1973). Structure of Foliage Canopies and Photosynthesis. *Annual Review of Ecology and Systematics*, November 1973, 4: 301-327.
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J. (2003). Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300: 332–336.
- Motyka V, Faiss M, Strnad M, Kamínek M, y Schmölling T, (1996). Changes in Cytokinin Content and Cytokinin Oxidase Activity in Response to Derepression of ipt Cene Transcription in Transgenic Tobacco Calli and Plants. *Plant Physiology* 11 2: 1035-1043.
- MOU (2010). *Molecular Breeding of Pasture Plants for Climate Change Adaptation and Mitigation. Memorandum of Understanding firmado por Argentina (FAUBA-INTA-UNS), Australia (AgriBio), Brasil (EMBRAPA), Chile (INIA), Nueva Zelandia (PPGW.Seeds), Uruguay (INIA)*
- Nawazish, S., Hameed, M., y Naurin, S. (2006). Leaf anatomical adaptations of *Cenchrus ciliaris* L. from the Salt Range, Pakistan against drought stress. *Pakistan Journal Botany*, 38(5). 1723-1730.

- Nishijima, T., Miyaki, H., Sasaki, K., y Okazawa, T. (2006). Cultivar and anatomical analysis of corolla enlargement of petunia (*Petunia hybrida* Vilm.) by cytokinin application. *Scientia horticulturae*, 111(1): 49-55.
- O'Brien, J. A., y Benková, E. (2013). Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. *Frontiers in plant science* 4: 451-453.
- Owen, C.R. (1951) Improvement of native dallisgrass (*Paspalum dilatatum*). Louisiana Agricultural Experimental State Bulletin, 449: 1–40.
- Pan, W. L., Cambereto J. J., Jackson W. A. y Moll R. H. (1986): Utilization of previously accumulated and concurrently absorbed nitrogen during reproductive growth in maize. *Plant Physiology* 82: 247-253.
- Parrish, D. J., y Fike, J. H. (2005). The biology and agronomy of switchgrass for biofuels. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24(5-6): 423-459.
- Peleg, L, Schmülling Thomas, y Onckelen Harry Van (2011). Analysis of Cytokinin Metabolism in *ipt* Transgenic Tobacco by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Plant Physiol.* 112: 141-148.
- Pharis, R. P., y King, R. W. (1985). Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 36(1): 517-568.
- Quarin, C. L., y Norrmann, G. A. (1987). Cytology and reproductive behavior of *Paspalum equitans*, *P. ionanthum*, and their hybrids with diploid and tetraploid cytotypes of *P. cromoerhizon*. *Botanical Gazette*, 386-391.
- Ray, C. B., y Stewart, R. T. (1937). Germination of seeds from certain species of *Paspalum*. *Journal of American Society. Agronomy*, 29: 548-554.
- Ream W. L., Gordont P. M y Nester EW. (1983). Multiple mutations in the T region of the *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid. *Proceedings of National Academy of Science USA* 80: 1660-1664, March 1983.
- Redig P, Schmülling T, y Van Onckelen H (1996). Analysis of Cytokinin Metabolism in *ipt* Transgenic Tobacco by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Plant Physiology* 112: 141-148.
- Reeve, H. K. y Sherman, P. W. (1993). Adaptation and goals of evolutionary research. *Quaternary review of biology.* 68:1-32.
- Roedel, P., Oancia, T., y Drevet, J. (1997). Effects of seed-specific expression of a cytokinin biosynthetic gene on canola and tobacco phenotypes. *Transgenic research*, 6(2): 133-141.

- Rivero, R. M., Gimeno, J., Van Deynze, A., Walia, H., y Blumwald, E. (2010). Enhanced cytokinin synthesis in tobacco plants expressing PSARK:: IPT prevents the degradation of photosynthetic protein complexes during drought. *Plant and cell physiology*, 51(11): 1929-1941.
- Roulin, S. y Feller, U. (1998). Light-independent degradation of stromal proteins in intact chloroplasts isolated from *Pisum sativum* L. leaves: requirement for divalent cations. *Plant*, 205: 297–304.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. (2006). Sugar sensing and signalling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 675–709.
- Rua, G. H., Speranza, P. R., Vaio, M., y Arakaki, M. (2010). A phylogenetic analysis of the genus *Paspalum* (Poaceae) based on cpDNA and morphology. *Plant Systematics and Evolution*, 288(3-4): 227-243.
- Salisbury Frank B., Ross Cleon W. (1992). Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamericana, S.A. de C.V. Cap. 13,. 331-316.
- Salisbury F B., Ross C W., Alonso J M (2000). Fisiología de las plantas Cengage Learning editores P.634-636, Cap. 16, parte III, pag. 559
- Santos, F. C., Techio, V. H., Freitas, A. S., de Castro, E. M., Davide, L. C., y Sobrinho, F. S. (2013). Adaptive leaf anatomical characteristics of *Brachiaria ruziziensis* genotypes (Poaceae) in different environments-doi: 10.4025/actascibiolsoci. v35i4. 18265. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 35(4): 579-584.
- Sharma, V. K., Hänsch, R., Mendel, R. R., y Schulze, J. (2005). Mature embryo axis-based high frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from multiple cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of experimental botany*, 56(417): 1913-1922.
- Scataglini, M. A., Zuloaga, F. O., Giussani, L. M., Denham, S. S., & Morrone, O. (2014). Phylogeny of New World *Paspalum* (Poaceae, Panicoideae, Paspaleae) based on plastid and nuclear markers. *Plant systematics and evolution*, 300(5): 1051-1070.
- Schlichter T.M (1982). Un modelo de simulación de la productividad actual y potencial de un pastizal de la Depresión del Salado. *Rev. Fec. Agro.* 3(1): 95-101.
- Schmülling, T., Schäfer, S., y Romanov, G. (1997). Cytokinins as regulators of gene expression. *Physiologia Plantarum*, 100(3): 505-519.
- Schrauf G.E., A.M. García, M. Losada, Cardone S., Staneloni R. y Spangenberg G. (2000). Vegetative and reproductive behaviour in apomictic *Paspalum dilatatum* Poir. plants regenerated from suspension cultured cells. *Second International Symposium:*

Molecular Breeding of Forage Crops 2000. Lorne y Hamilton - Australia.

-Schmülling, T., Werner, T., Riefler, M., Krupková, E., y Manns, I. B. (2003). Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species. *Journal of plant research*, 116(3): 241-252.

-Schnablová, R., Synková, H., Vičánková, A., Burketová, L., Eder, J., y Cvikrová, M. (2006). Transgenic ipt tobacco overproducing cytokinins overaccumulates phenolic compounds during in vitro growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(10): 526-534.

-Schrauf, G. E., Cornaglia, P. S., Deregibus, V. A., y Ríssola, M. G. (1995). Improvement in germination behaviour of *Paspalum dilatatum* Poir. seeds under different pre-conditioning treatments. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 38(4): 501-509.

-Schrauf, G.E., A.M. Garcia, G Aldo Humble, Staneloni R. , Mroginski L., Nagel J. y Spangenberg G. (2001). Obtención de plantas transgênicas de pasto miel (*Paspalum dilatatum* Poir). Congreso REDBIO. Guaiania Brasil.

-Schrauf G.E.; P.Picardo. Leva, A.M. Garcia, S.Cardone, Staneloni R., L. Mroginski, Quarín C. y G. Spangenberg (2002). Obtención de plantas transgênicas en especies del género *Paspalum*. REDBIO-Buenos Aires Argentina

-Schrauf G.E. (2009) Aplicación de métodos convencionales y biotecnológicos en el mejoramiento de *Paspalum dilatatum* Poir, Tesis doctoral presentada en la Universidad de Buenos Aires.

-Shikanai, T.; Shimizu, K.; Ueda, K.; Nishimura, Y.; Kuroiwa, T. y Hashimoto, T. (2001). The chloroplast clpP gene, encoding for a proteolytic subunit of ATP-dependent protease, is indispensable for chloroplast development in tobacco. *Plant Cell Physiology*. 42: 264–273.

-Silva, A. P., Holmstrup, M., Kostal, V., y Amorim, M. J. (2013). Soil salinity increases survival of freezing in the enchytraeid *Enchytraeus albidus*. *The Journal of experimental biology*, 216(14): 2732-2740.

-Singh, S., Letham, D. S., y Palni, L. M. S. (1992). Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VII. Endogenous cytokinin levels and exogenous applications of cytokinins in relation to sequential leaf senescence of tobacco. *Physiologia Plantarum*, 86(3): 388-397.

- Synkova, H., Semoradova, S., Schnablová, R., Witters, E., Husak, M., y Valcke, R. (2006). Cytokinin-induced activity of antioxidant enzymes in transgenic Pssu-ipt tobacco during plant ontogeny. *Biologia plantarum*, 50(1): 31-41.
- Smart C M., Scofield S R., Bevan M W. y Dyer T A., (1991). Delayed Leaf Senescence in Tobacco Plants Transformed with *tmr*, a Gene for Cytokinin Production in *Agrobacterium*. *The Plant Cell*, 3: 647-656, July 1991.
- Smigocki A.C. y Owens L.D. (1989) Light-independent degradation of stromal proteins in intact chloroplasts isolated from *Pisum sativum* L. leaves: requirement for divalent cations. *Plant*, 205: 297–304.
- Strasburger. (1986), Diallel analysis of the stay-green trait and its components in sorghum. *Crop Science* 36: 549-555.
- Sun Noh-Yoo y Amasino R. M., (1999). Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of *SAG12*. *Plant Molecular Biology* 41: 181–194, 1999.
- Spangenberg, G. y Z.Y. Wang. (1998). Biolistic Transformation of embryogenic cell suspensions. In *cell Biology: A Laboratory Handbook*, J.E. Celis Academic press pp 162-168.
- Subbiah, V., y Reddy, K. J. (2010). Interactions between ethylene, abscisic acid and cytokinin during germination and seedling establishment in *Arabidopsis*. *Journal of biosciences*, 35(3): 451-458.
- Swartzberg D, Kirshner B, Rav-David D, Elad Y. y Granot D, (2008). *Botrytis cinerea* induces senescence and is inhibited by autoregulated expression of the IPT gene. *European Journal of Plant Pathology* (2008) 120: 289–297.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2007). *Fisiología vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.
- Thomas, H. y Smart, C. M. (1993). Crops that stay green1. *Annals of applied Biology*, 123(1): 193-219.
- Thomas H y Smart C M. (2000). Five way to stay green. *Journal of experimental of Botany*. 51, GPM, special issue, 329-337.
- Thomas, H. y J.L. Stoddart. (1980). Leaf Senescence. *Annual review of plant physiology* 31:83-111.
- Thomas, H. y J.L. Stoddart. (1977). Biochemistry of leaf senescence in grasses. *Ann. Appl. Biol.* 85:461-463.
- Türpe, A. M. (1967). Histotaxonomía de las especies argentinas del género *Paspalum*. *Lilloa* 32: 1-272.

- Ueda, J., Miyamoto, K., y Kamisaka, S. (1994). Separation of a new type of plant growth regulator, jasmonates, by chromatographic procedures. *Journal of Chromatography A*, 658(1):129-142.
- Van der Graaff, E. E., Hooykaas, P. J., y Auer, C. A. (2001). Altered development of *Arabidopsis thaliana* carrying the *Agrobacterium tumefaciens* *ipt* gene is partially due to ethylene effects. *Plant growth regulation*, 34(3):305-315.
- Van Doorn W.G. y Woltering E.J. (2004). Senescence and programmed cell death: substance or semantics?. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 55, No. 406: 2147–2153.
- Van Oosterom, E.J., R. Jayachandra, y F.R. Bidinger. (1996). Diallel analysis of the stay-green trait and its components in sorghum. *Crop Science* 36:549-555.
- Vonshak, A. y Richmond, A. E. (1975). Initial status in the onset of senescence in tobacco leaves. *Plant Physiology* 55:786-90.
- Walden R., Reiss B., Koncz C., y Schell J., (1997). The impact of Ti-plasmid-derived gene vectors on the study of the mechanism of action of phytohormones. *Annual Review of Phytopathology* 1997. 35:45–66.
- Wang, M. S., Zapata, F. J., y De Castro, D. C. (1987). Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature seed and young inflorescence of wild rice (*Oryza perennis* Moench). *Plant cell reproduction*, 6(4): 294-296.
- Wareing P. F. y Phillips I. D. J. (1978). The control of growth and differentiation in plants. Second edition, Pergamon press, p. 281-303.
- Weaver L M., Gan S, Quirino B y Amasino R M. (1998). A comparison of the expression patterns of several senescence associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology* 37: 455–469.
- Yeung E.C. y Meinke D.W (1993). Embryogenesis in angiosperms: Development of the suspensor. *Plant Cell* 5: 1371-1381.
- Zapata JM, Guera A, Carrasco A Esteban-, Martín M. y Sabater B. (2005). Chloroplasts regulate leaf senescence: delayed senescence in transgenic *ndhF*-defective tobacco. *Cell Death and Differentiation* (2005) 12: 1277–1284.
- Zarlavsky, G. E. (2014). *Histología Vegetal: técnicas simples y complejas*. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires.
- Zavaleta-Mancera H.A., Franklin K.A., Ougham, H.J., Thomas, H., Scott, I.M. (1999). Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. I. Reappearance of NADPH.
- Zuloaga, F. O. and O. Morrone. (2005). Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur Austral (Argentina, Bolivia, Sur del Brasil, Chile, Paraguay y

Uruguay). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 102:
1–297.