

Mecanismos de respuestas al estrés abiótico en *Digitaria eriantha*:

ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS
Y BIOTECNOLÓGICOS

Hilda Pedranzani - Marcela Ruíz



HILDA PEDRANZANI

Mecanismos de respuestas
al estrés abiótico en
Digitaria eriantha:
ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS
Y BIOTECNOLÓGICOS



Universidad
Nacional
de San Luis

Mecanismos de respuestas al estrés abiótico en *digitaria eriantha*: aspectos fisiológicos, bioquímicos y biotecnológicos / Hilda Elizabeth Pedranzani ... [et al.] ; compilación de Hilda Elizabeth Pedranzani; Olga Marcela Ruiz - 1a ed. - San Luis: Nueva Editorial Universitaria - UNSL, 2022. Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-987-733-307-7

1. Biología Agrícola. 2. Ingeniería Agrícola. 3. Botánica. I. Pedranzani, Hilda Elizabeth, comp. II. Ruiz, Olga Marcela, comp.
CDD 632.96

Universidad Nacional de San Luis

Rector: CPN Víctor A. Moriño

Vicerrector: Mg. Héctor Flores

Subsecretaria General de la UNSL

Lic. Jaquelina Nanclares

Nueva Editorial Universitaria

Avda. Ejército de los Andes 950

Tel. (+54) 0266-4424027 Int. 5197 / 5110

www.neu.unsl.edu.ar

E mail: neu@unsl.edu.ar

Directora:

Lic. Jaquelina Nanclares

Administración:

Director: Tec. Omar Quinteros

Esp. Daniel Becerra

Dpto. de Impresiones:

Sr. Sandro Gil

Dpto. de Diseño:

Tec. Enrique Silvage

Ilustración de Tapa:

María Emilia Jofré Gutierrez

Prohibida la reproducción total o parcial de este material sin permiso expreso de NEU



RED DE EDITORIALES
DE UNIVERSIDADES
NACIONALES



Universidad
Nacional de
San Luis

PRÓLOGO

Este libro se ha realizado en su totalidad con la ayuda inestimable de la Universidad Nacional de San Luis, a través de los Proyectos de Ciencia y Técnica, en el marco de los cuales se generaron formación de Recurso Humanos, de grado y de posgrado y se produjo conocimiento científico publicado en revistas nacionales e internacionales. La problemática de *Digitaria eriantha*, una forrajera sudafricana, introducida en Argentina, implantada en los campos de San Luis, usada como recurso ganadero suplementario a los pastizales naturales y otras forrajeras implantadas, presentaba un problema de baja tolerancia al frío, por lo cual el Ing. Oscar Terenti, investigador de EEA INTA Villa Mercedes, (San Luis), sugirió esta problemática como interesante para estudiar y posiblemente lograr su mejora genética. Así se plasmaron Proyectos que atendieron a estas problemáticas reales, de los productores de la zona sur de San Luis. Los estudios abarcaron un amplio espectro, desde lo morfo-fisiológico hasta lo anatómico, el comportamiento frente al estrés, las hormonas implicadas y los mecanismos de respuestas involucrados. El cultivo *in vitro*, la formación de callos para mejora genética, el estudio de adaptación a condiciones extremas, etc. Luego de determinar las causas y los efectos del estrés en *Digitaria eriantha*, se incursionó en las asociaciones simbióticas como las micorrizas y las bacterias como mitigadoras del estrés. Conjuntamente con la UNSL, se trabajó en la temática a través de Proyectos Internacionales, donde se pudo avanzar en estas aristas del conocimiento.

El primer proyecto fue un Proyecto Promocionado N° 50106, en la antigua FICES (Facultad de Ingeniería y Ciencias Económico y Sociales), que se denominó. *Estudios fisiológicos y moleculares relacionados al estrés por frío en Digitaria eriantha con fines de selección*, cuya directora fue una Profesora externa la Dra. Guillermina Abdala, perteneciente a la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) y mi coordinación, durante los años 2001 y 2003. Durante dicho periodo se obtuvieron dos becas una de Estimulo y otra de Iniciación en la Investigación que dieron como fruto la Tesina de grado para optar al grado de Ingeniero Agrónomo de Andrea Mariela Quiroga, con el tema “*Respuestas morfofisiológicas de Digitaria eriantha y formación de callos como germoplasma factible para seleccionar plantas resistentes al frío*” (FICES, 2003) para alcanzar el grado de Ingeniero Agrónomo y las pasantías de Investigación de María Soledad Garavaglia, alumna de Ingeniería Agronómica en “*Utilización del cultivo in vitro para inducción de callos en Digitaria eriantha*” (FICES, 2003) y del Ing. Agr. Nicolás Bridges con el tema *Comparación entre dos especies del pastizal Digitaria eriantha y Trichloris crinita en relación a sus respuestas al estrés por bajas temperaturas y sequía*” (FICES, 2003).

El segundo Proyecto de la UNSL, que aportó conocimiento y profundización sobre la temática del estrés abiótico fue el Proyecto Consolidado N° 50304 (2004-2006): “*Estudios fisiológicos, moleculares y biotecnológicos del estrés por frío en Digitaria eriantha*” con igual dirección y codirección del anterior. En el marco de este Proyecto se realizaron tres tesinas de grado, una de Marisa Mariela Garbero sobre “*Respuestas moleculares del estrés por frío en Digitaria eriantha*” (FICES, 2006), otra de Claudia Eliana Escudero con el tema “*Cultivo in vitro de una gramínea forrajera introducida en Argentina, Digitaria eriantha*” (FICES, 2006) y la última de Alberto Di Giambatista en el tema “*Efecto del estrés por frío y sequía en parámetros morfofisiológicos de dos especies forrajeras: Trichloris crinita “nativa” y Digitaria eriantha “introducida”*”. (FICES, 2006), todas para alcanzar el grado de Ingeniero Agrónomo. También se ejecutaron Tesis de posgrado como la Maestría en Gestión Ambiental de la Prof. Ada Lucia Giulietti en “*Producción-Evaluación Química-Biológica de Lombricompuestos a partir de Residuos Pecuarios con la especie Digitaria eriantha como protagonista*” (FICES, 2006).

El tercer proyecto que aportó conocimiento, sobre la especie, a este libro fue el Proyecto Consolidado N° 50107(2007-2009) “*Mecanismos de regulación del estrés abiótico en especies de importancia forrajera y forestal*” con mi dirección y la Codirección Dra. Guillermina Abdala. Se realizó una Tesis doctoral en Ciencias Biológicas de la Ing. Marisa Mariela Garbero: “*Estrés por frío en Digitaria eriantha: forrajera promisorio para zonas semiáridas*” (UNRC, 2011) y pasantías de investigación de Maximiliano Sosa, alumno de Ingeniería Agronómica en el tema “*Preparación de medios de cultivo y siembra de tejidos vegetales in vitro en condiciones normales y de estrés abiótico*” y de la Lic. Nancy Tavecchio, en “*Determinación química de prolina en Digitaria eriantha bajo la acción de estrés por frío*”.

El cuarto proyecto que contribuyó a este libro fue el Proyecto Consolidado N° 50107 (2010-2013): “*Mecanismos de regulación del estrés abiótico en las plantas*”, con mi dirección y la codirección de la Dra. Guillermina Abdala, de la nueva Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias (FICA). Se realizó la Tesina de grado de Romina Osses “*Simbiosis Digitaria eriantha Steudel var. Mejorada INTA- Azospirillum brasilense. Efectos sobre producción, crecimiento y tolerancia a estreses* (FICA, 2013), para optar al grado de Ing. Agrónomo. Con la incorporación del Proyecto Redes Interuniversitarias IV (2012) “*Adaptación de las plantas a ambientes adversos: suelos, asociaciones simbióticas y mitigación*” en conjunto con las Universidad de Valladolid, Universidad de Granada, Universidad de Murcia todas de España y Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia, se incursió en la problemática de la simbiosis y la mitigación de estrés abiótico en esta especie.

El quinto proyecto Consolidado N°2-2914(2014-2017) (FQByF) *Adaptación de las plantas a ambientes adversos: simbiosis y mitigación*, con mi dirección y la codirección del Ms Cs. Oscar Terenti, conjuntamente con el Proyecto ICOOP (Proyecto Internacional para el desarrollo) CSIC Granada-UNSL “*Mitigación del estrés abiótico en Digitaria eriantha por asociación simbiótica combinada con micorrizas arbusculares (Rizophagus intrarradices) y bacterias promotoras de crecimiento (Actinomicetes)* (2015 -2016), se profundizó en el estudio de la relación micorriza-*Digitaria eriantha* y mitigación de los estreses por sequía, frío y salinidad.

En el marco de todos esos Proyectos tanto de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de San Luis, como de los Proyectos Internacionales y como producto de nuestra investigación, se produjeron diez publicaciones en revistas indexadas nacionales e internacionales, catorce abstracts con presentaciones de trabajos a congresos y ahora este libro que trata de resumir las distintas aristas de la investigación.

Con la convicción que la investigación es la fuente del conocimiento y la producción escrita la forma de sociabilizar la información, escribimos este libro para que futuros investigadores logren un acercamiento a esta especie sudafricana que vino a Argentina para quedarse.

Agradezco a mis colegas, docentes investigadores y alumnos de Ingeniería Agronómica y Ciencias Biológicas, que siempre se acercaron con la intención de aprender y crecer con la humildad de los investigadores, hoy autores de este libro.

Dra. Hilda Pedranzani

EDITORAS Y AUTORAS

Hilda E. Pedranzani, estudió el Profesorado de Biología en la Universidad Nacional de San Luis, la Licenciatura en Biología en la Universidad Nacional del Comahue y el Doctorado en Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional de Río Cuarto. Realizó posdoctorados: *Conservación y Gestión de Recursos Forestales* en la Universidad de Valladolid, España (2004-2005) (BECA ALBAN); *Endomicorrizas Arbusculares: Mitigación de estrés abiótico en plantas*, en el Departamento de Microbiología de Suelos. CSIC, Granada, España (2011) (BECA ERASMUS MUNDUS); Fisiología del estrés Abiótico (sequía y frío) en cereales, Universidad Checa de Ciencias de la Vida, Praga, República Checa (2012) (BECA MNA) como Staff Professor: *Estrés en plantas nativas y cultivadas* en la Universidad de Pisa, Italia, (2015) (BECA ERASMUS MUNDUS). Ha ganado 5 becas nacionales y 11 Internacionales. Desde 2013 es Profesora Titular de Fisiología Vegetal en el Departamento de Biología de la Facultad de Química Bioquímica y Farmacia (FQByF), UNSL y fue Profesora Asociada en Fisiología Vegetal, en la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias (FICA), donde se gestaron los proyectos de *Digitaria eriantha*. Ha dirigido 6 Proyectos de Investigación Acreditados en la FICA y 2 en la FQByF. Ha participado de 14 Proyectos de Investigación Acreditados en el ámbito de la UNSL. Actualmente dirige el PROICO N° 02-3318 *Mitigación del estrés abiótico en plantas por asociación simbiótica y su posible uso en la fitorremediación*. FQByF, UNSL. Ha asesorado Proyectos Internacionales, de INTA, UNRC y UNSalta. Ha dirigido un Programa y dos proyectos de Extensión. Ha sido directora de 15 cursos de posgrado internacionales dentro de la temática fisiología del estrés, mitigación y agricultura sustentable. Ha publicado 45 artículos en revistas indexadas, 5 libros, un capítulo de libro y más de 100 trabajos presentados a congresos nacionales e internacionales. Ha dirigido 14 tesis de grado de Agronomía y Biología y 10 Tesis de posgrado en el ámbito de la UNSL, UNRC y el exterior. Ha dirigido numerosas becas y pasantías de investigación. Es evaluadora de CONEAU y participa en el Comité Editorial Asesor de Revistas Internacionales.

Olga Marcela Ruiz, estudio Ingeniería Agronómica y la Maestría en Gestión Ambiental en la Universidad Nacional de San Luis. Desde 2017 se desempeña como Profesora Adjunta de la asignatura Nodo de Integración I, de la carrera de Ingeniería Agronómica, Departamento de Ciencias Agropecuarias, de la FICA (UNSL), donde se gestaron los proyectos de *Digitaria eriantha*. Actualmente es directora del Departamento de Ciencias Agropecuarias, FICA, UNSL. Ha participado desiete Proyectos de Investigación Acreditados en el ámbito de Agronomía (FICA) y dos en la Facultad de Química Bioquímica y Farmacia (FQByF) Actualmente dirige la Línea 3 del Proyecto Tetranual N°02-3318 “*Mitigación del estrés abiótico en plantas por asociación simbiótica y su posible uso en la fitorremediación*” en la FQByF de la UNSL. Ha participado de un Programa y dos Proyectos de Extensión de la UNSL. Ha sido Coordinador de 3 cursos de posgrado dentro de la temática fisiología del estrés, mitigación y agricultura sustentable. Ha publicado 12 artículos en revistas indexadas, 1 libro, 2 capítulos de libro y 25 trabajos presentados a congresos nacionales e internacionales. Su tema de Tesis de Maestría fue: “*Uso de la tierra y su impacto en la estructura forestal y biodiversidad del monte nativo de San Luis*” y se realizó en el ámbito del PROICO N° 2-2914 (2014-2017): *Adaptación de las plantas a ambientes adversos: simbiosis y mitigación*. (FQByF UNSL), del mismo grupo de trabajo.

AUTORES

Alberto Di Giambatista: estudio Ingeniería Agronómica en la FICES, Universidad Nacional de San Luis y en la actualidad ejerce como profesional independiente. Realizó su tesina de grado: *Efecto del estrés por frío y sequía en parámetros morfofisiológicos de dos especies forrajeras (Trichloris crinita "nativa" y Digitaria eriantha "introducida", en el ámbito del Proyecto N° 50304 (2004-2006) Estudios Fisiológicos, Moleculares y biotecnológicos del estrés por frío en Digitaria eriantha*. Secretaría de Ciencia y Técnica. Resolución 25/07. FICA. UNSL, en este mismo grupo de trabajo. Presento varios trabajos a congresos y publicaciones en Revistas indexadas.

Eliana Soledad Fernández, estudió Ingeniería Química en la Universidad Nacional de San Luis. De 2001 a 2015 se desempeñó como profesional en el ámbito industrial. Desde 2015 es docente en FICA (UNSL) y desde 2016 es Auxiliar de Química General e Inorgánica para Ingeniería Agronómica (FICA). Ha participado de 2 Proyectos de Investigación Acreditados en el ámbito de Agronomía (FICA), siendo actualmente docente integrante del PROICO N° 02-3318 Mitigación del estrés abiótico en plantas por asociación simbiótica y su posible uso en la fitorremediación, FQByF (UNSL). Ha publicado 1 artículo en revista indexada y tres trabajos presentados a congresos nacionales. Ha sido directora del Proyecto de Extensión "Reciclaje de residuos orgánicos desde los primeros años de vida. Solución ecológica a la generación de residuos orgánicos en la FICA".

Marisa Mariela Garbero, estudió Ingeniería Agronómica en la Universidad Nacional de San Luis y luego el Doctorado en Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional de Río Cuarto. Ha realizado un Posdoctorado en Manejo del estrés hídrico como una herramienta de optimización del uso del agua de riego Universidad de Castilla-La Mancha (España) (2013). Es Profesora Adjunta en Hidrología Agrícola, Departamento de Ciencias Agropecuarias, de FICA de la UNSL y es Profesora Adjunta en el Departamento Académico de Ciencias Ambientales y Gestión del Agua de la Universidad Nacional de los Comechingones. Ha participado de 6 Proyectos de Investigación Acreditados en el ámbito de Agronomía (FICA). Participa del Proyecto PROICO N° 14-0418: Herramientas de aplicación para la Gestión Integrada de los Recursos Hídricos en San Luis. Ha dirigido e integrado Proyectos de Extensión en la UNSL. Ha publicado 10 artículos en revistas indexadas, 1 capítulo de libro y 36 trabajos presentados a congresos nacionales e internacionales. Actualmente dirige tesis y beca de posgrado y ha dirigido pasantías y becas de grado. Ha realizado su tesina de grado: *Respuestas moleculares del estrés por frío en Digitaria eriantha* y su Tesis doctoral: *Estrés por frío en Digitaria eriantha: forrajera promisorio para zonas semiáridas* en el ámbito del Proyecto N° 50304 (2004-2006) Estudios Fisiológicos, Moleculares y biotecnológicos del estrés por frío en *Digitaria eriantha*. Secretaría de Ciencia y Técnica. FICA. UNSL, en este mismo grupo de trabajo.

Yanina Sol Garcia estudió la Licenciatura en Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional de San Luis, en 2020 realizó la tesis de grado denominada "Micropropagación in vitro de dos cepas de vid (*Vitis vinífera*): aplicación al mejoramiento genético y al estudio fisiológico de la vid" obteniendo así el título. Participó en PROICO N° 02-3318 *Mitigación del estrés abiótico en plantas por asociación simbiótica y su posible uso en la fitorremediación*, FQByF (UNSL). Ha sido autora y expositora de 3 trabajos en congresos, 2 capítulos de libro y 1

publicación. Ha participado en proyectos de extensión y en el año 2021 fue becada por el CONICET para realizar su tesis doctoral

Ada Lucia Giulietti estudio Química y Profesorado de Química Mineralogía y Merceología en la Universidad Nacional de Cuyo y la Maestría en Gestión Ambiental en la Universidad Nacional de San Luis. Desde 2006 se desempeñó como Profesora Adjunta en Química Orgánica I y II para carreras: Ing. Química / Ing. en Alimentos en el Departamento de Ciencias Básicas de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias UNSL. Ha dictado Cursos de posgrado en Química de Gestión Ambiental. Ha participado de 14 Proyectos de Investigación Acreditados en el ámbito de Agronomía (FICA). Ha participado de un Programa y dos proyectos de Extensión. Ha publicado 20 artículos en revistas indexadas y dos capítulos de libro, 40 trabajos presentados a congresos nacionales e internacionales. 3 libros digitales. Su tema de Tesis de maestría fue: *Producción y Evaluación Química – Biológica de Lombricompostos a partir de residuos Pecuarios*, el cual se realizó en el ámbito del Proyecto Trienal N° 50107, (2007-2009): Mecanismos de regulación del estrés abiótico en especies de importancia forrajera y forestal. (FICA; UNSL) con el mismo grupo de trabajo y en colaboración con INTA Villa Mercedes, San Luis.

Mariano Hernan Gutiérrez estudio Bioquímica en la Universidad Nacional de Córdoba. De 2003 a 2007 se desempeñó como profesional en el ámbito privado de la Bioquímica Clínica. Desde 2006 es docente de FICA (UNSL) en Química Orgánica 1 y 2 para Ingeniería Química. Desde 2021 Profesor Adjunto en Química y Bioquímica de los Alimentos para Bromatología (FICA). Ha participado de 4 Proyectos de Investigación Acreditados en el ámbito de Agronomía (FICA), siendo actualmente docente integrante del PROICON° 02-3318 (2018-2022) *Mitigación del estrés abiótico en plantas por asociación simbiótica y su posible uso en la fitorremediación*, FQByF (UNSL). Ha publicado 5 artículos en revistas indexadas y presentado 7 trabajos a Congresos Nacionales. Ha participado de un programa de Extensión de la UNSL. Actualmente se encuentra realizando la Maestría en Educación Superior, en la UNSL.

Magali Adriana Maidana-Estudio Profesorado en Ciencias Biológicas y Técnica en laboratorio en la Universidad Nacional de Río Cuarto. Es Especialista en Gestión Ambiental y actualmente estudia una Maestría en Gestión Ambiental y desarrolla una tesis *Adaptación de una forrajera Tetrachne degei Nees a condiciones ambientales de salinidad, frío y sequía: consideraciones anatomofisiológicas y bioquímicas*, en el ámbito del PROICO N° 02-3318 “Mitigación del estrés abiótico en plantas por asociación simbiótica y su posible uso en la fitorremediación”, FQByF (UNSL). Desde 2015 se desempeña como Profesora Adjunta en Biología General- Departamento de Ciencias Agropecuarias de la (FICA) UNSL. Ha participado de 14 proyectos de Investigación acreditado en el ámbito de Agronomía (FICA). Ha integrado Proyecto de extensión en la FICA (UNSL). Ha publicado 10 artículos en revistas con referato y 28 trabajos presentados a Congresos nacionales e internacionales.

Oscar Masciarelli estudio Microbiología y Magister en Biotecnología (2010) en la Universidad Nacional de Río Cuarto. Realizó un Posdoctorado La Universidad Embrapa Fortaleza de Fortaleza (Brasil)(2016) y una Estadia en Universidad de Jaume I Castellon de la Plana (España) (2020) Actualmente participa de un Proyecto de Investigación: *Impacto de bioinsumos desarrollado a partir de un mix de extractos naturales de algas y bacterias PGPRy* ha participado del Proyecto *Uso de Azospirillum brasilense como mejorador en las respuestas*

en vegetales también dependiente de la Secretaria de Ciencia y Técnica de la UNRC, con el cual colaboró con el desarrollo de la Tesina *Simbiosis Digitaria eriantha Steudel var. Mejorada INTA- Azospirillum brasilense. Efectos sobre producción, crecimiento y tolerancia a estreses*. FICA. UNSL, en el marco del PROICO N° 50107 (2010-2013): Mecanismo de regulación del estrés abiótico en las plantas, (FICA) UNSL. Ha publicado 29 artículos en revistas internacionales indexadas y 4 capítulos de libros y numerosos trabajos presentados a congresos nacionales e internacionales.

Romina Osses, estudió Ingeniería Agronómica en la Universidad Nacional de San Luis. Su tesis de grado versó en *Simbiosis Digitaria eriantha Steudel var. Mejorada INTA- Azospirillum brasilense. Efectos sobre producción, crecimiento y tolerancia a estreses*, en el marco del Proyecto PROICO N° 50107 (2010-2013): *Mecanismo de regulación del estrés abiótico en las plantas* (FICA) UNSL. Desde 2019 se desempeña como Auxiliar de Primera Categoría en Producción Animal y Pastizales Naturales, Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias (FICA) de la UNSL. Ha participado de 4 Proyectos de Investigación Acreditados en el ámbito de Agronomía (FICA). Actualmente participa del Proyecto PROIPRO N°14-1420: Análisis de sistemas de producción animal para la inclusión de tecnologías de proceso en la provincia de San Luis; y es directora de línea en el Proyecto PROICO N°14-1120: Análisis desde una perspectiva sistemática de dos componentes del sistema productivo animal en un marco de sustentabilidad e inocuidad del producto. Integra un Proyecto de Extensión en la UNSL. Ha publicado 1 artículo en revista indexada, 1 capítulo de libro y 16 trabajos presentados a congresos nacionales. Actualmente dirige pasantías en la FICA.

Maria Cecilia Pacheco Insausti, estudió Profesorado en Biología y Licenciatura en Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional de San Luis y actualmente es estudiante del Doctorado en Ciencias Biológicas en la misma institución. Desde el 2017 al 2019 ha realizado tres estancias en el Instituto de Ciencias Agrarias CSIC (Madrid) como becaria del Programa de Movilidad CSIC-EMHE (Enhancing Mobility between Latin- American and Carribean countries and Europe) con el proyecto: “Utilización de variedades de alfalfa para la remediación de suelos salinos contaminados por metales pesados). Desde el 2021, se desempeña como Auxiliar de Primera Categoría en Química Biológica y Diversidad Vegetal I para las carreras Licenciatura en Biología Molecular y la Licenciatura en Ciencias Biológicas. Ha participado de 3 Proyectos de Investigación Acreditados en el ámbito de la FQByF y Agronomía (FICA). Actualmente participa del PROICO N° 02-3318 Mitigación del estrés abiótico en plantas por asociación simbiótica y su posible uso en la fitorremediación, FQByF (UNSL). Ha integrado Proyectos de Extensión en la UNSL. Ha publicado 1 artículo en revista indexada, 2 capítulos de libros y 10 trabajos presentados a congresos nacionales e internacionales. Ha codirigido una tesis de grado y una beca Estimulo a la Vocación científica-CIN.

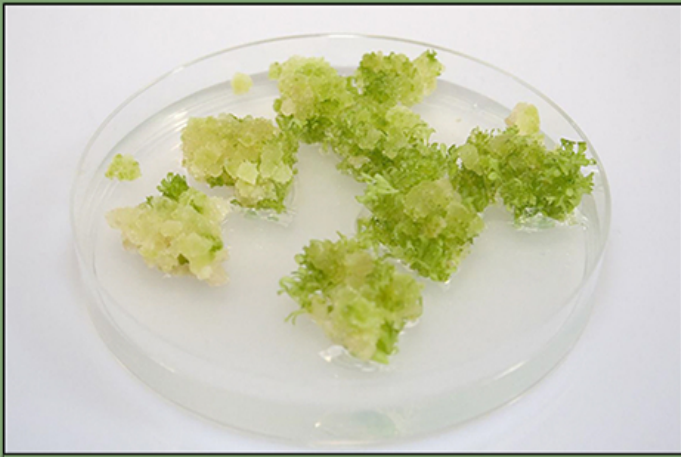
Maria Verónica Pérez Chaca, estudió Lic. en Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional de San Luis, es Dra en Biología de la Universidad Nacional de San Luis (2013). Realizó un postdoctorado en la Universidad Politécnica de Madrid en el Centro de Biotecnología y Genómica de plantas (2016). Ganó 5 becas nacionales y 1 beca internacional AEDIC II- ERASMUS MUNDUS. Desde 2016 se desempeña como Profesora Asociada Exclusiva, en la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la UNSL. Ha dictado cursos de postgrado y ha participado de 14 Proyectos de Investigación Acreditados por Ciencia y Técnica de la UNSL. Actualmente es directora del Proyecto de CyT-UNSL N° 2-4318 “Estudio metabólico del estrés oxidativo y sus consecuencias en el reloj biológico en *Glycinemax L*” y directora de línea del Proyecto de CyT-UNSL N° 2-2318. Es asesora externa

de Proyectos vinculados con la UNRio IV y UNViMe. Participó como directora e integrante en 4 Proyectos de Extensión. Ha publicado 18 artículos en revistas internacionales indexadas, 8 capítulos de libros y 75 trabajos presentados a congresos nacionales e internacionales. Ha dirigido y codirigido numerosas tesinas de grado, becas y pasantías. Actualmente dirige 2 tesis de postgrado, una tesis de maestría y 1 beca CONICET.

Andrea Mariela Quiroga, estudió Ingeniería Agronómica en la Universidad Nacional de San Luis y es Dra. en Ciencia Biológicas recibida en la Universidad Nacional de Río Cuarto. En su tesis de grado trabajo en el Tema “*Respuestas morfofisiológicas de Digitaria eriantha y formación de callos como germoplasma factible para seleccionar plantas resistentes al frío*” lo hizo en el marco del PROICON° 50304 (2004-2006): Estudios fisiológicos, moleculares y biotecnológicos del estrés por frío en *Digitaria eriantha*. FICA (UNSL). Ha realizado un postdoctorado en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo con una Beca Posdoctoral CONICET (2011). Realizo una Diplomatura Internacional de Gestión del Turismo Vitivinícola de la Universidad Juan Agustín Maza (2020). Desde 2013 es Profesora Responsable en la Maestría en Ciencia y Tecnología de Agroalimentos y desde 2014 jefa de Trabajos Prácticos en Fruticultura (FICA) UNSL. Es Codirectora del PROICO N° 02-3318 “Mitigación del estrés abiótico en plantas por asociación simbiótica y su posible uso en la fitorremediación”, FQByF (UNSL). Ha participado en 18 proyectos de Investigación acreditados en el ámbito Nacional e Internacional. Ha integrado 1 Programa y varios Proyectos de Extensión y desde 2012 dirige un Proyecto de Extensión en la FICA (UNSL)- Ha ganado 14 Becas Nacionales y 2 Internacionales. Ha publicado 10 artículos en revistas con referato, ha escrito 3 capítulos de libros, 35 trabajos presentados a Congresos nacionales e internacionales. Ha dirigido y codirigido tesis, becas y pasantías de alumnos de grado de la FICA (UNSL) y 1 beca de graduados de la FICA-UNCuyo.

Índice

Titulo	I
Prologo	II
Editoras y Autoras	IV
INDICE	IX
MÓDULO BIOTECNOLOGIA Y MEJORAMIENTO DE FORRAJES.	1
Capítulo I: Biotecnología y Mejoramiento Genético de especies forrajeras: Caso <i>Digitaria eriantha</i> cultivar Mejorada INTA	2
MÓDULO ESTRÉS ABIOTICO.	21
Capítulo II: Germinación de <i>Digitaria eriantha</i> Steudel subespecie <i>eriantha</i> cv sudafricana y de <i>Trichloris crinita</i> en condiciones de estrés abiótico.	22
Capítulo III: Efecto del frio y la aclimatación en la producción de <i>Digitaria eriantha</i> cv Mejorada INTA	32
Capítulo IV: Respuestas hormonales y del sistema antioxidante frente al frio en <i>Digitaria eriantha</i> .	40
Capítulo V: Efecto del frio sobre el crecimiento, hormonas promotoras y anatomía de <i>Digitaria eriantha</i> .	62
Capítulo VI: Metilación del ADN genómico en dos cultivares de <i>Digitaria eriantha</i> como respuesta a bajas temperaturas.	84
MÓDULO MITIGACIÓN DEL ESTRÉS ABIOTICO POR ASOCIACIONES SIMBIOTICAS	104
Capítulo VII: Mitigación del estrés abiótico en <i>Digitaria eriantha</i> Steudel cvs. Sudafricana y Mejorada INTA por asociación con <i>Azospirillum brasilense</i> cepas Az39 e ipdC.	105
Capítulo VIII: El rol de las micorrizas en la mitigación del estrés abiótico por asociación simbiótica con <i>Digitaria eriantha</i> .	132
Capitulo IX. Lombricompuestos y modulación de la germinación y crecimiento en <i>Digitaria eriantha</i> cvs. Sudafricana y Mejorada INTA.	166



MÓDULO BIOTECNOLOGÍA Y MEJORAMIENTO DE FORRAJES



CAPITULO 1

Biotecnología y Mejoramiento Genético de Especies Forrajeras: caso *Digitaria eriantha* cultivar *Mejorada* INTA

Hilda PEDRANZANI, Sol GARCIA, Magali MAIDANA

Resumen

A través del cultivo *in vitro*, con la aplicación exógena de hormonas, se puede inducir a una planta, a la producción de callos, células somáticas indiferenciadas. Una proporción intermedia de auxina y citoquinina promueve su inducción y posteriormente la regeneración de órganos. Esto representa una herramienta muy útil, ampliamente utilizada, con fines científicos y económicos. *Digitariaeriantha* Steudel subesp. *eriantha*, especie forrajera de origen sudafricano y adaptada a la zona semiárida argentina, fue regenerada y propagada *in vitro* con el fin de producir germoplasma de mayor resistencia a bajas temperaturas. Diferentes tejidos, medios de desinfección y de cultivo *in vitro* fueron probados. Se logró establecer callos friables los cuales se trasladaron a medio para inducción de plántulas lográndose obtener y aclimatar plantas con buen desarrollo radical y foliar los cuales fueron mantenidos a 20°C.

Palabras Claves: callo, cultivo *in vitro*, *Digitaria eriantha*, mejoramiento, selección

Abstract

Through *in vitro* culture, with the exogenous application of hormones, a plant can be induced, to the production of calluses, undifferentiated somatic cells. An intermediate proportion of auxin and cytokinin promotes its induction (Skoog and Miller, 1957) and subsequently organ regeneration. This represents a very useful, manageable tool for scientific and economic purposes. *Digitaria eriantha* Steudel subsp. *eriantha*, a forage species of South African origin and adapted to the Argentine semi-arid zone, was regenerated and propagated *in vitro* in order to produce germplasm of greater resistance at low temperatures. Different tissues, disinfection and *in vitro* culture media were tested. It was possible to establish friable calluses which were transferred to seedling induction medium, obtaining and acclimatizing plants with good root and foliar development which were kept at 20°C.

Key Word: callus, *in vitro* culture, plant regeneration, selection. improvement

INTRODUCCIÓN

Técnicas biotecnológicas aplicadas a programas de mejoramiento en forrajes

En los últimos años la biotecnología ha aportado varias metodologías para complementar los programas de mejoramiento, como el cultivo de tejidos, la hibridación somática, la variación somaclonal y la transgénesis. Esta última resulta muy promisoría, especialmente para incrementar la calidad del forraje, persistencia, resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a estreses abióticos y para manipular el crecimiento y desarrollo. Los marcadores moleculares brindan su utilidad para la identificación y selección de caracteres agronómicos complejos. Más recientemente, la genómica permite identificar a gran escala genes de interés para su introducción en los forrajes. En lo que respecta al cultivo *in vitro* y la regeneración de plantas se han desarrollado protocolos exitosos de regeneración para un amplio rango de especies forrajeras a partir de órganos, tejidos y células. La utilización de explantos como embriones, semillas e inflorescencias es frecuente para la inducción de callo. Los dos primeros (semillas y embriones maduros) poseen la ventaja de hallarse disponibles durante todo el año, aunque si son sexuales segregan y no son clones de individuos destacados, por ello se han ideado protocolos partiendo de solo semilla. En estos casos se utiliza una semilla o embrión para iniciar una línea celular a partir de la cual se realizarán todas las manipulaciones de interés. En ocasiones, tratando de cumplir otros objetivos, se han encontrado resultados para micropropagar especies de pastos, como es el caso de *Sorghum bicolor* y *Cenchrus ciliaris*. Murty (1992) comprobó que la embriogénesis de ambas especies es de alta estabilidad genética, con una fácil respuesta a la regeneración, y se obtiene un número considerable de individuos de un explante inicial. *Lolium multiflorum* se puede propagar con fines de producción de semillas y experimentación, ya que se obtuvieron 8 000 plantines de un simple hijo en un período de 3 meses (Dale, 1984). A través de la embriogénesis somática en *Medicago sativa* alfalfa en suspensión celular, (Brown *et al.*, 1989) han obtenido 300 000 embriones por un gramo de explante en 54 días utilizando un protocolo de ocho pasos. Existen otros cultivos que, aunque se perpetúen a través de semillas, presentan serias dificultades para obtener en breve tiempo una suficiente cantidad de las mismas. En la caña de azúcar se han obtenido un alto coeficiente de multiplicación, por lo que se pueden regenerar millones de vitroplantas a partir de un meristemo en cuestión de varios meses (Kosky, 1992). Esta técnica trae consigo un aumento del rendimiento entre el 15 y 30% en dependencia del genotipo durante la primera multiplicación en campo, dado fundamentalmente por el incremento del número de tallos (Santana, 1994).

Tabla 1.1: Técnicas biotecnológicas utilizadas en programas de mejoramiento en gramíneas

Técnicas	Objetivo	Forrajeras y autores
Embriogénesis somática y la organogénesis		(Komatsuda <i>et al.</i> , 1993; Ríos <i>et al.</i> , 2001).
Cultivo de meristemas	Minimizar el riesgo de inestabilidad genética Conservación de germoplasma Micro propagación	<i>Lolium</i> y <i>Festuca</i> (Dale y Dalton, 1983; Pérez-Vicente <i>et al.</i> , 1993) <i>Dactylisglomerata</i> (Dale y Dalton, 1983).
Cultivo de meristemas para eliminar virus, solo o combinado con quimioterapia	Erradicación del virus del mosaico del tabaco (TMV). Preservación a largo plazo en nitrógeno líquido (-196°C) o el almacenamiento a corto plazo en condiciones de crecimiento limitado	Gramíneas (Spangenberg <i>et al.</i> , 1998) Leguminosas (Yamada <i>et al.</i> , 1991).
Suspensiones celulares	Transformación por biolística, para la propagación clonal de un genotipo determinado y como fuente de protoplastos.	<i>Dactylisglomerata</i> (Horn <i>et al.</i> , 1988), <i>Festucaspp.</i> (Wang <i>et al.</i> , 1993b, 1995; Spangenberg <i>et al.</i> , 1994; Fournier <i>et al.</i> , 1996), <i>Loliummultiflorum</i> (Wang <i>et al.</i> , 1993a, 1995), <i>Lolium perenne</i> (Wang <i>et al.</i> , 1993a; 1995), <i>Elymus gigantea</i> (Wang <i>et al.</i> , 1996), <i>Paspalumsp</i> (Akashi <i>et al.</i> , 1993); <i>Pennisetumpurpureum</i> (Wan y Vasil, 1996), <i>Phragmitescommunis</i> (Wang <i>et al.</i> , 2001a) y <i>Eragrostiscurvula</i> (Echenique <i>et al.</i> , 2001).
Protoplastos	Obtención de híbridos somáticos,	Se han logrado plantas en <i>Festucaspp</i> (Takamizo <i>et al.</i> , 1990; Spangenberg <i>et al.</i> , 1994), <i>Loliumsp</i> (Wang <i>et al.</i> , 1993a, 1995), <i>Bromusinermis</i> (Gamborg <i>et al.</i> , 1970),

		<i>Dactylisglomerata</i> (Horn <i>et al.</i> , 1988), <i>Paspalum dilatatum</i> (Akashi y Adachi, 1992)) y <i>Poa pratensis</i> (Nielsen <i>et al.</i> , 1993) En <i>Medicago sativa</i> se obtuvieron protoplastos a partir de raíces (Xu <i>et al.</i> , 1982), de cotiledones (Lu <i>et al.</i> , 1982) y de hojas (Johnson <i>et al.</i> , 1981)
Semillas artificiales solo	Permiten la propagación vegetativa a gran escala o la producción de semilla híbrida comercial pero su obtención es aún muy laboriosa y los costos elevados.	Alfalfa (McKersie y Bowley, 1993) donde no se las utiliza a nivel comercial
cultivo de anteras y micrósporas	Se utiliza para acelerar el proceso de mejoramiento a través de la producción de haploides.	En <i>Festuca arundinacea</i> y <i>Festuca pratensis</i> (Nitsch y Nitsch, 1969; Niizeki, 1977), <i>Bromus inermis</i> (Saito <i>et al.</i> , 1973), <i>Dactylisglomerata</i> (Saito <i>et al.</i> , 1973), <i>Trifolium alexyrum</i> (Mokhtarzadeh y Costantin, 1978), <i>Medicago denticulata</i> (Zagorska <i>et al.</i> , 1990), <i>Lolium spp</i> (Bante <i>et al.</i> , 1990; Opsahl Ferstad <i>et al.</i> , 1994) y <i>Poa pratense</i> (Abdullah <i>et al.</i> , 1994).

Un eficiente sistema de producción de haploides por cultivo de micrósporas permite obtener alrededor de 10.000 embriones de cebada en tiempos relativamente cortos (Kasha, *et al.*, 2001).

Porque técnicas de cultivo *in vitro* en el mejoramiento genético en forrajeras

Las técnicas de cultivo *in vitro* han sido utilizadas en la mejora genética de gramíneas, como, por ejemplo, la obtención de callos, su mantenimiento y la organogénesis a partir de los mismos, se ha conseguido en muchas especies a partir de distintos explantes. Existen ejemplos de utilización de técnicas de cultivos de meristemas y yemas en el mantenimiento de ciertas líneas por propagación vegetativa y también se ha utilizado para el saneamiento y micropropagación masiva de estas especies. La elevada frecuencia de modificaciones genéticas, al obtener callos en estos cultivos, hace que sean apropiados para obtener tetraploides y aneuploides, en definitiva, para incrementar la

variabilidad genética. Cambios genéticos, que no implican variación en el número de cromosomas, también han sido observados y pueden suponer una fuente importante de variabilidad. Esta variabilidad ha permitido la selección de líneas de mayor rendimiento (Medrano y Pol, 2011).

El establecimiento y mantenimiento de callos (masas de células indiferenciadas) se ha realizado con éxito en distintas especies forrajeras y a partir de diferentes partes de la planta. En general es necesaria la adición de hormonas al medio de cultivo (auxinas y citoquininas) para estimular la división celular. A partir de los callos, en muchos casos, modificando el balance de hormonas puede inducirse la embriogénesis que conduce finalmente a la formación de plantas completas. En forrajeras, el establecimiento y mantenimiento de callos ha sido obtenido a partir de distintos explantes. El cultivo *in vitro* de anteras, que difícilmente permite la obtención de haploides, puede derivar hacia el desarrollo de callos, en general a partir del tejido de las paredes de la antera, por lo que los callos obtenidos, suelen ser diploides (Pagniez y Demasly, 1979, SivaReddy *et al.*, 1985). Similarmente, inflorescencias inmaduras han sido utilizadas para la obtención de callos en *Agropyron*, *Andropogon*, *Bromus* y otras especies forrajeras (Lo *et al.*, 1980), *Lolium*, (Dale *et al.*, 1981), *Dactylis glomerata* (Chen *et al.*, 1982) entre otros. La obtención de callos, se ha llevado a cabo con éxito también en inflorescencias maduras, (Conger y Donnell, 1983; Sharma *et al.*, 1984) a partir de embriones maduros separados del resto de la semilla (Donnell y Conger, 1984) y a partir de tejidos adultos como segmento de tallos (Kasperbaner *et al.*, 1979) o secciones de hoja (Hanning y Conger, 1982).

Aunque en ciertos casos se ha puesto énfasis en la utilidad de los callos para la preservación *in vitro*, y la propagación vegetativa mediante inducción de embriogénesis en la superficie de los mismos, la elevada frecuencia de modificaciones genéticas en estos cultivos hace que sean mucho más apropiados para obtener tetraploides y aneuploides, en definitiva, para incrementar la variabilidad genética. Parte de la variación observada puede ser de origen fisiológico, y desaparecer al llevar las plantas a maceta. Las variaciones en el número de cromosomas, son muy frecuentes y en general su frecuencia aumenta con el tiempo de mantenimiento, aunque pueden obtenerse tetraploides tras sólo dos meses de cultivo. Analizando una muestra de 30 plantas de *Lolium perenne* regeneradas a partir de callos que llevaban dos años de cultivo *in vitro*, observaron mezcla de tetraploides y aneuploides. Cambios genéticos que no implican variación en el número de cromosomas también han sido observados y que pueden suponer una fuente importante de variabilidad. Esta variabilidad ha permitido la selección de líneas de mayor rendimiento en caña de azúcar (Lin y Chen, 1978) y resistentes a ciertas enfermedades y ha permitido la obtención de nuevas líneas en híbridos de *L. multiflorum* - *L. perenne* (Ahloowalia, 1978).

Técnicas de cultivo de tejidos aplicadas a la Mejora Genética en Forrajeras

La dificultad que estas plantas presentan en el establecimiento y manejo de cultivo de tejidos *in vitro*, puede inducir un desaliento en cuanto a su potencial uso y su aplicabilidad. Sin embargo, existen ejemplos de utilización de técnicas de cultivos de meristemos y yemas en el mantenimiento de ciertas líneas por propagación vegetativa. La utilización de este método de propagación permite eliminar virus y micoplasmas en *Lolium multijlorum* y *Dacýlis glomerata* (Dale *et al.*, 1980). La obtención de callos, su mantenimiento y la organogénesis a partir de los mismos, se ha conseguido en muchas especies de forrajeras a partir de distintos explantes. La obtención de poliploides y aneuploides, ha sido llevada a cabo en diferentes especies (Dale *et al.*, 1981; Chen *et al.*, 1982) así como la obtención de líneas seleccionadas. La puesta a punto de estas técnicas permite pensar en selecciones por resistencia a infecciones, pestes, etc., como se ha conseguido en otras plantas, así como en las grandes posibilidades de utilización de los callos en programas de selección por resistencia a ciertas condiciones del medio (medios auxotróficos, alta concentración de aminoácidos, etc.) como ha sido llevado a cabo en otras especies. El problema de la baja respuesta a las condiciones de *cultivo in vitro*, parece estar relacionado con las características genéticas de este grupo de plantas. Se han descrito marcadas diferencias en la respuesta frente al cultivo de tejidos a nivel de género, especie y cultivar, así como heredabilidad del tipo de respuesta (Keyes *et al.*, 1980).

La selección por respuesta *in vitro* en varias generaciones ha dado líneas de mejor respuesta en cultivos *in vitro*. A pesar de estar documentado el efecto del genotipo, se desconoce por qué ciertos genotipos de una determinada especie responden y otros no. La regulación del contenido interno de hormonas, las interacciones hormona externa y célula (receptores), y los cambios de estos efectos con la ontogenia, son posibles vías de explicación de estas distintas respuestas. Las plantas forrajeras representan una gran parte de la superficie agrícola total, y son la base muchos alimentos producidos, por lo que juegan un papel fundamental en la alimentación humana. Aunque la hibridación y selección clásicas siguen ofreciendo la mayor parte de los logros en el campo de la mejora genética, las aportaciones de las técnicas de cultivo de tejidos en este campo, comienzan a ser palpables en ciertos casos concretos a pesar de las dificultades que presenta esta particular familia de plantas. No cabe duda de que explorar las posibilidades de uso de estas técnicas, mejorar los rendimientos de las mismas, y ampliar el número de especies y explantes utilizables puede reportar beneficios en la mejora genética de estas plantas

La formación de callos a partir de siembra de tejidos *in vitro*

La producción de un callo puede considerarse la dediferenciación de un tejido organizado, como ha sido determinado por los cambios observados en la morfología y en la actividad metabólica. La formación de un callo a partir de un tejido explantado está acompañada por una serie de cambios en el aspecto y en el metabolismo celular, aunque la naturaleza precisa de la respuesta a las condiciones de cultivo influida tanto por la composición del medio nutritivo como por las características fisiológicas del tejido del explante. Los primeros trabajos se realizaron con cortes de tubérculos de tupinambo, en los que las primeras divisiones en la superficie de corte estaban muy sincronizadas. La división queda restringida inicialmente a las capas periféricas del explante, formándose un cambium en la lesión cuyas células se dividen, pero no se expanden apreciablemente. Se producen cambios a nivel estructural, lo que refleja una alteración en la actividad metabólica de las células. El incremento en la respiración está asociado con un aumento del número de mitocondrias y de la actividad de enzimas glicolíticas, como la hexoquinasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y de la málica deshidrogenasa. Desaparecen los productos de reserva como los gránulos de almidón y la síntesis de RNA y proteínas. Con cuatro a seis semanas de cultivo, el tejido explantado podrá haber producido su peso en tejido calloso, el cual continuará creciendo si se separa y se pasa a un medio nutritivo fresco. En las condiciones nutritivas y hormonales adecuadas, la morfología del callo puede describirse como friable (Figura 1.1) (aquella en la que las células están asociadas unas a otras de manera relativamente laxa) o compacta (si las células se agregan más densamente) (Figura 1.2) Los distintos tipos de callos pueden caracterizarse por la diferente composición de sus respectivas paredes, poseyendo los callos compactos una proporción mayor de pectinas y hemicelulosas que los de tipo friable.

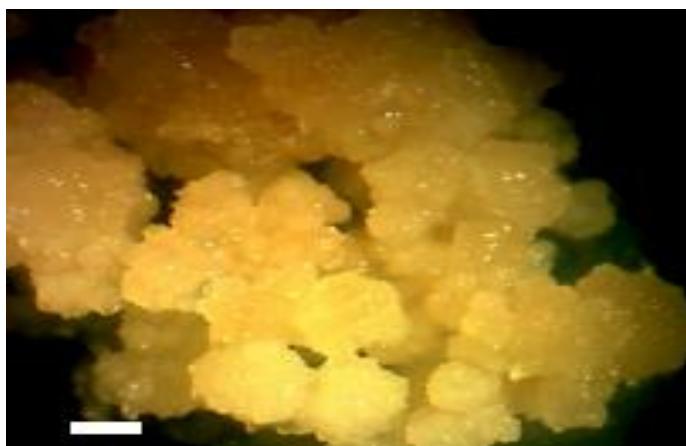


Fig. 1.1: Callo Friable *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., especie recalcitrante y apomítica (Fuente : Bernal-Flores *et al.*, 2015)

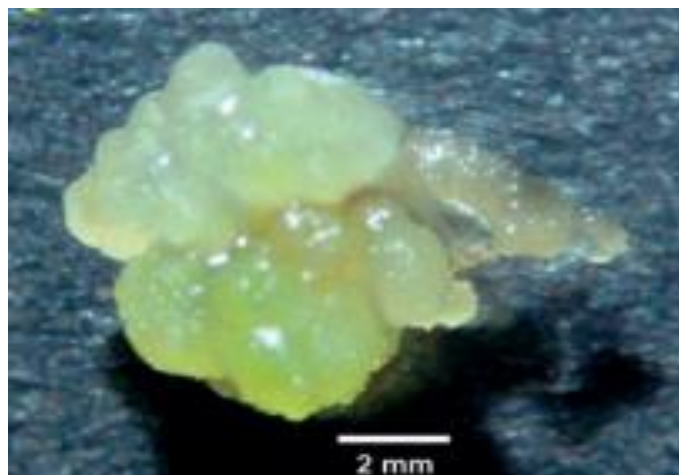


Fig. 1.2: Callo compacto *Perezia pinnatifida* (Asteraceae) planta medicinal andina (Fuente: Olivera-Fernández, *et al.*, 2017)

Características del crecimiento.

El crecimiento de los callos relativamente indiferenciados y de los cultivos en suspensión puede cuantificarse de distintas maneras, pero normalmente se expresa como el incremento del peso fresco, del peso seco o del número de células en un determinado intervalo de tiempo. El modelo general de crecimiento tiene una representación sigmoideal en la que puede reconocerse una fase de latencia, en la que no hay división celular o en muy pequeña cantidad, una fase en la que la proporción de divisiones alcanza un máximo, la fase <<exponencial>>, seguida de las fases lineal y estacionaria, en las que la proporción de células en división va disminuyendo gradualmente, prosiguiendo la vacuolización. Cada etapa está caracterizada por una serie de rasgos estructurales y bioquímicos distintos, pero todo el ciclo de crecimiento es una continuidad de cambios fisiológicos y en cualquier momento podrá encontrarse no una población homogénea con tipos celulares idénticos, sino un espectro de células con morfología, comportamiento químico y complemento genético distintos.

Iniciación del cultivo de callos

La lesión de un tejido vegetal suele tener como consecuencia la iniciación de la división celular en el punto de corte o en una zona adyacente a él y si el tejido se explanta y se suplementa con una mezcla de sales, vitaminas y reguladores del crecimiento (generalmente una auxina y una citoquinina) y una fuente de carbono (normalmente sacarosa), la división celular continuará y se formará un callo. Como material de explante puede utilizarse con éxito varios tejidos, pero el origen del tejido del explante puede ejercer un profundo efecto en el comportamiento del desarrollo posterior del callo. En general, los tejidos jóvenes o inmaduros en lo que al desarrollo se refiere como hipocótilos, hojas jóvenes, embriones inmaduros o inflorescencias inmaduras han

demostrado ser un material de partida apropiado. Para iniciar el cultivo de callos a partir de tejido se corta una porción de tejido de la parte más joven de una planta sana y coloca en solución de inmersión en etanol al 70% durante 20-30 seg, seguida de una esterilización completa con una solución halogenada como hipoclorito sódico (aproximadamente con un 2% de Cl disponible). Después de enjuagar de cinco a seis veces con agua destilada estéril, se sitúa, en un medio de agar sólido como el de Murashige y Skoog (1962), que contiene 30g l⁻¹ de sacarosa, 1mg l⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (una auxina sintética). El tejido se suele mantener bajo luz fluorescente (10-100 μmol m⁻²s⁻¹) a 24-28°C y la primera evidencia de la formación de un callo puede reconocerse por el aspecto cristalino de la superficie de corte en el plazo de 1-3 semanas. Después de 4-8 semanas se habrá desarrollado el suficiente callo como para poder transferirlo a un medio fresco y establecer el cultivo.

Manipulación del crecimiento y de la diferenciación *in vitro*

Como consecuencia de las condiciones hormonales y nutritivas, se activan una serie de procesos metabólicos y fisiológicos. Conforme las células absorben y liberan metabolitos, influyen en la composición del medio y se adaptan a un entorno en cambio continuo, en lo concerniente a la tasa de división celular y al comportamiento biosintético. Por supuesto que es posible hacer modificaciones experimentales específicas de la composición del medio y dirigir así el rumbo del desarrollo celular. Esto es así en virtud de la plasticidad del desarrollo de la célula vegetal y de la totipotencia genética observada en células plenamente diferenciadas (aunque en la práctica resulte exactamente difícil demostrar este fenómeno en una célula aislada).

No obstante, la manipulación de la diferenciación probablemente sea la estrategia aislada más importante en la biotecnología vegetal como medio tanto de regenerar plantas completas a partir de células individuales como de inducir la síntesis de metabolitos secundarios.

En una serie de experimento clásico, Skoog y Miller (1957) demostraron la relación aparentemente simple entre el balance auxina-citoquinina del medio nutritivo y el patrón de re diferenciación de un callo desorganizado de médula de tabaco. Observaron que si la concentración de citoquinina (kinetina) era elevada en relación a la de auxina (IAA), resultaba inducido el crecimiento de tallos; por el contrario, si la concentración de auxina era relativamente alta, se desarrollaban las raíces. A concentraciones intermedias, el tejido de la medula se desarrollaba para formar un callo desorganizado. Aunque las necesidades precisas de auxinas y citoquininas pueden diferir de una especie a otra, este procedimiento general, concretamente la manipulación de los niveles exógenos de auxina y citoquinina, ha sentado las bases de las técnicas de regeneración de una amplia gama

de especies. Los experimentos de Skoog y Miller ilustran también la importancia del papel de los reguladores del crecimiento, por encima del de otros componentes del medio, en la inducción de determinadas rutas del desarrollo. El mecanismo o los mecanismos de acción de los reguladores del crecimiento dista de estar claro, lo que sí se sabe es que la actividad de una combinación determinada de reguladores del crecimiento y, en menor medida, de otros componentes del medio, depende de la <<historia fisiológica>> de las células cultivadas, incluyendo el origen del tejido del explante y el tiempo que las células hayan estado mantenidas *in vitro*. Se ha observado que existe una disminución de la capacidad morfogénica y biosintética tras varios ciclos de crecimiento, simultáneamente con (pero no necesariamente como consecuencia de) un aumento de la variabilidad genética.

Patrones de organización estructural

La reorganización de un callo o de una suspensión celular suele transcurrir con la formación bien de órganos (tallos y raíces), bien de estructuras bipolares pseudoembrionarias (embriones somáticos, embrioides). Hemos visto ya como puede manipularse la organogénesis, al menos en algunas especies, alterando experimentalmente las proporciones de auxina/citoquinina (Figura 1.3). También es posible iniciar un cultivo de órganos con un mínimo de crecimiento desorganizado aislando explantes a partir de tejidos meristemáticos, como el ápice caulinar o las yemas axilares: aquí el cultivo se caracteriza por una proliferación de estructuras morfológicamente reconocibles, habitualmente tallos o raíces. Con una manipulación adecuada de la composición del medio, se puede inducir un desarrollo morfológico posterior, como la formación de raíces sobre tallos cultivados para crear una planta funcionalmente intacta, de la organogénesis en un callo indiferenciado por manipulación de la relación auxina/citoquinina del medio, fue aplicada infructuosamente a estas especies durante mucho tiempo (Figura 1.4 A y B). Sin embargo, la embriogénesis somática se observó en callos con una morfología particular denominados callos de <<tipo I>>, caracterizados por poseer un tejido compacto de crecimiento lento, de color blanco a amarillo pálido, formado por células pequeñas con citoplasma denso, que se originaban solo a partir de explantes particulares con unas condiciones hormonales específicas. Los callos no embriogénicos son blandos y friables y están compuestos por células vacuoladas de pared gruesa. En algunas especies como el maíz se ha descrito un callo friable y de división rápida y sin embargo embriogénica de <<tipo II>>. Los cereales necesitan elevados niveles de la auxina sintética 2,4-D para inducir el callo embriogénico que, si se han utilizado embriones como material de explante, se derivará de las células periféricas del escutelo.

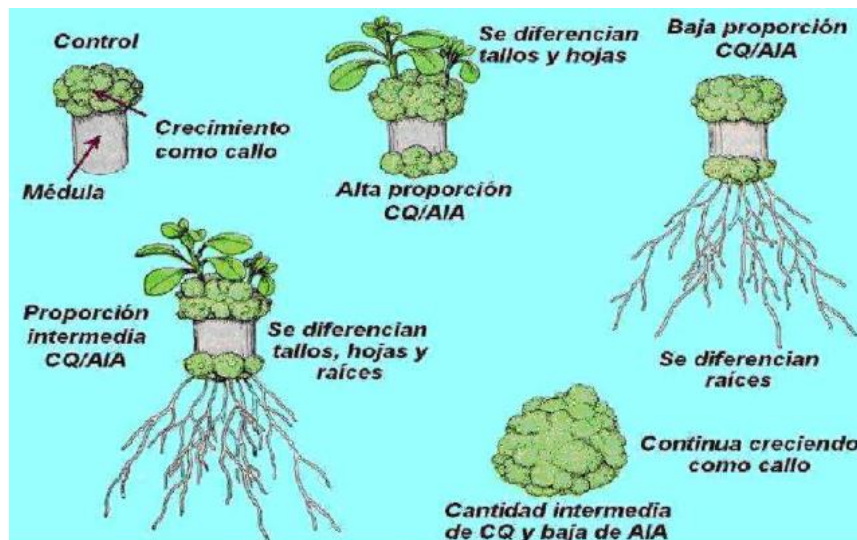


Fig. 1.3: Balance auxinas/citoquininas en la morfogénesis y formación de callo.
(Fuente: Skoog y Miller ,1957)

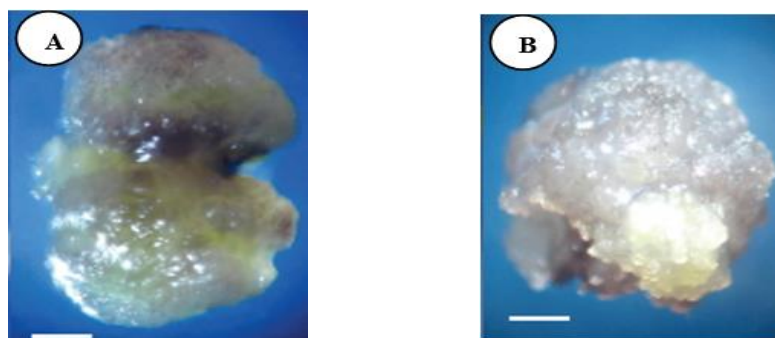


Fig. 1.4: Tipos de callos A: Tipo I tejido compacto de crecimiento lento B. Tipo II callo friable de crecimiento rápido (Fuente: Rodríguez Beraud *et al.*, 2014)

Si se utilizan inflorescencias inmaduras, el callo deriva del meristemo floral o del tejido parenquimático próximo al tejido vascular y, si se utilizan hojas, a partir de células de la epidermis inferior y del mesófilo próximo al tejido vascular. En realidad, los cultivos embriogénicos son una mezcla de células embriogénicas y no embriogénicas. El tipo embriogénico se mantiene por subcultivo selectivo en un medio con un elevado contenido de 2,4-D.

Si el callo embriogénico se transfiere a un medio con un contenido reducido de 2,4-D, se producirá la formación de embriones somáticos (Figura 1.5). El desarrollo tiene lugar por divisiones de una única célula o de una masa pro-embrionaria y conduce a una estructura bipolar que, a su vez, formara dos meristemos apicales. Este proceso es similar en cereales y en dicotiledóneas, como la zanahoria y el apio, y guarda un estrecho parecido con la embriogénesis cigótica. Es posible aumentar la frecuencia de embriogénesis en un cultivo en suspensión enriqueciéndolo en agregados celulares

embriogénicos. Esto puede lograrse tamizando el cultivo a través de columnas con perlas de vidrio o por centrifugación en gradiente de densidad para fraccionar la población celular por tamaños (Fujimura y Komamine, 1984). Se puede conseguir un cierto grado de sincronía en la embriogénesis transfiriendo los agregados embriogénicos por ejemplo a un medio sin auxina.

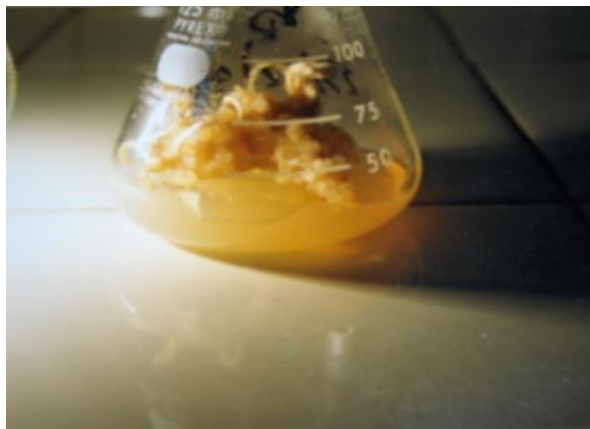


Fig. 1.5: Callo embriogénico de *Allium sativum* (Foto: Hilda Pedranzani)

Producción de callos en *Digitaria eriantha* Avanzada INTA: Programa de mejoramiento.

En estudios preliminares de *Digitaria eriantha* realizados en la región de Sudáfrica (Watt *et al.*, 1989) encontraron un sistema para micropropagar esta especie por embriogénesis somática, que consta de sales nutritivas MS + 1 mg 1 de 2,4-D, altas concentraciones de sacarosa (80 g/l) y agua de coco en la fase de implantación. Para la regeneración, el uso del agua de coco y 3 g/l de prolina tuvo muy buenos resultados.

Digitaria eriantha Steudel subesp Eriantha es una especie de origen sudafricano que crece a temperaturas de 36°C y ante la necesidad de producir germoplasma de mayor resistencia a bajas temperaturas, condujo a inducir la formación de callos a partir de diferentes explantos. Las técnicas de cultivo *in vitro* proveen medios de propagar masas de plantas, generar variación y llevar a cabo selección *in vitro* por características valiosas desde el punto de vista económico (Watt y Cresswell, 1988) Las respuestas cualitativas y cuantitativas del crecimiento del callo en cultivo implican un sinergismo entre el origen del tejido usado para inducción, la composición del medio y las condiciones físicas que prevalecen durante ésta etapa (Dodds y Roberts, 1982) El establecimiento de cultivos de tejidos a partir de especies de gramíneas *in vitro* hasta hace poco era dificultoso, pero ofrece hoy la posibilidad de desarrollar nuevas variedades e incrementar

la producción de cultivos tradicionales y no tradicionales (Vasil, 1987). Una de las opciones para incrementar la variabilidad genética es a partir de callos utilizando el 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) aumentando en forma proporcional a su concentración las variaciones somaclonales transmisibles a la descendencia. El cultivo de callos organogénicos como fuente de variabilidad genética y la posterior regeneración de plantas de maíz se ha utilizado con fines de mejoramiento genético (García *et al.*, 1992). En el presente trabajo se inducirá la producción de callos a partir de distintos explantos y expondrán a bajas temperaturas para la posterior selección de aquellos que resistan las condiciones impuestas, al nivel de callo (Terakawa y Wakasa, 1992) para producir finalmente plantas más tolerantes al frío con el objetivo de conseguir germoplasma adaptado a bajas temperaturas.

MATERIALES Y METODOS

A partir de plantas de *Digitaria eriantha* Mejorada INTA en maceta se extrajeron macollos, separándolos y utilizando los más jóvenes. Se sembraron meristemas y porciones de 2 cm de lámina foliar (lado interno y externo de la vaina) extraídos desde la base a la punta de la lámina y se desinfectaron según el protocolo enjuague con agua y Tween 20 (5 min), luego se sumergieron en etanol al 70% (30 seg) y posteriormente en hipoclorito de sodio 10% (15 min) con enjuagues de agua destilada estéril entre etapas. Los explantos se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo MS con 1mg/l-1 de 2,4-D para formación de callo, (Murashige y Skoog, 1962) sin asparagina, a una temperatura de 27°C en oscuridad. Se indujo crecimiento de plántulas a partir de callos en medio MS con el agregado de 1 mg/l-1 de BAP (bencil amino purina) y sacarosa al 6%, con un fotoperíodo de 16h, y crecieron en cámara a menores temperaturas (22°C) de las habituales para la especie (22°C).

RESULTADOS Y DISCUSION

Se pudo establecer que la capacidad de inducción de callos se restringió a meristemas y zona basal de las porciones internas de la lámina foliar. Se evidenció que los tejidos jóvenes y menos especializados tienen posibilidades de proliferar en las condiciones descriptas (Pedranzani *et al.*, 2001). El medio de García *et al.* (1992) sin asparagina que contenía 1mg/l-1 de 2,4-D usado en producción de callos en maíz, permitió formar callos en *Digitaria*, los cuales se mostraron con apariencia friable, color claro o blanco y sin pigmentaciones (Figura 1.6) crecieron a 27 ° C y se obtuvieron a 30-45 días de la siembra.



Fig. 1.6: Callo de *Digitaria eriantha* (Pedranzani *et al.*, 2004)

Estos callos, transferidos al medio MS con 1 mg/l-1 de BAP, produjeron la formación de plantas enteras en un porcentaje del 30%. Las plantas regeneradas a partir de callos se mantuvieron en excelentes condiciones a 20°C, mostrando buen desarrollo como germoplasma a partir del cual se podrán generar nuevas series de cultivos *in vitro* más tolerantes al frío.

BIBLIOGRAFIA

- Abdullah, A.; Pedersen, S; Andersen, SB.1994. Triploid and hexaploid regenerants from hexaploid timothy (*Phleum pratense* L.) via anther culture. *Plant Breed.* 112: 342-345
- Ahloowalia, BS.1978." Novel megrass genotypes regenerated from embryo callus culture" Abstr. 4th Inter. Congr. Plant tissue and organ culture Calgary N° 1723.
- Anónimo.1975. "Insolation culture of rice protoplast" *Sci. Sinica* 18:779-784
- Akashi, R; Adachi, T.1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature inflorescences of apomictic dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir). *Plant Sci.*, 82:219-225.
- Akashi, R; Hashimoto, A.; Adachi, T.1993. Plant regeneration from seed-derived embryogenic callus and cell suspension cultures of bahiagrass (*Paspalum notatum*). *Plant Sci.* 90: 73-80.
- Bante, I; Sonke, T.; Tandler, RF; Van Den Bruel, AMR; Meyer, EM.1990. Another culture of *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum*. In: The impact of Biotechnology in Agruculture (eds. R.S. Sangwan y B.S. Sangwan-Norreel), Kluwer Acad. Dordrecht. pp.105-127
- Bernal-Flores, Á., Quero-Carrillo, AR., Robledo-Paz, A., Zavaleta-Mancera, HA., & Pérez-Rodríguez, P.2015. Embriogénesis somática inducida con estrés osmótico en *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., especie recalcitrante y apomíctica. *Revista fitotecnica mexicana*, 38(4), 359-367.

Brown DCW, Bowley SR, McKersie BD, Senaratna T, Bowley JD. 1989. Synthetic alfalfa seed: an alternate approach to enhance alfalfa production efficiency. *Forage Notes*. 34:4

Chen CH, Chen LF, Ross JG. 1982. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of orchardgrass (*Dactylis glomerata*). *Euphytica* 31, 19-23.

Conger B V, Donnell RE. 1983. Plantlet formation from cultured inflorescences of *Dactylis glomerata*. *Plant cell tissue organ culture*, 3:247-255.

Dale PJ, Cheyne VA, Dalton S J. 1980. Pathogen elimination and in vitro plant storage in forage grasses and legumes. In *Tissue culture methods for plant pathologist*. Infrá D. A. y Melgeson. J P Ed.

Dale PJ, Thomas F, Brehell RIS, Wernicke. 1981. Embryogenesis from cultured immature inflorescences and nodes of *Lolium multiflorum*. *Plant cell, tissue organ culture*. 1, 47-45.

Dale PJ. 1984. Tissue culture and forage crop improvement. *Span* 27:2

Dale, PJ; Dalton, S.J. 1983. Immature inflorescence culture in *Lolium*, *Festuca*, *Phleum* and *Dactylis*. *Z. Pflanzensphysiol.*, 111:39-45.

Díaz, M1; Echenique, V2; Schrauf, G.3; Cardone, S3; Polci, P1; Lutz, E1 Y Spangenberg, G. *Biotecnología y Mejoramiento Genético de Especies Forrajeras* Ría, 33 (3): 77-104 ISSN Edición Impresa 0325-8718. Diciembre 2004. ISSN Edición En Línea 1669-2314 INTA, Argentina

Dodds JH, Roberts LW. 1982. *Experiments in plant tissue culture*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, USA, 36-50.

Donnell RE, Conger BV. 1984. Callus induction and plantlet formation from nature embryo explants of *Kentucky bluegrass*. *Crop. Sci.* 24, 573-578.

Echenique, V; Díaz, M; Polci, P; Mroginski, L. 2001. Embryogenic cell suspension from different explants and cultivars of *Eragrostis curvula* (Schrad) Nees. *Biocell*. 25: 131-138

Fournier, D; Ghesquiere, M; Poisson, C. 1996. Plant regeneration from cell suspension cultures of tetraploid tall fescue. *Plant cell Tissue organ culture*. 46: 165-168

Fujimura, T; Komamine, A. 1984. Fractionation of cultured cells, in *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 1. Ed. Vasil, I.k., pp. 159-166. Orlando, Florida, Academic Press.

Gamborg, OL; Constabel, F; Miller, RA. 1970. Embryogenesis and production of albinoplant from cell cultures of *Bromus inermis*. *Plant*, 95: 355-358

- García, MD; M del C Molina; Caso OH. Revista del V Cong. Nac. del Maíz- II Reunión Sudamericana de Maiceros, Pergamino, Buenos Aires. Cap. I. 1992. 61-69
- Hanning GE, Conger BV. 1982. Embryoid and plantlet formation from leaf segments of *Dactylis glomerata*. Theor. Appl. Genet. 63, 155-159.
- Horn, ME; Conger, BV; Harms, C.T.1988. Plant regeneration from protoplasts of embryogenic suspension culture of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L) Plant cell Rep. 73:371-374
- Johnson, LB; Stuteville, DL; Higgins, RK; Skinner,D.Z. 1981.Regeneration of alfalfaplants from protoplast of select clones. Plant Sci. Cell.20:297-304
- Komatsuda,T; Annaka, T;Oka,S.1993. Genetic mapping of a quantitative traits locus (QTL) that enhances the shoots differentiation rate in *Hordeum vulgare* L. Theor.Appl. Genet.,86:713-720
- Kasha, KJ, SimonE, Oro R, Yao QA, Hu TC, Carlson AR. 2001. An improved in vitro technique for isolated microspore culture in barley. Euphytica 120: 379-385.
- Kasperbawer MJ, Buchner RC, Bush LP. 1979.Tissue culture of annual ryegrass. Tall fescue F, Hybrids. Callus establishment and plant regeneration. Crop. Sci. 19, 457-460.
- Kasperbawer, MJ, Buckner, RC. & Springer, WD. 1980. Haploid plants by anther-panicle culture of tall-fescue. Crop. Sci. 20, 103-106.
- Keyes GJ, Collins GB, Taylor NL. 1980. Theor. Appl. Genet. 58, 265-271.
- Kosky R.1992. Cultivo de tejidos en la caña de azúcar. En: Conferencias Primer Curso FAO-Francia-Cuba sobre técnicas modernas de mejoramiento y multiplicación de especies agámicas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas, Cuba
- Lin, MC.; Chen, WH.1978. "Tissue and cell culture as aid to sugar cañe Breeding Ii Performance and yield potencial callus derived lines. Euphytica 27:273-282
- Lo PF, Chen CM, Si Ross JG. 1980. Vegetative propagation of temperate storage grasses through callus culture. Crop Sci. 20, 363-370.
- Lu, DY.; Pental, D.; Cocking, EC.1982. Plant regeneration from seedling cotyledon protoplast. Z. Pflanzenphysiol., 107:59-63
- Mckersie, BD.; Bowley, SL.1993. Synthetic seed in alfalfa. In synseedapplications of synthetic seed to crop improvement (ED. K Redenbaugh) CRC. Press Boca raton, pp.231-255

- Medrano H, Pol A.2011. Cultivo de tejidos y mejora genética en gramíneas forrajeras. *Pastos*, 15(1-2), 53-65.
- Mokhtarzadeh, A.; Costantin, JM. 1978. Plant regeneration from hypocotyl and anther derived callus of barseem clover. *Crop. Sci.* 18:567-572
- Murashige T, Skoog F.1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- MurtyVR. 1992. Achieving apomictic reproduction in sorghum in India and USA. *Apomixis Newsletter*. 5:50
- Nielsen, KA; Carsen, E.; Knudsen,E.1993. Regeneration of protoplast derived Green plants of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L) *Plant. Cell Rep.*, 12:537-540
- Nitsch, JP; Nitsch, C.1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163:85-87
- Niizeki, M.1977. Haploid, polyploid and aneuploid plants from cultures anthers and calluses in species of *Nicotiana* and forage crops.*J.Facul. Agri. Hokkaido Univ.* 58:343-466
- Olivera-Gonzales P, Espinoza del Río R, Tamariz-AngelesC.2017. *Perezia pinnatifida* (Asteraceae) planta medicinal andina. Multiplicación *in vitro* y embriogénesis somática de *Revista peruana de biología*, 24(3), 323-328.
- Pagnier M, Demaly Y.1979. Obtention d'individus androgénétiques par culture *in vitro* d'antheres de Ray-grass d'Italie (*Lolium multiflorum*). *Ann. Anelior. Plants.* 29, 6, 631-637.
- Pedranzani HE, Quiroga AM, Garavaglia S, Molina MC. 2001. XXVIII Jornadas Argentina de Botánica 76 La Pampa, Argentina.
- Pedranzani HE, Quiroga AM, Molina MC. 2004. Producción de callos e inducción de plantas de *Digitaria eriantha* Avanzada INTA *in vitro* Phyton 73:111-114
- Perez-Vicente, B.; Wen, XD.; Wang,ZY.; Leduc,N.; Sautter,C;Werli,E.; Potrykus,I.; Spangenberg,G.1993. Culture of vegetative and floral meristems in ryegrasses: potential targets for microballistic transformation.*J. Plant Physiol.*, 142:610-617.
- Rios, RD.; Gómez, C.; Ferri, A.; Ciano, J; Ardila,F.; Franzoni,P.2001. Transformación genética de alfalfa. REDBIO. Abstracts of the VI Latin –American Meeting on Plant Biotechnology. Brazil.pp.52
- Rodríguez Beraud MM, Latsague Vidal MI, Chacón Fuentes MA, Astorga Brevis PK.2014. Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugnimolinae. Bosque (Valdivia)*, 35(1), 111-118.

Saito, K.; Nakayama, R.; Takeda, K.; Kuwata, H. 1973. Studies of breeding of grass. Differentiation of plants by anther culture in orchardgrass and smooth brome grass. Bull. Fac. Agri. Hirosaki Univ., 21: 1-8

Santana I. 1994. Estudio de la variabilidad en poblaciones de caña de azúcar obtenidas por cultivo de tejidos. Tesis presentada en opción al grado de Dr. En Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de Investigaciones en Caña de Azúcar, La Habana 85 p.

Sharma HC, Gill BS, Sears RG. 1984. Inflorescence culture of wheat. *Agropyron* hybrids. Callus induction, plant regenerations and potential in overcoming sterility barriers. Plant Cell Tissue Organ Culture, 3, 247-255.

Skoog F, Miller CO. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*, in *The Biological Action of Growth Substances, Symp. Soc. Exp. Biol.*, Vol. 11 Ed. Porter, H.K., pp. 118-131- Cambridge, Cambridge University Press.

Siva Reddy V, Leehavathi S, Sen SK. 1985. Influence of genotype and culture medium on minoscore callus induction and free plant regeneration in anthers of *Oryza sativa*. Phisiol. Plant. 63, 309-314.

Spangenberg, G.; Wang, ZY.; Nagel, J.; Potrykus, I. 1994. Protoplast culture and generation of transgenic plants in red fescue (*Festuca rubra* L). Plant. Sci. 97:83-94

Spangenberg, G.; Wang, ZY.; Potrykus, I. 1998. Biotechnology in forage and turf grass improvement. In: Monographs on theor. Appl. Genet (eds. R. Frarkel et al.) Volume 23, Spring Verlag, Herdelberg.

Takamizo, T.; Sugino, K.; Ohsugi, R. 1990. Plant regeneration from suspension culture derived protoplast of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb) of a single genotype. Plant. Sci., 72: 125-131

Terakawa T, Wakasa K. 1992. Rice mutant resistant to the herbicide bensulfuron methyl (BSM) by in vitro selection. Japan, J Breed 42 267-275

Vasil IK. 1987. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops" *F. Plant Physiol.* 128, pp. 193-218.

Wang, ZY; Vallés, MP.; Montavon, P.; Potrykus, I.; Spangenberg, G. 1993a. Fertile plant regeneration from protoplasts of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds). Plant cell. Rep., 12:95-100

Wang, ZY; Nagel, J.; Potrykus, G. 1993b. Plants from cell suspension derived protoplasts in *Lolium* species. Plant Sci., 94:179-193.

Wang, ZY; Legris, G.; Valles, MP.; Potrykus, I.; Spangenberg, G. 1995. Plant regeneration from suspension and protoplasts cultures in the temperate grasses *Festuca* and *Lolium*. In: Curr. Issues Plant. Mol. And Cell. Biol (eds. M. Terzi, R. Cella, Y. A. Falavigna) Kluwer Academic Pub., Dordrecht, pp. 81-86.

Wang,L.; Wang,X.; Huang,B.1996. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from single cell suspension cultures of *Elymus giganteus*Vahl. Plant. Cell Rep., 15:865-868

Wang,ZY; Hopkins,A.; Mian, R.2001 a. Forage and turf grass biotechnology. Critical reviews in Plant Sci., 20: 573-619

Watt P, Mycock DJ, Cresswell CF. 1989.Plant regeneration by somatic embryogenesis from leaf explants of *Digitana eriantha*(Steud) Subsp. Eriantha. Proc. XVI Int. Grassl. Cong., Nice. p. 421

Watt P, CresswellCF. 1988. J Soc South Afr 5, 3 167-168

Xu,ZH; Davey,MR.; Cocking,EC.1982.Organogenesis from root protoplasts of the forage legumes *Medicago sativa* and *Trigonella foenum-graecum*. Zeitschrift-Fur-Pflanzenphysiologie. 107:231-235

Yamada, T.; Sakai, A.; Matsumura, T.; Higuchis, S.1991. Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L).Plant.Sci.73:111-116

Zagorska, N.; Stereva,R.; Robeva,P.1990. Alfalfa (*Medicago sativa*): *in vitro* production of haploid. In:Y.P.S Bajaj (Ed), Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol.12. Haploids in Crop Improvement: I. Springer, Berlin. 458-471



MÓDULO ESTRÉS ABIÓTICO



CAPITULO 2

Germinación de *Digitaria eriantha* Steudel subesp *eriantha* cv. Sudafricana y de *Trichloris crinita* en condiciones de estrés abiótico.

Alberto DI GIAMBATISTA, Olga M. RUIZ, Marisa GARBERO,

Hilda PEDRANZANI.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de diferentes temperaturas y potenciales osmóticos (PO) en la germinación de las semillas de *Digitariaeriantha* Steudel subesp. *Eriantha* cv. Sudafricana y *Trichloris crinita*. Las semillas se colocaron a germinar en cápsulas de Petri a temperaturas de 17°, 25°, 30° y 35°C y en soluciones de PEG6000, para simular potenciales osmóticos: 0 (Control, agua destilada); -0,5; -1 y -1,5 MPa. Se registró el porcentaje de germinación (PG). Ambas especies mostraron los mayores PG en el rango de 25° y 30°C; a 17°C el PG fue significativamente menor después de 14 días. En *T. crinita* el PG disminuyó significativamente con potenciales de -1 y -1,5 Mpa en todas las temperaturas; además, con -1,5 Mpa a 17° y 35°C las semillas no germinaron. El PG de las semillas de *D. eriantha* disminuyó con potenciales de -0,5 y -1,5 Mpa a 17° y 35°C, y a 25°C también disminuyó, pero con potenciales de -1 Mpa y -1,5 Mpa. Se concluye que a temperatura de 25°C ambas especies toleraron hasta -0,5 Mpa de PO y disminuyeron significativamente su PG a -1,0 Mpa y a -1,5 Mpa. A 30 °C con potenciales altos de 1,5 Mpa de PO ninguna de las dos especies germina.

Palabras claves: Estrés osmótico, germinación, temperatura

Abstract

The objective of this work was to determine the effect of different temperatures and osmotic potentials (OP) on the germination of seeds from *Digitariaeriantha* Steudel subsp. *eriantha* cv. Sudafricana and *Trichloris crinita*. The seeds were put to germinate on Petri dishes at temperatures of 17°, 25°, 30° and 35°C and in solutions of PEG6000, in order to simulate osmotic potentials: 0 (control, distilled water); -0,5; -1 and -1,5 MPa. The germination percentage (GP) was recorded. Both species showed the highest GP in the range 25 and 30°C; at 17°C the GP was significantly lower after 14 days. In *T. crinita* the GP significantly decreased with potentials of -1 and -1,5Mpa in all the temperatures; besides, with -1,5Mpa at 17° and 35°C the seeds did not germinate. The GP of the *D. eriantha* seeds decreased with potentials of -0,5 and -1,5 Mpa at 17° and 35°C, and it also decreased at 25°C but with potentials of -1 Mpa and -1,5 Mpa. It is concluded that at a temperature of 25°C both species tolerated up to -0.5 Mpa of PO and significantly decreased their PG to -1.0 Mpa and to -1.5 Mpa. At 30 °C with high potentials of 1.5 Mpa of PO none of the two species germinate.

Key words: Germination, osmotic stress, temperature

INTRODUCCIÓN

Origen, distribución y sinonimia

La germinación de las semillas es un estado crítico para el establecimiento de las plántulas y determina posteriormente la producción de los cultivos (Almansouriet *al.*, 2001), los cuales dependen de una interacción entre el sustrato de siembra y la calidad de la semilla (Khajeh-Hosseini *et al.*, 2003). Entre los factores adversos que afectan la germinación se pueden incluir la sensibilidad al estrés por sequía (Wilson *et al.*, 1985) y la tolerancia a la sal (Sadeghian y Yavari, 2004). Cornaglia *et al.* (2005) evaluaron los efectos del estrés hídrico en la germinación y el crecimiento de las plántulas en el pasto miel (*Paspalum dilatatum*), usando soluciones acuosas de Polietilenglicol (PEG 8000: 0, -0,25, -0,5, -0,75 y -1 Mpa). La velocidad de germinación fue más sensible al aumento del estrés hídrico que la germinación total, aunque ambas disminuyeron, y hubo una sensibilidad elevada al estrés hídrico durante la germinación y la emergencia temprana.

Demiret *et al.* 2013, al estudiar la germinación y el crecimiento frente a la sal (NaCl) y al efectoosmótico (con PEG, para potenciales de agua de -0,3, -0,6 y -0,9 Mpa) en semillas de *Capsicum annuum* L. cv. Sera Demre, cosechadas a los 50, 60 y 70 días después de la antesis, encontraron que la concentración de sal y el potencial osmótico más altos produjeron una disminución en la germinación y en el peso fresco de las plantas. Las semillas germinaron en todas las concentraciones de NaCl, pero a -0,9 Mpa de PEG no germinó ninguna semilla.

También Foolad y Lin (1997), en semillas de tomate en diferentes medios con idénticos potencialesosmóticos, hallaron que la velocidad de germinación fue afectada principalmente por el efecto osmótico con relación al contenido iónico del medio; los autores concluyeron que el estrés impuesto resultó en una mayor ganancia de biomasa, la cual puede ser atribuida a una mayor división celular y al contenido de azúcares (Gill *et al.*, 2003).

Murillo *et al.* (2002) señalaron que el estrés salino tuvo un menor efecto en la germinación de las semillas de *Vigna unguiculata* L. Walp que el estrés hídrico simulado con PEG a los mismos potenciales osmóticos. Demiret *et al.* (2003), en semillas de aubergine o brinjal (*Solanum melongena*), también encontraron que las semillas inmaduras fueron más sensibles al estrés osmótico extremo que al estrés salino.

D. eriantha Steud. subsp. *eriantha* es una especie introducida en 1991 en la Argentina, es perenne y de buena calidad forrajera. Rimieri (1997) desarrollo, a partir del cv. Sudafricana, el cv. Irene, el cual presentó una mejor adaptación a las condiciones edafoclimáticas de la región semiárida argentina.

Trichloris crinita es una especie nativa de la región semiárida argentina, de mediana a alta palatabilidad, perenne y es considerada un recurso forrajero del pastizal natural, tolerante a la sequía y a bajos niveles de salinidad (Cavagnaro *et al.*, 2007). Como toda especie del semiárido, el riego incrementa el número y la tasa de germinación de las semillas (Ordóñez *et al.*, 2003).

Este trabajo tuvo como objetivo investigar la tolerancia a diferentes temperaturas y combinaciones de temperatura y estrés osmótico en dos especies, una oriunda de Sudáfrica y otra de Argentina, ambas adaptadas a ambientes en los que predominan climas con altas temperaturas y suelos con bajos contenidos de humedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron semillas de las especies *D. eriantha* cv. Sudafricana y *T. crinita* cosechadas en el campo.

Tratamientos y diseño

Se aplicaron los siguientes tratamientos: **A-** 17, 25, 30 y 35°C en agua destilada estéril; **B-** 17, 25 y 35°C en solución de polietilenglicol (PEG 6000) con potenciales osmóticos de -0,5; -1 y -1,5 Mpa y agua estéril como testigo (tabla 2.1). Se colocaron 100 semillas en cinco cápsulas de Petri (20 semillas por cápsula) en un diseño completamente aleatorizado con cinco repeticiones.

Procedimiento

Previamente al inicio del estudio las semillas se seleccionaron, de acuerdo con la uniformidad de tamaño y las características externas, y se descartaron aquellas con alteraciones y malformaciones. Las semillas fueron esterilizadas superficialmente por inmersión en alcohol al 70% y con hipoclorito de sodio al 20% durante 5 y 30 min, respectivamente, y fueron enjuagadas con agua destilada estéril. Después se prepararon cápsulas de Petri de 10 cm de diámetro con papel de filtro (ambos previamente esterilizados) embebido con 5 ml de agua destilada estéril.

Tabla 2.1: Protocolo de preparación de soluciones de PEG 6000 para distintas temperaturas y potenciales osmóticos.

Presión osmótica	[PEG 6000] (g/L)	Volumen de agua final (mL)	Peso PEG 6000 (g)
Temperatura 17°C			
0 Mpa	0	260	0
-0,5 Mpa	187,317	260	48,70
-1,0 Mpa	277,449	260	72,14
-1,5 Mpa	346,868	260	90,18
Temperatura 25°C			
0 Mpa	0	260	0
-0,5 Mpa	202,130	260	52,15
-1,0 Mpa	295,713	260	76,88
-1,5 Mpa	367,667	260	95,59
Temperatura 35°C			
0 Mpa	0	260	0
-0,5 Mpa	224,065	260	58,26
-1,0 Mpa	322,327	260	83,81
-1,5 Mpa	397,764	260	103,42

La germinación se hizo en cámara de cultivo en oscuridad y se agregó semanalmente 5 mL de agua destilada estéril en los tratamientos A y B, y 5 mL de solución de PEG en B. Las semillas se consideraron germinadas cuando emergió la radícula.

Mediciones y Análisi estadístico

Se midió el porcentaje de germinación (PG) a los 3, 7 y 14 días para el tratamiento A y a los 14 días para el B. Los datos de germinación se analizaron usando ANOVA y las medias se compararon con LSD (Least significant difference) para $P < 0,05$.

RESULTADOS

Germinación a diferentes temperaturas

En la tabla 2.2 se observan los porcentajes de germinación de *D. eriantha* T. crinita a 17, 25, 30 y 35°C de temperatura a los 3, 7 y 14 días posteriores a la siembra.

Tabla 2.2: Germinación en semillas de *Digitaria eriantha* subesp. eriantha cv Sudafricana y *Trichloris crinita* (%).

Especie	Día	Temperatura			
		17°C	25°C	30°C	35°C
<i>Digitaria eriantha</i>	3	3 ± 2,7 ^a	27 ± 5,7 ^b	27 ± 10,2 ^b	16 ± 4,2 ^b
	7	10 ± 5,0 ^a	28 ± 10,4 ^b	28 ± 7,6 ^b	20 ± 6,1 ^{ab}
	14	16 ± 4,2 ^a	29 ± 11,4 ^b	30 ± 5,0 ^b	20 ± 6,1 ^{ab}

a, b, c Valores en una misma fila con superíndices no comunes difieren a $P < 0,05$ (Digiambatista *et al.*, 2010)

En *D. eriantha* a los tres días, en el tratamiento con la temperatura más baja (17°C) se observó el menor porcentaje de germinación, con diferencias significativas respecto a las otras tres temperaturas, entre las cuales no hubo diferencias. A los siete días el PG mostró sus valores máximos a 25 y 30°C de temperatura, con diferencias significativas respecto al PG a 17°C. A los 14 días se mantuvo la relación observada a los siete días. El tratamiento de 17°C tuvo el mayor incremento en el PG respecto al observado en los días 3 y 7. En *T. crinita* a los tres días posteriores a la siembra, los PG a 25 y 30°C mostraron diferencias significativas con respecto a las temperaturas mínima y máxima, y el PG a 35°C difirió del alcanzado con 17°C (tabla 2.2). A los siete días se obtuvieron los máximos valores de PG a 25 y 30°C, que superaron el 90% y mostraron diferencias significativas respecto a 17 (75%) y 35°C (68%), temperaturas entre las cuales también existió diferencia significativa (tabla 2.2). A los 14 días después de la siembra, a 35°C el PG fue significativamente menor que en los otros tres tratamientos (tabla 2.2).

Germinación en condiciones de estrés osmótico

Con el objetivo de observar la tolerancia de las semillas a dos condiciones de estrés, se realizaron diferentes combinaciones entre las temperaturas y los potenciales osmóticos (PO).

A 17°C el efecto del PO en el PG de *T. crinita* se manifestó a -1,0 Mpa, donde descendió en forma altamente significativa (5%) respecto al control (80%), y a -1,5 Mpa las semillas no germinaron. En *D. eriantha* el PG disminuyó significativamente a potenciales de -0,5 y -1,5 Mpa (figura 2.1).

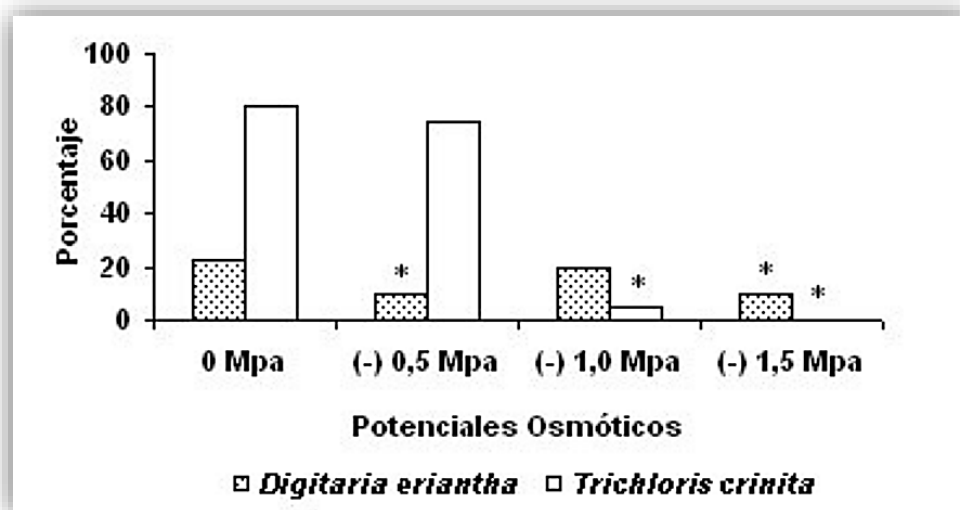


Fig. 2.1: Porcentaje de germinación en semillas de *Digitaria eriantha* subesp. *Eriantha* cv. Sudafricana y *Trichloris crinita* a 14 días de la siembra, bajo condiciones de estrés osmótico y 17°C de temperatura (Digiambatista *et al.*, 2010)

A 25 °C el efecto del PO en el PG de *T. crinita* se manifestó a -1,0 y a -1,5 Mpa, donde descendió en forma altamente significativa respecto al control. En *D. erianthael* PG disminuyó significativamente a potenciales de -1,0 y -1,5 Mpa de igual modo que *Trichloris crinita* pero con valores inferiores en todos los casos (Figura 2.2)

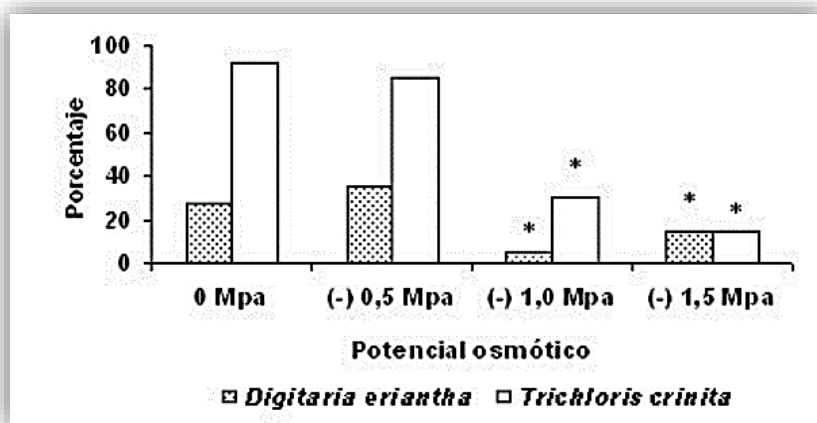


Fig. 2.2: Porcentaje de germinación en semillas de *Digitariaerianthasubesp. eriantha* cv. Sudafricana y *Trichloris crinita* a 14 días de la siembra, bajo condiciones de estrés osmótico y 25°C de temperatura (Digiambatista *et al.*, 2010)

A 35 °C el efecto del PO en el PG de *T. crinita* se manifestó a -1,0 Mpa donde descendió en forma altamente significativa respecto al control igual que a 25 °C. A 1,5 Mpa no existió germinación. A 35 °C el PG de *D. erianthase* manifestó a -0,5 Mpa incrementando significativamente el PG y a -1,5 Mpa no existió germinación. (Figura 2.3).

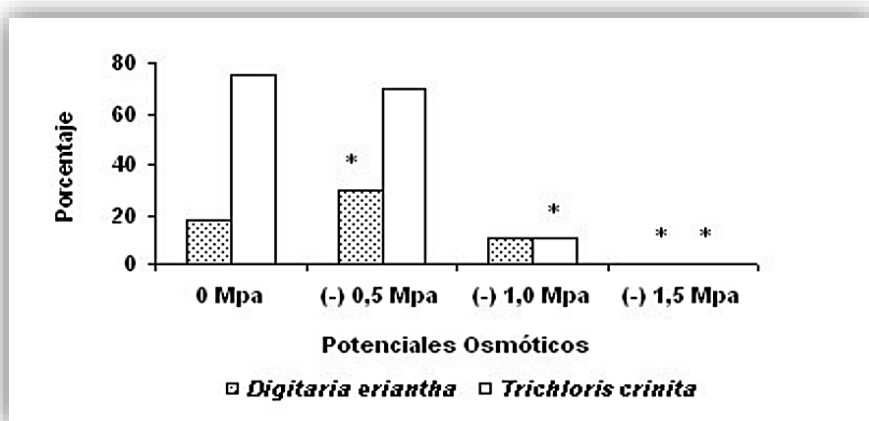


Fig.2.3: Porcentaje de germinación en semillas de *Digitariaerianthasubesp. Eriantha* cv. Sudafricana a 14 días de la siembra, bajo condiciones de estrés osmótico y 35°C de temperatura (Digiambatista *et al.*, 2010).

DISCUSIÓN

La temperatura es uno de los factores más importantes que regulan el proceso de germinación. Los resultados del presente trabajo mostraron incrementos en el PG a medida que esta se incrementó; sin embargo, cuando superó los 30°C el PG disminuyó. Ello evidenció que el rango óptimo para ambas especies fue entre 25 y 30°C. No obstante, Greco *et al.* (2002) determinaron que el mayor porcentaje en *T. crinita* (90-100%) ocurrió entre 25 y 35°C y la máxima velocidad de germinación entre 30 y 35°C, y dedujeron que existe una correlación entre la germinación y la temperatura del suelo. Esto puede estar asociado a las temperaturas típicas de la época estival, que coincide con el momento del año en el que se concentran las precipitaciones en las zonas donde vegetan ambas especies. En estudios realizados en otras especies se concluyó que las temperaturas óptimas para la germinación, obtenidas mediante trabajos en laboratorio, responden a un determinado patrón que ha sido interpretado como un comportamiento de valor adaptativo al clima regional (Funes *et al.*, 2009; Chiloet *al.*, 2009).

Al mismo tiempo, el PG en el rango óptimo de temperatura fue alto a partir del tercer día posterior a la siembra y mostraron poco incremento con el transcurso del tiempo. Sin embargo, a valores extremos de 17 y 35°C las semillas germinaron más lentamente, por lo que se observaron incrementos en el PG incluso después de 14 días, lo que sugiere que estas afectaron el PG a los tres, siete y 14 días, en ambas especies.

Estos resultados difieren de los encontrados en *D. erianthacv.* Avanzada INTA, en la cual las semillas germinaron de forma similar desde 10 hasta 35°C (Terenti, 2004; Pedranzani *et al.*, 2005). Por otra parte, el bajo contenido de humedad edáfica es otro de los factores ambientales que afectan el porcentaje y el tiempo de germinación (Brown, 1995). El descenso del potencial osmótico producido por el PEG 6000, provoca una reducción en la viabilidad y el vigor de las semillas (Fanti y Pérez, 2004). En *D. erianthacv.* Sudafricana los descensos más importantes se observaron en la combinación de -0,5 Mpa a 17°C y en -1,5 Mpa a 35°C. La PO de -1 Mpa no afectó el PG a las temperaturas extremas, pero con 30°C (óptima de germinación de la especie) afectó la germinación.

En *T. crinita* el PO -0,5 Mpa no afectó significativamente la germinación en ninguna de las temperaturas evaluadas. Sin embargo, los potenciales menores redujeron significativamente el PG, lo que coincide con lo observado en semillas de trigo (González *et al.*, 2005) y de *Bulnesia retama* (Rodríguez Rivera *et al.*, 2007); además con PO de -1,5 Mpa las semillas no germinaron con las temperaturas extremas (17 y 35°C). En *StipaneaeiyLeymuserianthusse* han encontrado respuestas similares, es decir, que las temperaturas extremas y los altos PO inhibieron la germinación (Bonvissuto y Busso, 2007).

De acuerdo con los resultados se concluye que las temperaturas de 25 a 30 °C fueron las óptimas para *T. crinita* y *D. eriantha*, en las que se alcanzaron los máximos valores de PG con bajos potenciales osmóticos. A temperatura de 25°C ambas especies toleraron hasta -0,5 Mpa de PO y disminuyeron significativamente su PG a -1,0 Mpa y a -1,5 Mpa y a 30 °C con potenciales altos de 1,5 Mpa de PO ninguna de las dos especies germina.

Agradecimientos

Al Proyecto Consolidado PROICO N° 50110 de la SECYT, Facultad de Ingeniería y Ciencias Económicas y Sociales, Universidad Nacional de San Luis, Argentina.

BIBLIOGRAFIA

Almansouri M, Kinet JM, Lutts S. 2001. Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant and Soil*. 231:243.

Bonvissuto GL, Busso CA. 2007. Germination of grasses and shrubs under various water stress and temperature conditions. *Revista Internacional de Botánica Experimental Phytol*. 76:119.

Brown R. 1995. The water relations of range plants: adaptations to water deficits. In: *Wildland plants: physiological ecology and developmental morphology*. (Eds. D.J. Bedunah and R.E. Sosebee). Society for Range Management. Denver, Colorado, USA. p. 291.

Cavagnaro JB, Trione SO. 2007. Physiological, morphological, and biochemical responses to shade of *Trichloriscrinita*, a foragegrass from the arid zone of Argentina. *J. Arid Environ*. 68: 337-347.

Chilo G, Vacca Molina M, Carabajal R, Ochoa M. 2009. Efecto de la temperatura y salinidad sobre la germinación y crecimiento de plántulas de dos variedades de *Chenopodium quinoa*. *Agriscientia*. 26 (1):15.

Cornaglia PS, Schrauf GF, Nardi M, Deregibus A. 2005. Emergence of dallisgrass as affected by soil water availability. *Rangeland Ecology & Management*. 58 (1):35.

Demir I, Mavi K, Ozcoban M, Okcu G. 2013. Effect of salt stress on germination and seedling growth in serially harvested aubergine (*Solanum melongena* L.) seeds during development. *Israel J. Plant Sci*. 51:125.

Demir I, Mavi K. 2008. Effect of salt and osmotic stresses on the germination of pepper seeds of different maturation stages. *Braz. Arch. Biol. Technol*. 51 (5):897.

Digiambatista GA, Garbero M, Ruiz OM, Giulietti A, Pedranzani H. 2010.

Germination of *Trichloris crinita* and *Digitaria eriantha* in abiotic stress conditions. *Revista Pastos y Forrajes*, 33: (4):1-9.

FantiSC, Pérez JG. 2004. Processo germinativo de sementes de paineirasobestresses hídrico e salino. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 39 (9):903.

Foolad MR, Lin GY. 1997. Genetic potential for salt tolerance during germination in *Lycopersicon* species. *Hortscience*. 32:296.

Funes G, Díaz SM, Venier MP. 2009. La temperatura como principal determinante de la germinación en especies del Chaco seco de Argentina. *Ecología Austral*. 19:129.

G Di Giambatista, M Garbero, M Ruiz, A Giuliotti y H Pedranzani. 2010. Germination of *Trichloris crinita* and *Digitaria eriantha* under abiotic stress conditions. *Revista Pastos y Forrajes*. ISSN 0864-0394. N° 4. Vol. 33: 1-9.

Gill PK, Sharma AD, Singh P, Bhullar SS. 2003. Changes in germination growth and soluble sugar contents of *Sorghum bicolor* (L.) Moench seeds under various abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*. 40:157.

González LM, Argente L, Zaldívar N, Ramírez R. 2005. Efecto de la sequía simulada con PEG-6000 sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas de dos variedades de trigo. *Cultivos Tropicales*. 26 (4):49.

Grecco SA, Cavagnaro JB. 2002. Effects of drought in biomass production and allocation in three varieties of *Trichloris crinita* P. (Poaceae) a forage grass from the arid Monte region of Argentina. *Plant Ecol*. 164: 125-135.

Khajeh-Hosseini M, Powell AA, Bingham IJ. 2003. The interaction between salinity stress and seed vigour during germination of soybean seeds. *Seed Sci. & Technol*. 31:715.

Murillo-Amador B, López-Aguilar R, Kaya C, Larriñaga-Mayoral J, Flores-Hernández, A. 2002. Comparative effects of NaCl and polyethylene glycol on germination, emergence and seedling growth of cowpea. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 188:235.

Ordóñez GP *et al*. 2003. Efecto de la temperatura sobre la germinación de dos especies de pastura *Digitaria eriantha* y *Trichloris crinita*. XXIX Jornadas Argentinas de Botánica & XV Reunión Anual de la Sociedad Botánica de Chile. San Luis, Argentina. p. 189.

Pedranzani HE, Ruiz OM, Garbero M, Terenti OA. 2005. Efecto de baja temperatura sobre distintos parámetros de producción en *Digitaria eriantha* cv. Mejorada INTA. *Phyton*. 54:121.

Rimieri P. 1997. Creación de cultivares mejorados e identificables de *Poa ligularis* y *Digitaria eriantha*. Informe técnico de proyectos (Área de Producción Animal). INTA, EEA San Luis, Argentina. p. 183.

Rodríguez Rivera MF, Sosa LR, Fernández EA, Reale MI, Villarreal V. 2007. Efecto del estrés hídrico a distintas temperaturas sobre la germinación de semillas de *Bulnesia*

retama (Gill. ex. Hook.) Griseb. —Zigofiláceas— en San Luis, Argentina. *Revista Internacional de Botánica Experimental Phyton*. 76:5.

Sadeghian SY, Yavari N. 2004. Effect of water-deficit stress on germination and early seedling growth in sugar beet. *J. of Agronomy&CropScience*. 190 (2):138.

Terenti, OA. 2004. Evolución del crecimiento y la calidad de la semilla en *Digitariaeriantha*. *Pastos y Forrajes*. 27 (1):21.

Wilson DR, Jamieson PD, Hanson R, Jermyn WA. 1985. Models of growth and water use of field pea (*Pisum sativum*L.). In: The Pea crop. (Eds. P.D. Hebblethwaite, M.C. Heath and T.C.K. Dawkins). Butterworths, London, UK. p. 139.

CAPITULO 3

Efecto del frío y la aclimatación en la producción de *Digitaria eriantha* cv. Mejorada INTA.

Olga Marcela RUIZ, Marisa GARBERO, Hilda PEDRANZANI.

Resumen

Digitariaeriantha es una especie megatérmica, componente natural del pastizal de Sudáfrica introducida en el año 1991 en la región central semiárida templada de Argentina. Representa un importante recurso forrajero con aproximadamente 100.000 ha de producción al año. El rebrote primaveral se inicia con el aumento de la temperatura ambiental y generalmente es afectado por las heladas tempranas y tardías de -3 a -5° C. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de las bajas temperaturas en el estado de plántula en las variables de producción. Se sembraron semillas en sustrato de tierra/vermiculita 1:1, fueron mantenidas a temperatura de 25° C, con aplicación de riego semanal y fotoperiodo 16 hs luz 8 hs oscuridad por treinta días. A partir de este momento (día 0) se realizaron los tratamientos con frío sometiendo las plántulas a 4° C durante 48 hs en la primera semana, durante un lapso de 96 hs a igual temperatura y en las mismas plantas en la tercera semana. Se evaluó peso seco en planta entera, raíz y follaje, longitud foliar y radical, semanalmente, durante un mes. El análisis estadístico de los resultados se realizó por el procedimiento GLD (General Lineal Model) de SAS (Statistical Analysis System), utilizando contraste de medias con Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($PS \leq 0,05$).

Palabras claves: baja temperatura, *Digitaria eriantha*, longitud foliar, longitud radical, peso seco.

Abstract

Digitaria eriantha is subtropical specie; a component of natural range in Southafrica. It was introduced in 1991, in the central semi-arid region of Argentine. It represents an important forage source, with approximately 100.000 ha under production. Spring bloom is favor by increasing temperatures and can be affected by late or early frost of -3 to -5°C. The objective of this work was to evaluate the effects on different yield parameters of low temperature during seedling state. Sced were sown in earth/vermiculite (1:1) substrate, incubated during 30 days with 16:8 (light: darknes), photoperiod at 25 °C and received 48 h, 4 °C cold treatment and 96 hours, 4 °C cold treatment two weeks later. After, these plants were kept at 25 °C, while whole plant, root and foliage dry matter and radical and foliage length was weekly sampled for a 30-day period. The test of Duncan's multiple range ($p \leq 0.05$), from the GLM of SAS was runned on the results which show a statistically significant decreased of whole plant and foliage DM r production during the first two weeks after cold treatment, while roots showed decrease DM production on the 3^{er} week after treatment.

Key words: *Digitaria eriantha*, dry weight, foliate longitude, low temperature, radical longitude.

INTRODUCCION

El estrés abiótico (altas y bajas temperaturas) limita de una forma u otra la producción agrícola. Las plantas exhiben una tasa máxima de crecimiento y desarrollo a una temperatura óptima o a un rango diurno de temperatura (Fiher y Hay, 1981). La aclimatación y tolerancia al frío implica una serie de procesos biológicos, moleculares y metabólicos (Tomashow, 1999; Larkindale *et al.*, 2005; Kotak *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007). La exposición de las plantas a la temperatura conduce a cambios en el metabolismo celular y ese estrés cambia la estructura, las propiedades catalíticas, la función de las enzimas y los transportadores de metabolitos de membrana (Kubien *et al.*, 2003). Los metabolitos que responden al estrés incluyen azúcares solubles, aminoácidos, poliaminas y lípidos (Levitt, 1972; Guy, 1990; Nayyar *et al.* 2005; Farooq *et al.* 2009). Las plantas expuestas al estrés por frío presentan diversos síntomas fenotípicos en la etapa de crecimiento como: fallas en la germinación, plántulas atrofiadas, expansión de las hojas, marchitez y clorosis que puede conducir a necrosis; en la etapa reproductiva produce esterilidad del polen que se cree es uno de los factores claves responsables de la reducción del rendimiento de grano de los cultivos (Suzuki *et al.*, 2008). En plantas de arroz expuestas al frío se afecta gravemente el desarrollo reproductivo en la época de antesis conduciendo a la esterilidad de las flores (Jiang *et al.*, 2002).

El mayor efecto adverso del frío en los vegetales se da por daño en la membrana plasmática (Steponkus, 1984; Steponkus *et al.*, 1993) conduciendo a la pérdida de la integridad de la membrana reduciendo la naturaleza fluidica de la membrana celular y aumentando su rigidez, siendo la membrana el sitio de percepción del cambio de temperatura (Sangwan *et al.* 2002; Uemura *et al.* 2006; Vaultier *et al.* 2006; Wang *et al.*, 2006) y se desencadena una serie de vías de señalización que incluye mensajeros secundarios que promueven la producción de proteínas sensibles al frío (Rajashekar, 2000). Se ha demostrado que la rigidez de la membrana plasmática durante la exposición al frío induce genes sensibles al frío que ayudan a la aclimatación en alfalfa y *Brassicanapus* (Orvar *et al.*, 2000; Sangwan *et al.*, 2001). Los órganos vegetales difieren en su nivel de tolerancia, normalmente las raíces son mucho más sensibles que la corona (Mc Kersie y Leshem, 1994), lo cual es comprensible dado que la corona es el sitio del meristema principal responsable de la producción de nuevas raíces y brotes en el final del periodo frío.

Digitaria eriantha se considera una especie mega térmica, componente natural del pastizal de Sudáfrica. Ha sido definida como una especie perenne estival, que vegeta desde mediados de setiembre hasta las primeras heladas y florece a partir demediados de diciembre (Veneciano *et al.* 1998). El rebrote primaveral se inicia con el aumento de la

temperatura ambiental y generalmente es afectado por las heladas tempranas y tardías de -3 a -5°C.

La baja tolerancia a las heladas tempranas y tardías, se considera como una de las principales debilidades de la especie, debido a lo cual se considera importante identificar las variables morfofisiológicas y de crecimiento que se ven modificadas por efecto del estrés. Se ha observado que el peso fresco de planta entera, de follaje y de raíces se vieron afectadas por efecto del estrés por frío, y se ha demostrado el efecto del frío tanto en el crecimiento como en el contenido de agua de raíces (Ruiz *et al.* 2003).

La sequía y las heladas son consideradas condiciones ambientales que causan efectos adversos en el crecimiento de las plantas y en la productividad de los granos, por lo cual se han estudiado las respuestas de las plantas tanto a niveles molecular, celular como fisiológico y ya se han descrito una gama de genes relacionados con respuesta al estrés y variados productos metabólicos sintetizados como consecuencia del mismo. (Thomashow, 1994; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996).

MATERIALES Y METODOS

Se sembraron 8 terrinas al voleo conteniendo cada una de ellas 100 semillas de *Digitaria eriantha* cv. Mejorada INTA con un sustrato de tierra/vermiculita 1:1, mantenidas a una temperatura de 25 °C y con aplicación de riego semanal y fotoperiodo 16 hs luz 8 hs oscuridad, durante treinta días, a partir de este momento se realizaron los tratamientos. Las plántulas de 15 cm fueron extraídas para su medición y procesamiento, en cada una de las muestras se evaluó peso seco (PS), secado en estufa a 60 °C hasta peso constante, en planta entera, raíz y follaje, y longitud foliar y radicular, semanalmente durante un mes. Cada muestra estuvo representada por 10 plantas y un total de 4 repeticiones.

La primera sección de frío se llevó a cabo durante la primera semana y consistió en someter a las plantas a una temperatura de 4 °C durante 48 hs. La segunda sección de frío se efectuó en la tercera semana, durante un lapso de 96 hs, a igual temperatura y en las mismas plantas.

Se compararon las medias de la longitud foliar, radicular, PS y Porcentaje de Materia Seca (PMS). El análisis estadístico de los resultados se realizó por el procedimiento GLD (General Linear Model) de SAS (Statistical Analysis System) utilizando contraste de medias con Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSION

Se observaron diferencias significativas en la longitud foliar entre plantas control y tratadas en la 1° y 2° semana (Tabla 3.1), evidenciándose el efecto negativo de las 48hs de frío, y por el contrario no se vio afectada por 96 horas de bajas temperaturas.

En cambio, la longitud radicular se vio afectada después de la acumulación de los dos tiempos de frío (48+96 hs), ya que la primera sección de baja temperatura no afectó a dicha variable. La primera sección de baja temperatura afectó significativamente al peso seco de follaje y raíz durante las dos primeras semanas. El segundo tratamiento de frío no disminuyó significativamente al peso seco del follaje, mientras que si modificó negativamente el peso seco radical durante la tercera semana. No obstante, en la cuarta y quinta semana no se detectaron diferencias significativas en el peso seco radicular (Tabla 3.2).

Tabla 3.1: Longitud foliar y radicular de *Digitaria eriantha* cv. Mejorada INTA durante cinco semanas con dos tiempos de tratamiento con bajas temperaturas (48 y 96 hs a 4 °C)

Longitud (mm)	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Foliar	12,25 a	5,75 b	14,50 a	12,00 b	16,80 a	16,50 a	18,50 a	22,50 a	18,50 a	20,00 a
Radical	7,50 a	7,00 a	7,00 a	6,80 a	8,50 a	7,50 a	7,50 a	9,50 b	8,00 a	9,30 a

Medias con la misma letra para la misma fila, indica que no hay diferencia significativa. Test de rangos múltiples de Duncan ($\leq 0,05$). I: Control - II: Tratado con bajas temperaturas (Pedranzani *et al.*, 2005).

Tabla 3.2: Peso seco de planta entera, follaje y raíces de *Digitaria eriantha* durante cinco semanas con dos tiempos de bajas temperaturas (48 y 96 hs a 4 °C)

Peso Seco	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Planta Entera	0,160 a	0,021 b	0,290 a	0,100 b	0,300 a	0,160 a	0,440 a	0,270 a	0,450 a	0,500 a
Follaje	0,133 a	0,023 b	0,250 a	0,070 b	0,250 a	0,140 a	0,360 a	0,220 a	0,360 a	0,410 a
Raíz	0,030 a	0,010 b	0,055 a	0,025 b	0,050 a	0,020 b	0,090 a	0,050 a	0,100 a	0,090 a

Medias con la misma letra para la misma fila, indica que no hay diferencia significativa, para $p \leq 0,05$. Test de rangos múltiples de Duncan I: Control - II: Tratado con bajas temperaturas (Pedranzani *et al.*, 2005).

Tabla 3.3: Variación del (%MS) porcentaje de materia seca de *Digitaria eriantha* durante 5 semanas con dos tiempos de tratamiento (48 y 96 hs a 4 °C).

% Materia Seca	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Follaje	17,33 a	10,86 b	22,79 a	16,68 b	24,00 a	19,85 b	36,79 a	23,19 b	39,32 a	28,93 b
Raíz	43,33 a	25,27 b	50,00 a	25,00 b	41,80 a	27,86 b	64,20 a	38,32 b	66,79 a	45,00 b

Medias con la misma letra para la misma fila, indica que no hay diferencia significativa. Test de rangos múltiples de Duncan ($\leq 0,05$). I: Control - II: Tratado con bajas temperaturas (Pedranzani *et al.*, 2005)

En la Tabla 3.3 la variación del (PMS) de follaje y de raíz durante las cinco semanas muestra diferencias significativas a favor del control, manteniendo el efecto negativo del estrés por frío durante todo el período de experimentación.

El crecimiento vegetativo de follaje y raíces de *Digitaria eriantha* ha sido afectado notoriamente por las bajas temperaturas. El follaje más expuesto al frío manifestó una caída en el crecimiento durante la exposición por 48 hs a 4°C y sus efectos se observaron durante las primeras dos semanas con diferencias significativas con respecto al control, recuperándose a partir de la tercera semana debido a un fortalecimiento evidente, de manera tal, que la segunda exposición al frío por más tiempo no afectó este parámetro. En cambio, en las raíces menos expuestas, se observó una disminución de crecimiento luego de acumularse 144 hs de frío a la cuarta semana, recuperándose posteriormente.

En la Tabla 4.2 se observa la respuesta de las plántulas de *Digitaria eriantha* en relación con la producción de materia, fotosíntesis y metabolismo representado por el parámetro peso seco. El metabolismo se vió afectado inmediatamente después del primer estímulo del frío, evidenciado con un decaimiento significativo en la producción de materia orgánica (peso seco) durante la primer y segunda semana; tanto en planta entera como en el follaje y persistió esta tendencia en la tercera semana para las raíces.

El parámetro más afectado por el efecto del frío fue el Porcentaje de Materia Seca (PMS) ya que la disminución en este parámetro fue mantenida a lo largo de las cinco semanas evaluadas, demostrando un efecto negativo en los valores de producción de materia seca disponible para sus consumidores herbívoros.

La variación en el % de metilación de ADN en el cv. Mejorada INTA presento diferencias significativas a las 24 y 48 hs de tratamiento a 10 °C de temperatura con respecto al control; desapareciendo dicha diferencia a las 72 hs, (2); si comparamos con los efectos en los parámetros medidos vemos que a las 48 hs de tratamiento a 4 °C se

observaron respuestas similares y también una paulatina recuperación a las 72 h y en adelante. Esta es una forma de respuesta al estrés común en variedades más tolerantes, ya que poseen los mecanismos de defensa para reaccionar en las primeras horas y luego retomar el metabolismo normal y comportarse como si el efecto del estrés hubiese desaparecido.

. BIBLIOGRAFIA

Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.* 29: 185-212.

Fitter AH, Hay RKM. 1981. *Environmental Physiology of Plants*, Academic Press, New York.

Guy CL 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant Phys.* 41: 187-223.

Jiang QW, Kiyoharu O, Ryozi I. 2002. Two novel mitogen-activated protein signalling components, OsMEK1 and OsMAP1, are involved in a moderate low-temperature signalling pathway in rice. *Plant Physiol.* 129: 1880-1891.

Kotak S, Larkindale J, Lee U, von Koskull-Doring P, Vierling E, Scarf KD. 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 310-316.

Kubien DS, von Caemmerer S, Furbank RT, Sage RF. 2003. C4 photosynthesis at low temperature. A study using transgenic plants with reduced amounts of rubisco. *Plant Physiol.* 132: 1577-1585.

Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E. 2005. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signalling pathways in the thermotolerance, *Plant Physiol.* 138: 882-888.

Levitt J. 1972. *Responses of Plants to Environmental Stresses*. Academic Press, New York.

Mc Kersie BD, Leshem YY. 1994. *Stress and stress coping in cultivated plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Nayyar H, Chander K, Kumar S, Bains T. 2005. Glycine betaine mitigates cold stress damage in Chickpea. *Agron. Sustain. Dev.* 25: 381-388.

Orvar BL, Sangwan V, Omann F, Dhindsa RS. 2000. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* 23: 785-794.

Pedranzani H., M. Ruiz, M. Garbero, O. Terenti. 2005. Efectos del frío sobre los parámetros de producción de *Digitaria eriantha* *International Journal of Experimental Botany*. *Fyton* (2005):211-216.

- Rajashekar CB. 2000. Cold response and freezing tolerance in plants. In: Wilkinson RE (Ed.), Plant-environment interactions, 2nd edition. Marcel Dekker, Inc., New York, USA: pp 321-341.
- Ruiz M, Garbero M, Guzmán L, Pedranzani H. 2003. Parameter of production in *Digitaria eriantha* under cold stress. Biocell 27 (2): 274. ISSN 0327-9545 (print) ISSN667-5746 (electronic).
- Sangwan V, Foulds I, Singh J, Dhindsa RS. 2001. Cold-activation of *Brassica napus*BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx. Plant J. 27: 1-12.
- Sangwan V, Orvar BL, Dhindsa RS. 2002. Early events during low temperature signaling. In: Li C., Palva E.T. (Eds.), Plant cold hardiness. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands: pp. 43-53.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 1996. Molecular responses to drought and cold stress. Current Opinions in Biotechnology 7, 161-167.
- Statistical Analysis System. 1988. SAS/ STAT (Statistical Analysis System). User's Guide, Release 6.03 Edition.
- Suzuki K, Nagasuga K, Okada M. 2008. The chilling injury induced by high root temperature in the leaves of rice seedlings. Plant Cell Physiol. 49: 433-442.
- Thomashow MF. 1994. *Arabidopsis thaliana* as a model for studying mechanisms of plant cold tolerance in Arabidopsis. Meyrowitz E. and Somerville C (Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 807-834.
- Tomashow MF. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms, Annu. Rev. Plant Phys. 50, 571-599.
- Umeura M, Tominaga Y, Nakagawara C, Shigematsu S, Minami A, Kawamura Y. 2006. Responses of the plasma membrane to low temperatures. Physiologia Plantarum. 126: 81-89.
- Vaultier MN, Cantre C, Vergnolle C, Justin AM, Demandre C, Benhassaine-Kesri G, Cicek D, Zachowski A, Ruelland E. 2006. Desaturase mutants reveal that membrane rigification acts as a cold perception mechanism upstream of the diacylglycerol kinase pathway in *Arabidopsis* cells. FEBS Letters. 580: 4218-4223.
- Veneciano JH, Terenti OA, Del Castello ER. 1998. Variación estacional de rendimientos y calidad de *Digitaria eriantha*, con y sin fertilización. Inf. Técnica n° 146. E.E.A. SanLuis (INTA): 29 pp.
- Wang X, Li W, Welti R. 2006. Profiling lipid changes in plant response to low temperatures. Physiologia Plantarum, 126: 90-96.

Zhu J, Dong CH, Zhu JK. 2007. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 290-295.

CAPITULO 4

Respuestas hormonales y del sistema antioxidante frente al frío en

Digitaria eriantha.

Marisa GARBERO, Verónica PEREZ CHACA, Hilda PEDRANZANI.

Resumen

Los dos cultivares de *Digitariaeriantha* cv. Sudafricana (cultivar sensible al frío) y cv. Mejorada INTA (cultivar resistente al frío) se expusieron a diferentes periodos a baja temperatura y evaluaron varios parámetros. El estrés por frío causó un aumento mayor de ABA en el cv. Mejorada INTA que en el cv. Sudafricana. En ambos cultivares, el ABA glucosil éster y el ácido dihidrofaseico fueron los catabolitos más abundantes. El tratamiento con frío disminuyó el ácido jasmónico (JA) en las hojas de ambos cultivares. En el cv. Sudafricana, 12-hidroxi-jasmónico (12-OH-JA) disminuyó y se elevó el ácido 12-oxo-fitodienoico. En cuanto a la defensa antioxidante, ambos cultivares aumentaron los tioles no proteicos en respuesta al estrés por frío. Sin embargo, el nivel de glutatión reducido (GSH) fue mayor en las hojas de cv. Mejorada INTA que cv. Sudafricana. En las hojas del cv. Sudafricanas tratadas con frío aumentaron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), pero en el cv. Mejorada INTA mostraron un mayor incremento. La actividad de la enzima superóxido dismutasa disminuyó y la actividad de ascorbato peroxidasa aumentó en hojas tratadas con frío en el cv. Sudafricana. No se observó un cambio significativo de estas enzimas para cv. Mejorada INTA. La tolerancia al frío de cv. Mejorada INTA podría relacionarse con altos niveles basales de JA, 12-OH-JA y GSH, el aumento de ABA y la estabilidad de TBARS después del tratamiento con frío.

Palabras claves: Ácido abscísico. Defensa antioxidante. Estrés por frío. Jasmonatos

Abstract

The two cultivars of *Digitariaeriantha*: cv. Sudafricana (a cold-sensitive cultivar) and cv. Mejorada INTA (a cold-resistant cultivar) were exposed to low temperatura and many parameters were evaluated. Cold stress caused a greater ABA increase in cv. Mejorada INTA than in cv. Sudafricana. In both cultivars abscisic acid glucose ester and dihydrophaseic acid were the most abundant catabolites. Cold treatment decreased JA in leaves of both cultivars. In cv. Sudafricana, 12-hydroxyjasmonate (12-OH-JA) decreased and 12-oxophytodienoic acid increased. In regard to antioxidant defense, both cultivars increased the non-protein thiols in response to cold stress. However, reduced glutathione (GSH) level was higher in leaves of cv. Mejorada INTA than cv. Sudafricana. Cold-treated leaves of cv. Sudafricana increased thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), but cv. Mejorada INTA leaves showed no such increase. Superoxide dismutase activity decreased and ascorbate peroxidase activity increased in cold-treated leaves of cv. Sudafricana. No significant change of these enzymes was observed for cv. Mejorada INTA. The cold tolerance of cv. Mejorada INTA could be related to JA, 12-OH-JA and GSH high basal contents, ABA increase, and TBARS stability after cold treatment.

Keywords: Absciscic acid, Antioxidant defense, Jasmonates Low temperature.

INTRODUCCIÓN

Para ampliar las áreas sembradas con *D. eriantha* en Argentina, es necesario mejorar su tolerancia al estrés ambiental, como el frío, la sequía y la salinidad. La elucidación de sus respuestas bioquímicas y fisiológicas a condiciones adversas nos ayudará a mejorar las características de esta especie para su crecimiento en hábitats semiáridos. Varias respuestas fisiológicas ocurren típicamente bajo estrés por frío, por ejemplo, niveles alterados de hormonas y actividades enzimáticas y tasas reducidas de respiración, crecimiento y desarrollo. El estrés reduce el crecimiento y el rendimiento de cualquier cultivo, incluso en tierras de regadío en todo el mundo.

Estudios realizados en *Digitariaeriantacv*. Mejorada INTA mostraron que esta variedad al ser sometida a baja temperatura (4 °C) durante 24 o 72 h aumentaba la materia seca en raíces y hojas como así también su longitud en comparación con el control (Garbero, 2010). El ácido abscísico (ABA) juega un papel esencial en la actuación frente a una amplia gama estresores, como bajas temperaturas, metales pesados, sequía, alta salinidad, y el estrés por radiación. (Zhu, 2016). A nivel celular, el daño estructural ocurre en las membranas, debido a los cambios en la fluidez de los ácidos grasos y al aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs). Las EROs (radical superóxido: $O_2^{\cdot-}$, peróxido de hidrógeno: H_2O_2 , y radical hidroxilo: $HO^{\cdot}$), son moléculas altamente activas que dañan las membranas provocando peroxidación lipídica, daño de proteínas y de ADN, particularmente en cloroplastos y mitocondrias (Bracale y Coraggio 2003). En las plantas, como en todos los organismos aeróbicos, las EROs son subproductos comunes formados por la inevitable fuga de electrones en O_2 de la actividad de transporte de electrones localizadas en cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y en las membranas plasmáticas o como consecuencia de varias vías metabólicas confinadas en diferentes loci celulares. Los estresores abióticos y bióticos conducen a una mayor generación de EROs debido a la interrupción de la homeostasis celular (Sainiet *al.*, 2018). No obstante, las EROs juegan un doble papel en las plantas; en bajas concentraciones, actúan como moléculas de señalización que facilitan varias respuestas en células vegetales, aumentando las defensas antioxidantes tanto enzimáticas como no enzimáticas. Por el contrario, en niveles altos causan daño a los constituyentes celulares que desencadenan el estrés oxidativo. En cualquier caso, pequeñas moléculas antioxidantes modulan la acción de estas especies ambivalentes. (Das y Roychoudhury, 2014). Según Saini, (2018) si los niveles de EROs son demasiado bajos o demasiado altos perjudican el crecimiento y desarrollo de las plantas, por lo que los niveles de EROs deben permanecer dentro del rango correcto para así promover la salud de las plantas. Las alteraciones en los niveles de EROs como parte de la función normal de la planta no deben exceder el límite umbral entre los potenciales redox y los niveles citotóxicos o citostáticos.

Entre las fitohormonas, el ácido abscísico (ABA) y el ácido jasmónico (JA) desempeñan un papel central en las respuestas al estrés. En plantas superiores ABA se deriva de carotenoides C₄₀. El precursor de ABA es la zeaxantina, que se convierte en xantoxina mediante una serie de etapas de isomerización y de epoxidación mediadas por enzimas y una reacción de dioxigenación final que escinde el compuesto del carotenoide C₄₀ (Nambara y Marion-Poll, 2005; Marion-Poll y Leung, 2006). El ABA se desactiva activando la oxidación en varias posiciones y por una "vía de conjugación" (Kushiro *et al.*, 2004; Nambara y Marion-Poll, 2005). Las vías de hidroxilación oxidan los grupos metilo (C-7', C-8' y C-9') de la estructura del anillo ABA. La hidroxilación en C-8', considerada la más común en el catabolismo de las plantas, produce 8'-hidroxi-ABA (8'-OH-ABA), que se isomeriza en ácido fáseico (PA). El PA se reduce posteriormente a ácido dihidrofaseico (DPA) y/o su análogo, ácido epi-dihidrofaseico (*epi*-DPA). ABA y 8'-hidroxi-ABA también se pueden conjugar como ésteres de glucosa (ABA-GE) o glucósidos, siendo ABA-GE la forma predominante según Cutler y Krochko (1999). Además, otros conjugados con los grupos hidroxilo de ABA y sus catabolitos hidroxilados han sido encontrados (Nambara y Marion-Poll, 2005). El nivel de ABA en un tejido particular está determinado por grados relativos de biosíntesis versus catabolismo (Nambara y Marion-Poll, 2005), pero también puede implicar la liberación de ABA a partir de su conjugado inactivo con glucosa por una β -glucosidasa (Lee *et al.*, 2006). El aumento del contenido de ABA endógeno y la inducción de su expresión génica, en respuesta al frío, la sequía y el estrés por salinidad, están bien documentados (Xiong *et al.*, 2002; Gusta *et al.*, 2005).

Jasmonatos (JA) se producen a partir de ácido linolénico a través de la formación de ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), una vía que consta de varios pasos enzimáticos. Diversos derivados de JA (éster metílico, conjugados de L-aminoácido, éster de glucosa, formas hidroxiladas) también se encuentran en plantas (Wasternack y Hause, 2002; Wasternack, 2007). Los JA son inducidos por ataques de patógenos o heridas, que típicamente conducen a la generación de EROs (Suhita *et al.*, 2004), y regulan una variedad de respuestas de desarrollo de la planta. En los últimos años se ha encontrado evidencia que apoya la idea de que JA puede desempeñar funciones relevantes en la respuesta al estrés abiótico (Kazan, 2015; Riemann *et al.*, 2015). Pospisilová (2003) reportó que los JAs desempeñan un papel en el estrés hídrico a través de los efectos sobre el cierre de los estomas regulados o potenciados por los jasmonatos. Asimismo, los efectos del metiljasmonato (MeJA) sobre cambios en las actividades de enzimas que capturan oxígeno y la composición lipídica de la membrana se estudiaron en hojas de fresa bajo estrés hídrico. MeJA redujo el aumento de la actividad peroxidasa y mantuvo altas las actividades de catalasa y superóxido dismutasa y el contenido de ácido ascórbico. Además, el tratamiento con MeJA redujo la transpiración y la peroxidación lipídica de

membranas, expresadas en contenido de malondialdehído (MDA) (Wang, 1999). En plantas de *Pinus pinaster* se ha encontrado que JA y OPDA actuarían en la señalización del estrés hídrico (Pedranzani *et al.*, 2007). Yoon *et al.* (2009) observaron que, en las plántulas de soja, la aplicación de MeJA contrarrestaba los efectos negativos del estrés de NaCl sobre el crecimiento de las plantas, el contenido de clorofila, la tasa de fotosíntesis de las hojas, la tasa de transpiración de las hojas y el contenido de prolina. Además, se demostró que los JAs aumentan la tolerancia a la congelación en *Bromus sp.* (Wilensky *et al.*, 1994). Las hormonas del estrés como ABA, JA, ácido salicílico y etileno interactúan directa o indirectamente con EROs y el aumento de la producción de EROs está funcionalmente acoplado a la acción de estas hormonas (Ahlfors *et al.*, 2004; Apel y Hirt 2004). Incrementos en las EROs asociados a bajas temperaturas han sido reportados en diversas especies como *Zea mays* L., *Cucumis sativus* L., *Panicum miliaceum* L., *Solanum tuberosum* L. (Lukatkin, 2002a), *Fragaria × ananassa* D. (Zhang *et al.*, 2008) y *Medicago sativa* L. (Wang *et al.*, 2009) entre otras. Para prevenir el daño de EROs, las plantas han desarrollado sistemas de defensa antioxidante enzimático y no enzimático. Las enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD) y ascorbato peroxidasa (APX) previenen el daño de EROs (Mittler, 2002; Menéndez-Benavente *et al.*, 2004). SOD cataliza la dismutación de radicales hidroxilos ($O_2^{\cdot-}$) en H_2O_2 y O_2 , protegiendo las células contra los efectos tóxicos de este radical el cual es producido en varios compartimentos celulares. APX, una enzima clave para la captura de H_2O_2 , se encuentra en citosol, cloroplastos y mitocondrias de plantas superiores. La actividad de las enzimas antioxidantes ha sido estudiada en plantas de alfalfa en relación a las bajas temperaturas. En esta especie se determinó que la sensibilidad al frío puede ser linealmente correlacionada con los bajos niveles de actividad de SOD, APX y catalasa (Wang *et al.*, 2009). Por otra parte, Lukatkin (2002b) sostiene que las plantas que presentan menor inactivación de las enzimas antioxidantes durante el periodo de bajas temperaturas son más resistentes al frío.

Las moléculas antioxidantes no enzimáticas incluyen glutatión (GSH) y tioles no proteicos (TNP) (del Río *et al.*, 2006). GSH, el antioxidante no enzimático más importante, controla el estado de reducción/oxidación (redox) en las células vegetales y su nivel es un indicador útil del estado redox. Los ácidos grasos linoleico y linolénico son particularmente sensibles al ataque de $O_2^{\cdot-}$ y OH (Mueller, 2004; Halliwell y Gutteridge, 2007), dando lugar tras su oxidación a hidroperóxidos de lípidos y aldehídos complejos como el 4 hidroxí-2-nonenal y el malondialdehído (MDA). El MDA generado puede dañar el ADN al conjugarse con una guanina, creando un anillo extra en su estructura (Jeon *et al.*, 2005). En relación a las bajas temperaturas, se han observado incrementos en el contenido de MDA en plantas tales como *Cucumis sativus* L. (Xue *et al.*, 2008),

Fragaria × *ananassa* D. (Zhang *et al.*, 2008) y *Vitisvinifera* (Maet *al.*, 2010). Además, Castelli *et al.* (2010) proponen que el daño oxidativo, particularmente MDA foliar es potencial indicador de la tolerancia a estrés salino.

El objetivo de nuestro estudio fue investigar las relaciones entre ABA y sus catabolitos, JA y componentes enzimáticos y no enzimáticos de la defensa antioxidante en dos cultivares de *D. eriantha* con diferentes sensibilidad al frío ante estrés por frío.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas y estrés frío

Digitariaeriantha cv. Sudafricana y cv. Mejorada INTA se cultivaron en macetas que contienen turba: vermiculita (4: 1), en una Cámara de crecimiento Conviron E15 (Conviron, Winnipeg, MB, Canadá) con 16 h de luz, $175 \mu\text{Em}^2 \text{s}^{-1}$; 25°C, 60% de humedad relativa; 8 h de oscuridad, 20°C, 60% de humedad relativa. El día 30 (Fig. 4.1), las plantas se sometieron a estrés por frío (4°C) durante un período de 6, 24 o 72 h. Se utilizó un diseño aleatorio simple con tres repeticiones, con plantas en el tiempo 0 como controles. Cada muestra consistió en diez plantas.



Fig. 4. 1: Plantas de *D. eriantha* cvs. Sudafricana (izquierda) y Mejorada INTA (derecha) con 30 días de crecimiento. (Foto: Hilda Pedranzani)

Cuantificación de ácido abscísico y metabolitos

Los extractos secos de las muestras conteniendo ABA y sus metabolitos se resuspendieron con 100 μ l de MeOH para la purificación y análisis mediante un cromatógrafo Alliance 2695 (Waters, Inc., California, USA) equipado con una bomba cuaternaria con autoinyector de muestra. Se utilizó una columna ResteckC18 (Resteck USA, 2.1 x 100 mm, 5 μ m) a 25°C, con un volumen de inyección de 10 μ l. La elución se llevó a cabo en gradiente con un sistema de solvente binario: 0.2% HOAc en H₂O (solvente B) / MeOH (solvente A) a una velocidad de flujo de 200 μ l min⁻¹, procediendo con las siguientes proporciones (v/v) de solvente A: (t (min), %A) : (0, 40), (25, 80). Al final de cada corrida se establecieron 7 min de equilibración del sistema y columna. La identificación y cuantificación de ABA y sus metabolitos se realizó mediante un espectrómetro de masa de doble cuadrupolo (Micromass Quattro Ultima PT, Manchester City, UK). Todos los análisis se realizaron utilizando la fuente de electrospray en modo de ionización negativo. La cuantificación se llevó a cabo por inyección de las muestras en modo SIR. La adquisición de datos por SIR se realizó por monitoreo de iones parentales para ABA, ²D₆-ABA, PA, ²H₃-PA, DPA, ²H₃-DPA y ABA-GE, ²H₅-ABA-GE respectivamente.

Cuantificación de jasmonatos

Un gramo de MF de hojas se homogeneizó en mortero con nitrógeno líquido y 10 ml de MeOH. A cada muestra se adicionaron: 100 ng de (²H₆) JA; 100 ng de (²H₅) OPDA; 100 ng de 12-(²H₃) O Ac-JA y 100 ng de 11-(²H₃) O Ac-JA, como estándares, se filtró para obtener el sobrenadante, el cual se evaporó a sequedad y redisolvió con 10 ml de metanol. Se adicionó a las columnas de DEAE-Sephadex A-25 (3 ml en 100% MeOH), previamente lavada con 5 ml de 1N AcOH en 100% MeOH, 10 ml de MeOH 100%; estas fracciones se descartaron. Luego se agregó la muestra a la columna, diluida en un volumen máximo de 10 ml de MeOH, y se eluyó con 3 ml de MeOH, 3 ml de 0,1 N AcOH en 100% MeOH; estas fracciones se descartaron. Se agregó 5 ml de 1N AcOH en 100% MeOH; esta última fracción, donde eluyen los compuestos ácidos como el JA, se recolectó y se llevó a sequedad en evaporador rotativo al vacío. Los extractos secos se disolvieron en MeOH y se analizaron por HPLC, utilizando una columna Eurospher 100, 5 μ m. La elución se realizó con una mezcla isocrática de MeOH: H₂O en 0,1% H₃PO₂ (60:40) a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹. UV: 200 nm. Se recolectaron las fracciones correspondientes a los respectivos tiempos de retención: 14 min, Rt de JA; 22.5 min, Rt de OPDA; 9.30 min, Rt de 11-OH-JA; 11 min, Rt de 12-OH-JA y se evaporaron a sequedad. Los extractos se resuspendieron en 200 μ l de CHCl₃/N, N-di-isopropil-etilamina (1:1 v/v) y se derivatizaron con 10 μ l de pentafluorobencilbromuro a 20°C durante una noche. Posteriormente se llevó a sequedad, se resuspendió con 7 ml de n-

hexano y se filtró por columna de Silica gel (SiOH; 500 mg) (Macherey- Nagel, Düren, Germany). Los pentafluorobencil ésteres se eluyeron con una mezcla de 7 ml de n-hexano/dietiléter (2:1 v/v). Se evaporaron a sequedad y el extracto se retomó con 100 µl de acetonitrilo y se inyectó en un GC-MS a fin de identificar y cuantificar los compuestos de interés.

Se utilizó un espectrómetro de masa Hewlett Packard (modelo 5970 B) combinado con un cromatógrafo de gases HP 5890. Las temperaturas programadas fueron las siguientes: desde 60°C (1 min) a 180°C (30°C min⁻¹); desde 180°C (1 min) a 200°C (10°C min⁻¹), desde 200°C (1 min) a 270°C (5°C min⁻¹). El espectro de masa se obtuvo a un voltaje de ionización de 70 eV.

Contenido de malondialdehído

La determinación de la peroxidación de los lípidos se realizó según Heathy Packer (1968). El contenido de malondialdehído (MDA) se midió a través de la reacción con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). 250 mg de tejido foliar fueron homogeneizados en 1,5 ml de TCA 0,1% (dilución 1:20) y centrifugados a 10.000 g durante 15 min. Los sobrenadantes se mezclaron con 1 ml de TBA 0,5% (en TCA 20%). Se llevaron a baño María a 95°C, durante 30 min y rápidamente se enfriaron en baño de hielo. Los homogenatos se centrifugaron a 10.000 g por 15 min y se leyó la absorbancia a 532 y 600 nm. El nivel de lipoperoxidación se expresó como nmol de MDA formado, usando un coeficiente de extinción de 155 mM⁻¹cm⁻¹.

Determinación de enzimas antioxidantes

Para la determinación de superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) se homogeneizaron 250 mg de hojas en 1,5 ml del buffer de extracción (50 mM de buffer fosfato (pH 7,4), 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 1 g de polivinilpirrolidona (PVP) y 0,5% (v/v) de Tritón X-100, en condiciones de frío. Los homogenatos se centrifugaron a 10.000 g por 20 min y el sobrenadante se utilizó para el análisis. La actividad de SOD se midió en espectrofotómetro, según Beyer y Fridovich (1987). En este estudio una unidad de SOD se define como la cantidad requerida para inhibir un 50% la fotoreducción de nitrobluetetrazolium. La actividad específica de SOD se calculó como unidades/mg de proteínas. Los resultados se expresaron en porcentaje del control. Para la estimación de la actividad de ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11) 300 mg de hojas se colocaron en 1,5 ml del medio homogeneizador (50 mM de buffer fosfato (pH 7,0), 0,1 mM de EDTA, 5 mM de ascorbato y 1% PVP). Para el ensayo de actividad enzimática, la relación de peróxido de hidrógeno dependiente de la oxidación del ácido ascórbico, se determinó en una reacción mixta que contenía 50 mM de buffer fosfato (pH 7,4), 5 mM de ácido ascórbico y extracto de enzima (Chen y Asada, 1989). La reacción se inició con el agregado de 100 µl de 0,1 mM (v/v) H₂O₂ y la tasa de oxidación del ácido

ascórbico se estimó por el descenso de la absorbancia a 290 nm por 3 min. La actividad específica de APX se expresó como porcentaje del control. La concentración de proteínas fue determinada espectrofotométricamente usando albúmina bovina como estándar (Bradford, 1976).

Determinación de compuestos antioxidantes no enzimáticos

Glutation reducido (GSH) y tioles no proteicos (TNP) se extrajeron por homogeneización de 250 mg de hojas en 2 ml 0,1 N de HCl (pH 2), 1% (w/v) de PVP y se centrifugó a 10.000 g a 4°C durante 10 min (Schupp y Rennenberg, 1988). La cantidad de GSH del sobrenadante se estimó incubando 100 µl de la alícuota con buffer fosfato (0,5 M KH_2PO_4 / K_2HPO_4), conteniendo 1 g/l de ácido ascórbico y 0,5 g/l de ácido glioxílico (pH 6,8), por 5 min a 60°C. La solución se colocó rápidamente en hielo. 100 µl del reactivo de Ellman (solución de DTNB) se agregó a todos los tubos, se mezcló y centrifugó a 12.000 rpm por 2 min. Se midió la absorbancia a 412 nm. El tubo control contenía el buffer y el estándar de GSH (preparado de una solución GSH stock, diluyendo 4 mM en una proporción 1:10) (Ball, 1966). Los resultados obtenidos se expresaron como µmoles GSH/g de PF. Para la determinación de tioles no proteicos se usó el reactivo de Ellman. 200 µl del sobrenadante se mezcló con buffer fosfato (0,5 M KH_2PO_4 / K_2HPO_4 , 1 mM EDTA, pH 8) y 100 µl de solución de DTNB (6 mM DTNB, 50 mM buffer potasio fosfato, pH 7,4) se agregaron para iniciar la reacción. Luego de 15 min de incubación a 30°C, se midió la absorbancia a 412 nm y se corrigió con DTNB/control sin enzima. Los resultados se expresaron como mMoles DTNB/g de PF.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y los datos se sometieron a prueba de rango múltiple a posteriori. El software utilizado fue Statgraphics Plus, versión 3 (Manugistics, Rockville, MD, EE. UU.).

RESULTADOS

ABA y sus catabolitos

ABA y sus catabolitos ABA-GE, DPA y PA se detectaron en hojas de ambos cv. Sudafricana y cv. Mejorada INTA. Las hojas de control (tiempo 0) de ambos cultivares mostraron un contenido de ABA similar (Fig. 4. 2A, B). ABA-GE y DPA fueron los compuestos más abundantes en las hojas control de ambos cultivares (Fig. 4.2C, F), mientras que PA fue un catabolito menor (Fig. 4.2G, H). El contenido de ABA-GE, DPA y PA en hojas de control del cv. Sudafricana fue más alto que en el cv. Mejorada INTA. Bajo estrés por frío (24 o 72 h) el contenido de ABA aumentó cuatro veces en el cv. Sudafricana. En el cv. Mejorada INTA, hubo un aumento constante de 6 a 72 h (Fig.

4.2A, B). El estrés por frío causó una disminución en ABA-GE en el cv. Sudafricana (Fig. 4. 2C). En el cv. Mejorada INTA, este compuesto no cambió a las 6 y 72 h, pero alcanzó su punto máximo a las 24 h (Fig. 4. 2D). El DPA disminuyó bajo estrés por frío en el cv. Sudafricana (Fig. 4.2E). PA también disminuyó a las 6 y 24 h, pero regresó al nivel de control a las 72 h (Fig. 4.2G). El estrés por frío del cv. Mejorada INTA no afectó los niveles de DPA (Fig. 4.2F) o PA (Fig. 4.2H).

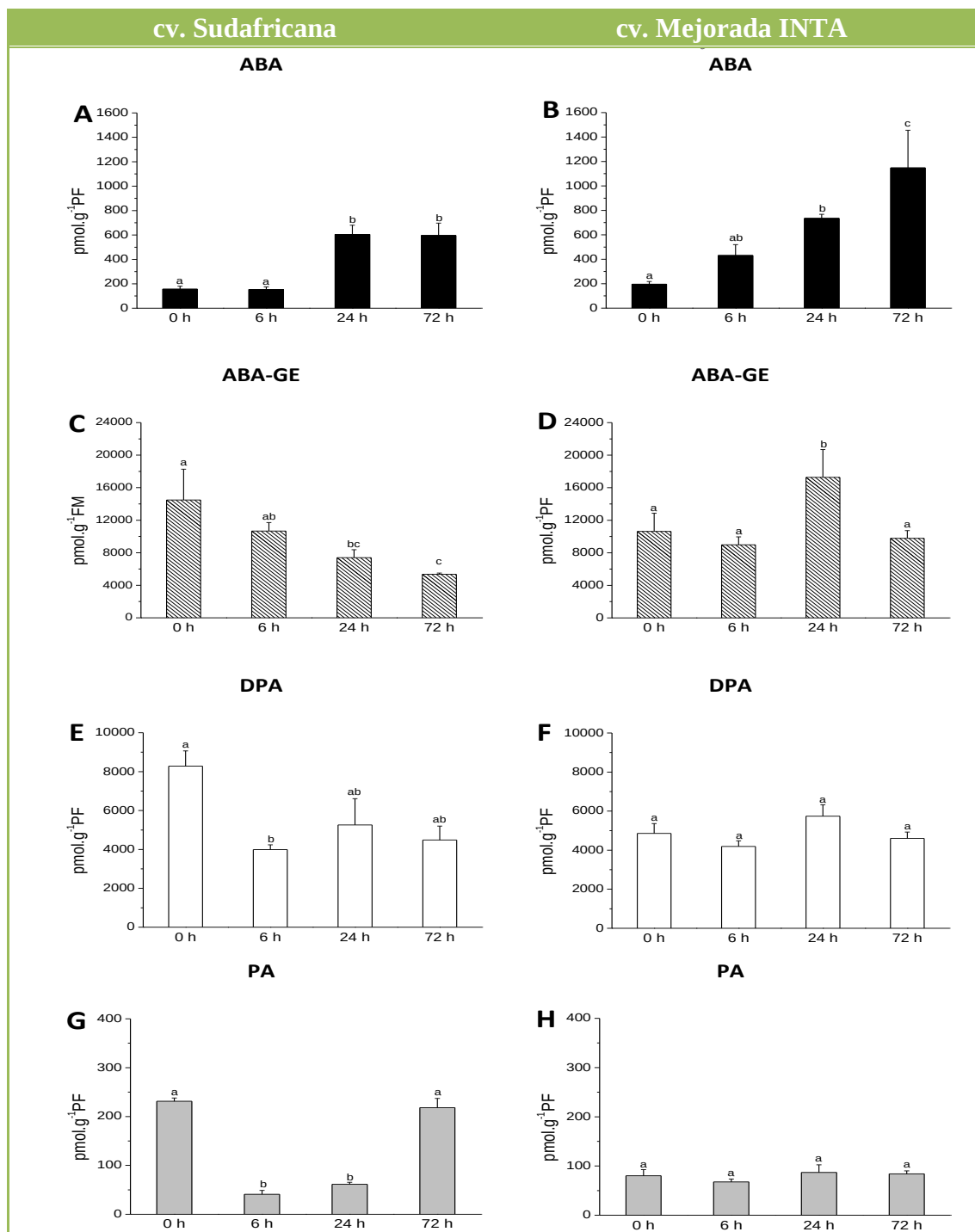


Fig. 4.2: Contenido de ácido abscísico (ABA) y sus catabolitos en *Digitaria ariantha* a 6, 24 y 72 h de estrés por frío. A. ABA en el cv. Sudafricana. B. ABA en el cv. Mejorada INTA. C. ABA-GE en el cv. Sudafricana. D. ABA-GE en el cv. Mejorada INTA. E. DPA en el cv. Sudafricana. F. DPA en el cv. Mejorada INTA. G. PA en el cv. Sudafricana. H. PA en el cv. Mejorada INTA (n = 3). Letras distintas indican valores que difieren significativamente a $P < 0.05$ (Garbero *et al.*, 2011)

Jasmonatos

OPDA (el precursor JA), JA y sus derivados, 11-OH-JA, 12-OH-JA, se detectaron en las hojas de ambos cultivares. JA y 12-OH-JA fueron los compuestos más abundantes. Los niveles de JA fueron más altos en las hojas control del cv. Mejorada INTA que en el cv. Sudafricana (Fig. 4.3A, B). Lo mismo ocurrió para 12-OH-JA (Fig. 4.3E, F). Por el contrario, 11-OH-JA fue menor en el cv. Mejorada INTA (datos no mostrados), y OPDA no difirió entre los dos cultivares (Fig. 4.3C, D). Bajo estrés por frío (24 o 72 h), el nivel de JA disminuyó dos veces en comparación con el control en el cv. Sudafricana, y triplicado en el cv. Mejorada INTA (Fig. 4.3A, B). OPDA mostró un ligero aumento en el cv. Sudafricana para el tratamiento de 72 h, pero no mostró cambios para ningún tiempo de estrés en el cv. Mejorada INTA (Fig. 4.3C, D).

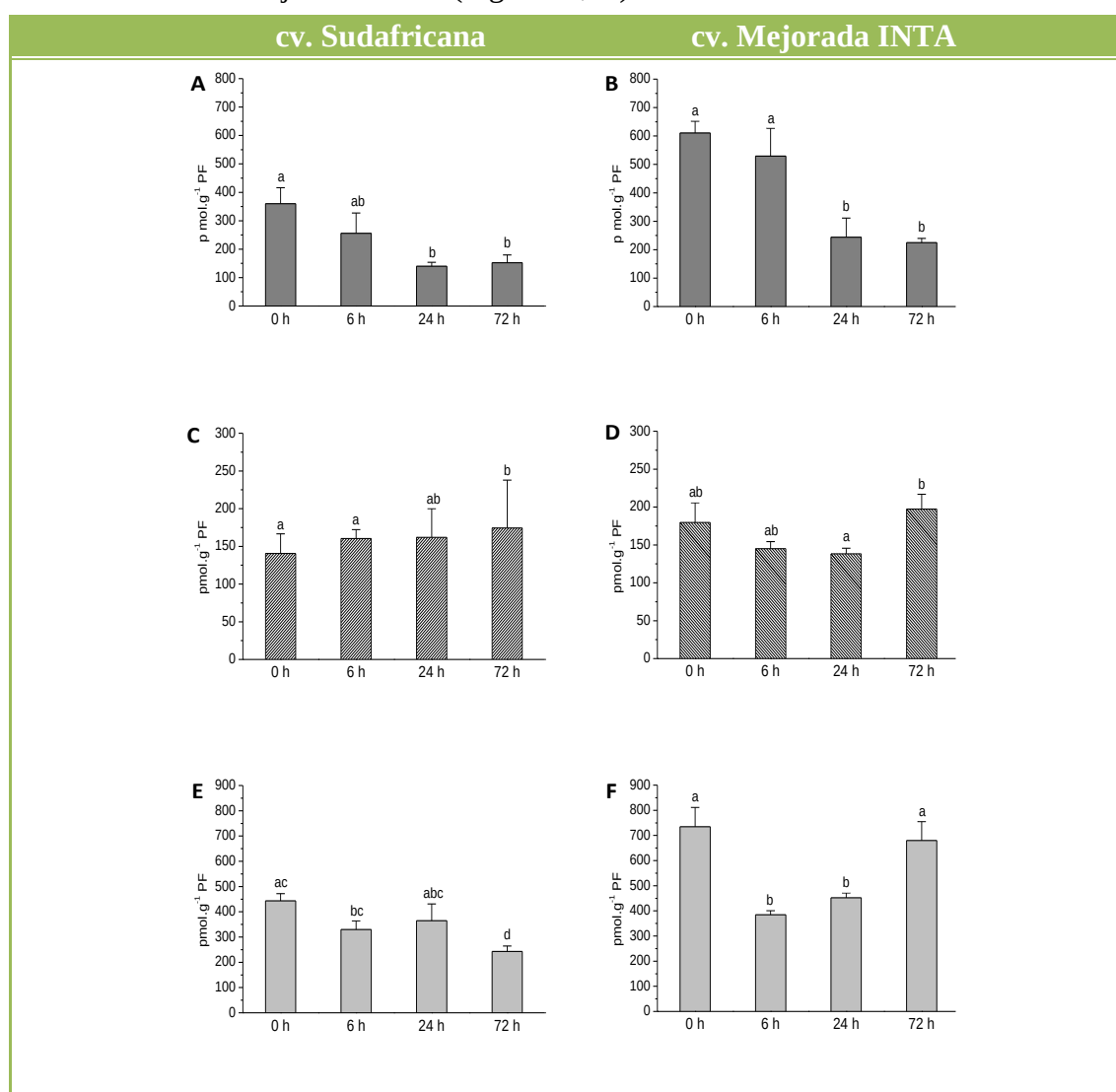


Fig. 4.3: Niveles endógenos de JAs en *Digitariaerianthacv.* Sudafricana y Mejorada INTA a 6, 24 y 72 h de frío. A y B: JA; C y D: OPDA; E y F: 12-OH-JA. Datos expresados como media $\pm$ ES (n = 3). Letras distintas indican valores que difieren significativamente a $P < 0.05$ (Garbero *et al.*, 2011).

12-OH-JA mostró un descenso solamente a las 72 h en el cv. Sudafricana (Fig. 4.3E). En el cv. Mejorada INTA, este compuesto descendió dos veces el valor del control a las 6 y 24 h de tratamiento y retomó los valores del control a las 72 h (Fig. 4.3F). En el compuesto 11-OH-JA, no se observaron cambios para ningún tiempo con tratamiento con frío ni en ninguno de los cultivares (datos no mostrados). En resumen, para ambos cultivares, el contenido de ABA fue menor que el contenido de JA en plantas control. Frente a estrés por frío, el nivel de ABA se incrementó mientras que JA disminuyó.

Peroxidación lipídica

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés) se encontraron en hojas de ambos cultivares de *D. eriantha*. En plantas control, el nivel de TBARS fue mayor en el cv. Mejorada INTA que en el cv. Sudafricana (Fig. 4.4). El nivel incrementa significativamente en plantas del cv. Sudafricana expuestas a 24 y 72 h de estrés por frío (Fig. 4.4A), sin embargo, no se observan cambios en el cv. Mejorada INTA (Fig. 4.4B). Los niveles de TBARS en plantas tratadas con frío en el cv. Sudafricana considerando los incrementos no alcanzan los niveles observados en el cv. Mejorada INTA.

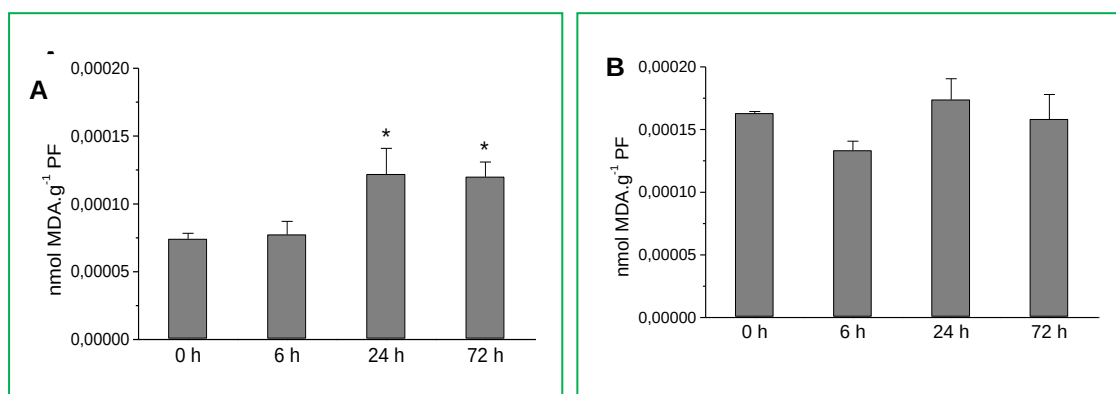


Fig. 4.4: Niveles de malondialdehído (MDA) en hojas de *Digitariaeriantha* a 6, 24 y 72 h de estrés por frío A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA. Datos expresados como media $\pm$ ES (n = 5). * Indica valores que difieren significativamente a $P < 0.05$ (Garbero et al., 2011)

Actividad enzimática

Los cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes en respuesta al frío variaron según el tiempo de tratamiento. En el cv. Sudafricana, la actividad de SOD disminuyó en relación con el control a las 24 h y fue dos veces menor a las 72 h. El cv. Mejorada INTA mostró una ligera disminución (no significativa) de la actividad de SOD a las 6 y 24 h y volvió al valor de control a las 72 h (Fig. 4.5A). La actividad de APX fue muy baja en las hojas de control de ambos cultivares. En el cv. Sudafricana, aumentó seis,

siete y diez veces, respectivamente, a los 6, 24 y 72 h de tratamiento en frío. En el cv. Mejorada INTA la actividad de APX no se modificó significativamente con ninguno de los tratamientos con frío (Fig. 4.5B).

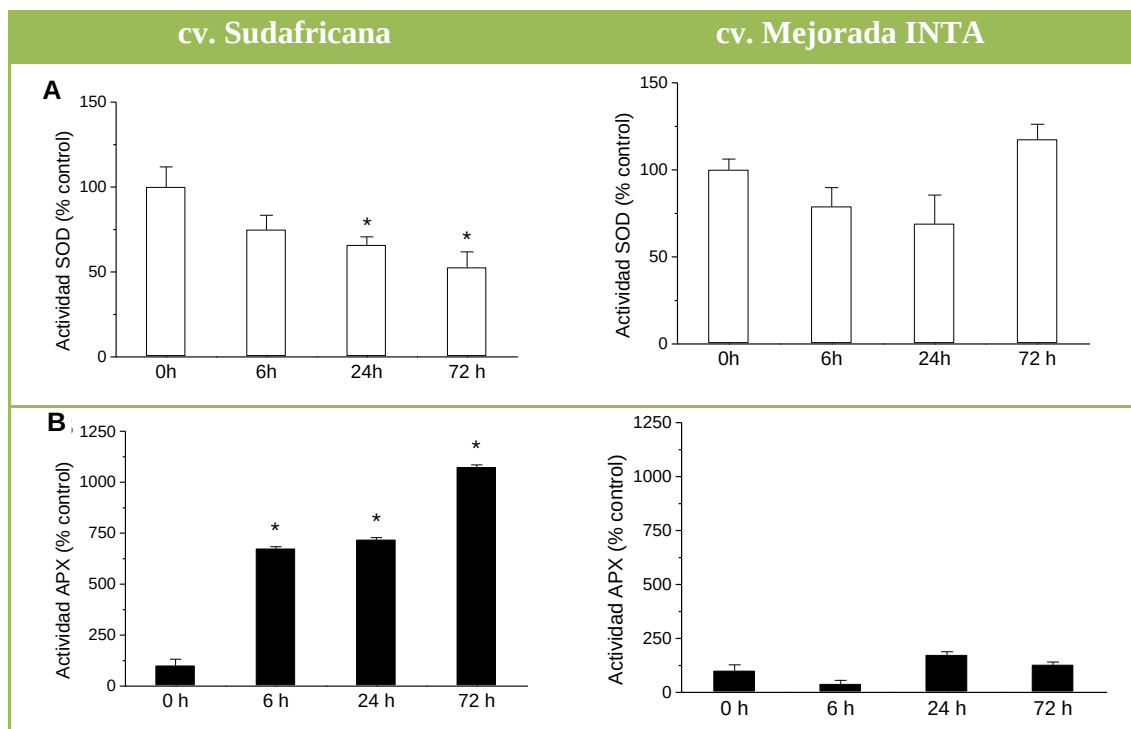


Fig. 4.5: Defensa antioxidante enzimática en hojas de *Digitaria aegyptia* cvs. Sudafricana y Mejorada INTA a 6, 24 y 72 h de estrés por frío. A: Superóxido dismutasa. B: Ascorbato peroxidasa. Datos expresados como media $\pm$ ES (n = 5). * Indica valores que difieren significativamente a $P < 0.05$ (Garbero *et al.*, 2011).

Antioxidantes no enzimáticos

Los niveles de GSH y TNP en los dos cultivares bajo estrés por frío se resumen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Contenido de GSH y TNP en hojas de *Digitariaerianthacvs.* Sudafricana y Mejorada INTA. Datos expresados como media $\pm$ ES (n = 5). * Indica valores que difieren significativamente a $P < 0.05$ (Garbero *et al.*, 2011).

Cultivar	Tiempo	GSH (μ M GSH/g PF)	TNP (mM DTNB/g PF)
Sudafricana	0 h	1251,73 $\pm$ 58,5	66,89 $\pm$ 3,62
	6 h	1375,66 $\pm$ 47,2	91,79 $\pm$ 7,65
	24 h	1156,07 $\pm$ 103,9	122,04 $\pm$ 8,48*
	72 h	1437,63 $\pm$ 133,8	151,05 $\pm$ 16,40*
Mejorada INTA	0 h	2171,5 $\pm$ 165,9	56,394 $\pm$ 4,35
	6 h	1893,0 $\pm$ 129,4	47,816 $\pm$ 5,20
	24 h	2660,9 $\pm$ 251,0	112,45 $\pm$ 6,0*
	72 h	2732,4 $\pm$ 104,4	112,94 $\pm$ 3,0*

El nivel de GSH fue consistentemente más alto para el cv. Mejorada INTA que para el cv. Sudafricana y no se modificó significativamente por el tratamiento con frío en ninguno de los casos. El nivel de TNP aumentó en 24 y 72 h en frío en ambos cultivares.

DISCUSIÓN

Cambios en los niveles de ABA endógeno y sus catabolitos, JA y las respuestas de los sistemas de defensa antioxidante, bajoestrés por frío en cortos periodos de tiempo, se compararon en dos cultivares de *D. eriantha* con diferente sensibilidad al frío.

ABA y JA son las principales hormonas involucradas en las respuestas de estrés abiótico (Janowiak *et al.*, 2002, Jung *et al.*, 2007, Wasternack 2007, Huang *et al.*, 2008). La salinidad, la sequía y el estrés por frío causan un aumento en los niveles de ABA endógeno (Xiong *et al.*, 2002) y de las JA (Xin *et al.*, 1997, Kramel *et al.*, 2000, Balbi y Deboto, 2008).

El grado de acumulación de ABA depende no solo de la biosíntesis de ABA, sino también de la desactivación de ABA, incluido el catabolismo y la conjugación (Ren *et al.*, 2007). Jiang y Hartung (2007) sugirieron que, bajo condiciones de estrés, ABA-GE es el catabolito transportado en el xilema.

En las hojas *Digitaria* sin estrés, el contenido de ABA fue menor que el de sus catabolitos, lo que sugiere que las vías de oxidación y conjugación están activas. La mayor acumulación de ABA-GE observada en las hojas control, en relación con DPA y PA, puede ser una consecuencia de la regulación de ABA, principalmente a través de la conjugación. El alto contenido de DPA sugiere que el PA tiene una corta vida media y se metaboliza rápidamente a DPA.

Por el contrario, el catabolismo de ABA a PA o DPA predomina en otras especies, incluidas semillas de manzana, frutos y semillas de cereza dulce (Setha *et al.*, 2005),

células de maíz cultivadas en suspensión (Balsevichet *al.*, 1994) y plantas de *Arabidopsis* (Huanget *al.*, 2008), lo que demuestra que el metabolismo de ABA se regula de manera diferente en diferentes plantas.

En el presente estudio, el estrés por frío causó un mayor aumento de ABA en el cv. tolerante al frío cv. Mejorada INTA que en el cv. Sudafricana. El grado de tolerancia al estrés no estaba relacionado con el contenido de ABA de las plantas control, sino con el contenido diferencial de ABA bajo estrés. De manera similar, las plántulas de maíz con diferentes genotipos no difirieron en el contenido de ABA antes del tratamiento con frío, pero el contenido de ABA mostró un mayor aumento en las plántulas tolerantes al frío que en las sensibles al frío durante el tratamiento (Janowiaket *al.*, 2002). En el cv. Sudafricana, el aumento de ABA en el estrés por frío podría ser el resultado de la síntesis de *novo* de ABA o de la desconjugación de ABA-GE. El cv. Mejorada INTA también mostró un aumento de ABA en el estrés por frío, pero probablemente solo a través de la síntesis de *novo* síntesis, ya que este cultivar no mostró disminución de ABA-GE como se observó en el cv. Sudafricana.

La alteración de los niveles de PA y DPA después del estrés por frío en el cv. Sudafricana indica que la oxidación es una vía más importante en este cultivar que en Mejorada INTA y confirma la asociación entre el estrés por frío y el metabolismo de ABA.

JA es la otra hormona vegetal involucrada en la respuesta al estrés por frío, como se ejemplifica en los estudios de la crucífera *Thellungiella* (Wong *et al.*, 2006).

En el presente estudio, el contenido basal de JA fue menor en las hojas del cv. Sudafricana que del cv. Mejorada INTA y el tratamiento con frío disminuyó no solo JA sino también su derivado 12-OH-JA. La sensibilidad al frío del cv. Sudafricana puede estar relacionado con un bajo contenido de JA y 12-OH-JA. Pedranzani *et al.* (2003) mostraron que los cultivares de tomate que difieren en la tolerancia a la salinidad y la capacidad de acumular sodio también difieren en el contenido basal de JA. Las cantidades de JA y compuestos relacionados fueron mayores en el cultivar tolerante a la salinidad, cv. Pera, que en el cultivar sensible a la salinidad, cv. HellfruchtFrühstamm.

El ligero aumento de OPDA a las 72 h en respuesta al tratamiento con frío en el cv. Sudafricana puede ser una consecuencia del daño de la membrana celular; es decir, el estrés por frío puede liberar OPDA del conjunto esterificado de monogalactosildiacilglicerol-OPDA, especialmente en membranas de cloroplastos. Otra posibilidad es que los ácidos grasos se liberen de la membrana a partir del monogalactosildiacilglicerol para la biosíntesis de OPDA (Weber 2002; Buseman *et al.*, 2006; Boettcher y Weiler 2007).

La inducción de muchos genes por JA / metiljasmonato, pero no por 12-OH-JA, sugiere que la acumulación diferencial de jasmonatos contribuye a la regulación positiva de un cierto subconjunto de genes, combinado con regulación negativa por hidroxilación de JA (Mierschet *al.*, 2008). La hidroxilación de JA puede representar un apagado en la señalización de JA para los genes regulados positivamente y un represor aún más fuerte para los genes regulados negativamente.

Los dos cultivares mostraron diferencias notables en la respuesta temporal y la acumulación de 12-OH-JA bajo estrés por frío. La disminución de 12-OH-JA observada en el cv. Mejorada INTA a las 6 y 24 h puede permitir la desrepresión de ciertos genes relacionados con el estrés por frío. La cuestión de qué genes implicados en el estrés por frío están regulados hacia arriba o hacia abajo por OPDA, JA y 12-OH-JA es un tema interesante para estudios futuros.

La acumulación diferencial de ABA y sus catabolitos, así como de JAs (OPDA, JA, 12-OH-JA), observada en *Digitaria*, refleja la participación de estos compuestos en las respuestas diferentes frente al estrés que muestran los dos cultivares.

En la respuesta al estrés por frío de *Digitaria*, ABA y JA parecen tener una relación inversa; es decir, el aumento de ABA se correlaciona con una disminución de JA en las hojas estresadas. Numerosos estudios previos han sugerido interacciones entre las vías de señalización de ABA y JA (Jung *et al.*, 2007, Huang *et al.*, 2008, Kazan y Manners, 2008). La hipótesis de que JA actúa de manera sinérgica con ABA para promover la respuesta al estrés (Munemasa *et al.*, 2007) fue contradicha por un estudio de microarrays de genes sensibles a JA en *Arabidopsis*. El tratamiento con JA redujo la transcripción de genes sensibles a ABA-estrés por frío/sequía, lo que indica una interacción antagonista entre las vías de señalización de JA y ABA (Jung *et al.*, 2007).

Las lesiones en las plantas relacionadas con el estrés están asociadas con el daño oxidativo a nivel celular (Mittler 2002; Huang y Guo 2005; del Río *et al.*, 2006). Un parámetro utilizado para medir la lesión por oxidación es el nivel de MDA, un producto de la peroxidación lipídica. Por ejemplo, se observó un aumento de MDA en arroz bajo estrés de enfriamiento (Huang y Guo, 2005) y en el pasto bermuda triploide bajo sequía (Lu *et al.*, 2009). En este trabajo se observó el aumento de MDA en el cv. Sudafricana bajo estrés por frío, sugiriendo que el cultivar tolerante al frío cv. Mejorada INTA puede estar mejor protegido contra lesiones por estrés por frío.

El aumento en la peroxidación lipídica observada en las hojas del cv. Sudafricana después del estrés por frío puede ser una consecuencia de la producción de EROs debido a una menor actividad de SOD. Se ha encontrado una disminución de la actividad de SOD en cultivares de arroz sensibles al frío, cv. IR-50, después del estrés por frío (Huang y Guo, 2005). La sensibilidad al frío del cv. Sudafricana también puede deberse a la baja actividad de esta enzima. La disminución de la actividad de SOD estuvo acompañada por un aumento abrupto de la actividad de APX. Cuando la función de eliminación de SOD se deteriora, se acumulará O_2^- , lo que contribuirá al estallido oxidativo y al aumento de la peroxidación lipídica. El sistema de peroxidasas existe en múltiples isoformas que son estímulos exógenos regulados por el desarrollo y altamente reactivos, de forma similar al estrés por frío. Otro factor relacionado con los sistemas de defensa de las plantas es la red de señalización del Eros, que puede estar involucrada en las primeras etapas de la respuesta homeostática.

Entre los componentes del sistema de defensa vegetal no enzimático, los TNP como la γ -glutamilcisteína, ácido glutámico, cisteína y GSH son moléculas importantes en la defensa celular, incluida la respuesta al estrés por frío. Los depósitos de tiol parecen estar equilibrados entre el crecimiento y un depósito reabastecido de GSH en tejidos. En

nuestro estudio, el nivel de TNP aumentó en ambos cultivares de *Digitaria* bajo estrés por frío. El GSH puede usarse como un mecanismo de defensa en lugar de un precursor de fitoquelatina y podría incorporarse en la vía Halliwell-Asada, junto con APX. Esto podría explicar por qué los niveles de GSH no se alteraron de manera significativa por el tratamiento con frío, aunque fueron más altos en el cv. Mejorada INTA que en el cv. Sudafricana.

Las respuestas adaptativas en las plantas están mediadas por fitohormonas (ABA, JA) e incluyen las defensas antioxidantes. La adición exógena de ABA indujo actividades de enzimas antioxidantes en varias especies (Jiang y Zang 2001; Lu *et al.*, 2003, 2009). Lu *et al.* (2009) informaron que la aplicación de ABA aumentó la tolerancia a la sequía en el cultivar TifEagle de pasto bermuda triploide, mediante la promoción de actividades de SOD y catalasa.

Del mismo modo, los enlaces entre las JA y las enzimas antioxidantes se han establecido en estudios con la adición exógena de JA y metiljasmonato. Babar Ali *et al.* (2006) aplicaron metiljasmonato a las raíces de *Panaxginseng* cultivadas en suspensión y observaron un comportamiento enzimático antioxidante similar: disminución de la actividad de SOD y aumento de la actividad de APX. Los cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes luego del agregado de metiljasmonato pueden prevenir el estrés oxidativo al aumentar la eficiencia del sistema antioxidante.

En base a nuestros resultados, la tolerancia al frío del cv. Mejorada INTA podría asociarse con el mayor contenido de ABA y la estabilidad de la peroxidación lipídica (en términos de TBARS y actividades enzimáticas) frente al estrés por frío, mientras que la disminución en el contenido de JA sugiere que los contenidos endógenos de JA no pueden prevenir el estrés oxidativo en las hojas tratadas de este cultivar.

Gran parte de nuestro conocimiento de las respuestas al estrés frío proviene de estudios que usan la aplicación exógena de hormonas. Los resultados del presente estudio establecen un vínculo entre los niveles de hormonas endógenas, el sistema de defensa antioxidante y la sensibilidad al frío en dos cultivares *Digitaria*.

BIBLIOGRAFÍA

Ahlfors R, Lång S, Overmyer K, Jaspers P, Brosché M, Tauriainen A, Kollist H, Touminen H, Belle-Boix E, Piippo M, Inzé D, Palva ET, Kangasjärvi J. 2004. *Arabidopsis* RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 belongs to the WWE protein–protein interaction domain protein family and modulates abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate response. *Plant Cell* 16:1925–1937

Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373–399

Babar Ali M, Yu KW, Hahn EJ, Paek KY. 2006. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panaxginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Rep* 25:613–620

- Balbi V, Deboto A. 2008. Jasmonate signaling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol* 177:301–318
- Ball CR. 1966. Estimation and identification of thiols in rat spleen after cysteine or glutathione treatment: relevance to protection against nitrogen mustards. *BiochemPharmacol* 15:809–816
- Balsevich JJ, Cutler AJ, Lamb N, Friesen LJ, Kurz EU, Perras MR, Abrams SR. 1994. Response of cultured maize cells to (+)-abscisic acid, (–)-abscisic acid and their metabolites. *Plant Physiol* 106:135–142
- Beyer FW, Fridovich I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem* 16:559–566
- Boettcher C, Weiler EW. 2007. Cyclo-Oxylipin-galactolipids in plants: occurrence and dynamics. *Planta* 226:629–637
- Bracale M, Coraggio L. 2003. Cellular responses and molecular strategies for the adaptation to chilling and freezing stresses in plants. In: Troppi LS, Pawlik-Skowro B (eds) *Abiotic stresses in plants*. Klumer, Dordrecht, pp 36–53
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Buseman CM, Tamura P, Sparks AA, Baughman EJ, Maatta S, Zhao J, Roth MR, Esch SW, Shah J, Williams TD, Welti R. 2006. Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* 142:28–39
- Castelli SL, Grunberg K, Muñoz N, Griffa S, LópezColomba E, Ribotta A, Biderbost E, Luna C. 2010. Oxidative damage and antioxidant defenses as potential indicators of salt-tolerant *Cenchrus ciliaris* L. genotypes. *Flora* 205: 622–626
- Chen GX, Asada K. 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isoenzymes and the difference in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol* 30:987–998
- Cutler A, Krochko J. 1999. Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci* 4:472–478
- Das K and Roychoudhury A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.*, 02 December 2014 | <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>.
- Del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB. 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol* 14:330–335
- Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho JV, Gómez Cadenas A. 2005. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J AgricFoodChem* 53:8437–8442

Fedoroff NV, Battisti DS, Beachy RN, Cooper PJ, Fischhoff DA, Hodges CN, KnaufVC, LobellD., MazurBJ, Molden D., Reynolds MP, Ronald PC, Rosegrant MW, Sánchez PA, Vonshak A, ZhuJK.2010. RadicallyRethinkingAgricultureforthe 21st Century Science, 327, pp. 833 - 834

Garbero M. 2010. Estrés por frío en *Digitariaeriantha*: forrajera promisoría para zonas semiáridas. PhD thesis, Universidad Nacional de Río Cuarto

Garbero M, Pedranzani H, Zirulnik F, Molina A, Pérez-Chaca MV, Vigliocco A, Abdala G. 2011.Short-term cold stress in twocultivars of *Digitaria eriantha*: Effects on stress-related hormones and antioxidant defense system. Acta PhysiologiaePlantarum 33(2):497–507

Gusta LV, Trischuk R, Weiser CJ. 2005.Plantcoldacclimation: the role of abscisicacid. J Plant Growth Regul 24:308–318

Halliwell B, Gutteridge J. 2007. In: Free Radicals in Biology and Medicine, Ed 4th. Oxford University Press, Oxford, UKHeath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch BiochemBiophys 125:189–198

Huang D, Wu W, Abrams SR, Cutler AJ. 2008. The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. J Exp Bot 59:2991–3007

Huang M, Guo Z. 2005. Responses of antioxidative system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity. Biol Plant 49:81–84

Janowiak F, Maas B, Dörffling K. 2002. Importance of abscisic acid for chilling tolerance of maize seedlings. J Plant Physiol 159:635–643

Jeong Y-C, Nakamura J, Upton P, Swenberg J. 2005. Pyrimido [1,2- α]-purin-10(3H)-one, M1G, is less prone to artifact than base oxidation. Nucleic Acids Res 33: 6426- 6434

Jiang F, Hartung W. 2007. Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. J Exp Bot 59:37–43

Jiang M, Zang J. 2001. Effects of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidative damage in leaves of maize seedling. Plant Cell Physiol 42:1265–1273

Jung C, Lyou SH, Yeu SY, Kim MA, Rhee S, Kim M, Lee JS, Choi YD, Cheong J-J. 2007. Microarray-based screening of jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Rep 26:1053–1063

Kazan K. 2015. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. Trends in Plant Sciences 20:219–229

Kazan K, Manners JM. 2008. Jasmonate signaling: toward and integrated view. Plant Physiol 146:1459–1468

- Kramell R, Miersch O, Atzorn R, Parthier B, Wasternack C. 2000. Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the “oxylin signature” in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiol* 123:177–187
- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E. 2004. The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J* 23:1647–1656
- Lee KH, Piao HL, Kin H-Y, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I, Kwak JM, Lee I-J, Hwang I. 2006. Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increase active pools of abscisic acid. *Cell* 126:1109–1120
- Lu S, Guo Z, Peng X. 2003. Effects of ABA and S-3307 on drought resistance and antioxidative enzyme activity of turfgrass. *J HortSciBiotechnol* 73:663–666
- Lu S, Su W, Li H, Guo Z. 2009. Absciscic acid improves drought tolerance of triploid bermudagrass and involves H₂O₂- and NO-induced antioxidant enzyme activities. *Plant PhysiolBiochem* 47:132–138
- Lukatkin AS. 2002a. Contribution of oxidative stress to the development of coldinduced damage to leaves of chilling-sensitive plants: 1. Reactive oxygen species formation during plant chilling. *Russian Journal of Plant Physiology* 49 (5): 622-627
- Lukatkin AS. 2002b. Contribution of oxidative stress to the development of coldinduced damage to leaves of chilling-sensitive plants: 2. The activity of antioxidant enzymes during plant chilling. *Russian Journal of Plant Physiology* 49 (6): 782-788
- Ma YY, Zhang YL, Shao H, Lu J. 2010. Differential physio-biochemical responses to cold stress of cold-tolerant and non-tolerant grapes (*Vitis* L.) from china. *Journal of Agronomy & Crop Science* 196: 212-219
- Marion-Poll A, Leung J. 2006. Absciscic acid synthesis, metabolism and signal transduction. In: Hedden P, Thomas SG (eds) *Plant hormone signaling*, annual plant review. Blackwell, Oxford, pp 1–35
- Menéndez-Benavente L, Teixeira FK, Kamei CLV, Pinheiro MM. 2004. Salt stress induces expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian indica rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci* 166:323–331
- Miersch O, Neumerkel J, Dippe M, Stenzel I, Wasternack C. 2008. Hydroxylatedjasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytol* 177:114–127
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405–410
- Mueller MJ. 2004. Archetype signals inplants: the phytoprostanes. *CurrOpin Plant Biol* 7: 441-448
- Munemasa S, Oda K, Watanabe-Sugimoto M, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y. 2007. The coronatine-insensitive 1 mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in *Arabidopsis* guard cells. *Specific*

- impairment of ion channel activation and second messenger production. *Plant Physiol* 143:1398–1407
- Nambara E, Marion-Poll A. 2005. Absciscic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 56:165–185
- Pedranzani H, Racagni G, Alemano S, Miersch O, Ramírez I, Peña-Cortés H, Taleisnik E, Machado-Domenech E, Abdala G. 2003. Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regul* 41:149–158
- Pedranzani H, Sierra de Grado R, Vigliocco A, Miersch O, Abdala G. 2007. Cold water stress and produces changes in endogenous jasmonates in two Populations of *Pinus pinaster* Ait. *Plant Growth Regul*. 52: 111-116
- Pospisilová J. 2003. Participation of phytohormones in the stomatal regulation of gas exchange during water stress. *Biol Plant* 46:491–506
- Ren H, Gao Z, Chen L, Wei K, Liu J, Fan Y, Davies WJ, Jia W, Zhang J. 2007. Dynamic analysis of ABA accumulation in relation to the rate of ABA catabolism in maize tissue under water stress. *J Exp Bot* 58:211-219
- Riemann M, Dhakarey R, Hazman M, Mito B, Kohli A, Nick P. 2015. Exploring jasmonates in the hormonal network of drought and salinity responses. *Frontiers in Plant Science* 6:1-16
- Saini P, Gani M, Kaur JJ, Godara LC, Singh, C, Chauhan SS, Francies RM, Bhardwaj A, Bharat Kumar N, Ghosh MK. 2018. Reactive Oxygen Species (ROS): A Way to Stress Survival in Plants. *Abiotic Stress-Mediated Sensing and Signaling in Plants: An Omics Perspective* pp 127-153. DOI <https://doi.org/10.1007/978-981-10-7479-0>
- Schupp R, Rennenberg H. 1988. Diurnal changes in the glutathione content of spruce needles (*Picea abies* L.). *Plant Sci* 57:113–117
- Setha S, Kondo S, Hirai N, Ohigashi H. 2005. Quantification of ABA and its metabolites in sweet cherries using deuterium-labeled internal standards. *Plant Growth Regul* 45:183–188
- Suhita D, Raghavendra AS, Kwak JM, Vavasseur A. 2004. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol* 134:1536–1545
- Wang CY. 1999. Methyl jasmonate reduces water stress in strawberry. *J. Plant Growth Regul.* 18:127–134
- Wang WB, Kim YH, Lee HS, Deng XP, Kwak SS. 2009. Differential antioxidation activities in two alfalfa cultivars under chilling stress. *Plant Biotechnol. Rep.* 3: 301-307
- Wasternack C. 2007. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* 100:681–697
- Wasternack C, Hause B. 2002. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress response and development. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 72:165–221

- Weber H. 2002. Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci* 7:217–224
- Wilén RW, Ewan BE, Gusta LV. 1994. Interaction of ABA and jasmonic acid on the inhibition of seed germination and the induction of freezing tolerance. *Can J Bot* 72:1009–1017
- Wise RR, Naylor AW. 1987. Chilling-enhanced photooxidation: Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiology* 83: 278-282
- Wong CE, Li Y, Labbe A, Guevara D, Nuin P, Whitty B, Diaz C, Golding GB, Gray GR, Weretilnyk EA, Griffith M, Moffatt BA. 2006. Transcriptional profiling implicates novel interactions between abiotic stress and hormonal response in *Thellungiella*, a close relative of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 140:1437–1450
- Xin ZY, Zhou X, Pilet PE. 1997. Level changes of jasmonic, abscisic and indole-3yl-acetic acids in maize under desiccation stress. *J Plant Physiol* 151:120–124
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14: S165–S183
- Xu P-L, Guo Y-K, Bai J-G, Shang L, Wang X-J. 2008. Effects of long-term chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light. *Physiologia Plantarum* 132: 467–478
- Yoon JY, Hamayun M, Lee SK, Lee IJ. 2009. Methyl Jasmonate Alleviated Salinity Stress in Soybean. *J. Crop Sci. Biotech.* 12 (2): 63-68
- Zhang Y, Hao-Ru T, Ya L. 2008. Variation in antioxidant enzyme activities of two strawberry cultivars with short-term low temperature stress. *World Journal of Agricultural Sciences* 4 (4): 458-462
- Zhu JK. 2016. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell* 167. Vol 2, Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>

CAPITULO 5

Efecto del frío sobre el crecimiento, hormonas promotoras y anatomía de *Digitaria eriantha*

Marisa GARBERO, Hilda PEDRANZANI

Resumen

Dos cultivares de *Digitaria eriantha* (Sudafricana sensible al frío y Mejorada INTA tolerante al frío) estuvieron expuestos al estrés por frío (5 °C) durante 0, 6, 24 o 72 h y se compararon en términos de crecimiento de hojas y raíces, período de recuperación, anatomía de brotes y hojas y niveles de clorofila, auxina (ácido indol-3-acético, AIA) y citoquininas (CK). En el cv. Sudafricana, el tratamiento con frío causó un crecimiento reducido, ligeros cambios en el nivel de clorofila, niveles reducidos de AIA y de la CK iso-penteniladenina (iP) y reducción del peso fresco (PF) y peso seco de la hoja (PS) durante el período de recuperación. Se observaron daños en la anatomía de los cloroplastos, el tallo principal y las yemas axilares. El estudio ultraestructural mostró un número reducido de granos de almidón en los cloroplastos de la vaina del haz y el mesófilo. En el cv. Mejorada INTA, el tratamiento con frío no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento o el nivel de clorofila. El PF y PS de las hojas volvieron rápidamente a los niveles normales durante el período de recuperación. La anatomía del meristema de la planta se vio afectada, sin embargo, la ultraestructura de la vaina del haz y los cloroplastos del mesófilo no se afectaron. La tolerancia al frío del cv. Mejorada INTA parece estar relacionado con la estabilidad de los niveles de clorofila y CK, el aumento de AIA y el mantenimiento de la anatomía y ultraestructura de brotes y hojas.

Palabras claves: Anatomía, auxinas, citoquininas, crecimiento, *Digitaria eriantha*, frío.

Abstract

Two cultivars of *Digitaria eriantha* (cold-sensitive cv. Sudafricana and cold-tolerant cv. Mejorada INTA) were exposed to cold stress (5 °C) for 0, 6, 24, or 72 h, and compared in terms of leaf and root growth, recovery period, shoot and leaf anatomy, and levels of chlorophyll, auxin (indole-3-acetic acid, IAA) and cytokinins (CKs). In Sudafricana, cold treatment caused reduced growth, slight changes in chlorophyll level, reduced levels of IAA and CK iso-pentenyladenine (iP), and reduced leaf dry weight (DW) and fresh weight (FW) during the recovery period. Anatomical damage was observed in chloroplasts, main stem, and axillary buds. Ultrastructural study showed reduced numbers of starch grains in chloroplasts of the bundle sheath and mesophyll. In Mejorada INTA, cold treatment had no significant effect on growth or chlorophyll level. Leaf DW and FW quickly returned to normal levels during the recovery period. Anatomy of ground meristem was affected, but ultrastructure of bundle sheath and mesophyll chloroplasts was not. The cold tolerance of cv. Mejorada INTA appears to be related to the stability of chlorophyll and CK levels, increase of IAA, and maintenance of normal shoot and leaf anatomy and ultrastructure.

Keywords: Anatomy, auxin, cytokinins, cold, *Digitaria eriantha*, growth.

INTRODUCCIÓN

El estrés por frío es uno de los estreses ambientales abióticos más graves que enfrentan las plantas durante su ciclo de vida. El estrés por frío limita el rendimiento agronómico al reducir el crecimiento de las plantas, con efectos negativos e impredecibles sobre la acumulación de biomasa (Bracale y Coraggio 2003). En este trabajo se estudiaron dos cultivares de *D. eriantha*: cv. Sudafricana, originario de Sudáfrica y cv. Mejorada INTA, desarrollado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), provincia de San Luis, Argentina, basado en su resistencia a las condiciones semiáridas. La elucidación de los mecanismos de respuesta de estos cultivares al estrés por frío es altamente deseable en vista de la importancia económica de *D. eriantha* como recurso forrajero y los posibles beneficios de expandir el cultivo de esta especie a áreas con clima más frío. Un mejor conocimiento de los mecanismos de tolerancia al estrés por frío ayudará a los mejoradores y a los agricultores a identificar y seleccionar las plantas más adecuadas para las áreas frías.

En el cultivo sorgo, la exposición al frío inhibió el crecimiento y causó la reducción del peso seco y el área foliar (Ercoliet *et al.*, 2004). En las plantas de trigo, las bajas temperaturas redujeron la tasa de crecimiento relativo de la raíz en los cultivares de invierno (Pro INTA Pincén y Pro INTA Puntal) en comparación con los cultivares de primavera (Buck Patacón y San Agustín INTA) y produjeron una relación raíz / brote menor en cultivares de invierno. Además, la exposición al frío redujo la tasa de crecimiento de los brotes en todos los cultivares y el área de la superficie de la raíz aumentó de manera más significativa en los cultivares de primavera (Equiza *et al.*, 2001). Las hojas de muchas especies de plantas cultivadas a baja temperatura muestran tasas muy bajas de fotosíntesis y cambios en la composición del pigmento (Haldimann *et al.*, 1996) y el contenido de pigmentos (Oliveira *et al.*, 2009). El contenido de clorofila *a*, *b*, y de carotenoides totales, fue mayor en *Zea mays* tolerante al enfriamiento que en otros genotipos (Haldimann 1999). El análisis de los rasgos morfológicos es útil para estudiar las adaptaciones de las plantas al estrés ambiental, como el frío. En *Brassica napus*, el estrés por frío indujo cambios en el patrón de expansión de las células del mesófilo y un mayor grosor de las paredes celulares en la epidermis superior (Stefanowska *et al.*, 1999). En el trigo, el grosor de las terceras hojas fue aproximadamente 1,5 veces mayor a 5 °C que las desarrolladas a 25 °C, tanto en los cultivares de primavera como en invierno. Además, en variedades de trigo de invierno expuestas a estrés por frío la superficie foliar abaxial mostró una mayor longitud de células epidérmicas y una menor frecuencia estomática y esto se relacionó con hojas dobladas en un ángulo más cerrado a lo largo de la nervadura central (Equiza *et al.*, 2001). La exposición de plantas resistentes al frío a

bajas temperaturas provoca cambios obvios en la ultraestructura celular. Las primeras manifestaciones de la lesión por frío incluyen hinchazón y desorganización de los cloroplastos (tilacoides dilatados, desorganización de las pilas de grana, formación de pequeñas vesículas en la envoltura de cloroplastos y tamaño y cantidad de granos de almidón reducidos) y cambios en la estructura de las mitocondrias (Kratsch y Wise, 2000). Las hojas de *Arabidopsis* expuestas a bajas temperaturas presentaron invaginaciones de membrana y numerosas microvesículas cerca de la membrana plasmática (Ristic y Ashworth, 1993). Las hojas de plantas tratadas con frío de *Cucumis sativus* L. también mostraron hinchazón de cloroplastos y tilacoides y formación de vesículas en laminillas (Xuet *et al.*, 2008).

Muchos estudios han demostrado la participación de hormonas vegetales (particularmente ácido abscísico, etileno, ácido salicílico y ácido jasmónico) en respuesta a estreses abióticos. Los niveles y funciones de las hormonas involucradas en el crecimiento, incluyendo el ácido indol-3-acético (AIA) y las citoquininas (CK), están claramente influenciados por factores de estrés ambiental. Existe cierta evidencia de que las CK interactúan con factores de estrés abiótico y biótico y que AIA está involucrada en respuestas de estrés abiótico (Hare *et al.*, 1997; Ghanashyam y Jain, 2009; Jain y Khurana, 2009; Shibasaki *et al.*, 2009). Ha habido avances recientes en la comprensión de la biosíntesis y la señalización de CK (Kieber y Schaller, 2010) y la interacción de señales ambientales con CK para modular la fisiología de las plantas (Argueso *et al.*, 2009). Por lo tanto, parece que estas hormonas vegetales desempeñan un papel importante en la capacidad de las plantas para mantener el crecimiento y el desarrollo bajo estrés por frío.

Nuestros estudios demuestran que la exposición del cv. Mejorada INTA y el cv. Sudafricana a bajas temperaturas causó una respuesta diferencial en términos de ácido abscísico, niveles de ácido jasmónico y en la defensa antioxidante (Garbero *et al.*, 2011). Estos hallazgos sugieren que la tolerancia al frío del cv. Mejorada INTA se relacionó con un aumento del nivel de ácido abscísico y con el mantenimiento de la peroxidación de lípidos bajo estrés por frío. En el presente estudio, la hipótesis fue que el estrés por frío altera los parámetros de crecimiento, la ultraestructura de la hoja y los niveles de la hormona de crecimiento en mayor grado en el cv. Sudafricana sensible al frío que en el cv. tolerante al frío Mejorada INTA. En consecuencia, cuantificamos y comparamos los efectos del estrés por frío sobre el crecimiento, el meristema apical y la morfología foliar, la ultraestructura de la hoja y los niveles de pigmentos fotosintéticos, auxinas y citoquininas en estos dos cultivares de *D. eriantha*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas y estrés frío

D. eriantha cv. Sudafricana y cv. Mejorada INTA se cultivaron a partir de semillas en macetas que contienen turba: vermiculita (4: 1, v / v), en una cámara de crecimiento Conviron E15 (Conviron, Winnipeg, Canadá) bajo un ciclo de 16 h de luz, 25°C / 8 h de oscuridad, 20°C, a 60% de humedad relativa. La densidad del flujo fue $175 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ usando tubos fluorescentes F96T12 / CW / 1500 (General Electric, EE. UU.) aumentados con luz procedente de lámparas incandescentes (OSRAM). El día 30, las plantas se transfirieron a una cámara a 5 ± 1 °C durante 6, 24 o 72 h, bajo un ciclo de 16 h luz / 8 h oscuridad y 60% de humedad relativa. Las plantas no tratadas consideradas como controles (tiempo 0) se mantuvieron en condiciones de crecimiento. Se utilizó un diseño simple y aleatorizado con tres repeticiones. Cada muestra consistió en 10 plantas.

Parámetros de crecimiento, período de recuperación y análisis de pigmentos

Cuatro plantas se separaron en hojas y raíces y se registró el peso fresco (PF; g planta⁻¹) de estas partes. Las muestras se secaron a continuación en un horno a 60°C hasta que se obtuvo un peso seco constante (PS). Las longitudes de las hojas y las raíces se registraron a las 6, 24 y 72 h de tratamiento en frío.

Después de 72 h de tratamiento con frío, las plantas se mantuvieron a 25 °C durante 21 días (período de recuperación). Los controles fueron plantas cultivadas continuamente a 25 °C sin tratamiento en frío. PF, PS y la longitud de las hojas se registraron los días 7, 14 y 21 días del período de recuperación y se expresaron como porcentajes de los valores de control. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Se extrajeron pigmentos de clorofila moliendo hojas en acetona al 80% a temperatura ambiente y sus niveles se expresaron en miligramos / gramo de PF usando las ecuaciones de Porra (2002). Los niveles de carotenoides se calcularon usando la fórmula de Lichtenthaler y Wellburn (1983).

Estudios anatómicos

Se tomaron muestras de ápice de plantas control y de 6, 24 y 72 h de plantas expuestas al frío y muestras foliares de plantas control y tratadas en frío durante 72 h se colocaron en FAA (95% de etanol: ácido acético glacial: 37-40% de formaldehído: agua; 50:5:10:35, v/v). Las muestras se deshidrataron según lo descrito por Johansen (1940), utilizando soluciones graduadas de etanol y xileno. Los tejidos completamente infiltrados se incrustaron en Histowax (cera parafínica altamente purificada mezclada con aditivos poliméricos) y se obtuvieron una serie de secciones transversales de 12 μm de espesor

usando un microtomo giratorio Minot. Las secciones se tiñeron tres veces con hematoxilina, safranina y Fast Green FCF según lo descrito por Johansen (1940). Las preparaciones histológicas se evaluaron usando un microscopio estándar Zeiss Model 16. Las fotomicrografías se tomaron usando un microscopio Zeiss Axiophot y las imágenes se capturaron y digitalizaron utilizando la cámara AxioCamHRc y el programa AxioVision 4.3.

Estudio de ultraestructura

Las hojas de plantas tratadas en frío por 72 h se fijaron al vacío en glutaraldehído al 2% (v/v) en buffer de fosfato (pH 7,2) durante 4 horas a 4°C. Las muestras se lavaron con buffer fosfato a intervalos de 30 minutos y se fijaron en solución de tetróxido de osmio al 1% (m/v) (OsO_4) durante 1 hora a 4 °C. Las muestras se lavaron luego con buffer fosfato y se deshidrataron a través de una serie graduada de etanol: agua (50, 70, 80, 95 y 3 veces en etanol al 100%, v/v), 10 min en cada solución. El etanol se reemplazó por acetona 3 veces, 10 minutos cada vez. Las muestras se incrustaron entonces en EPON (Shell, Londres, Reino Unido) mediante una serie de mezclas de resina: acetona (1:1, m/v) seguido de un cambio de resina:mezcla de acetona (1:2 m/v). Finalmente, las muestras se incrustaron en 100% EPON durante 1 hora a temperatura ambiente. La resina se polimerizó a 35, 45 y 60°C (12 h cada uno). Los cortes ultrafinos (60-90 nm) se realizaron con ultramicrotomo Reichert-Jung SuperNova. Las secciones se cortaron en sentido transversal a fin de que ambas capas se pudieran ver en la misma sección. Los cortes se tiñeron con acetato de uranilo al 4% en etanol al 50% por 10 min y luego con citrato de plomo durante 5 min a temperatura ambiente. La microscopía electrónica de transmisión se realizó en un JEM 1200 EX II (Tokio, Japón) que opera a 80 kV.

Evaluación de auxina

Se homogeneizaron 0,2 g de PF de hojas en IKA-ULTRATURRAX T25 basic (Staufen, Alemania) con agua desionizada acidificada (H_2O : AcH; 99: 1). Se añadieron 100 mg de [$^2\text{H}_5$] AIA como estándar interno. El homogeneizado se dejó 15 minutos en frío y se centrifugó a 5.000 g. Se recogió el sobrenadante y se ajustó el pH a 2,8 usando ácido acético al 15% (v/v). El sobrenadante se dividió dos veces contra un volumen igual de éter dietílico. La fase acuosa se descartó y la fracción orgánica se evaporó a 34°C al vacío. Los extractos secos se disolvieron en 1,5 ml de metanol (MeOH). Las muestras se filtraron en un colector de vacío a caudal $<1 \text{ ml min}^{-1}$, y el eluido se secó en un SpeedVac SC110 (Savant Instruments, Inc. NY, EE. UU.). Las muestras se resuspendieron en 50 μl de MeOH al 100% y se inyectaron 15 μl en un HPLC, Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, EE. UU.), equipado con columna RESTEK C18 (100 mm x 2,1 mm, columnas 3- μm de partícula). Las fracciones se separaron usando un gradiente de disolvente A,

MeOH; disolvente B, 0,2% (v/v) de ácido acético en agua (H₂O), velocidad de flujo inicial 0,2 ml min⁻¹. El gradiente se incrementó linealmente desde 40% (v/v) MeOH -60% (v/v) H₂O-ácido acético a los 25 min, hasta 80% (v/v) MeOH -20% (v / v) H₂O-ácido acético. Para la identificación y cuantificación de AIA se realizaron análisis de espectrofotometría de masa en un espectrofotómetro de masas en tándem cuadrupolo (MS-MS, Quattro Ultima; Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado con una fuente de iones por electrospray (ESI), en el modo de ionización negativa. La mezcla que contiene AIA endógeno y el estándar interno se analizó por espectrometría de masas en tándem con el monitoreo de reacción múltiple (MRM). Las siguientes reacciones seleccionadas se utilizaron para la determinación de AIA: m/z 174 → m/z 130 (endógeno) y m/z 180 → m/z 135 para (estándar interno, 2H5-AIA), con un tiempo de retención de 4,53 min. Se utilizó el software del espectrómetro MassLynx™ v. 4.1 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

Evaluación de citoquininas

Se homogeneizaron 0,1 g de peso seco de hoja y se extrajeron CK durante la noche en solución de Bielecky modificada (MeOH: agua: ácido metanoico (75:20:5) (v/v/v)) a -20°C de acuerdo con Granda et al. (2010). Se añadió [¹⁴C] BA (1,96 GBq / mmol, MoravekBiochemicals, Brea, CA, EE. UU.) para cuantificar las pérdidas. Las muestras se centrifugaron a 4.500 g y el sobrenadante se reextrajo con 1 ml de solución de Bielecky modificada, se incubó durante 1 h, se mezcló y se eliminó el MeOH al vacío (Savant SC-200). Se añadieron 0,6 ml de ácido metanoico 1 M, se transfirió previamente a la columna de fase inversa (Columnas C18, Varian) y se añadieron 0,2 ml dos veces.

Las muestras se eluyeron con 1 ml de 1 M methanoicacid / 80% de MeOH (v/v) en una columna de modo mixto (OASISTM MCX, Waters), bases de CK y ribósidos se eluyeron con 1 ml de 0,35 M de hidróxido de amonio / 60% de MeOH (v/v) y secado al vacío. Luego, se separó por HPLC (Waters 2695), se resuspendió en 0,15 ml de disolvente C (acetonitrilo: tampón de acetato de trietilamina 40 mM pH 7; 1:19; v/v), se filtró y se añadió alícuota de 0,1 ml a columna con gradiente de disolvente C: disolvente D (acetonitrilo 100%) de 5:95 (v/v) a 20:80 (v/v) durante 20 min y (20:80) durante 7 min. CKs fueron putativamente identificadas por co-elución con estándares de zeatina (Z), ribósido de zeatina (ZR), dihidrozeatina (DHZ), ribósidodihidrozeatina (DHZR), isopenteniladenina (IP), y isopenteniladenosina (IPA). Los eluidos se secaron y el nivel de CK se midió mediante inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) usando anticuerpos policlonales específicos (Fernandez *et al.*, 1995) según lo descrito por Centeno *et al.* (1996). El anticuerpo CK se incubó en una placa de 96 pocillos a 4 °C durante la noche y en una muestra de 0,1 ml durante 30 min con 0,1 ml de trazador (marcado con fosfatasa

alcalina). La placa se incubó después 2,5 horas a 4 °C, se lavó con tampón TBS, se le añadieron 0,2 ml de paranitrofenilfosfato y la intensidad de la reacción enzimática fue medida luego de 45 min a 37 °C. El nivel de CK fue calculado en una curva estándar realizada en los ensayos ELISA.

Análisis estadístico

Las diferencias entre medias se consideran significantes $ap \leq 0,05$, utilizando los procedimientos ANOVA de una vía, Kolmogorov-Smirnov y Newman-Keul's. Las variaciones fueron homogéneas en todos los casos.

RESULTADOS

Parámetros de crecimiento, período de recuperación y contenido de pigmentos

El PF y PS de hojas y raíces de cv. Sudafricana no se modificó por el estrés por frío (Fig. 5.1a, c). Por el contrario, el PF y PS de cv. Mejorada INTA fue superior a los valores de control (plantas no tratadas) para 6, 24 y 72 h de tratamiento con frío ($5 \pm 1^\circ\text{C}$). Los mayores incrementos (aproximadamente un 93% más que el control) se observaron para PF de hoja a las 24 y 72 h (Fig. 5.1b). Mejorada INTA también mostró PS de raíz significativamente más alto a las 24 y 72 h (Fig. 5.1d).

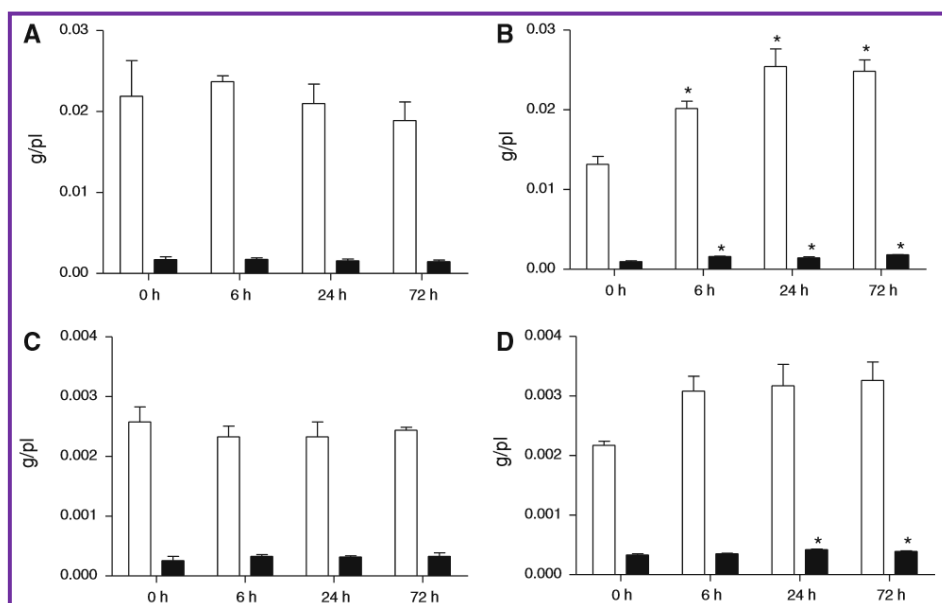


Fig. 5.1: Parámetros de crecimiento de dos cultivares de *Digitaria ariantha*. A, C: cv. Sudafricana. B, D: cv. Mejorada INTA. A, B: Peso fresco de hojas barras blancas; Peso seco de hojas barras negras. C, D: Peso fresco de raíces barras blancas; Peso seco de raíces barras negras. Datos expresados como media $\pm$ ES para $n = 3$. * Indican diferencias significativas entre muestras $ap \leq 0,05$ (Garbero *et al.*, 2012).

La longitud de la hoja y la raíz de Sudafricana no se vieron afectadas por el estrés por frío (Fig. 5.2a). En contraste, la longitud de la hoja de Mejorada INTA fue mayor que

el control para todos los tratamientos (6, 24, 72 h) y la longitud de la raíz aumentó a las 24 y 72 h (Fig. 5.2b).

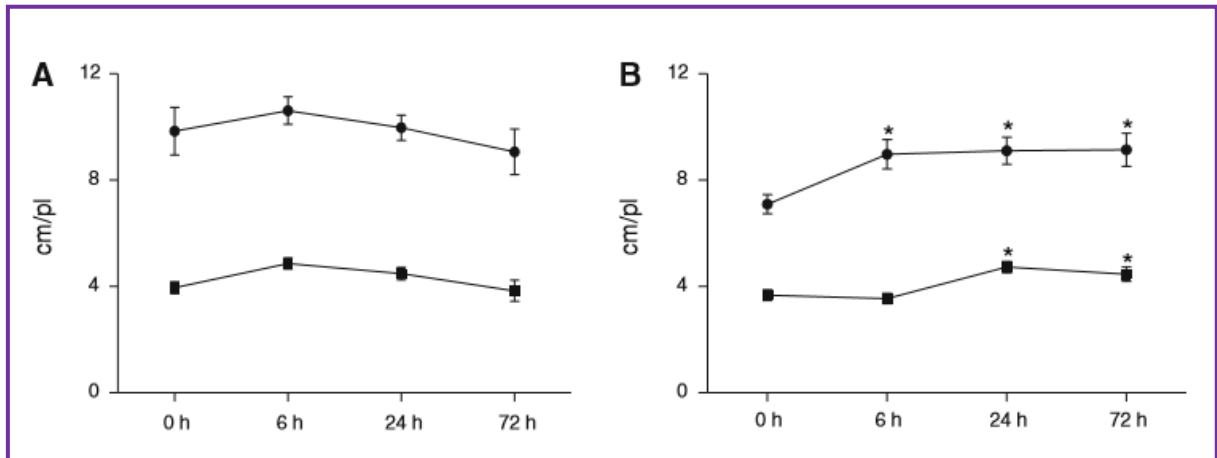


Fig. 5.2: Longitud de hojas (círculos) y raíces (cuadrados) para cv. Sudafricana (A) y Mejorada INTA (B). Datos expresados como media $\pm$ ES para $n = 3$. * Indican diferencias significativas entre muestras a $P \leq 0,05$ (Garbero *et al.*, 2012).

Durante el período de recuperación a 25 °C, el PS de la hoja de Mejorada INTA fue significativamente más alto que el de Sudafricana en los días 7, 14 y 21 (Fig. 5.3a). En los días 0 y 7 del período de recuperación, el PF foliar de ambos cultivares fue 35% más bajo que el control. Después del día 14, el PF de las hojas comenzó a aumentar ligeramente en ambos cultivares. En el día 21, el PF de las hojas fue más alto para Mejorada INTA que para Sudafricana (Fig. 5.3b). La longitud de la hoja no fue significativamente diferente ni para el cultivar en comparación con el control, ni entre los cultivares, en ningún punto durante el período de recuperación (Fig. 5.3c).

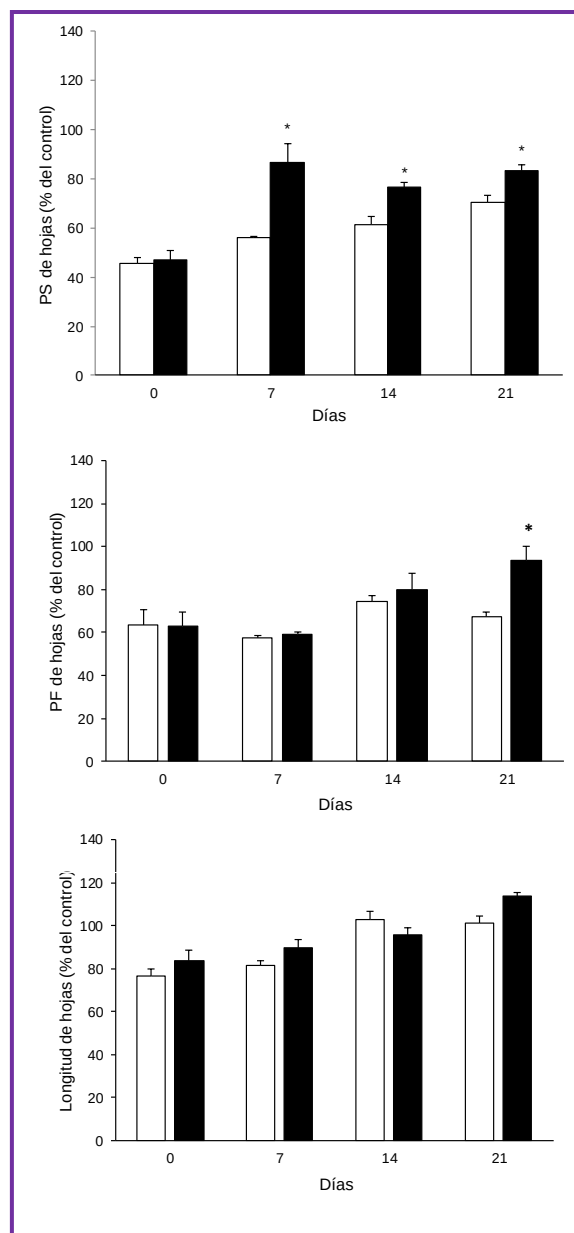


Fig. 5.3: Recuperación de hojas luego de 72 h de tratamiento con frío. PS (A), PF (B) y longitud (C) medidas a 0, 7, 14 y 21 días del periodo de recuperación. Cv. Sudafricana barras blancas. Cv. Mejorada INTA barras negras. Datos expresados como media $\pm$ ES para $n = 3$. * Indican diferencias significativas entre muestras a $P \leq 0,05$ (Garbero *et al.*, 2012)

Con respecto al contenido de pigmentos fotosintéticos, la clorofila *a* era más alta que la clorofila *b* en las hojas de ambos cultivares (Fig. 5.4a, b). En cv. Sudafricana, los niveles de clorofila *ayb* fueron 11 y 46% más altos que el control a las 6 h, luego disminuyeron después de 72 h (Fig. 5.4a). El estrés por frío no tuvo un efecto significativo en el nivel de clorofila *ao b* en Mejorada INTA (Fig. 5.4b), ni en el nivel de carotenoides en ninguno de los cultivares (Fig. 5.4a, b).

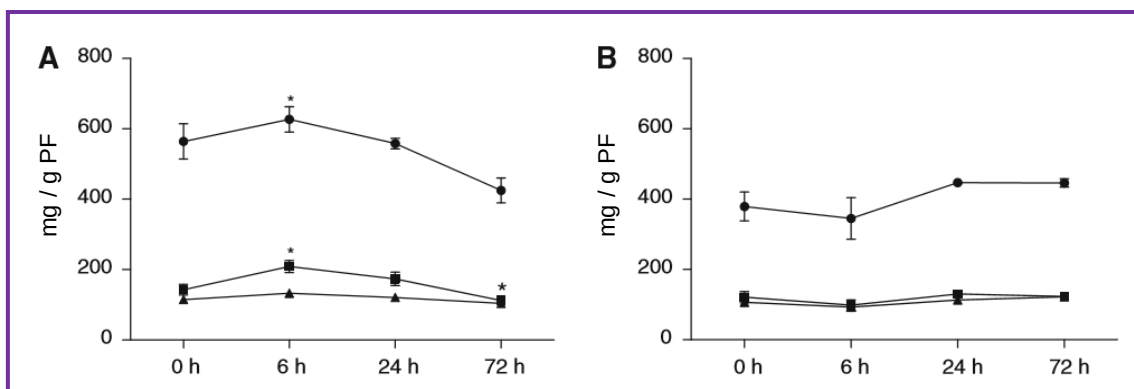


Fig. 5. 4: Niveles de clorofila *a* (círculo), clorofila *b* (cuadrado) y carotenoides (triángulo) en cv. Sudafricana (A) y Mejorada INTA (B). Datos expresados como media $\pm$ ES para $n = 3$. * Indican diferencias significativas entre muestras a $P \leq 0,05$ (Garbero *et al.*, 2012).

Estudios anatómicos

La anatomía de la región apical del tallo principal de plantas control fue similar entre Sudafricana (Fig. 5.5a) y Mejorada INTA (Fig. 5.5b). El meristema apical de la yema terminal y de las yemas axilares se observan protegidos por primordios foliares en diversas etapas de desarrollo. El meristema apical, del cual se origina la corteza y la médula del tallo, se localizó en la zona subapical. También se observaron trazas procambiales que luego se diferenciarán en tejidos vasculares. La región meristemática del brote de ambos cultivares se vio afectada diferencialmente por el estrés por frío. Las paredes celulares mostraban oscurecimiento inusual y su naturaleza celulósica estaba enmascarada por la deposición de material amorfo. Además, el contenido celular apareció precipitado. En Sudafricana, el tratamiento con frío durante 6 h dañó solo el meristema apical (Fig. 5.5c). Después de 24 h, el tallo principal y el meristema apical de las yemas axilares se vieron afectados (Fig. 5.5e). El daño por frío se generalizó después de 72 h, haciéndose menos evidente hacia la región basal del brote, donde los tejidos ya estaban diferenciados (Fig. 5.5g). En Mejorada INTA, a las 6 h no se observó daño por frío (Fig. 5.5d). Pequeñas áreas en el meristema apical se vieron afectadas a las 24 h (Fig. 5.5f) y recién luego de 72 h de tratamiento en frío el meristema apical mostró daño (Fig. 5.5h).

Digitaria es una especie C₄, con anatomía foliar Kranz típica de la subfamilia de gramíneas Panicoideae (Fig. 5.6a, Sudafricana, Fig. 5.6b, Mejorada INTA). Los haces vasculares están rodeados por las células de la vaina parenquimática que contienen numerosos cloroplastos amiláceos. Alrededor de la vaina parenquimática se encuentra un mesófilo clorofílico formado por células con una disposición radial. La estructura foliar de los dos cultivares se vio afectada diferencialmente por el estrés por frío. Las hojas de Sudafricana, después de 72 horas de frío, mostraron cloroplastos hinchados en las células

de la vaina y del mesófilo. Los cloroplastos del mesófilo aparecieron descoloridos y algunas células de la vaina y del mesófilo perdieron sus plástidos y parecían vacías (Fig. 5.6c). El frío tuvo menos efecto en las hojas de Mejorada INTA, donde solo los cloroplastos de las células del mesófilo aparecieron hinchados (Fig. 5.6d).

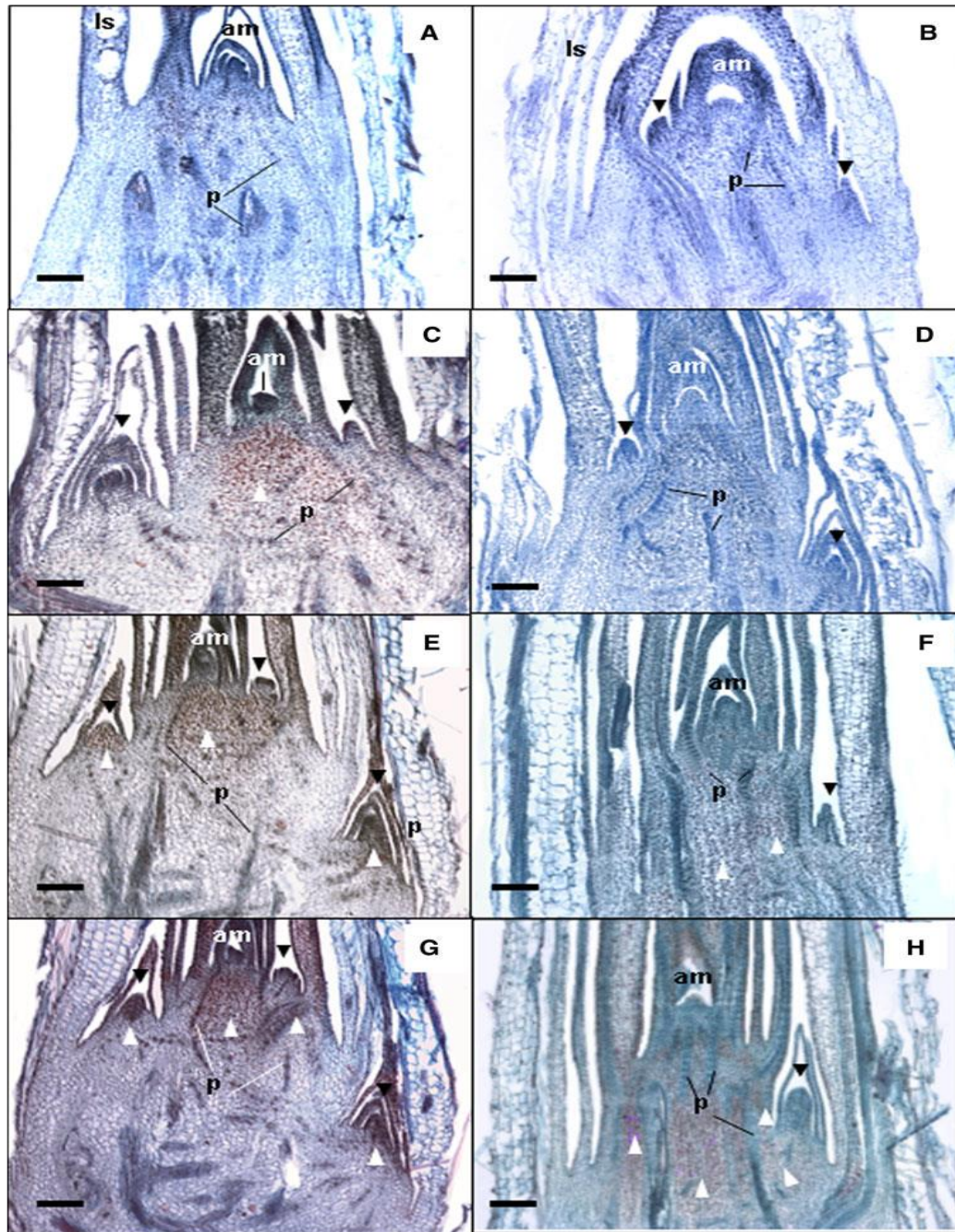


Fig. 5.5: Sección longitudinal de la región apical del tallo principal de Sudafricana (A, C, E, G) y Mejorada INTA (B, D, F, H) a las 0 h (A, B; control), 6 h (C, D), 24 h (E, F) y 72 h (G, H) de estrés por frío. Referencias: ls, vaina de la hoja; am, meristema apical; p, procambio; triángulo blanco, tejido dañado por el frío; triángulo negro, yemas axilares. Escala: 100µm (Garbero *et al.*, 2012)

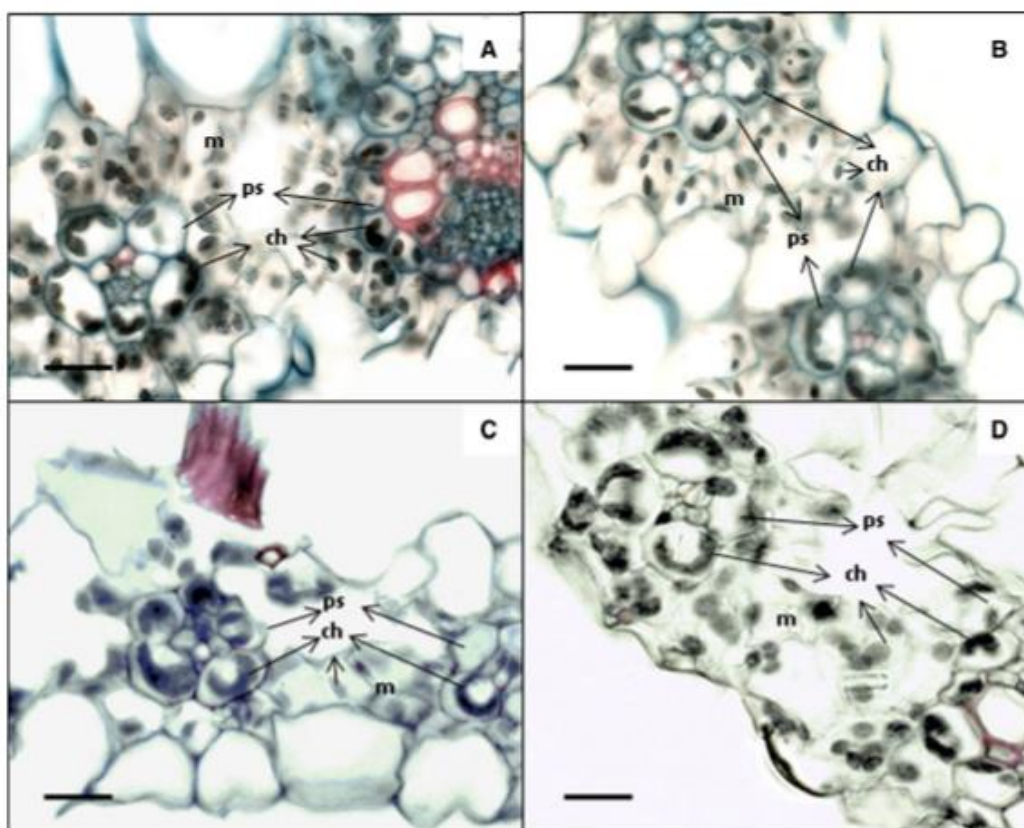


Fig. 5.6: Sección transversal de hojas de *Digitaria ariantha* cv. Sudafricana (A, C) y Mejorada INTA (B, D) en plantas control (A, B) y con estrés por frío a 72 h (C, D). Referencias: ch, cloroplastos; m, mesófilo; ps, parénquima. Escala: 10 μ m (Garbero *et al.*, 2012).

Estudios ultraestructurales

Dado que los estudios anatómicos mostraron cambios de cloroplastos en respuesta al estrés por frío, se realizó un análisis ultraestructural de estos orgánulos en células de la hoja. Para ambos cultivares, las células de la vaina de hojas de plantas control contenían grandes cloroplastos, sin grana y con granos de almidón distribuidos uniformemente que mostraban una forma elipsoidal larga (Fig. 5.7a, b). En Sudafricana, el número y el tamaño de los granos de almidón en los cloroplastos de la vaina se redujeron significativamente después de 72 h de tratamiento con frío (Fig. 5.7c), mientras que en Mejorada INTA los granos de almidón fueron similares en tamaño al control (Fig. 5.7d).

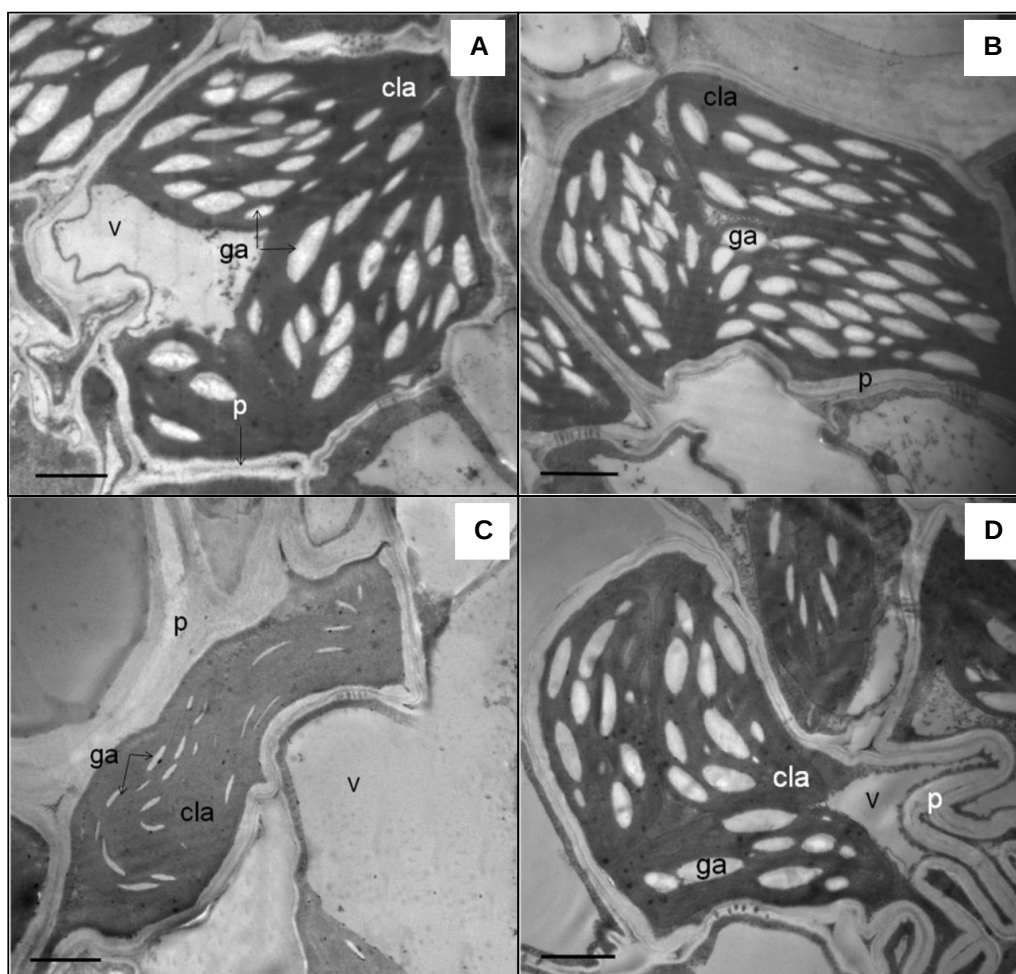


Fig. 5.7: Cloroplastos amiláceos de *Digitariaerianthacv.* Sudafricana (A, C) y Mejorada INTA (B, D) en plantas control (A, B) y con estrés por frío a 72 h (C, D). Referencias: cla: cloroplasto amiláceo; ga: gránulos de almidón; p: pared celular; v: vacuola. Escala: 1 μ m (Garbero *et al.*, 2012)

En las hojas del control de ambos cultivares, los cloroplastos del mesófilo tenían una forma elipsoidal con grandes granos de almidón, pero los cloroplastos de Mejorada INTA (Fig. 5.8b) eran más pequeños que los de Sudafricana (Fig. 5.8a). Después de 72 horas de frío, el número de granos de almidón en los cloroplastos de mesófilo se redujo en Sudafricana (Fig. 5.8c), pero en Mejorada INTA los cloroplastos del mesófilo mantuvieron su integridad y los granos de almidón fueron similares al control (Fig. 5.8d).

La ultraestructura mitocondrial fue similar en las hojas de control de ambos cultivares (Fig. 5.9a, b). Además, las mitocondrias no fueron alteradas por el tratamiento en frío en cualquiera de los cultivares (Fig. 5.9c, d).

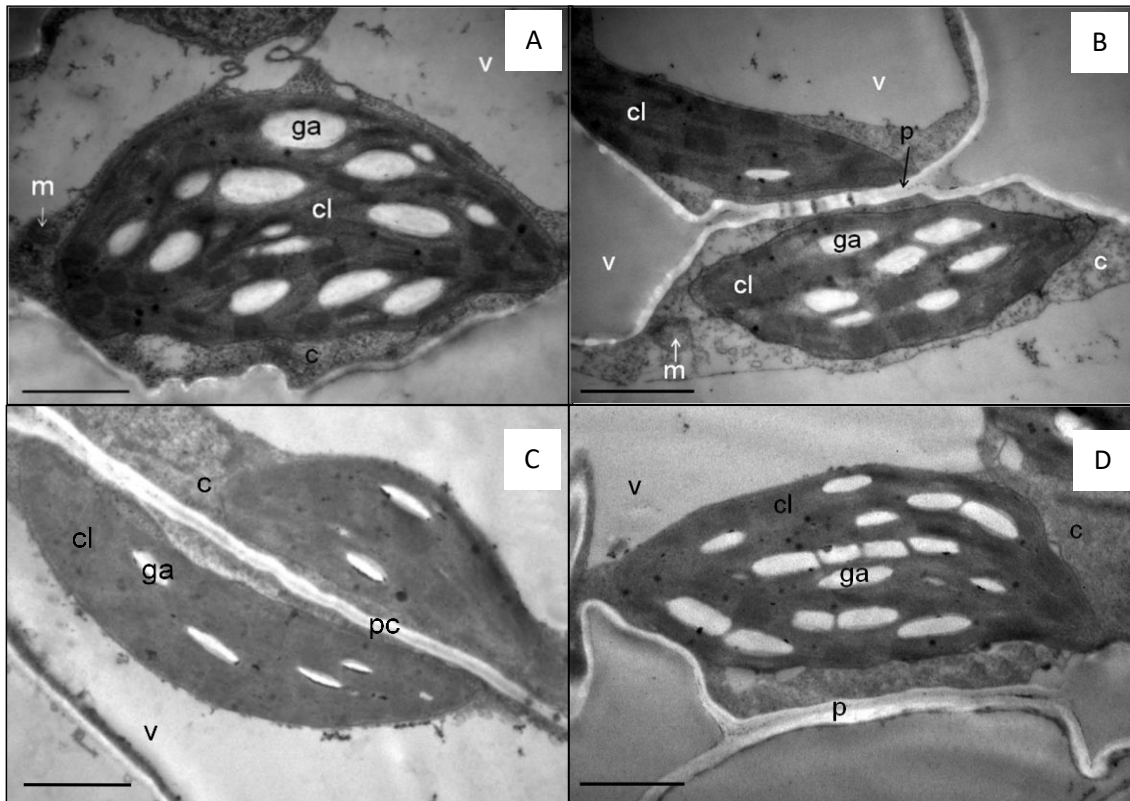


Fig. 5.8: Cloroplastos del mesófilo de *Digitaria eriantha* cv. Sudafricana (A, C) y Mejorada INTA (B, D) en plantas control (A, B) y con estrés por frío a 72 h (C, D). Referencias: c: citoplasma; cl, cloroplasto; ga: gránulos de almidón; m: mitocondria; p: pared celular; v: vacuola. Escala: 2 μ m (Garbero *et al.*, 2012).

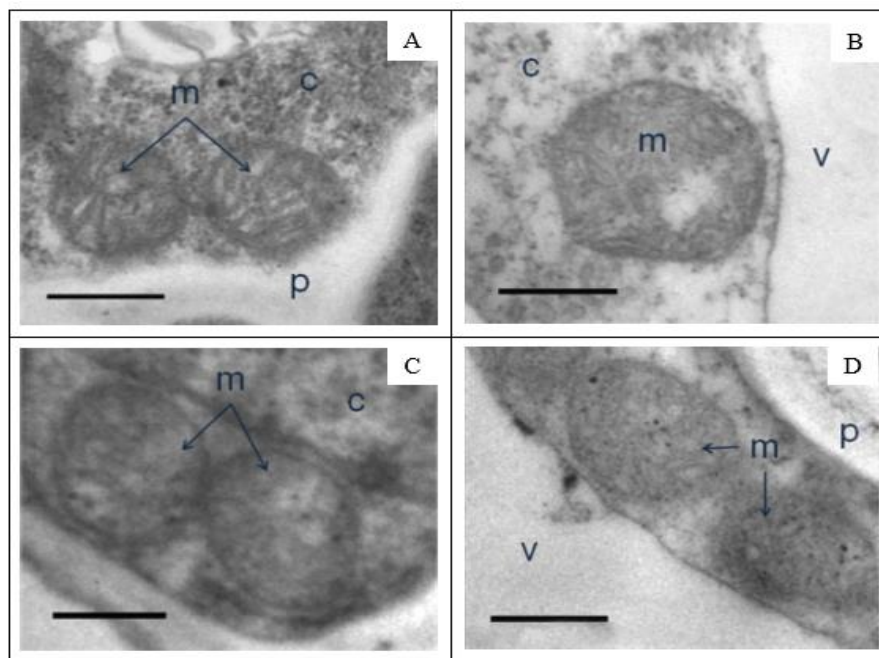


Fig. 5.9: Mitocondrias de *Digitaria eriantha* Cv. Sudafricana, A: Control, C: 72 h de frío. Cv. Mejorada INTA, B: Control, D: 72 h de frío. Referencias: c: citoplasma; m: mitocondria; p: pared celular; v: vacuola. Escala: 0,5 μ m (Garbero *et al.*, 2012).

Niveles de auxina (AIA) y citoquininas (CK) en hojas

Se encontraron niveles de auxina (AIA) y citoquininas (CK) en hojas de ambos cultivares, pero el nivel en hojas control fue mucho más alto para Sudafricana (Fig. 5.10a) que para Mejorada INTA (Fig. 5.10b). En Sudafricana, el nivel de AIA se redujo 60% a las 72 h de frío en comparación con el control (Fig. 5.10a). En contraste, en Mejorada INTA el nivel de AIA a las 24 h y 72 h de estrés por frío fue 160% y 115%, respectivamente, más alto que el nivel de las hojas control (Fig. 5.10b).

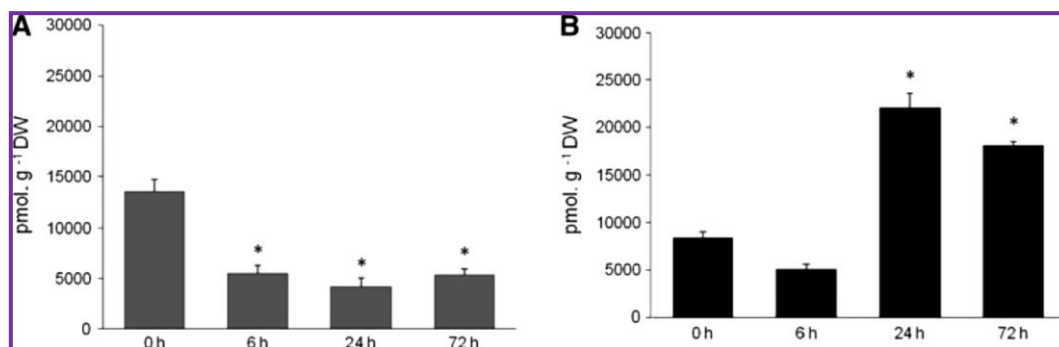


Fig. 5.10: Nivel de ácido indol-3-acético (AIA) en hojas de Sudafricana (A) y Mejorada INTA (B). Datos expresados como media $\pm$ ES para $n = 3$. * Indican diferencias significativas entre muestras a $P \leq 0,05$ (Garbero *et al.*, 2012).

Niveles de las citoquininas: isopenteniladenina (iP), isopenteniladenosina (iPA), dihidrozeatina (DHZ) y ribósido dihidrozeatina (RDHZ) se cuantificaron en hojas control y tratadas con frío en ambos cultivares. Zeatina (Z) y el ribósido de zeatina (RZ) no fueron detectables.

Después de 72 h de tratamiento con frío, el nivel de iP se redujo en un 50% en relación con el control en Sudafricana (Fig. 5.11a), pero no se modificó en Mejorada INTA (Fig. 5.11b). El nivel de iPA no se vio afectado por el frío en ninguna de las variedades (Fig. 5.11c, d). En las hojas control, los niveles de iP y iPA fueron más altos para Sudafricana (Fig. 5.11a, c) que para Mejorada INTA (Fig. 5.11b, d). En el cv. Sudafricana, DHZ y RDHZ no se detectaron en las hojas control, pero se encontraron después de 6 h de frío. En Mejorada INTA, se observó DHZ tanto en el control como a las 6 h de estrés por frío. Además, se observó RDHZ a las 6 h, pero no en hojas control (Tabla 5.1).

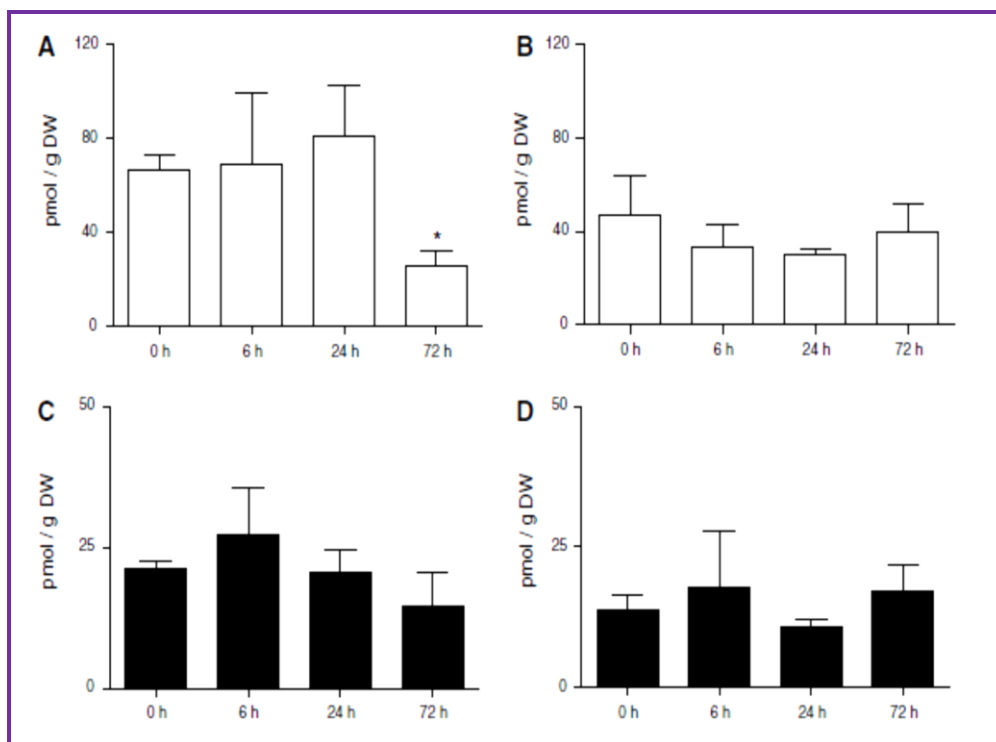


Fig. 5.11: Nivel de iso-pentenil adenina (iP) (A, B) e isopentenil adenosina (iPA) (C, D) en hojas de Sudafricana (A, C) y Mejorada INTA (B, D). Datos expresados como media $\pm$ ES para $n = 3$. * Indican diferencias significativas entre muestras a $p \leq 0,05$ (Garbero *et al.*, 2012).

Tabla 5.1: Nivel de dihidrozeatina (DHZ) y ribósido dihidrozeatina (RDHZ) en *Digitaria eriantha* cv. Sudafricana y Mejorada INTA a 6, 24 y 72 horas de estrés por frío. Datos expresados como media $\pm$ ES para $n = 3$. * Indican diferencias significativas entre muestras a $p \leq 0,05$ (Garbero *et al.*, 2012).

cv.	Tratamiento con frío (h)	DHZ (pmol/g PF)	RDHZ (pmol/g PF)
Sudafricana	0	Nd	nd
	6	28,22 $\pm$ 7,2	18,94 $\pm$ 1,4
	24	nd	nd
	72	nd	nd
Mejorada INTA	0	27,17 $\pm$ 20,3	nd
	6	29,43 $\pm$ 7,1	15,53 $\pm$ 1,0
	24	nd	nd
	72	nd	nd

nd: no detectado

DISCUSIÓN

La exposición de las plantas a bajas temperaturas induce cambios morfológicos y fisiológicos y la sensibilidad a este factor de estrés varía según las especies y los genotipos. En este estudio, cuantificamos las respuestas diferenciales al estrés por frío en cultivares de *D. eriantha* que presentaban diferente sensibilidad a las bajas temperaturas.

Los hallazgos mejoran nuestra comprensión sobre las respuestas al frío en esta importante especie forrajera y las posibles estrategias para aumentar la tolerancia al frío.

Las producciones potenciales de biomasa varían ampliamente para las plantas crecidas en condiciones estresantes. En el cultivar sensible Sudafricana, la reducción en el crecimiento de hojas y raíces (PF, PS y longitud) bajo estrés por frío, podría estar relacionado con una disminución dramática en el nivel de AIA. Otros factores estresantes abióticos también redujeron el contenido de AIA en *Phaseolus vulgaris* sensible a salinidad tratado con NaCl 100 o 150 mM (Yurekli *et al.*, 2004). En *Populus x canescens* y *P. euphratica* el estrés salino disminuyó la concentración de AIA y modificó los vasos y la pared celular (Junghans *et al.*, 2006). Recientemente, Elobeid *et al.* (2011) observaron reducciones en el crecimiento (elongación de las raíces, madera y brotes e iniciación de hojas) que estuvieron acompañados de una disminución en la concentración de auxina en las plantas de álamo expuestas a cadmio.

Con respecto a las CK, encontramos que iP fue la única CK en Sudafricana que mostró una disminución después de 72 h de tratamiento con frío. Esto sugiere que la reducción del crecimiento durante el estrés por frío estuvo más relacionada con la disminución brusca de AIA que con los niveles de CK. Sin embargo, la reducción de CK junto con la disminución del contenido de clorofila puede afectar la producción de biomasa en cv. Sudafricana bajo tratamiento con frío. Por lo tanto, en este cultivar la reducción de los niveles hormonales y el contenido de clorofila están relacionados con su sensibilidad al estrés por frío.

Por otro lado, la resistencia o sensibilidad al frío se puede estimar por la capacidad de una planta para recuperarse después de que se detenga el estrés por frío (Ercoli *et al.*, 2004). Durante el período de recuperación, cv. Sudafricana no mostró un aumento significativo en el PF o PS de las hojas, lo que indica el efecto duradero del estrés por frío en el crecimiento.

El macollaje (producción de tallos después de que el brote primario inicial haya crecido de una semilla) es un rasgo agronómico importante, ya que el número de macollos por planta determina la productividad y el rendimiento del cultivo. En cv. Sudafricana, los estudios microscópicos revelaron daños en el tallo principal que afecta el crecimiento de la planta y daños en las yemas axilares que reprimieron la producción de macollos. Esto se reflejó en la reducción del PF y PS durante el período de recuperación en plantas

tratadas con frío en comparación con las plantas de Mejorada INTA. Del mismo modo, la deposición de material amorfo y la precipitación del contenido celular en tejidos del tallo indicaron necrosis celular. Este daño fue progresivo de 6 a 72 h en ambos cultivares y fue más grave para Sudafricana.

Los síntomas ultraestructurales generales del estrés por frío son muy similares en todas las especies de gramíneas. Incluyen la hinchazón y la desorganización de los cloroplastos, el tamaño y número reducidos de granos de almidón, la dilatación de los tilacoides y el desapilado de la grana (Kratsch y Wise, 2000). Los cloroplastos de cv. Sudafricana tratados con frío estaban hinchados y descoloridos. Los estudios ultraestructurales mostraron un número reducido de granos de almidón en los cloroplastos de la vaina del haz y de las células del mesófilo. El efecto del frío fue mayor en los cloroplastos de la vaina del haz, ya que perdieron su forma y tenían el estroma no diferenciado.

Por lo tanto, los cambios en los cloroplastos de la vaina de haz de Sudafricana pueden estar relacionados con el aumento del contenido de malondialdehído (MDA) que observamos anteriormente (Garbero *et al.*, 2011). El aumento del contenido de MDA (el producto final de la peroxidación de la membrana) es un indicador importante del estrés oxidativo y en plantas de pepino se ha asociado con cambios ultraestructurales en las membranas de cloroplastos causados por el estrés por frío (Xu *et al.*, 2008).

Los cambios observados en los cloroplastos de Sudafricana a las 72 h de tratamiento con frío coinciden con un menor contenido de pigmentos fotosintéticos y un aumento en el nivel de ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) (Garbero *et al.* 2011). OPDA, el precursor en la vía de biosíntesis del ácido jasmónico, se forma a partir de membranas de cloroplastos (Weber 2002; Buseman *et al.*, 2006; Boettcher y Weiler 2007). En Sudafricana, las membranas dañadas de los cloroplastos pueden liberar una mayor cantidad de OPDA como fue propuesto por Garbero *et al.* (2011).

A diferencia de cv. Sudafricana, el contenido de clorofila bajo estrés por frío no cambió en el cv. Mejorada INTA, tolerante al frío, mostrando un proceso de fotosíntesis activo. Además, las hojas y raíces de este cultivar mostraron un crecimiento sostenido con un notable aumento de AIA a las 24 y 72 h de tratamiento con frío. Casualmente, Yurekli *et al.* (2004) informaron un aumento de AIA en *Phaseolus acutifolius*, un cultivo tolerante a la salinidad, después de 48 o 72 h de tratamiento con NaCl. Además, se observó un rápido aumento de AIA en dos especies de *Malus* con diferente capacidad para tolerar la hipoxia (Bai *et al.*, 2011). Los niveles de CK (iP y iPA) no se modificaron en el cv tolerante Mejorada INTA y esto contribuyó a su mejor crecimiento bajo estrés por frío. De manera similar, en *Euphorbia pulcherrima*, los niveles de CK se redujeron ligeramente en el cultivar tolerante al frío (Tantau y Dörffling, 1991).

En nuestros cultivares de *Digitaria*, las CK DHZ y RDHZ se detectaron bajo estrés por frío sólo a las 6 h. Por lo tanto, aún no podemos descartar la posibilidad de que estas CK desempeñen algún papel complementario en la respuesta al estrés por frío.

Como la resistencia al frío se puede estimar por la capacidad de una planta para recuperarse después de que cese el estrés por frío, en el presente estudio estimamos la capacidad de Mejorada INTA para recuperarse después de que se suspendió el estrés por frío. Encontramos que las plantas de Mejorada INTA recuperaron el PF normal y el PS unos pocos días después de que se detuviera el tratamiento con frío.

El tratamiento con frío en Mejorada INTA afectó sólo el meristema apical y la fuerte recuperación del crecimiento se puede atribuir al hecho de que los tejidos de las yemas axilares no se dañaron, lo que permitió el desarrollo normal del macollaje. Los estudios microscópicos mostraron una ligera hinchazón solamente en los cloroplastos del mesófilo y el análisis ultraestructural no reveló un efecto significativo del tratamiento con frío en los cloroplastos del mesófilo o de la vaina. Estos hallazgos son consistentes con los estudios en otras especies tolerantes al frío, por ejemplo, *Pisum sativum*, *Brassica oleracea* var. *acephala* y un cultivar de *C. sativus* que presentaba los cloroplastos intactos y una peroxidación lipídica insignificante (Wise *et al.*, 1983; Wise y Naylor, 1987; Xu *et al.*, 2008). La resistencia al frío de los cloroplastos de Mejorada INTA se confirma por la estabilidad en el contenido de MDA y de OPDA informado en nuestro estudio anterior (Garbero *et al.*, 2011) y el contenido estable de clorofilas encontrado en el presente estudio.

La falta de efecto del estrés por frío en la ultraestructura de las mitocondrias foliares en ambos cultivares de *Digitaria* es consistente con las observaciones en *Nicotiana tabacum* (Nessler y Wernsman, 1980), pepino (Wise y Naylor, 1987) y maíz (Taylor y Craig, 1971).

En conclusión, la tolerancia al frío de Mejorada INTA parece estar relacionada con la estabilidad de los niveles de clorofila y CK, el aumento de AIA y la conservación de la anatomía y la ultraestructura de los órganos de la planta. Estas características permiten un crecimiento continuo durante el estrés por frío y una recuperación rápida cuando el frío se detiene. Los cultivares tolerantes al frío, como Mejorada INTA, tendrán una importancia cada vez mayor como recursos forrajeros en áreas con climas áridos e inviernos duros.

BIBLIOGRAFÍA

- Argueso CT, Ferreira FJ, Kieber JJ. 2009. Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant Cell Environ* 2009:1–14
- Bai T, Yin R, Li C, Ma F, Yue Z, Shu H. 2011. Comparative analysis of endogenous hormones in leaves and roots of two contrasting *Malus* species in response to hypoxia stress. *J Plant Growth Regul* 30 (2):119–127
- Boettcher C, Weiler EW. 2007. Cyclo-oxilipin-galactolipids in plants: occurrence and dynamics. *Planta* 226:629–637
- Bracale M, Coraggio L. 2003. Chilling and freezing stresses in plants: cellular response and molecular strategies for adaptation. In: di Troppi LS, Pawlick-Skowronska B (eds) *Abiotic stresses in plants*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 23–52
- Buseman CM, Tamura P, Sparks AA, Baughman EJ, Maatta S, Zhao J, Roth MR, Esch SW, Shah J, Williams TD, Welti R. 2006. Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* 142:28–39
- Centeno ML, Rodríguez A, Feito I, Fernández B. 1996. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in *Actinidia deliciosa* tissue cultures. *Plant Cell Rep* 16:58–62
- Elobeid M, Göbel C, Feussner I, Polle A. 2011. Cadmium interferes with auxin physiology and lignification in poplar. *J Exp Bot.* doi:10.1093/jxb/err384
- Equiza MA, Miravé JP, Tognetti JA. 2001. Morphological, anatomical and physiological responses related to differential shoot root growth inhibition at low temperature in spring and winter wheat. *Ann Bot* 87:67–76
- Ercoli L, Mariotti M, Masoni A, Arduini I. 2004. Growth responses of sorghum plants to chilling temperature and duration of exposure. *Eur J Agron* 21:93–103
- Fernández B, Centeno ML, Feito I, Sánchez-Tamés R, Rodríguez A. 1995. Simultaneous analysis of cytokinins, auxins and abscisic acid by combined immunoaffinity chromatography, high performance chromatography and immunoassay. *Phytochem Anal* 6:49–54
- Frasinelli C, Martínez Ferrer J. 1999. Resultados preliminares en sistemas de cría e invernada. In INTA-Forrajas Avanzadas S.A. 38 Jornada Técnica sobre Digigrass (*Digitaria eriantha*). Villa Mercedes (SL). Marzo 24:3–11
- Garbero M, Pedranzani H, Zirulnik F, Molina A, Pérez-Chaca MV, Vigliocco A, Abdala G. 2011. Short-term cold stress in two cultivars of *Digitaria eriantha*: Effects on stress-related hormones and antioxidant defense system. *Acta Physiologiae Plantarum* 33(2):497–507
- Garbero M, Andrade A, Reinoso H, Fernández Muñiz MB, Cuesta Moliner C, Escudero C, Abdala G, Pedranzani HE. 2012. Differential effect of short-term cold stress on growth,

anatomy, and hormone levels in cold-sensitive versus -resistant cultivars of *Digitaria eriantha*. *Acta Physiologiae Plantarum* doi:10.1007/s11738-012-1007-x

Ghanashyam C, Jain M. 2009. Role of auxin-responsive genes in biotic stress responses. *Plant Signal Behav* 4:846–848

Granda V, Cuesta C, Álvarez R, Ordás R, Centeno ML, Rodríguez A, Majada JP, Fernández B, Feito I. 2010. Rapid responses of C14 clone of *Eucalyptus globulus* to root drought stress: Time-course of hormonal and physiological signaling. *J Plant Physiol* 168 (7):661–670

Haldimann P. 1999. How do changes in temperature during growth affect leaf pigment composition and photosynthesis in *Zea mays* genotypes differing in sensitivity to low temperature? *J Exp Bot* 50:543–550

Haldimann P, Fracheboud Y, Stamp P. 1996. Photosynthetic performance and resistance to photoinhibition of *Zea mays* L. leaves grown at sub-optimal temperature. *Plant Cell Environ* 19:85–92

Hare PD, Cress WA, Van Staden J. 1997. The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress. *Plant Growth Regul* 23:79–103

Jain M, Khurana JP. 2009. Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. *FEBS J* 276:3148–3162

Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique VI-VII*. Mc- Graw-Hill, New York

Junghans U, Polle A, DÜchting P, Weiler E, Kuhlman B, Gruber F, Teichmann T. 2006. Adaptation to high salinity in poplar involves changes in xylem anatomy and auxin physiology. *Plant Cell Environ* 29:1519–1531

Kieber JJ, Schaller GE. 2010. The perception of cytokinin: a story 50 years in the making. *Plant Physiol* 154(2):487–492

Kratsch HA, Wise RR. 2000. The ultrastructure of chilling stress. *Plant Cell Environ* 23:337–350

Lichtenthaler HK, Wellburn AR. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* 11:591–592

Nessler CL, Wernsman EA. 1980. Physiological observations of extranuclear temperature-sensitive lethality in *Nicotiana tabacum* L. *Bot Gaz* 141:9-14

Oliveira JG, da Costa Aguiar Alves PL, Vitória AP. 2009. Alterations in chlorophyll a fluorescence, pigment concentrations and lipid peroxidation to chilling temperature in coffee seedlings. *Environ Exp Bot* 67:71–76

Porra RJ. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynth Res* 73:149–156

- Ristic Z, Ashworth EN. 1993. Changes in leaf ultrastructure and carbohydrates in *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) cv Columbiaduring rapid cold acclimation. *Protoplasma* 172:111–123
- Shibasaki K, Uemura M, Tsurumi S, Rahman A. 2009. Auxin response in *Arabidopsis* under cold stress: Underlying molecular mechanisms. *Plant Cell* 21:3823–3838
- Stefanowska M, Kuras M, Kubacka-Zebalska M, Kacperska A. 1999. Low temperature affects pattern of leaf growth and structure of cell walls in winter oilseed rape (*Brassica napus* L., var. *oleifera* L.). *Ann Bot* 84:313–319
- Tantau H, Dörffling K. 1991. Effects of chilling on physiological responses and changes in hormone levels in two *Euphorbia pulcherrima* varieties with different chilling tolerance. *J Plant Physiol* 138:734–740
- Taylor AO, Craig AS. 1971. Plants under climatic stress. II. Low temperature, high light effects on chloroplast ultrastructure. *Plant Physiol* 47:719–725
- Veneciano JH. 2006. Gramíneas perennes para ambientes semiáridos: Características y productividad. Inf. Técnica 171. EEA del INTA San Luis. Argentina. ISSN 0327-425X, pp 1–77
- Weber H. 2002. Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci* 7:217–225
- Wise RR, Naylor AW. 1987. Chilling-enhanced photooxidation. The peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure. *Plant Physiol* 83:272–277
- Wise RR, McWilliam J, Naylor AW. 1983. A comparative study of low temperature-induced ultrastructural alterations of three species with differing chilling sensitivities. *Plant Cell Environ* 6:525–535
- Xu P-L, Guo Y-K, Bai J-G, Shang L, Wang X-J. 2008. Effects of long-term chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light. *Physiol Plant* 132:467–478
- Yurekli F, Porgali ZB, Turkan I. 2004. Variations in abscisic acid, indole-3-acetic acid, gibberellic acid and zeatin concentrations in two bean species subjected to salt stress. *Acta BioloCracov SerBot* 46:201–212

CAPITULO 6

Metilación del ADN genómico en dos cultivares de *Digitaria eriantha* como respuesta a bajas temperaturas.

Mariela QUIROGA, Sol GARCIA, Hilda PEDRANZANI

Resumen

Uno de los mecanismos más importante en la evolución de las plantas es la hibridación interespecífica. Este mecanismo induce cambios en el genoma que abarcan tanto alteraciones genéticas como epigenéticas. Estudios recientes muestran que los cambios epigenéticos generan variantes alélicas llamadas “epialelos” que pueden tener consecuencias morfológicas, fisiológicas y ecológicas de importancia en la evolución de las plantas. Los epialelos constituyen una nueva fuente de variabilidad que se suma a la variabilidad genética. Dada la importancia que posee la especie *Digitaria eriantha* como recurso forrajero para la zona semiárida templada central Argentina, se realizó un experimento para comparar el grado de metilación del 5-metil citosina en residuos de citocina de ADN genómico y su relación con indicadores del crecimiento. Para este estudio se seleccionó el cultivar sintético Mejorada INTA y el nativo Sudafricana. Se utilizó una metodología rápida que permite determinar la metilación del ADN genómico en 15 min. Se concluyó que el cv. Mejorada INTA es tolerante al frío, mientras que el Sudafricana es sensible. Este trabajo contribuye al conocimiento de selección temprana de germoplasma tolerante al frío.

Palabras claves: DNA, *Digitaria eriantha*, epigenética, metilación, variabilidad.

Abstracts

One of the most important mechanisms in the evolution of plants is interspecific hybridization. This mechanism induces changes in the genome that encompass both genetic and epigenetic alterations. Recent studies show that epigenetic changes generate allelic variants called "epialelos" that can have important morphological, physiological and ecological consequences on the evolution of plants. The epialelos constitute a new source of variability that adds to the genetic variability. Given the importance of the *Digitaria eriantha* species as a forage resource for the central temperate semiarid zone of Argentina, an experiment was carried out to compare the degree of methylation of 5-methyl cytosine in cytokine residues of genomic DNA and its relationship with growth indicators. The synthetic cultivar Mejorada INTA and the native Southafrican were selected for this study. A rapid methodology was used to determine the methylation of genomic DNA in 15 min. It was concluded that cv. Mejorada INTA is cold tolerant, while South African is sensitive. This work contributes to the knowledge of early selection of cold tolerant germoplasm.

Key words: DNA, *Digitaria eriantha*, epigenetics, methylation, variability.

INTRODUCCIÓN

Un concepto central del neodarwinismo es que sin variabilidad no es posible la evolución. Para que la selección natural actúe es imprescindible que exista variabilidad genética; si la variación genética de determinada población disminuye y aumenta la homocigosis, ésta se dirigiría a un camino evolutivo sin salida. Sin embargo, las poblaciones tienen en general un alto grado de heterocigosis. Una de las principales fuentes de variabilidad son las mutaciones genéticas al azar que dan lugar a cambios heredables en las secuencias de nucleótidos. Las variantes alélicas que se originan dentro de una población por mutaciones y que se recombinan en la meiosis dan lugar a fenotipos que son la base de la microevolución adaptativa. Por otro lado, es llamativo como genomas que comparten más del 90% de sus secuencias, como el del hombre y el chimpancé, presenten fenotipos tan diferentes. Recientes avances en el área de la biología y genética molecular han demostrado que existe otra fuente de variación llamada epigenética. La epigenética es el estudio de cambios heredables en la expresión y función génica que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia de ADN (Richards, 2006). Se encontró que la variación heredable no necesariamente se basa en cambios de secuencias, sino que existen cambios heredables en la expresión génica en total ausencia de variabilidad genética. Una característica fundamental del fenómeno epigenético es que está influenciado por el ambiente y un mismo genotipo puede mostrar fenotipos alternativos. Diferentes estreses pueden inducir cambios epigenéticos en un individuo, en plantas se mencionan, entre otros, el ataque de patógenos, el cultivo *in-vitro* y la hibridación interespecífica (McClintock, 1984). El objetivo de la presente revisión es describir los mecanismos epigenéticos y analizar su relación con la hibridación interespecífica, así como su influencia en la evolución de las plantas.

Mecanismos epigenéticos

Se han descrito diferentes mecanismos relacionados con el fenómeno epigenético, tales como: metilación de citosinas, modificación de histonas (acetilación y metilación) y micro y pequeños ARNs de interferencia. El mecanismo más común en plantas es la metilación en la posición 5' del anillo de citosina (5mC), los motivos que predominantemente se encuentran metilados son dinucleótidos CG y trinucleótidos CNG (siendo N cualquiera de los cuatro nucleótidos) (Martienssen y Colot, 2001). Su distribución en el genoma no es al azar y varía dependiendo del tejido y el estado de desarrollo de la planta. Las enzimas ADN metiltransferasas catalizan la formación de 5mC por transferencia del grupo metilo de la S-adenosil metionina a las citosinas del

ADN (Colot y Rossignol, 1999) (Figura 6. 1A). Se reconocen dos tipos de ADN metiltransferasas: a) las de "de novo", que añaden grupos metilo a sitios no metilados de la doble hebra de ADN y b) las de "mantenimiento", que metilan sitios en base a 5mC de una hebra molde. En *Arabidopsis thaliana* las enzimas cromometilasa 3 (CMT3) y metiltransferasa 1 (MET1) son las responsables de metilar los sitios CNG y CG, respectivamente (Kankel *et al.*, 2003). Tanto CMT3 como MET1 se encargan de mantener los patrones de metilación luego de la replicación del ADN, reconociendo cadenas hemimetiladas (5mCG/CG ó 5mCNG/CNG) e incorporando grupos metilo en las citosinas no metiladas. De esta manera los patrones de metilación se heredan tanto mitótica como meióticamente.

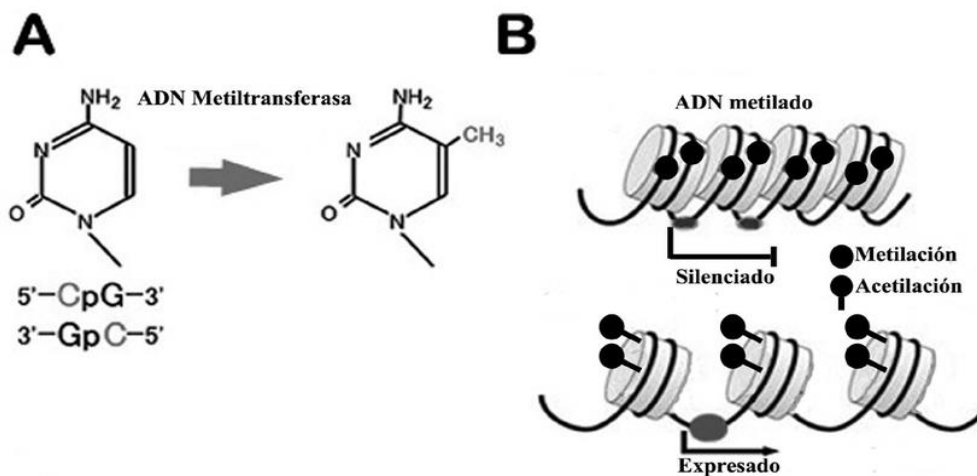


Fig.6.1: A. Agregado del grupo metilo al carbono 5' de la citosina. B. Pasaje del estado de cromatina condensada y silenciada, por desacetilación de histonas e hipermetilación del ADN, al estado descondensado y activada en el que la cromatina está desmetilada y acetilada (Massuelli y Marfil, 2011).

La metilación del ADN está directamente relacionada con el silenciamiento génico, las regiones del ADN altamente metiladas en general se encuentran silenciadas. Se demostró que anulando los genes CMT3 y MET1 se desmetila el genoma activándose elementos transponibles y genes que se encontraban silenciados. Estos estudios mostraron que la pérdida de metilación produce aberraciones tales como cambios morfológicos en hojas y flores, así como en el tiempo de floración. En plantas un proceso del desarrollo controlado epigenéticamente, es el de vernalización: la promoción de la floración por exposición de una plántula a un período de baja temperatura. La expresión de FLC, el gen clave que media esta respuesta, es reprimida por modificación de histonas en *A. thaliana*. La supresión de FLC en plantas vernalizadas está asociada con una disminución en la acetilación de la histona H3 y con un incremento en la metilación de las lisinas 9 y 27 (Bastow *et al.*, 2004). El proceso de utilización de marcas pre-existentes que guían la incorporación de nuevas marcas, descrito para el mantenimiento de la metilación,

también es aplicable para la maquinaria de modificación de histonas. La isoforma de la histona H3 que está metilada en la lisina 9, una modificación distintiva de la cromatina silenciada, recluta lisina 9 histonas metiltransferasas a través de proteínas intermediarias. Este mecanismo asegura que las marcas de histonas apropiadas sean añadidas a los nuevos nucleosomas que se van incorporando a las hebras sintetizadas tras un evento de replicación del ADN.

Los cambios en la metilación del ADN afectan la estructura de la cromatina y viceversa, sugiriendo que las dos principales marcas bioquímicas propias del estado silenciado de la cromatina se refuerzan mutuamente (Figura 6.1 B). La 5mC sirve como una guía para el establecimiento y el mantenimiento de otros códigos epigenéticos, como son las modificaciones postraduccionales de las proteínas histónicas que empaquetan el ADN en los nucleosomas. La metilación del ADN ha sido asociada con la desacetilación de la histona H3 y con la metilación de esta histona en la lisina 9 (Gendrel *et al.*, 2002), y a partir de complejos proteicos con actividad de histonas desacetilasas o histonas metiltransferasas se han aislado ADN metiltransferasas (Fuks *et al.*, 2003). Finalmente, la conexión entre la metilación del ADN y la estructura de la cromatina se ve reforzada por el hecho de que la mutación en la proteína remodeladora de la cromatina DDM1 (Decreased DNA Methylation 1) provoca una marcada reducción en la metilación del ADN (Brzeski y Jerzmanowski, 2003).

En los últimos años, pequeños ARNs no codificantes han recibido especial atención por controlar múltiples fenómenos epigenéticos (Bernstein y Allis, 2005). La interferencia asociada a ARN (iARN) es un proceso de silenciamiento postranscripcional de genes, muy conservado evolutivamente, por lo que un ARN induce la degradación secuencia-específica de secuencias de ARNm (siARNs, de doble cadena, exógenos) o la represión de la traducción (miARNs, ARNs cortos, endógenos, codificados en el genoma). Estudios recientes demuestran que ARNs pequeños, generados por la maquinaria del ARN de interferencia, pueden dirigir la metilación de citosinas y la modificación de histonas asociadas con la quiescencia transcripcional de regiones genómicas particulares (Wassenegger, 2005). Por otro lado, si bien la actividad de silenciamiento génico postranscripcional mediada por miARNs no puede considerarse de naturaleza epigenética, por no ejercer efectos de silenciamiento a largo plazo y porque no se ha podido determinar su herencia a través de las divisiones celulares, su expresión diferencial tiene efectos fenotípicos sin alterar la secuencia lineal de nucleótidos. Las interacciones entre las vías moleculares descritas, al establecer y/o reforzar diferentes estados epigenéticos sobre secuencias idénticas de ADN, alteran la afinidad de unión de proteínas que median la activación transcripcional. De esta forma, las modificaciones

epigenéticas a nivel del ADN y de los nucleosomas afectan la expresión génica y, en definitiva, el fenotipo.

Epialelos y variación natural

Los estudios sobre epigenética son recientes; en los últimos años las técnicas de biología molecular han permitido profundizar en el conocimiento de los mecanismos responsables de los fenómenos epigenéticos. Diversos estudios sobre mutantes naturales en plantas como tomate (*Solanum lycopersicum*), maíz (*Zea mays*), *A. thaliana* han demostrado que los fenotipos observados tienen bases epigenéticas. Al comparar secuencias de alelos salvajes y mutantes se comprobó que eran idénticas, sin embargo, el número y distribución de los grupos metilo en dichas secuencias variaban y explicaban los diferentes fenotipos observados; a estas mutaciones se las llama "epimutaciones" y a las variantes alélicas "epialelos". En plantas, a diferencia de lo que sucede en los animales en quienes, durante la gametogénesis, se borran los patrones parentales de metilación y se establecen nuevos patrones, en general los patrones se transmiten en forma estable de generación en generación. Las ADN metiltransferasas de mantenimiento se encargan de incorporar los grupos metilo durante la replicación del ADN y por lo tanto los epialelos son tanto meiótica como mitóticamente estables (Kakutani, 2002).

En plantas se han encontrado varios epialelos estables de ocurrencia natural. Un ejemplo interesante es el mutante Pelórica de *Linaria vulgaris*, descrito por Carl Linnaeus en 1744, donde la simetría bilateral de la flor cambia a una simetría radial en el mutante (Gustafsson, 1979). Cubas *et al.* (1999) demostraron que el mutante era un epialelo del gen *Lcyc*, que controla la simetría dorsoventral de la flor, el cual estaba altamente metilado y silenciado en el mutante. Esta modificación era heredable y el grado de metilación del gen *Lcyc* se correlacionaba con el fenotipo de la flor, de tal manera que las plantas tipo salvaje estaban parcialmente metiladas, mientras que las pelóricas e intermedias estaban altamente metiladas. Esta epimutación no era totalmente estable presentando reversiones y cierta inestabilidad somática, una misma planta podía tener una rama con flores pelóricas y otra con flores intermedias. Esta es una característica importante de las epimutaciones que la diferencian de las mutaciones genéticas que son estables durante el ciclo de vida de un individuo. El mutante en tomate *Cnr* (Colorless non-ripening) produce frutos sin color y pericarpio harinoso. Manning *et al.* (2006) descubrieron que era una epimutación que apareció en la variedad Liberto de tomate en forma natural. El epialelo *Cnr* en Liberto estaba hipermetilado en la zona promotora del gen y se encontraba silenciado. Al igual que en el caso del epialelo *Lcyc*, la epimutación *Cnr* presenta reversiones con cambios de color en el mismo fruto. Se han descrito otros epialelos naturales en plantas, tales como el alelo P1 que altera la pigmentación en maíz

(Hollick *et al.*, 1995), el silenciamiento del gen *pai2* que afecta la biosíntesis de triptófano (Bender y Fink, 1995; Melquist *et al.*, 1999) y el gen *bal* que produce enanismo y aumento de la resistencia a patógenos en *A. thaliana* (Stokes *et al.*, 2002). Los ejemplos citados indican que los epialelos tienen características distintivas de las mutaciones génicas y que constituyen un fenómeno de importancia desde el punto de vista evolutivo. La metilación global de citosinas puede ser inferida indirectamente usando enzimas de restricción sensibles a la metilación. El tratamiento con los isoesquizómeros HpaII y MspI, que reconocen sitios 5'-CCGG-3', y posterior ligamiento de adaptadores y amplificación por PCR (MSAP- Methylation -Sensitive Amplification Polymorphism) o hibridización con sondas específicas (Southern blots) se usan normalmente para monitorear el nivel de metilación dentro del genoma. Estudios recientes utilizando estas técnicas demostraron que dentro de poblaciones naturales de plantas existe variabilidad en los patrones de metilación (Cervera *et al.*, 2002; Riddle y Richards, 2002). Marfil *et al.* (2009), estudiando una población natural de *Solanum ruiz-lealii*, observaron escasa variabilidad genética medida por AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y demostraron que plantas que tenían menos de un 4% de variabilidad genética presentaban un 28% de variabilidad epigenética. En algodón se encontraron altos niveles de polimorfismo de metilación que excede el polimorfismo medido por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Keyte *et al.*, 2006). De la misma manera, (Riddle y Richards, 2002) determinaron que, mientras la variación entre líneas de *Arabidopsis* era mínima, la variación natural para los sitios metilados era significativamente superior.

Hibridación interespecífica y shock genómico.

El genoma está sometido a estreses de diferentes tipos. McClintock (1984) propuso el término estrés genómico para referirse a todas aquellas respuestas no programadas a un cambio inusual que conduce a una reestructuración extensiva del genoma. McClintock se refiere básicamente a cuatro causas de estrés: 1) cultivo de tejidos, 2) ataque de patógenos, 3) contaminantes de varios tipos y 4) cruzamientos interespecíficos. La hibridación interespecífica tanto a nivel diploide (homoploide) como poliploide (alopoliploide) es un mecanismo importante en la evolución y especiación de las angiospermas (Hegarty y Hiscock, 2005). La unión en un núcleo híbrido de dos genomas diferentes promueve una serie de remodelaciones del genoma, tanto genéticas como epigenéticas. Una forma de determinar el origen híbrido es utilizar marcadores moleculares, donde marcadores específicos de las especies parentales pueden ser identificados en el híbrido. Sin embargo, estudios recientes demuestran que tanto los híbridos diploides como poliploides experimentan remodelaciones genéticas y epigenéticas que pueden llevar a la aparición de nuevos fragmentos o la desaparición de marcadores parentales en el híbrido. En híbridos poliploides entre *A. thaliana* y *A.*

arenosa se observó inestabilidad fenotípica, cambios en la expresión génica y en los patrones de metilación (Comai, 2000; Madlung *et al.*, 2002). En autopoliploides sintéticos de *Paspalum* y *Eragrostis* se detectaron remodelaciones genéticas y alteraciones en la expresión de genes (Martelotto *et al.*, 2005; Mecchia *et al.*, 2006). En híbridos sintéticos entre *Solanum kurtzianum* y *S. tuberosum* se encontraron reestructuraciones genéticas detectadas por AFLP y cambios epigenéticos, específicamente en los patrones de metilación, en híbridos F1 y retrocruzas (Marfil *et al.*, 2006). Una de las consecuencias más interesantes de la hibridación, como disparador del "shock genómico", es la activación y movilización de elementos transponibles (ET), tales como transposones y retrotransposones. Se observó una activación masiva de ET en híbridos entre especies de *Helianthus* (Ungerer *et al.*, 2006). Trabajando con cruzamientos intergenéricos en arroz, se ha descrito una amplia activación de ET acompañada de inestabilidades epigenéticas (Wang *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 1999). No se conocen los mecanismos que podrían activar a los ET, sin embargo, es posible que por efecto de la hibridación se remuevan o remodelen marcas epigenéticas en regiones promotoras y como consecuencia se produzca una movilización masiva de estos. Michalak (2009) afirma que la activación de ET se encuentra íntimamente ligada a la regulación epigenética y de pequeños ARNs. La mayoría de los elementos repetitivos en el ADN eucariota moderadamente repetitivo está compuesta por ETs. En general la actividad de transposones es desfavorable y posiblemente tanto la metilación del ADN como los pequeños ARNs surgieron como mecanismos de control y represión de estos elementos.

Epigenética y Evolución

En híbridos sintéticos y naturales de *Solanum* se encontró que: a) plantas que presentaban flores anormales compartían un patrón de metilación similar, el cual a su vez era diferente al de las plantas con flores normales, b) la desmetilación química de plantas con flores normales daba lugar a flores anormales, c) ciertas secuencias eran particularmente sensibles a remodelar su metilación (Marfil *et al.*, 2006; Marfil *et al.*, 2009). Estos resultados muestran que en poblaciones naturales de papa se pueden estar generando variaciones epigenéticas por efecto de la hibridación. La Figura 6.2 ilustra como a través de un shock genómico por hibridación se producen alteraciones epigenéticas que dan lugar a variaciones fenotípicas que, en el caso de las especies de papa, pueden estar sujetas a la acción de la selección natural al tener la posibilidad de mantenerse por reproducción clonal (tubérculos) por varias generaciones. Este proceso podría dar lugar a la generación de nuevas formas, ecotipos o especies.

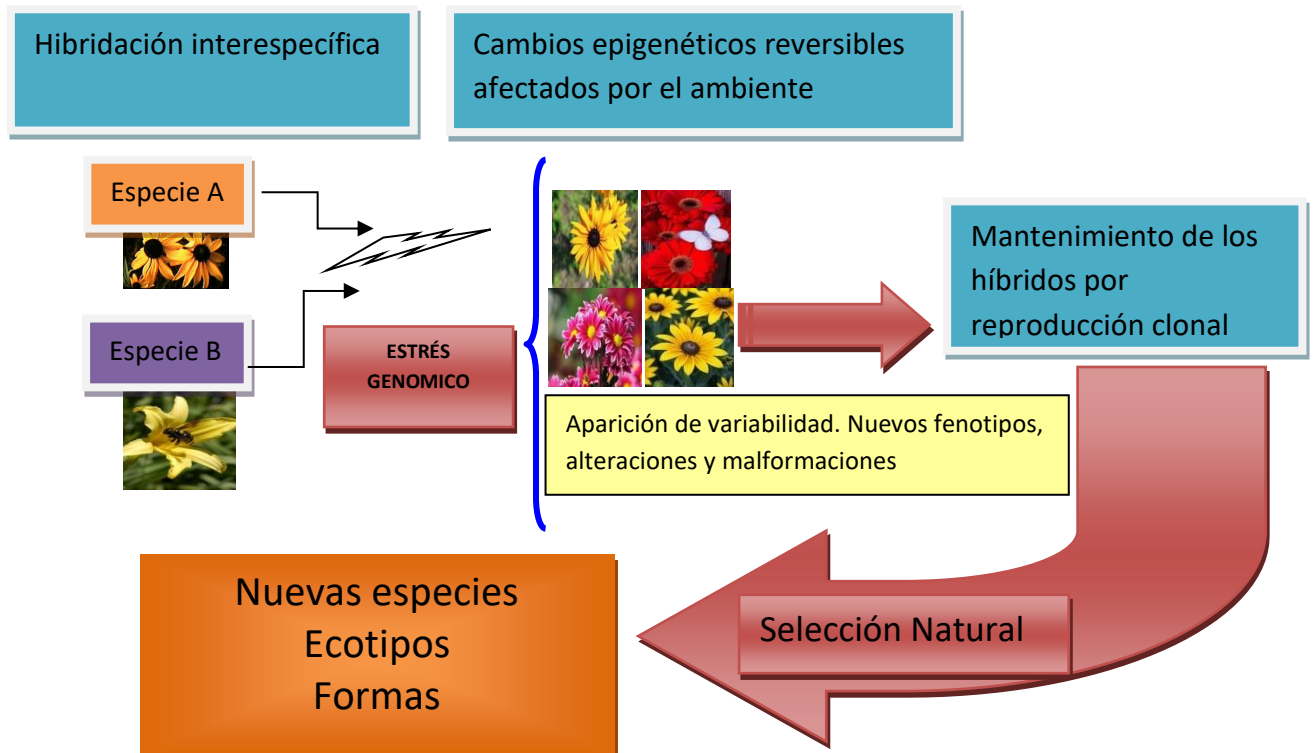


Fig.6.2: Modelo hipotético de evolución epigenética en el que por efecto de la hibridación interespecífica en *Solanum* se induce un shock genómico que produce cambios epigenéticos. Estos cambios dan lugar a fenotipos nuevos sobre los que puede actuar la selección natural, originando nuevas especies (adaptado de Massuelli y Marfil 2011, diagrama Hilda Pedranzani).

La hibridación induce una serie de cambios tanto genéticos como epigenéticos en el genoma, estando algunos de estos mediados por elementos transponibles (Chase *et al*, 2010). Estos cambios resultan en la generación de epialelos que son metaestables (eventualmente reversibles) y potencialmente influenciados por el ambiente; es innegable que este tipo de variación epigenética heredable tiene implicancias relevantes en la evolución de las poblaciones naturales. Las novedades fenotípicas generadas como: a) cambios en el tiempo de floración, b) alteraciones en las estructuras forales (simetría de la flor, color de la flor, aberraciones florales, etc.), c) disminución en la fertilidad de polen, conducirían a un aislamiento reproductivo de los híbridos en relación a las especies progenitoras; si la planta híbrida poseyera cierta fertilidad podrían establecerse como una nueva especie. Sin embargo, no se cuenta con suficiente información para evaluar como la selección natural actúa sobre este tipo de epialelos, que pueden potencialmente responder a cambios ambientales y revertir su fenotipo.

Epigenética significa “por encima de los genes”

El término fue acuñado en 1942 por el embriólogo, paleontólogo y genetista escocés Conrad Waddington para designar el estudio de las interacciones entre el genotipo y el fenotipo, es decir, entre la información codificada en los genes y aquella que efectivamente se expresa. El término epigenética es considerado una de las más importantes invenciones teóricas de Conrad Waddington (Robertson, 1977). Actualmente, el concepto de epigenética ha sido ampliado para designar el análisis causal de los procesos del desarrollo, de tal modo que su objetivo es el estudio de los mecanismos precisos por medio de los cuales el genotipo da origen al fenotipo (Morange, 2005). Una de las concepciones más importantes de Waddington sobre la epigenética, perfectamente ejemplificada por el paisaje epigenético, es la interacción entre el organismo, los genes y el ambiente durante el desarrollo, de modo que el modelo permite representar las influencias ambientales en el desarrollo y la expresión génica (Morange, 2002).

El término epigenética, no obstante, tiene múltiples significados en la actualidad y comenzó a ser utilizado con mayor frecuencia a partir de la década de los años 90. La definición común de epigenética es “el estudio de cambios en la función génica heredables mitótica o meióticamente que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia de ADN” (Russo *et al.*, 1996), o simplemente el estudio de los mecanismos por medio de los cuales los genes ejercen sus efectos fenotípicos (King *et al.*, 2006). Otro concepto hace referencia al estudio de los procesos que regulan la actividad génica por medio de modificaciones postraduccionales, la metilación del ADN o cambios cromatínicos como las modificaciones de histonas (Morange, 2005). Las publicaciones más recientes sobre el tema han abordado la epigenética de una forma más completa, reconociendo su importancia práctica y teórica en biología (Jablonka y Lamb, 2002). Los mecanismos tradicionales de regulación epigenética incluyen metilación del ADN y modificaciones de histonas, entendiendo a estas proteínas como las encargadas de empaquetar el ADN. Considerando que los dos tipos de mecanismos participan en la modulación de los complejos remodeladores de la cromatina, estos mecanismos son importantes para el establecimiento de patrones correctos de expresión génica (Morgan y Whitelaw, 2008). Estos mecanismos son modificaciones covalentes en el ADN o en la cromatina asociada, que no implican alteraciones en la secuencia del ADN, pero que tienen gran influencia sobre la expresión génica. Ocurren como consecuencia de complejas maquinarias enzimáticas, son mitótica y meióticamente estables y pueden ser adquiridas o perdidas como consecuencia de factores ambientales externos. Esto otorga mayor plasticidad a los organismos, que pueden adaptarse con mayor rapidez a su entorno (Henderson y Jacobsen, 2007). Los primeros estudios sobre aspectos epigenéticos se realizaron en sistemas animales. Sin embargo, en la actualidad existe ya cierto número de

trabajos enfocados a los sistemas vegetales. En el presente trabajo se hace una descripción basada en algunos reportes que se consideraron importantes, sobre los avances en la investigación epigenética de plantas, básicamente sobre los mecanismos de metilación.

Metilación del ADN

La metilación del ADN es el proceso epigenético mejor conocido, el cual participa en la regulación de la expresión génica de dos maneras, directamente al impedir la unión de factores de transcripción, e indirectamente propiciando la estructura cerrada de la cromatina. El ADN presenta regiones de 1000-1500 pares de bases (pb), ricas en dinucleótidos citosina-fosfato-guanina (CpG), que son reconocidas por las enzimas ADNmetiltransferasas, las cuales, durante la replicación del ADN, metilan el carbono 5 de las citosinas de la cadena recién sintetizada, manteniéndose así la memoria del estado metilado en las moléculas hijas de ADN (Salozhin *et al.*, 2005). La metilación de las citosinas en los mamíferos es un proceso bien conservado en las divisiones celulares y la falla para mantener la información epigenética correcta conlleva consecuencias graves para la célula, como a la expresión génica anormal y a la apoptosis, ambos mecanismos asociados con el desarrollo de cáncer (Haslberger *et al.*, 2006). El patrón de metilación no se mantiene constante a lo largo de toda la vida de un individuo, sino que sufre sucesivas modificaciones. En mamíferos, los cambios en el patrón de metilación más importantes se producen durante el desarrollo embrionario. Después de la fecundación, se eliminan los patrones de metilación previamente establecidos (excepto en algunas zonas con loci con impronta génica) y se establece un nuevo patrón de metilación necesario para la expresión específica de tejido de algunos genes en mamíferos, y para el “imprinting” genómico. Una vez establecidos, los nuevos patrones de metilación deben ser heredados por las células hijas. La herencia anormal de dichos patrones lleva a la formación de tumores y a procesos de envejecimiento. Los cambios en el patrón de metilación, tanto normales como en caso de enfermedad, se producen a través de tres mecanismos básicos:

1.-Metilación de novo: es la metilación de secuencias no metiladas estableciendo así un nuevo patrón de metilación. La mayor parte de la metilación de novo se produce durante el desarrollo embrionario, aunque también se da en los puntos de integración de ADN viral en el genoma y durante el envejecimiento. Aunque la metilación de novo ha sido demostrada en diferentes procesos biológicos y especies, se desconoce cómo se seleccionan las secuencias que van a ser metiladas de novo (Stewart *et al.*, 1982).

2.-Metilación de mantenimiento: es el proceso mediante el cual se mantiene el patrón de metilación después de la replicación. Cada ronda de replicación genera una

cadena de ADN de nueva síntesis no metilada, frente a la cadena complementaria vieja que sí está metilada (Goll y Bestor, 2005).

3.-Desmetilación: es el proceso que permite eliminar los patrones de metilación previos. Ocurre principalmente durante el desarrollo preimplantacional, y en general, durante todo el desarrollo. Se puede producir mediante dos procesos:

-Desmetilación pasiva: se produce una reducción gradual de los niveles de metilación debida a la ausencia de metilación de mantenimiento a lo largo de sucesivas rondas de replicación (Liu *et al.*, 2003).

-Desmetilación activa: se produce de forma independiente de la replicación de ADN, gracias a la intervención de enzimas específicas (Kress *et al.*, 2001).

Metilación del ADN de plantas

Durante la última década, la investigación en epigenética se ha enfocado principalmente en los mamíferos, mientras que las plantas han recibido menos atención. La información disponible sobre epigenética en plantas se centra en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Reinders y Paszkowski, 2009), en arroz (Akimoto *et al.*, 2007) y maíz (Wang *et al.*, 2009), entre otras.

En plantas, las modificaciones epigenéticas son de suma importancia, ya que, al llevar una vida sésil, no pueden moverse en busca de nutrientes o mejores condiciones ambientales. Las modificaciones epigenéticas en las plantas pueden ser transmisibles a la línea germinal y ser heredadas transgeneracionalmente (Takeda y Paszkowski, 2006). Entre las modificaciones epigenéticas que podemos encontrar está la metilación de citosinas del ADN, que en plantas se puede presentar en tres contextos diferentes: el clásico contexto CG y también en contextos CNG y CNN (asimétrica, siendo N cualquier nucleótido), exclusivos de plantas.

La metilación está vinculada generalmente con el silenciamiento de transposones y elementos repetitivos (Tran *et al.*, 2005).

Epigenética de plantas

Existen claras evidencias de que aproximadamente el 30% de los residuos de citosinas en el genoma vegetal se encuentra metilado (Janousek *et al.*, 2002). Aunque aún no se ha logrado descifrar completamente cómo opera este lenguaje epigenético, sí se conoce que a diferencia de los procesos genéticos los epigenéticos pueden en algunos casos ser inducidos por el ambiente (Patterson *et al.*, 1993, Cubas *et al.*, 1999, Richards, 2006, Jirtle y Skinner, 2007). De este modo los efectos epigenéticos generan un gran

número de polimorfismos sobre los cuales actúa la selección natural. Por todo ello es posible afirmar que los procesos epigenéticos juegan un papel muy significativo en la variación natural y la evolución (Bossdorf *et al.*, 2007). De hecho, éstos pueden llegar incluso a incrementar el potencial evolutivo de los organismos en respuesta a estrés abiótico y jugar un papel importante en los procesos de especiación y evolución (Rapp y Wendel, 2005; Richards, 2006). La epigenética nos ha presentado una nueva dimensión que ayuda a explicar mejor cómo las poblaciones biológicas pueden alcanzar una alta diversidad y cómo pueden en muchos casos adaptarse a inesperados y profundos cambios en su hábitat natural. Pocas especies de plantas han sido estudiadas por su variabilidad epigenética, y de las especies estudiadas, la mayoría son de interés económico para el hombre. Sin embargo, en el mundo existen miles de especies de plantas, cuyos estudios epigenéticos podrían contribuir a comprender mejor el papel del ambiente en la generación de nuevos atributos que participan en la direccionalidad de los procesos evolutivos.

Situación ambiental y especies megatérmicas

La combinación de inviernos extremadamente secos y temperaturas muy bajas determinan, para la región pampeana semiárida, una casi nula tasa de crecimiento de las pasturas perennes invernales. La alternativa de usar verdeos, si bien provee forraje de muy buena calidad, presenta como inconvenientes su alto costo de implantación, la competencia que se establece en los mejores campos con la agricultura de cosecha, el deterioro que el laboreo continuado ocasiona al suelo, y los menores rendimientos que se logran en comparación con los recursos estivales.

Estas desventajas se agravan si dicho forraje es utilizado por categorías de bajos requerimientos nutricionales, tales como vacas de cría en gestación. La mejor manera de solucionar el mencionado déficit forrajero parece consistir, consecuentemente, en la transferencia del volumen de pasto producido en verano por gramíneas perennes de ciclo estival para su utilización en la época invernal. Esto redundaría en un uso más eficiente de los recursos naturales (luz, agua, nutrientes), dado que este tipo de plantas posee un sistema fotosintetizante más eficaz (C4): los mecanismos fisiológicos de estas especies posibilitan disponer de un potencial de producción que supera con holgura al de las plantas C3. Si esa pronunciada diferencia de rendimientos no es compensada por nítidas diferencias de calidad, el cultivo de especies C3 pierde sentido. En los sistemas pastoriles bovinos los rendimientos, condicionados principalmente por la producción de forraje, pueden incrementarse con la incorporación de gramíneas cultivadas mejoradas.

Caracterizan a las especies megatérmicas elevadas tasas de crecimiento durante la estación cálida, por lo que tienden a encañar rápidamente, lo que determina una marcada disminución de su calidad. Esto se atenúa en alguna medida por estar las plantas

conformadas por componentes de muy distinto valor nutritivo (hojas y tallos florales) y de fácil discriminación (por su disposición espacial en la mata) por parte del animal.

Las gramíneas megatérmicas introducidas han cobrado importancia en el Norte de Córdoba como constituyentes de cadenas forrajeras tendientes a incrementar la productividad de los sistemas ganaderos. La adaptación de estas especies se extiende hasta la región pampeana semiárida inclusive, evidenciando en ella un comportamiento ventajoso respecto a recursos de crecimiento invernal. En esta región se reconoce al agua y al nitrógeno como los dos factores que en mayor medida limitan la producción, y en el uso de ambos es más alta la eficiencia de las especies C4. Sin embargo, la única gramínea de estas características actualmente difundida en forma masiva en la región pampeana semiárida es el pasto llorón, que precisamente carece de aptitud para ser utilizado como cultivo diferido. No obstante, otros cultivos subtropicales de aceptable diferimiento (*Digitaria*, *kleingrass*, pasto salinas) han comenzado a expandirse en diferentes ambientes del territorio provincial, aportando a la conformación de sistemas de pastoreo basados en el uso exclusivo de pasturas perennes los doce meses del año. En la comunicación que se presenta se estudió para Villa Mercedes (33° 39' lat. S – 65° 22' long. O y 515 msnm) el régimen térmico para los años 1968-9, complementándose el trabajo con otros parámetros climáticos de posible utilidad para eventuales usuarios del mismo (período libre de heladas, fechas de primera y última heladas, etc.). Se efectúan breves consideraciones referidas a la estrecha relación existente entre los factores climáticos del medio y el crecimiento de pasturas megatérmicas perennes nativas y cultivadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se sembraron semillas de *D. eriantha* de dos cultivares (Mejorada INTA y Sudafricana) en bandejas de 50 cm x 20 cm, con turba y perlita en proporción de 3:1. Se desinfectaron las semillas con detergente comercial agitando por 5 min; posteriormente se lavaron con agua bidestilada y se colocaron en agua con hipoclorito de sodio al 20% durante 15 min. Finalmente se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril en flujo laminar. Las semillas se sembraron sobre vermiculita estéril y se regaron con una solución del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962). Se colocaron en cámara de cultivo a 25°C, con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad durante 30 días; después se realizaron los tratamientos con frío a 10°C con luz por períodos de 24, 48 y 72 h, y el testigo permaneció a 25°C. Posteriormente se extrajo el material vegetal que se almacenó a -80°C para su estudio de metilación de ADN. Para obtener el porcentaje total de metilación del ADN genómico se desarrolló un protocolo basado en la electroforesis capilar de alta resolución (HPCE), mediante la cual es posible determinar el grado de metilación del ADN genómico en menos de 15 minutos (Fraga *et al.*, 2000). El proceso

de determinación de metilación de ADN se hizo en cuatro etapas básicas: a) Extracción de ADN b) Cuantificación de la concentración de ADN mediante el espectrofotómetro c) Hidrólisis enzimática d) Electroforesis capilar. Todas las separaciones se realizaron mediante un capilar de sílice abierto (600 x 0,075 mm, longitud efectiva 540 mm) que fue montado en un equipo de electroforesis capilar (Capillary Ion Analyzer, CIA), conectado a una unidad de procesamiento de datos Millennium 2010 (todos de marca Waters Chromatography S.A.). Las lecturas de las muestras se tomaron por duplicado y cada muestra tuvo cuatro repeticiones. Las lecturas del CIA aportaron los valores de área de citosina (C), 5-metil citosina (5-mc), adenina, timina y guanina. Los dos primeros valores fueron tomados como referencia para cuantificar la metilación del ADN mediante el cálculo del porcentaje relativo de 5-mc de la siguiente forma:

$$\% \text{ 5mc} = \frac{\text{Área de 5-mc} \times 100}{(\text{Área 5-mc} + \text{área C})}$$

Donde: 5-mc= 5-metil citosina C= citosina

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 6.1 se observan variaciones en el porcentaje de metilación de ADN en el cv. Mejorada INTA. Existieron diferencias significativas a las 24 y 48 h de tratamiento a 10°C de temperatura con respecto al control; esta diferencia desapareció a las 72 hs. Por su parte, el cv. Sudafricana no mostró diferencias significativas en el porcentaje de metilación de ADN en los tratamientos de 24, 48 y 72 h a 10°C comparados con el control; no obstante, se observaron diferencias significativas a las 72 h con relación a 24 y 48 h de tratamiento a bajas temperaturas.

Tabla 6.1: Metilación de ADN genómico expresado en porcentaje.

Tiempo de Exposición	% 5-mc	
	cv. Mejorada INTA	cv. Sudafricana
a 10°C		
Control	77.724 a	74.201 ab
24 h	34.030 b	67.983 b
48h	29.154 b	66.961 b
72h	76.019 a	76.993 a

a, b Letras distintas expresan diferencias significativas entre el control y los tratamientos (Duncan, 1955) ($R^2 = 0,60$; CV= 7,83) (Quiroga *et al.*, 2004)

Como es conocido, la metilación de residuos citosina en el ADN genómico supone un mecanismo de control génico (Razin y Riggs, 1980). En las plantas, al igual que en el resto de las eucariotas, la metilación sitio específica de promotores y secuencias

codificantes de genes inhibe la unión de proteínas reguladoras y puede, por lo tanto, reprimir la transcripción (Ehrlich y Ehrlich, 1993). Además, las investigaciones recientes parecen confirmar que la metilación del ADN genómico es esencial para el desarrollo normal en las plantas (Kakutani, Jeddeloh y Richards, 1995; Kakutani, Jeddeloh, Flowers, Munakata y Richards, 1996; Finnegan, Peacock y Dennis, 1996; Kakutani, 1997) y los animales (Banks y Fedoroff, 1989). También la sequía y las heladas son condiciones ambientales que causan efectos adversos en el crecimiento de las plantas y en la productividad de los granos. Las plantas responden a estos estreses tanto a nivel molecular, como celular y fisiológico. Distintos tipos de estrés inducen la expresión de una amplia gama de genes relacionados con la respuesta al ambiente y, como consecuencia, se sintetizan variados productos metabólicos (Thomashow, 1994; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996). En el cv. Sudafricana (sensible) la falta de metilación en todos los tiempos de tratamiento con frío, permite suponer una ausencia de respuesta de este cultivar al estrés aplicado. En el cv. Mejorada INTA (tolerante) los niveles de metilación de 5-metil citosina disminuyeron en los primeros tiempos postratamiento (24 y 48 h) y se recuperaron los niveles cercanos al control a las 72 h de tratamiento, coincidente con el incremento del crecimiento y la recuperación de la planta en sentido amplio (Quiroga, 2003). Las diferencias observadas en el cv. Avanzada INTA en los porcentajes de metilación de ADN genómico, probablemente se deban a que dicho cultivar activa rápidamente un mecanismo de control que induce la desmetilación de bases, lo cual permitiría desreprimir genes que se expresarían en proteínas de defensa tales como: proteínas del canal de agua, proteinasas (CLP proteasa, ubiquitina, etc.), proteínas LEA, proteínas kinasas, etc. (Kishor, Hong, Miao, Hu y Verma, 1995). Por su parte, el cv. Sudafricana no parece captar la señal del estrés por frío, ya que los niveles de metilación fueron similares a lo largo del tratamiento a las 24, 48 y 72 h a 10°C de temperatura, lo cual representa una falta de desrepresión de genes asociados a mecanismos de control antiestrés; esta tendencia tiene correlación con la falta de regulación del crecimiento en esas condiciones (Quiroga, 2003), debido probablemente a que su memoria genética no prevé la aclimatación a bajas temperaturas. Así mismo, se considera que es la primera vez que se informa la metilación del ADN genómico en plantas de *D. eriantha* relacionado con el estrés por bajas temperaturas y se le reconoce como un factor regulador de mecanismos de respuesta frente a esta señal. También es una contribución al estudio de respuestas tempranas a nivel molecular de las plantas frente al estrés y conducentes a seleccionar germoplasma de *D. eriantha* con una mayor tolerancia al frío.

BIBLIOGRAFIA

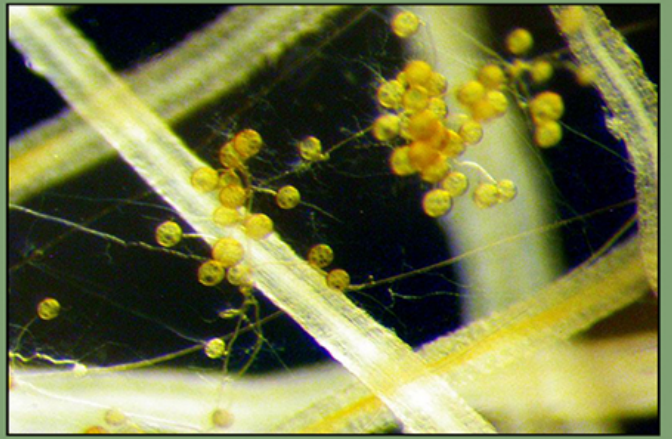
- Akimoto K, Katakami H, Kim HJ, Ogawa E, Sano CM, Wada Y, Sano H. 2007. Epigenetic inheritance in rice plants. *Annals of Botany* 100: 205-17.
- Banks JA, Fedoroff N. 1989. Patterns of developmental and heritable change in methylation of the Suppressor-mutator transposable element. *Gen. Dev.* 10:425.
- Bastow R, Mylne JS, Lister C, Lippman Z, Martienssen RA, Dean C. 2004. Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature* 427: 164-167.
- Bender J, Fink GR. 1995. Epigenetic control of an endogenous gene family is revealed by a novel blue fluorescent mutant of *Arabidopsis*. *Cell* 83: 725-734.
- Bernstein E, Allis CD. 2005. RNA meets chromatin. *Genes Dev* 19: 1635-1655.
- Bossdorf O, Richards C, Pigliucci M. 2007. Epigenetics for ecologists. *Ecology Letters* 10: 1-10.
- Brzeski J, Jerzmanowski A. 2003. Deficient in DNA methylation 1 (DDM1) defines a novel family of chromatin-remodeling factors. *J Biol Chem* 278, 823-828.
- Cervera MT, Ruiz-García L, Martínez-Zapater JM. 2002. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *MGG* 268: 543-552.
- Chase M, Paun O, Fay M. 2010. Hybrid matic histone H3 methylation patterns on the *Arabidopsis* geneization and speciation in angiosperms: a role for pollinator shifts. *BMC Biology* 8: 45.
- Colot V, Rossignol JL. 1999. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *BioEssays* 21: 402-411.
- Comai L. 2000. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plant. *PMB* 43: 387-399.
- Cubas P, Vincent C, Coen E. 1999. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* 401: 157-161.
- Ehrlich M, Ehrlich K. 1993. Effects of DNA methylation on the binding of vertebrate and plant proteins to DNA. In: *DNA methylation: biological significance*. (Eds. J.P. Jost and H.P. Saluz). Birkhauser Verlag, Boston. p. 145.
- Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES. 1996. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:8449.
- Fraga MF, Rodríguez R, Cañal MJ. 2000. Rapid quantification of DNA methylation by high performance capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 21:2990
- Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T. 2003. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 31:2305-2312.
- Gendrel AV, Lippman Z, Yordan C, Colot V, Martienssen RA. 2002. Dependence of heterocro DDM1. *Science* 267:1861-1863.

- Goll MG, Bestor TH. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry* 74: 481-514.
- Gustafsson A. 1979. Linnaeus peloria: the history of a monster. *Theor Appl Gen* 54: 241-248.
- Haslberger A, Varga F, Karlic H. 2006. Recursive causality in evolution: a model for epigenetic mechanisms in cancer development. *Medical Hypotheses* 67: 1448-54.
- Hegarty JM, Hiscock SJ. 2005. Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. *New Phytologist* 165: 411-423.
- Henderson I, Jacobsen S. 2007. Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447: 418-24.
- Hollick JB, Patterson GI, Coe-Jr EH, Cone KC, Chandler VL. 1995. Allelic interactions heritably alter the activity of a maize pl allele. *Genetics* 141: 709-719.
- Jablonka E, Lamb M. 2002. The changing concept of epigenetics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 981: 82-96.
- Janousek B, Matsunaga S, Kejnovsky E, Zluvova J, Vyskot B. 2002. DNA methylation analysis of a male reproductive organ specific gene (MROS1) during pollen development. *Genome* 45: 930-938.
- Jirtle RL, Skinner MK. 2007. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics* 8: 253-262.
- Kakutani T. 2002. Epialleles in plants: Inheritance of epigenetic information over generations. *Plant Cell Physiol* 43: 1106-1111.
- Kakutani T. 1997. Genetic characterization of lateflowering traits induced by DNA hypomethylation mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 12:1447.
- Kakutani T, Jeddloh JA, Richards EJ. 1995. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* DNA hypomethylation mutant. *Nucleic Acids Res.* 23:130.
- Kakutani T, Jeddloh JA, Flowers SK, Munakata K, Richards EJ. 1996. Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:12406.
- Kankel MW, Ramsey DE, Stokes TL, Flowers SK, Haag JR, Jeddloh JA, Riddle NC, Verbsky ML, Richards EJ. 2003. *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* 163: 1109-1122.
- Kishor PBK, Hong Z, Miao GH, Hu CAA, Verma DPS. 1995. Overexpression of D'-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology.* 108:138.
- Keyte AL, Percifeld R, Liu B, Wendel JF. 2006. Intraspecific DNA Methylation Polymorphism in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *J Hered* 97: 444-450.
- King R, Stansfield W, Mulligan P. 2006. A dictionary of genetics. Oxford University Press. New York.

- Kress C, Thomassin H, Grange T. 2001. Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted? *FEBS Letters* 494: 135-40.
- Liu B, Piao H, Zhao F, Liu Z, Huang B. 1999. DNA methylation changes in rice induced by *Zizania latifolia* (Griseb.) DNA introgression. *Hereditas* 131: 75-78.
- Liu L, Wylie RC, Andrews LG, Tollefsbol TO. 2003. Aging, cancer and nutrition: the DNA methylation connection. *Mechanisms of Ageing and Development* 124: 989-98.
- Madlung A, Masuelli RW, Watson B, Reynolds SH, Davison J, Comai L. 2002. Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Physiol* 129: 733-746.
- Manning K, Tor M, Poole M, Hong Y, Thompson AJ, King GJ, Giovannoni JJ, Seymour GB. 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat Genet* 38: 948-952.
- Marfil CF, Masuelli RW, Davison J, Comai L. 2006. Genomic instability in *Solanum tuberosum* x *Solanum kurtzianum* interspecific hybrids. *Genome* 49: 104-113.
- Marfil C, Camadro E, Masuelli R. 2009. Phenotypic instability and epigenetic variability in a diploid potato of hybrid origin, *Solanum ruizlealii*. *BMC Plant Biology* 9: 21.
- Massuelli R, Marfil C. 2011. Variabilidad epigenética en plantas y evolución. *Journal of Basic & Applied Genetics*. 22. Issue 1. Article 1.
- Martelotto LG, Ortiz JPA, Stein J, Espinoza F, Quarín CL, Pessino SC. 2005. A comprehensive analysis of gene expression alterations in a newly synthesized *Paspalum notatum* autotetraploid. *Plant Sci* 169: 211-220.
- Martienssen RA, Colot V. 2001. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science* 293: 1070-1074.
- McClintock B. 1984. The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226: 792-801.
- Mecchia MA, Ochogavía A, Selva JP, Laspina N, Felitti S, Martelotto L, Spangenberg G, Echenique V, Pessino SC. 2006. Genome polymorphisms and gene differential expression in a 'back-and-forth' ploidy-altered series of weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*). *J Plant Physiol* 164: 1051-1061.
- Melquist S, Luff B, Bender J. 1999. *Arabidopsis* PAI gene arrangements, cytosine methylation and expression. *Genetics* 153: 401-413.
- Michalak P. 2009. Epigenetic, transposon and small RNA determinants of hybrid dysfunctions. *Heredity* 102: 45-50.
- Morange M. 2002. The relations between genetics and epigenetics. A historical point of view. *Annals of the New York Academy of Sciences* 981: 50-60.
- Morange M. 2005. Quelle place pour l'épigénétique. *Medecine/Sciences* 21: 367-369.
- Morgan, D. K., E. Whitelaw. 2008. The case for transgenerational epigenetic inheritance in humans. *Mammalian Genome* 19: 394-7.

- Morgan DK, Whitelaw, E. 2008. The case of transgenerational epigenetic inheritance in humans. *Mamm Genome* 19: 394–397.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum*. 15:473.
- Patterson G, Thorpe C, Chandler V. 1993. Paramutation, an allelic interaction, is associated with a stable and heritable reduction of transcription of the maize regulatory gene. *Genetics* 135: 881-894.
- Quiroga AM. 2003. Respuestas morfofisiológicas de *Digitaria eriantha* Steudel subsp. *eriantha* y producción de callos como germoplasma factible para seleccionar plantas resistentes al frío. Tesis presentada en opción al Título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ingeniería y Ciencias Económico-Sociales. Universidad Nacional de San Luis, Argentina. 66 p.
- Quiroga AM, Pedranzani H, Rodriguez R, Abdala G. 2004. Metilación de ADN genómico en dos cultivares de *Digitaria eriantha* a bajas temperaturas. *Pastos y Forrajes* (27) 4: 317-320
- Rapp R, Wendel J. 2005. Epigenetics and plant evolution. *New Phytologist* 168: 81-91.
- Razin A, Riggs A. 1980. DNA methylation and gene function. *Science*. 210:604
- Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. 1996. Molecular responses to drought and cold stress. *Current Opinions in Biotechnology*. 7:161.
- Reinders J, Paszkowski J. 2009. Unlocking the Arabidopsis epigenome. *Epigenetics* 4: 557-63.
- Richards EJ. 2006. Inherited epigenetic variation – revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics* 7: 395-401.
- Riddle NC, Richards EJ. 2002. The control of natural variation in cytosine methylation in arabidopsis. *Genetics* 162: 355-363.
- Robertson A. 1977. Conrad Hal Waddington. 8 November 1905-26 September 1975. *Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society* 23: 575–622.
- Russo V, Martienssen R, Riggs A. 1996. Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Salozhin SV, Prokhorchuk EB, Georgiev GP. 2005. Methylation of DNA of the major epigenetic markers. *Boichemistry* 70: 525-532.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 1996. Molecular responses to drought and cold stress. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 2,161-167.
- Stewart CL, Stuhlmann H, Jahner D, Jaenisch R. 1982. De novo methylation. Expression and infectivity of retroviral genomes introduced into embryonal carcinoma cells. *Proceedings of National Academy of Science* 79: 4098-102.
- Stokes TL, Kunkel BN, Richards EJ. 2002. Epigenetic variation in Arabidopsis disease resistance. *Genes Dev* 16: 171-182.

- Takeda S, Paszkowski J. 2006. DNA methylation and epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Chromosoma* 115: 27-35.
- Thomashow MF. 1994. *Arabidopsis thaliana* as a model for studying mechanisms of plant cold tolerance. In: *Arabidopsis*. (Meyrowitz, E. and Somerville, C., Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. p. 807.
- Tran RK, Henikoff J, Zilberman D, Ditt R, Jacobsson S, Henikoff S. 2005. DNA methylation profiling identifies CG methylation clusters in *Arabidopsis* genes. *Current Biology* 15: 154-159.
- Ungerer MC, Strakosh SC, Zhen Y. 2006. Genome expansion in three hybrids sunflower species is associated with retrotransposon proliferation. *Curr Biol* 16: 876-873.
- Wang H, Chai Y, Chu X, Zhao Y, Wu Y, Zhao J, Ngezahayo F, Xu CG, Liu B. 2009. Molecular characterization of a rice mutator-phenotype derived from an incompatible cross-pollination reveals trans-generational mobilization of multiple transposable elements and extensive epigenetic instability. *BMC Plant Biology* 9: 63.
- Wang X, Elling A, Li X, Li N, Peng Z, He G, Sun H, Qi Y, Liu X, Deng X. 2009. Genome-wide and organ specific landscapes of epigenetic modifications and their relationships to mRNA and small RNA transcriptomes in maize. *Plant Cell* 21: 1053-69.
- Wassenegger M. 2005. The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell* 122: 13-16.



MÓDULO MITIGACIÓN DEL ESTRÉS POR ASOCIACIONES SIMBIÓTICAS



CAPITULO 7

Mitigación del estrés abiótico en *Digitaria eriantha* Steudel cvs. Sudafricana y Mejorada INTA por asociación con *Azospirillum brasilense* cepas Az39 e ipdC.

Romina OSSES, Oscar MASCIARELLI, Mariela QUIROGA, Hilda PEDRANZANI

Resumen

Digitaria eriantha Steudel es una especie forrajera adaptada a áreas de pastoreo, pero con sensibilidad a bajas temperaturas, estrés hídrico y salinidad. Las poblaciones bacterianas promotoras de crecimiento vegetal PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria) poseen la capacidad de colonizar el sistema radicular de plantas y mitigar los estreses. El objetivo del presente trabajo es estudiar el comportamiento de dos cultivares de *D. eriantha* cv. Sudafricana y Mejorada INTA, en asociación con *A. brasilense* cepa Az39 y *A. brasilense* cepa ipdC frente a diferentes estreses abióticos. Se sembraron semillas inoculadas y sin inocular en maceta y se colocaron en cámara 23:21°C (día: noche) con un fotoperiodo 16:8 (día: noche) con una densidad de flujo de fotones de 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Cuando las plantas tuvieron diez cm de alto, se sometieron a los diferentes tipos de estrés (frío, sequía y salinidad). Finalizados los tratamientos de estrés, se midieron diferentes bioparámetros de crecimiento. Los dos cultivares de *D. eriantha* hicieron asociaciones con ambas bacterias, y la mejor respuesta se obtuvo con la cepa hipoprodutiva *A. brasilense* cepa ipdC con el cv. Mejorada INTA, donde se vieron incrementados todos los parámetros medidos, expresando esta asociatividad la habilidad de mitigar todos los estreses.

Palabras clave biomasa, crecimiento, mitigación del estrés, PGPR, simbiosis.

Abstract

Digitaria eriantha Steudel is a forage species adapted to grazing areas but sensitive to low temperatures, water stress and salinity. The promoter's bacterial populations of plant growth PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria) have the ability to colonize the root system of plants and mitigate stresses. The aim of this work is to study the behavior of two cultivars of *D. eriantha* cv. Sudafricana and Mejorada INTA, in association with *Azospirillum brasilense*, strain Az39 and ipdC (hyper production and low production producer of auxins, respectively) and their behavior in different abiotic stresses. Inoculated and uninoculated seeds were planted in pots and placed in chamber C 23:21 (day: night) with a photoperiod 16:8 (day: night) with a photon flux density of 300 $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. When the plants were ten cm high they were subjected to different types of stress (cold, drought and salinity). Finalized stress treatments, growth parameters were measured. The two cultivars of *D. eriantha*, made association with both bacteria and the best combination was obtained with the strain *A. brasilense* strain ipdC with cv. Mejorada INTA, in which all measured parameters were increased expressing in this associativity the ability to mitigate all types of stresses that were studied.

Key words, biomass, growth, mitigation of stress, PGPR, symbiosis.

INTRODUCCIÓN

La rizósfera es la zona localizada entre las raíces de la planta y el suelo que la rodea (Dijkstra *et al.*, 2014), la cual está conformada por tres áreas, que son la ectorizósfera, rizoplasma y endorizósfera (Johansson *et al.*, 2004). La rizósfera es el ecosistema con mayor diversidad microbiana del suelo (Rovira y Davey, 1974; Lynch y Whipps, 1991). Los microorganismos presentes en la rizósfera intervienen en los ciclos de los nutrientes del sistema suelo-planta (Singh y Mukerji, 2006). Las poblaciones bacterianas de este microambiente se ven influenciadas principalmente por los compuestos orgánicos que segrega la planta como los ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares, ácidos fenólicos, flavonoides, enzimas, etc., así como por la disponibilidad de nutrientes, pH y textura del suelo (Stafford *et al.*, 2005; Singh y Mukerji, 2006; Raaijmakers *et al.*, 2009). Los microorganismos asociados a la raíz establecen sinergismos con las plantas de dos maneras principales: las que forman una relación simbiótica (*Rhizobium*-Leguminosas) y las de vida libre, las cuales se pueden encontrar en el suelo, sobre o dentro de los tejidos de la planta (Kloepper *et al.*, 1988a; Frommel *et al.*, 1991). Las bacterias de vida libre que promueven el desarrollo de la planta e incluso que actúan como control biológico de fitopatógenos, son usualmente conocidas como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR de las siglas en inglés PlantGrowth-PromotingRhizobacteria) (Glick, 1995; Kloepper *et al.*, 1989; Bashan y Holguin, 1998). La escasez mundial de recursos hídricos en conjunto con la salinización del suelo, se vuelven factores abióticos que limitan el desarrollo de las plantas, se estima que un 50% de las tierras cultivables estarán afectadas por estos tipos de estrés para el 2050. Por lo anterior, los microorganismos juegan un papel muy importante en el ámbito agrícola al ser una alternativa importante para poder disminuir los efectos nocivos de estrés abiótico (sequía, altas y bajas temperaturas, salinidad, toxicidad por metales, etc.) en la producción de los cultivos (Milošević *et al.*, 2012).

La promoción de crecimiento en plantas producido por las PGPR puede ser multifactorial; como la solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, fijación biológica de nitrógeno, producción de la enzima 1-Aminociclopropano- 1-ácido carboxílico (ACC) desaminasa, producción y regulación de fitohormonas, actividad de biocontrol, producción de componentes orgánicos volátiles (VOC's), activación de la resistencia sistémica inducida (ISR), etc. (Bhattacharyya y Jha, 2012). Las PGPR se pueden adaptar a diversas condiciones ambientales y además tienen la capacidad de ayudar a mitigar condiciones de estrés en plantas. En condiciones de sequía y/o salinidad el efecto de protección de las PGPR consiste en reducir la producción de etileno, incrementar las concentraciones de fitohormonas como el ácido abscísico y las auxinas, dar protección contra las especies reactivas de oxígeno (ROS), producir solutos

compatibles, solubilizar fosfatos, producir exopolisacáridos y controlar a los fitopatógenos. La presente revisión muestra un panorama general de los mecanismos empleados por las PGPR como respuesta a diversos tipos de estrés abióticos y cuál es su efecto protector sobre las plantas como un potencial de uso como biofertilizantes.

Regulación de hormonas

Las plantas están expuestas a diversos factores ambientales adversos, por lo que han desarrollado mecanismos de adaptación complejos (Yang *et al.*, 2013), liberando compuestos químicos como las hormonas (Alazem y Lin, 2015). Las hormonas de las plantas se pueden clasificar de acuerdo a su estructura y actividad fisiológica en; auxinas (AUX), ácido abscísico (ABA), citoquininas (CTK), giberelinas (GA), etileno (ET), ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y brasinosteroides (BR). Estas hormonas desempeñan diversas funciones en la planta, como controlar y coordinar la división, el crecimiento y la diferenciación de las células (Miransari y Smith, 2014); y en diferentes etapas del ciclo de vida de la planta; la germinación, el desarrollo de órganos, crecimiento del tallo, así como la habilidad para responder a estímulos de estrés como el daño por insectos, patógenos, sequía y baja disponibilidad de nutrientes.

Muchas veces actúan individualmente, aunque también en conjunto; como en el caso de sequía o de estrés salino; cuando el ET acelera la senescencia de las hojas individualmente, pero en conjunto con el ABA son moléculas señalizadoras de estrés abiótico (Hassine y Lutts, 2010); en la absorción de nutrientes como el azufre (S), al transformar las formas no disponibles a disponibles intervienen las hormonas CTK y AUX, aunque también se ha mencionado que el ABA y el JA están involucrados (Honsel *et al.*, 2012). ABA y GA tienen actividad en conjunto para la regulación de la α amilasa, compuesto necesario en la germinación de la semilla (Kondhare *et al.*, 2014). Y en la regulación de la respuesta contra fitopatógenos las hormonas involucradas son el SA, JA, ET y ABA (Alazem y Lin, 2015). Otra estrategia utilizada por las plantas para hacer frente a los daños causados por factores bióticos y abióticos, es la asociación con bacterias rizosféricas que pueden activar señales químicas que modifican la concentración de las hormonas vegetales (Bent *et al.*, 2001); por ejemplo el incremento en la concentración de ET, que tiene efectos positivos en la estimulación de raíces adventicias y otros no tan deseados como la disminución del crecimiento de la raíz (Saravanakumar y Samiyappan, 2007). La disminución en la concentración de ET, origina que la planta tenga mayor resistencia al estrés abiótico y la inoculación con PGPR que producen la enzima desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC desaminasa) cuya función es desviar la ruta biosintética del etileno y de esta manera favorece el crecimiento y desarrollo vegetal, principalmente en plantas sensibles al ET (Penrose y Glick, 2003; Esquivel *et al.*, 2013). Las PGPR pueden promover el crecimiento de la planta hospedera por medio de las auxinas con la síntesis del ácido indolacético (IAA) mediante una ruta

alternativa que depende del triptófano proveniente de los exudados de la raíz aumentando su concentración en la rizósfera (Ali y Hasnain, 2007). Las concentraciones altas de IAA inducen el desarrollo de raíces adventicias y, por el contrario, a bajas concentraciones de IAA la elongación de la raíz principal se incrementa (Patten y Glick, 2002).

En las últimas décadas se han realizado algunos estudios que comprueban que ciertas PGPR le proporcionan a la planta un grado de tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico (sequía, salinidad, metales pesados, etc.). Algunos géneros de estas bacterias incluyen son: *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Azospirillum*, *Microbacterium*, *Methylobacterium*, *Variovorax*, *Enterobacter*, etc. (Grover *et al.*, 2011) (Fig. 7.1)

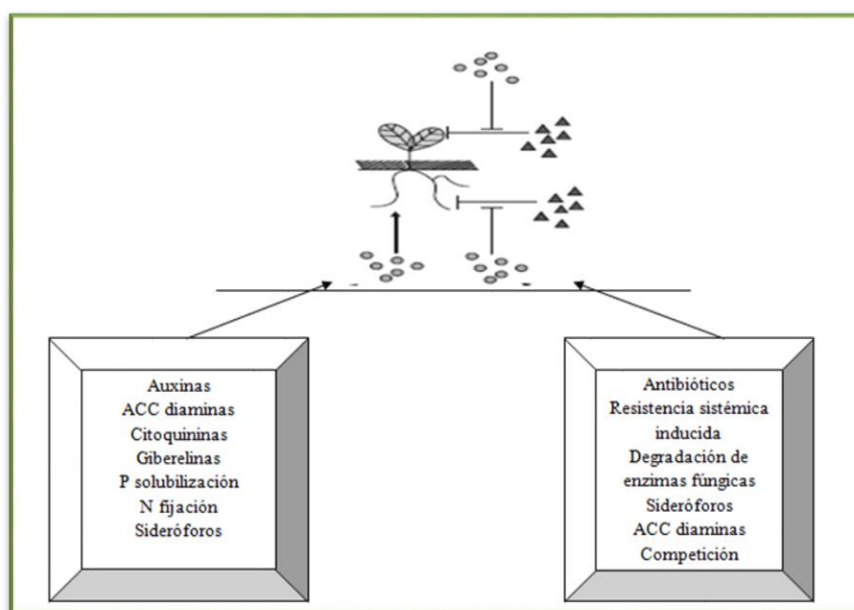


Fig. 7.1: Facilitación del crecimiento de las plantas por bacterias promotoras del crecimiento (PGPR) (Grover *et al.*, 2011)

Sequía.

Las PGPR son capaces de mitigar el estrés en plantas causado por sequías mediante diversos mecanismos. A) Ácido Abscísico y Citoquininas. Actualmente se sabe que la sequía afecta el balance hormonal incrementando el contenido de ABA en parte aérea y a su vez reduce los niveles de citoquininas endógenas, lo anterior activa el mecanismo de cierre de estomas, como respuesta a la sequía evitando la pérdida de agua (Yang *et al.*, 2009). El antagonismo entre citoquininas y ABA puede ser el resultado de interacciones metabólicas: las citoquininas comparten un origen biosintético común con ABA, creando claramente el potencial para el antagonismo en la formación de estos dos compuestos (Cowan *et al.*, 1999). Un alto contenido de citoquininas puede anular los efectos de ABA en la funcionalidad de los estomas bajo condiciones de estrés; por lo

tanto, una reducción en el suministro de esta hormona podría amplificar la respuesta y disparar a un contenido cada vez mayor de ABA (Davies y Zhang, 1991). Existen pocos reportes que ligan las PGPR en la respuesta ABA-CTK, *Paenibacillus polymyxa* se reportó como una PGPR que incrementa los niveles de CTK y a su vez reduce los niveles de ABA bajo condiciones de estrés abiótico (Timmusk y Wagner, 1999). B)

Producción de antioxidantes.

El estrés salino da lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales afectan a las células de la planta, causando daño oxidativo en la membrana de lípidos, proteínas o DNA, sin embargo, Mitigación del estrés abiótico mediante PGPR 7 hay enzimas que se encargan de evitar dichos daños, por ejemplo, la superóxidodismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ascorbatoperoxidasa (POX) y antioxidante no enzimático tal como ascorbato, glutatión y tocoferol. Las PGPR usan mecanismos similares para neutralizar el estrés oxidativo que es causado por ROS, a través de la inducción de enzimas antioxidantes tales como ascorbatoperoxidasa y superóxidodismutasa (Kohler *et al.*, 2009 a, b; Jha y Subramanian, 2014).

Inhibición de la síntesis de etileno.

El etileno es una hormona gaseosa que desempeña múltiples funciones en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta, también sirve como modulador clave entre la respuesta de la planta al estrés ambiental y crecimiento normal. Dicho estrés se puede contrarrestar mediante la degradación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) mediante la enzima ACC desaminasa, ayudando a disminuir el estrés y por lo tanto promoviendo el crecimiento normal de la planta (Glick *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009). En la ruta biosintética del etileno, la S-adenosilmetionina (SAM) es convertida por la enzima ACC sintasa a ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), el precursor inmediato del etileno. En presencia de ACC-desaminasa producida por la bacteria, el ACC de la planta es secuestrado y degradado por células bacterianas, la remoción de éste provoca que se disminuyan los efectos perjudiciales del etileno (Glick, *et al.*, 2007). La función de la enzima ACC desaminasa es convertir el ACC en α -cetobutirato y amonio. Lo anterior trae dos ventajas en las plantas: disminuye el etileno por la degradación del precursor inmediato, pero además incrementa la disponibilidad de amonio en la rizósfera. Recientes estudios han mostrado que las PGPR que contienen ACC desaminasa inducen la producción de raíces más largas, ayudando a una mayor absorción de agua (Saleem *et al.*, 2007; Zahir *et al.*, 2008; Esquivel-Cote *et al.*, 2013).

Salinidad.

La salinidad de los suelos se ha convertido en uno de los principales problemas en el mundo, que afecta aproximadamente a 400 millones de hectáreas de cultivos de interés

económico (Bot *et al.*, 2000; FAO, 2002), interfiriendo en la germinación, crecimiento y el rendimiento de cultivos (Khan y Panda, 2008). Entre los efectos negativos de la salinidad se encuentran el incremento en la producción de etileno, plasmólisis (pérdida del líquido constituyente de las células, en condiciones hipertónicas), toxicidad de Na⁺ y Cl⁻, incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y afectación de la fotosíntesis (Sairam y Tyagi, 2004; Gamalero *et al.*, 2009). Las PGPR usan diferentes mecanismos para contrarrestar el estrés salino, entre los que destacan A) Osmorregulación y acumulación de prolina. La prolina es un aminoácido que se encarga de proteger las membranas y proteínas contra efectos de iones inorgánicos, y su acumulación reduce el potencial redox en las células bajo ambientes salinos (Jain *et al.*, 2001; Wahid y Close, 2007). Además de llevar a cabo un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis y funcionamiento de estructuras fotosintéticas, para combatir el impacto de la salinidad en plantas. Algunos iones como el sodio (Na⁺) y el cloro (Cl⁻) ayudan a la adaptación de la planta a la salinidad, contribuyendo al ajuste osmótico de las vacuolas, los exopolisacáridos también ayudan a aminorar el estrés ocasionado por la salinidad, evitando que el Na⁺ esté disponible para la planta (Bano y Fatima, 2009).

Transporte restringido de Na⁺.

Se ha mostrado por análisis transcripcional que aproximadamente 600 genes de *Arabidopsis thaliana* modifican su expresión en presencia de salinidad, tal es el caso del Transportador de K⁺ de Alta Afinidad 1 (HKT1, por sus siglas en inglés) encargado del ajuste de los niveles de Na⁺ y K⁺. La expresión del gen HKT1 se disminuye reduciendo a su vez el ingreso de Na⁺ a través de la raíz. El análisis transcripcional ha mostrado que los compuestos orgánicos volátiles (VOC's) que producen algunos microorganismos benéficos como las PGPR (Yang *et al.*, 2009), tal como 2,3 butaneidol (Xiao-Min y Huiming, 2015), disminuyen la expresión de HKT1 en la raíz, pero la aumentan en la parte aérea, manteniendo de este modo el balance en los niveles de Na⁺ en toda la planta (Yang *et al.*, 2009).

Solubilización de fosfatos.

El fósforo es uno de los elementos más importantes para la planta ya que interviene en una serie de procesos metabólicos como la fotosíntesis, la respiración, y la síntesis del almidón, pero especialmente porque forma parte de los ácidos nucleicos (DNA y RNA), del trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP) y del monofosfato de adenosina (AMP) (Rodríguez y Flores, 2004). La disponibilidad de fósforo en suelos salinos es limitada, por lo que las PGPR se encargan de solubilizar fosfatos. La solubilización de fosfatos por parte de las bacterias la realizan por

acidificación, quelación, reacción de intercambio iónico y la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular tal como el ácido glucónico. La solubilización de los fosfatos realizada por las PGPR contribuyen a disminuir los efectos de la salinidad y en consecuencia a mejorar el desarrollo de la planta (Giri *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2006).

Síntesis de auxinas.

La auxina endógena de más abundancia es el ácido indolacético (IAA), que cumple con la mayor parte de las acciones realizadas por las auxinas. Además del IAA sólo se han encontrado otros tres tipos de auxinas en las plantas; el ácido-indol-3- butírico, el ácido 4-cloroíndole-3-acético y el ácido fenil acético (Sauer *et al.*, 2013). Estas hormonas vegetales desempeñan una función relevante en el crecimiento, el desarrollo y la formación de tejidos vasculares en la planta mediante la regulación de la expresión de genes (Abel y Theologis, 1996; Miransari y Smith, 2014). Algunas de las PGPR reportadas con la capacidad de producir AIA son: *Azospirillum*, *Arthrobactersp.*, *Bacilluspumilus*, *Halomonassp.*, *Nitrinicolalacisaponensis*, *Pseudomonas mendocina* entre otras, las cuales pueden aminorar el estrés por salinidad en las plantas (Dodd *et al.*, 2010; Tiwari *et al.*, 2011).

Las poblaciones bacterianas promotoras de crecimiento vegetal PGPR (*Plantgrowth-promotingrhizobacteria*) poseen la capacidad de colonizar el sistema radicular de las plantas o su entorno más cercano. Dentro de las PGPR más referenciadas está *Azospirillum*(α -subclase de las proteobacterias) (Cassán *et al.*, 2009; Bashan *et al.*, 2012). Ésta es una bacteria Gram negativa, de vida libre, fijadora de nitrógeno y asociada a la rizósfera de las plantas. En nuestro país, la práctica de inoculación con *Azospirillumbrasilense* cepa Az39 se ha extendido desde el cultivo de maíz (Fulchieri y Frioni, 1994), trigo (Thuar *et al.*, 2005) a otras especies vegetales, como gramíneas forrajeras (Vella *et al.*, 2005), entre otras. En esta investigación se usaron dos cepas de la bacteria *Azospirillumbrasilense* con el fin de estudiar el comportamiento de los dos cultivares de *D. eriantha* en simbiosis con *A. brasilense* cepa Az39 y *A. brasilense* cepa *ipdC*⁻.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y condiciones de crecimiento del cultivo:

Semillas de *Digitariaerianthacv.* Mejorada INTA y *D. erianthacv.* Sudafricanase sembraron sobre un soporte constituido por una mezcla de suelo y perlita (2:1, v/v) en maceta de 300 cc a razón de 5 g. de semillas en cada uno por cuádruplicado. Las macetas se colocaron en cámara de crecimiento a 23:21 °C (día: noche) con un fotoperíodo 16:8 (día: noche) con una densidad de flujo de fotones de 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y se dividieron en cuatro grupos: **1)** 23 °C y soporte a capacidad de campo (control); **2)** 4 °C por 72 h.; **3)** regadas con 200 mM de NaCl y **4)** regadas con 100 ml de PEG cada dos días, en tres concentraciones 0,5; 1,0 y 1,5 Mpa (Fig. 7.2)

Cepas Bacterianas y medios de cultivos: las cepas de *A. brasilense* utilizadas fueron *A. brasilense*Az39 y la mutante *ipdC*.

Ensayos de inoculación: las semillas de *Digitaria* se agruparon en bolsas plásticas, a razón de 50 g por cada grupo para ser inoculadas con 5 ml de cada estirpe bacteriana a razón de 1×10^7 ufc/ml previo a la siembra.

Tratamientos de inoculación para cada grupo de macetas: se utilizó un tratamiento control medio NFb (medio de cultivo libre de nitrógeno y con malato como fuente de carbono, usado por excelencia para el enriquecimiento de *Azospirillum*), un control negativo (*A. brasilense* cepa *ipdC*) y *A. brasilense* cepa Az39.

Cada grupo de macetas fue tratado con el inóculo correspondiente. El sistema de riego utilizado fue por capilaridad, colocando las macetas de cada tratamiento sumergidos en bandejas que contenían un volumen constante de solución nutritiva de Hoagland 25% hasta el inicio del tratamiento del estrés.

Crecimiento

En las muestras controles (sin bacterias) y tratadas (con bacterias) bajo condiciones normales y de estrés abióticos se evaluaron parámetros de crecimiento como: longitud radicular y foliar, tomándose como muestra un pool de 10 plantas, con tres repeticiones.

Biomasa

En cada tratamiento de simbiosis y estrés se evaluó PF y PS radicular y foliar, tomándose como muestra un pool de 10 plantas, con tres repeticiones.

Tratamiento estadístico de los datos

Los datos fueron analizados por el método estadístico INFOSTAT (Universidad Nacional de Córdoba) y los rangos múltiples de DUNCAN. Este test controla errores de tipo I

donde $\alpha=0,05$ $df=16$ y $MSE=6.208333$, para un número de medias = 8 y un rango crítico de 4.305 a 4.893.



Fig. 7.2: Plantas de *Digitaria eriantha* cv. Sudafricana creciendo en invernáculo

(Foto: Romina Osses)

RESULTADOS Y DISCUSION

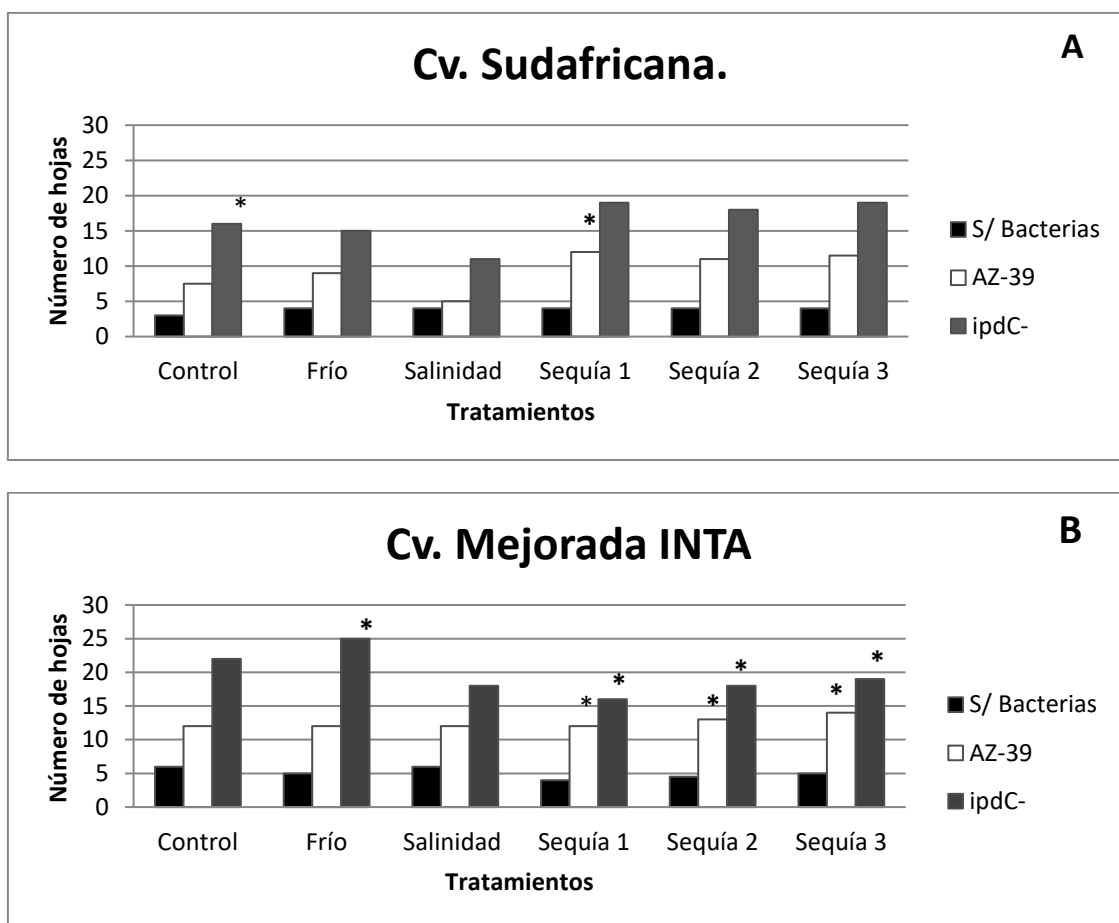


Fig. 7.3: Número de hojas de *Digitaria eriantha* cv. Sudafricana y cv. Mejorada INTA sin bacterias e inoculadas con *A. brasilense* cepa AZ-39 y *A. brasilense* cepa ipdC-, en condiciones de control y estrés por frío (4 °C), salinidad (200 mM) y tres niveles de sequía (1: 0,5 Mpa; 2: 1,0 Mpa; 3: 1,5 Mpa) (Osses *et al.*, 2017)

En *Digitaria eriantha* cv. Sudafricana, se encontraron aumentos significativos en el tratamiento control, inoculado con la cepa ipdC- y en el tratamiento de estrés por sequía 0,5 Mpa, en plantas inoculadas con la cepa AZ-39, (Fig. 7.3 A). En el cv. Mejorada INTA, se encontraron aumentos significativos en el número de hojas en el tratamiento control, frío y los tres tratamientos de sequía con la inoculación de la cepa ipdC-. La cepa AZ-39 promovió un aumento significativo del número de hojas en condiciones de sequía con 0,5 Mpa, 1,0 y 1,5 Mpa. y la salinidad afectó al crecimiento y ninguna de las dos cepas promovió el aumento del número de hojas. (Fig. 7.3 B).

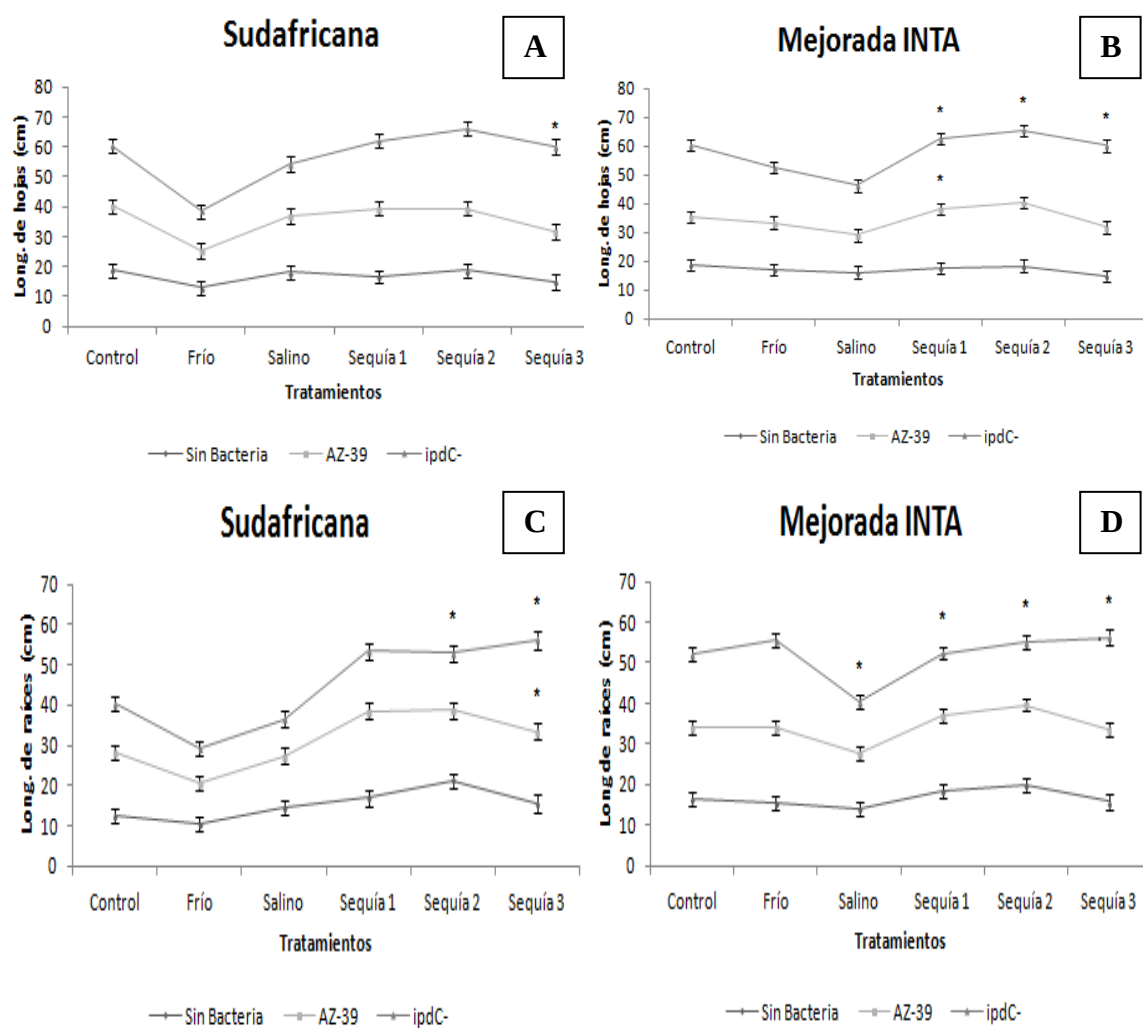


Fig. 7.4: Longitud foliar y radical de *Digitaria ariantha* cv. Sudafricana y cv. Mejorada INTA sin bacterias e inoculadas con *A. brasilense* cepa Az-39 y *A. brasilense* cepa ipdC-, en condiciones de control y estrés por frío (4 °C), salinidad (200 mM) y tres niveles de sequía (1: 0,5 Mpa; 2: 1,0 Mpa; 3: 1,5 Mpa). (Osses *et al.*, 2017)



Fig. 7.5: *D. eriantha* cv. Mejorada INTA sin bacteria, con 4 tratamientos: control (sin estrés); estrés salino; estrés por frío y estrés por sequía (1,5 Mpa) (Foto: Romina Osses)



Fig. 7.6: *D. eriantha* cv. Mejorada INTA inoculadas con *A. brasilense* cepa AZ-39, con 4 tratamientos: control (sin estrés); estrés salino; estrés por frío y estrés por sequía (1,5 Mpa) (Foto: Romina Osses)



Fig. 7.7: *D. eriantha* cv. Mejorada INTA inoculadas con *A. brasilense* cepa *ipdC*, con 4 tratamientos: control (sin estrés); estrés salino; estrés por frío y estrés por sequía (1,5 Mpa) (Foto: Romina Osses)

En el cv. Sudafricana, en los tratamientos control, frío y salinidad no se observaron diferencias significativas con ninguna bacteria; sólo se observó un aumento significativo del largo de hojas en el tratamiento de estrés por sequía con una presión osmótica de -1,5 Mpa, inoculado con la cepa *ipdC*- (Fig.7. 4 A). En Mejorada INTA, igualmente no hubo cambios significativos para plantas control, bajo frío o salinidad, solo hubo un aumento significativo en la longitud de hojas en los tres tratamientos de estrés por sequía; para presiones osmóticas de -0,5 Mpa se observó en plantas inoculadas con ambas cepas y sólo con la cepa *ipdC*- para presiones de -1,0 y -1,5 Mpa (Fig. 7. 4 B). La longitud de raíces varió según el tipo de inoculación y estrés aplicado. En el cv. Sudafricana, las plantas control, sometidas a estrés por frío y salinidad, no presentaron diferencias significativas en la longitud radical. Los tratamientos de sequía incrementaron la longitud de la raíces cuando fueron inoculados con la cepa *ipdC*- y soportaron presiones osmóticas de -1 Mpa o cuando fueron inoculados con ambas cepas para presiones -1,5 Mpa, existiendo un mayor crecimiento en plantas inoculadas con la cepa *ipdC* (Fig. 7. 4 C). En el cv. Mejorada INTA, la longitud de raíces incrementó en forma significativa bajo estrés salino y sequia bajo presiones osmóticas de -0,5, 1,0 y 1,5Mpa, inoculados con la cepa *ipdC*- (Fig.7.4 D)

En el cv. Sudafricana el peso fresco foliar (PFF) aumentó en forma significativa con respecto al control en los tratamientos con inoculación con la cepa AZ-39 y con *ipdC*-. El PFF incrementó de forma significativa en los tres tratamientos de estrés por sequía

(0,5, 1 y 1,5 Mpa) en las plantas inoculadas con ambas cepas, en forma cuantitativamente mayor con la cepa ipdC⁻. Bajo frío y salinidad, el PFF no varió en ninguno de los tratamientos sin inoculación y con ninguna de las dos cepas (Tabla 7.1A).

En el cv. Mejorada INTA, se encontraron aumentos significativos en el tratamiento control, inoculado con la cepa ipdC⁻ y una disminución significativa en el PFF en plantas inoculadas con la cepa AZ-39. En el tratamiento de estrés por frío, se observaron aumentos significativos en plantas inoculadas con ambas cepas, siendo más notorio con la cepa ipdC⁻. En el tratamiento salino se observó una disminución significativa de PFF en las plantas inoculadas con AZ-39, manteniéndose las inoculadas con la cepa ipdC⁻ cercanos al control. En los tratamientos de estrés por sequía inoculados con ambas bacterias existieron incrementos significativos a 0,5, 1,0 y 1,5 Mpa; en todos los casos la cepa ipdC⁻ respondió con mayores valores de PFF que AZ-39 (Tabla 7.1A) (Fig. 7.5; Fig. 7.6; Fig. 7.7)

En raíces del cv. Sudafricana, el peso fresco de raíces (PFR) se incrementó significativamente en el tratamiento control, inoculados con ambas cepas: AZ-39 e ipdC⁻. El estrés por frío y por salinidad no produjo variación en el PFR en ninguno de los casos de la inoculación y sin ella. Hubo aumentos significativos en los tres tratamientos de estrés por sequía, en la concentración 0,5 Mpa sólo hubo aumento en las plantas inoculadas con la cepa AZ-39; lo contrario ocurrió en la concentración 1,0 Mpa, donde se vieron aumentos en las plantas inoculadas con la cepa ipdC⁻; en cambio, en la concentración 1,5 Mpa se vieron aumentos en las plantas inoculadas con ambas cepas, en mayor medida con la cepa ipdC⁻ (Tabla 7.1B)

En el cv. Mejorada INTA, el PFR en el tratamiento sin estrés se incrementó con la cepa ipdC⁻ y disminuyó con la cepa AZ-39; con frío el PFR aumentó en forma significativas con ambas cepas; con salinidad no existieron diferencias significativas. También hubo aumentos significativos en los tres tratamientos de estrés por sequía, en la concentración 0,5 Mpa fue más notorio en la cepa AZ-39; en las concentraciones 1,0 Mpa y 1,5 Mpa, fue en mayor medida con la cepa ipdC⁻ (Tabla 7.1B).

El peso seco foliar (PSF) en el cv. Sudafricana, aumentó en forma significativa en el tratamiento control, inoculados con ambas cepas. El frío y la salinidad no produjeron cambios en la acumulación de PSF en ningún caso. Existieron aumentos significativos en los tres tratamientos de estrés por sequía, en las concentraciones 0,5 y 1,0 Mpa fueron aquellos inoculados con la cepa ipdC⁻; en la concentración 1,5 Mpa en aquellas plantas inoculadas con ambas cepas. En el cv. Mejorada INTA, se encontraron aumentos significativos de PSF en el tratamiento control, inoculado con la cepa ipdC⁻ y disminuciones significativas en las plantas con la cepa AZ-39. En el tratamiento de frío existió un incremento significativo en plantas inoculadas con ipdC⁻ y en los tratamientos con sequía se observaron incrementos significativos en todos los potenciales inoculados con la cepa ipdC⁻ (Tabla 7.1C)

Tabla 7.1: Peso fresco y peso seco foliar y radical de *Digitariaeriantha* cv. Sudafricana y cv. Mejorada INTA sin bacterias e inoculadas con *A. brasilense* cepa Az-39 y *A. brasilense* cepa ipdC⁻, en condiciones de control y estrés por frío (4 °C), salinidad (200 mM) y tres niveles de sequía (1: 0,5 Mpa; 2: 1,0 Mpa; 3: 1,5 Mpa). (Osses *et al.*, 2017)

cv. Sudafricana				cv. Mejorada INTA		
A	Peso Fresco Foliar (g)			Peso Fresco Foliar (g)		
<i>Tratamientos</i>	<i>SB</i>	<i>AZ-39</i>	<i>ipdC⁻</i>	<i>SB</i>	<i>AZ-39</i>	<i>ipdC⁻</i>
Control	3,35±2,08d	9,22±2,18b	10,61±2,16b	11,22±2,3b	6,95±2,45c	22,82±2,4a
Frío	1,91±2,04d	3,64±2,20d	3,73±2,18d	4,86±2,31d	8,30±2,43b	12,74±2,3b
Salinidad	4,70±2,05d	3,56±2,19d	4,48±2,12d	6,60±2,30c	3,58±2,47d	5,69±2,2cd
Sequía 0,5 Mpa	2,90±2,06d	5,57±2,21c	10,78±2,15b	2,42±2,28d	5,24±2,49c	12,05±2,4b
Sequía 1,0 Mpa	4,16±2,08d	5,86±2,22c	9,87±2,18b	4,73±2,27d	6,39±2,40c	11,10±2,4b
Sequía 1,5 Mpa	4,22±2,35d	12,77±2,37b	23,74±2,4a	4,34±2,60d	12,70±2,63 b	23,75±2,6a
B	Peso Fresco de Raíces (g)			Peso Fresco de Raíces (g)		
Control	0,38±1,634ef	7,16±1,72b	8,22±1,72b	7,81±1,87b	5,61±1,9c	15,94±1,8a
Frío	0,29±1,65ef	0,42±1,72ef	0,27±1,73ef	1,83±1,88d	4,45±1,9c	9,61±1,9b
Salinidad	0,64±1,66ef	0,45±1,70ef	0,59±1,74ef	3,13±1,87d	1,59±1,9de	2,95±1,9d
Sequía 0,5 Mpa	0,51±1,67ef	2,59±1,71d	1,50±1,79e	0,57±1,87ef	2,00±1,9d	1,82±2,0d
Sequía 1,0 Mpa	2,55±1,63d	3,44±1,74d	5,94±1,72c	2,12±1,87d	2,94±1,8d	5,90±1,8c
Sequía 1,5 Mpa	2,52±1,86d	8,05±1,87b	15,79±1,86a	2,500±2,14d	8,05±2,1b	15,78±2,1a
C	Peso Seco Foliar (g)			Peso Seco Foliar (g)		
Control	0,84±0,84d	2,86±0,89c	3,26±0,81c	3,41±0,83c	1,92±0,8d	6,61±0,84b
Frío	0,40±0,82de	0,58±0,87de	0,60±0,86de	1,51±0,82d	2,79±0,8d	4,31±0,83c
Salinidad	1,29±0,83d	0,85±0,86d	0,96±0,90d	1,97±0,80d	1,27±0,8d	1,63±0,85d
Sequía 0,5 Mpa	1,15±0,90d	1,69±0,80d	3,63±0,87c	1,06±0,81d	1,29±0,8d	3,80±0,86c
Sequía 1,0 Mpa	1,79±0,89d	2,35±0,81d	3,13±0,85c	1,88±0,79	2,24±0,8d	3,39±0,85c
Sequía 1,5 Mpa	1,66±0,94d	4,38±0,94c	10,53±0,94 a	1,67±0,93d	4,40±0,9c	1067±0,92^a
D	Peso Seco de Raíces (g)			Peso Seco de Raíces (g)		
Control	0,21±0,31d	0,90±0,33c	1,08±0,33c	1,69±0,78d	1,30±0,8c	2,88±0,82b
Frío	0,11±0,31d	0,13±0,33d	0,10±0,33d	0,46±0,78d	0,96±0,8c	1,76±0,82c
Salinidad	0,30±0,31d	0,06±0,33e	0,23±0,33d	0,59±0,78d	0,41±0,8d	0,63±0,82d
Sequía 0,5 Mpa	0,28±0,31d	0,61±0,33d	0,56±0,33d	0,28±0,78d	0,31±0,8d	0,92±0,82c
Sequía 1,0 Mpa	0,87±0,31d	0,79±0,33d	1,17±0,33c	0,37±0,78d	0,90±0,8c	1,37±0,82c
Sequía 1,5 Mpa	0,74±0,36d	1,82±0,36b	4,11±0,36a	0,74±0,89d	1,82±0,8b	4,18±0,89^a

El peso seco de raíces (PSR) en *Digitariaeriantha* cv. Sudafricana, se vio incrementado significativamente en plantas inoculadas con ambas cepas. El frío no provocó diferencias significativas PSR entre plantas control e inoculadas. La salinidad provocó una significativa disminución del PSR en plantas inoculadas con la cepa AZ-39, no así en las inoculadas con la cepa ipdC⁻. La cepa AZ-39 tuvo un efecto mitigatorio en la sequía severa incrementando el valor de PSR y la cepa ipdC⁻ lo hizo con niveles de sequía de 1,0 y 1,5 Mpa siempre respecto de las plantas sin bacteria.

En Mejorada INTA, las plantas inoculadas con la cepa AZ-39 disminuyeron su PSR con diferencias significativas respecto al control en cambio la cepa ipdC⁻ incrementó el PSR significativamente. Ante el frío el PSR se vio incrementado con ambas cepas. Bajo tratamiento salino, no existieron diferencias significativas entre las plantas control y las inoculadas con ambas cepas. Las plantas inoculadas con ipdC⁻; mostraron incrementos significativos en todos los tratamientos de sequía, con respecto al control. Las plantas inoculadas con AZ-39 también respondieron favorablemente, con 1,0 Mpa y 1,5 Mpa.

Tabla 7.2: Resumen del efecto de la inoculación con *A. brasilense* cepa Az-39 y *A. brasilense* cepa ipdC-, en *Digitaria eriantha* cv. Sudafricana y cv. Mejorada INTA en condiciones de control y condiciones de estrés por frío, salinidad y tres niveles de sequía. **Referencias:**+: Incremento; -: Descenso; **Blanco:** Sin cambios. (Osses *et al.*, 2017)

cv. Sudafricana				cv. Mejorada INTA		
A		Peso Fresco Foliar (g)		Peso Fresco Foliar (g)		
Tratamientos	SB	AZ-39	ipdC-	SB	AZ-39	ipdC-
Control		+	+		-	+
Frío					+	+
Salinidad					-	
Sequía 0,5 Mpa		+	+		+	+
Sequía 1,0 Mpa		+	+		+	+
Sequía 1,5 Mpa		+	+		+	+
B		Peso Fresco de Raíces (g)		Peso Fresco de Raíces (g)		
Control		+	+		-	+
Frío					+	+
Salinidad						
Sequía 0,5 Mpa		+			+	
Sequía 1,0 Mpa			+			+
Sequía 1,5 Mpa		+	+			+
C		Peso Seco Foliar (g)		Peso Seco Foliar (g)		
Control		+	+		-	+
Frío						+
Salinidad						
Sequía 0,5 Mpa			+			+
Sequía 1,0 Mpa			+			+
Sequía 1,5 Mpa		+	+			+
D		Peso Seco de Raíces (g)		Peso Seco de Raíces (g)		
Control		+	+		-	+
Frío					+	+
Salinidad		-				
Sequía 0,5 Mpa						+
Sequía 1,0 Mpa			+		+	+
Sequía 1,5 Mpa		+	+		+	+
E		Número de hojas		Número de hojas		
Control			+			+
Frío						
Salinidad						
Sequía 0,5 Mpa		+			+	+
Sequía 1,0 Mpa					+	+
Sequía 1,5 Mpa					+	+
F		Largo de hojas (cm)		Largo de hojas (cm)		

Control			
Frío			
Salinidad			
Sequía 0,5 Mpa		+	+
Sequía 1,0 Mpa			+
Sequía 1,5 Mpa		+	+
G	Largo de raíces (cm)	Largo de raíces (cm)	
Control			
Frío			
Salinidad			+
Sequía 0,5 Mpa			+
Sequía 1,0 Mpa		+	+
Sequía 1,5 Mpa	+	+	++

Las plantas de *D. eriantha* bajo condiciones de estrés abiótico ven afectados los parámetros morfofisiológicos, la producción de hormonas y pigmentos fotosintéticos (Garbero *et. al.*, 2011). El propósito de este trabajo fue establecer si *D. erianthacvs.* Sudafricana y Mejorada INTA mostraban respuestas favorables cuando se asociaban a bacterias PGPR, mitigando el estrés y disminuyendo los efectos negativos de los mismos.

Bajo situaciones de estrés, tales como escasez de recursos o bajas temperaturas, el crecimiento de los organismos se ralentiza, pero al desaparecer el factor de estrés los organismos pueden incrementar sus tasas de crecimiento llegando a alcanzar tallas idénticas a organismos no sometidos a estrés, este proceso ocurre tanto en plantas como animales y se denomina crecimiento compensatorio. Sin embargo, las plantas presentan peculiaridades morfológicas y fisiológicas que las hacen capaces de mantener crecimiento compensatorio incluso en presencia del factor que provoca el estrés (Retuerto *et al.*, 2003).

En condiciones control (sin estrés), ambos cultivares mostraron un aumento en el NH, PFF, PFR, PSF y PSR cuando fueron inoculados con *Azospirillum brasilense* cepa *ipdC*, esto indicaría lo beneficioso de la simbiosis con esta bacteria. Cuando las plantas se inocularon con la cepa AZ-39, sólo resultó beneficiosa la simbiosis con el cv. Sudafricana, mostrando un aumento de PFF, PFR, PSF y PSR; en el cv. Mejorada INTA, se observaron disminuciones en el PFF, PFR, PSF y PSR al inocularse con AZ-39, lo que demuestra una simbiosis no beneficiosa. Cassanet *al.*, 2009 en cultivos de soja (*Glycine max* L.) y de maíz (*Zea mays* L.) en simbiosis con *A. brasilense*, también cepa AZ-39, logró incrementos significativos en la longitud de raíces.

El efecto de las bajas temperaturas sobre una planta puede causar alteraciones metabólicas que determinen diferentes grados de sensibilidad a este factor de estrés. Algunos autores sugieren que el incremento del PF refleja con más precisión el efecto de las bajas temperaturas en el crecimiento de los órganos de una planta. Esto es debido a que durante la aclimatación al frío una importante fracción del incremento en PF

corresponde a la deposición de muchos solutos, incluyendo carbohidratos no estructurales, proteínas, lípidos y aminoácidos (Levitt, 1980). Las plantas de *D. eriantha* cv. Sudafricana detuvieron su crecimiento por efecto del frío, con las dos cepas de *Azospirillum*, lo que quedó demostrado en los parámetros de PFF y PFR; PSF y PSR y longitud de los órganos vegetativos. Dado que *D. eriantha* es una especie forrajera, la reducción del crecimiento de las hojas es un efecto desfavorable que afecta el rendimiento futuro del cultivo (Terenti, 2004). En el cv. Mejorada INTA inoculados con la cepa *ipdC*⁻, el NH, PFF y PFR, PSF y PSR se incrementaron frente al frío, y en las plantas inoculadas con la cepa AZ-39, solo PFF, PSF y PSR, evidenciando mejor respuesta de este cv. a la simbiosis bacteriana y la respuesta frente a este estrés. Garbero *et al.*, 2011, demostraron que frente al frío esta especie desarrolla mecanismos de respuesta antioxidantes y hormonales probablemente incrementados por estas asociaciones simbióticas.

Para combatir las condiciones de salinidad, las plantas han desarrollado diferentes mecanismos y estrategias, que implican la acción de diferentes mecanismos (transporte de solutos compatibles, señalización de procesos en desarrollo, etc.) que intervienen para conseguir que la planta crezca, se desarrolle y llegue a producir en condiciones de elevada salinidad (Breckle, 2002). Las plantas del cv. Sudafricana y cv. Mejorada INTA mostraron pocas variaciones en sus parámetros de crecimiento con las dos cepas bacterianas lo que probablemente pondría en evidencia que el nivel de salinidad al cual fueron sometidas las plantas, no produce injuria alguna en ambos cultivares, por lo cual se mantienen cercanos al control.

Las plantas muestran ante el estrés hídrico respuestas que tienden a evitarlo o bien mecanismos o adaptaciones que permiten tolerarlo (Valladares *et al.*, 2004). Cuando el déficit hídrico se desarrolla lentamente, las plantas pueden presentar respuestas de aclimatación que tienen efectos sobre el crecimiento, como la disminución de la expansión foliar y el aumento del crecimiento radicular (Potter *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2008). Otro mecanismo de resistencia a nivel fisiológico es el cierre de estomas, estructuras responsables de la mayor proporción de pérdida de agua en las plantas (Taiz y Zeiger, 2006). Ambos cultivares presentaron respuestas favorables en la mitigación de los tres niveles de sequía impuestos. En los tres casos se mostraron aumentos en todos los parámetros evaluados en plantas inoculadas con *A. brasilense* cepa *ipdC*⁻; en contraposición a la cepa AZ-39, donde el efecto mitigador se observó solo en algunos parámetros. La cepa *ipdC*⁻ es más eficiente en la mitigación del estrés por sequía, más aún en altas concentraciones (1,5 Mpa). El parámetro longitud de raíces (LR) sufrió disminuciones en concentraciones de PEG de 0,5 y 1,0 Mpa, no así a la mayor concentración, esto corroboraría el efecto compensatorio. Giuliattiet *al*, 2008, demostraron que *D. eriantha* cv. Sudafricana y Mejorada INTA incrementaban su biomasa en los parámetros PSF y PSR cuando crecían en contacto con sustratos que contenían vermicompuestos. Por su lado, Pedranzani *et al.*, 2015, informaron que cuando *D. eriantha* cv. Sudafricana desarrollaba simbiosis con micorrizas arbusculares los niveles de defensas antioxidantes y las hormonas ácido jasmónico y su precursor ácido oxofitodienoico aumentaban en forma significativa cuando la planta se encontraba en situaciones de estrés abiótico.

En este estudio se demostró que el cv. Mejorada INTA presentó mayores beneficios en la mitigación del estrés por sequía que el cv. Sudafricana, evidenciando una vez más la superioridad del cv Mejorada INTA en forma independiente y en simbiosis con *A. brasilense* inoculado con ambas cepas.

Variación en el contenido de agua y nitrógeno en *D.eriantha* cv. Mejorada INTA

En las figuras 7.8 y 7.9 se presentan las variaciones del porcentaje de agua y nitrógeno en muestras de follaje procedentes de plantas sin bacterias y en simbiosis con *A. brasilense* cepa AZ-39 y *A. brasilense* cepa *ipdC*, en condiciones de control y estrés por frío (4°C), salinidad (200 mM) y sequía (1,5 Mpa). Y en las tablas 7.3 y 7.4 se presentan las variaciones del porcentaje de agua y nitrógeno en relación a los tratamientos de estrés.

Contenido de agua

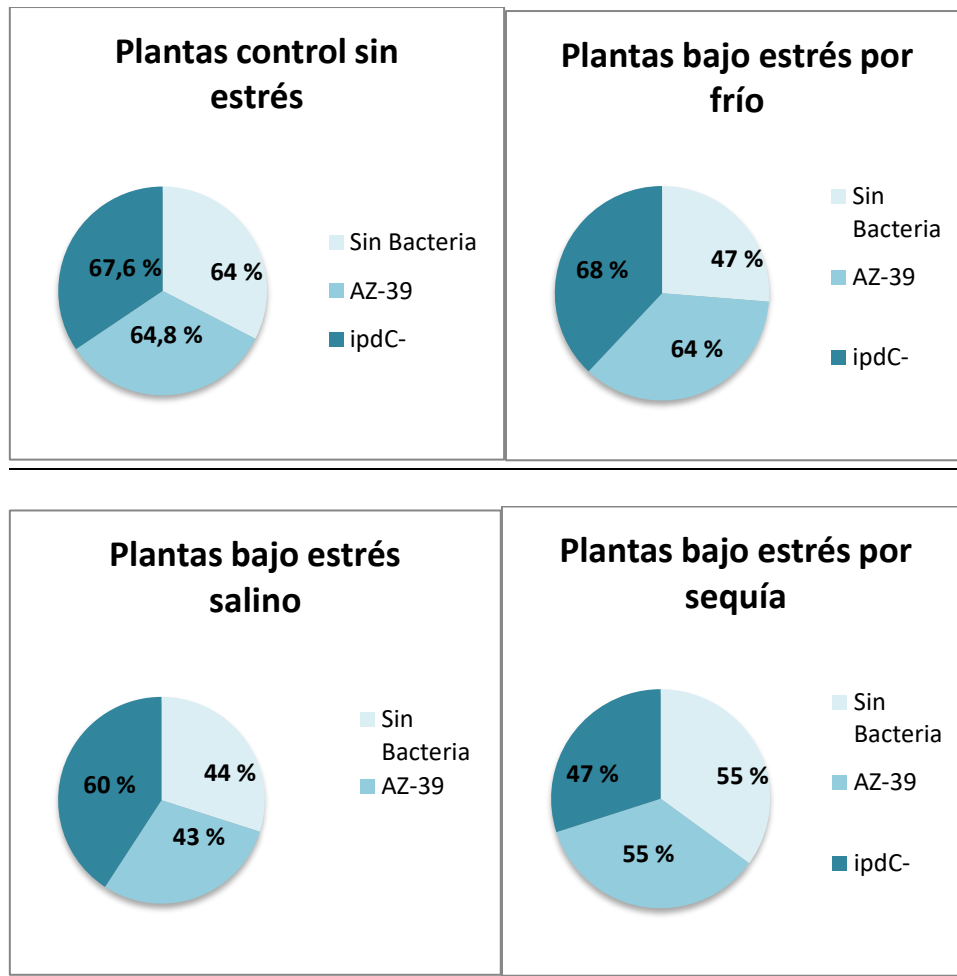


Fig. 7.8: Variación del porcentaje de agua en muestras de follaje procedentes de plantas sin bacterias e inoculadas con *A. brasilense* cepa Az39 y *A. brasilense* cepa *ipdC*⁻, en condiciones de control y estrés por frío (4°C), salinidad (200 mM) y sequía (1,5 Mpa) (Osses, 2014)

Taba 7.3: Variación del porcentaje de agua en relación a los tratamientos de estrés. Letras diferentes en la misma columna expresan diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Tratamiento	Control	Frío	Salino	Sequía
Sin Bacteria	64,0 a	47,0 c	44,0 d	55,0 b
AZ-39	64,8 a	64,0 a	43,0 c	55,0 b
ipdC ⁻	67,6 a	68,0 a	60,0 b	47,0 c

El porcentaje de contenido de agua en follaje de plantas control y de plantas bajo estrés por frío y estrés salino, fue mayor en aquellas inoculadas con ambas cepas de *A. brasilense*. En aquellas plantas bajo estrés por sequía el porcentaje de agua fue similar (Fig. 7.8). Las plantas inoculadas con la cepa AZ-39 e *ipdC*⁻ mostraron un mayor

porcentaje de agua cuando fueron sometidas al frío. En aquellas bajo estrés salino, sólo se observó un porcentaje mayor de agua en aquellas plantas inoculadas con la cepa *ipdC* (Tabla 7.3).

Contenido de Nitrógeno

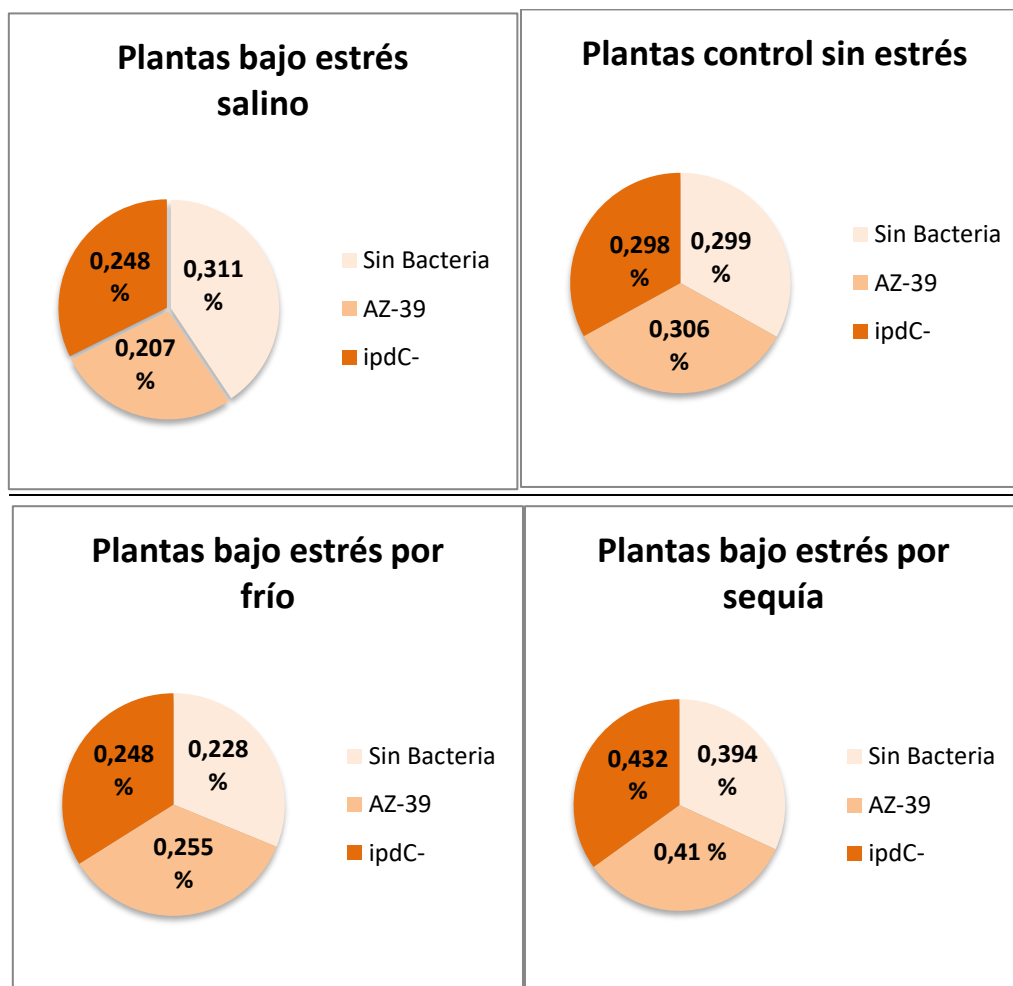


Fig. 7.9: Variación del porcentaje de nitrógeno en muestras de follaje procedentes de plantas sin bacterias e inoculadas con *A. brasilense* cepa Az39 y *A. brasilense* cepa *ipdC*, en condiciones de control y estrés por frío (4°C), salinidad (200 mM) y sequía (1,5 Mpa) (Osses, 2014)

Taba 7.4: Variación del porcentaje de nitrógeno en relación a los tratamientos de estrés. Letras diferentes en la misma columna expresan diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Tratamiento	Control	Frío	Salino	Sequía
Sin Bacteria	0,299 b	0,228 c	0,311 a	0,394 a
AZ-39	0,306 b	0,255 c	0,207 c	0,410 a
ipdC-	0,298 b	0,248 c	0,248 c	0,432 a

En los tratamientos control, estrés por frío y estrés salino, los porcentajes de nitrógeno se mantuvieron similares (Fig. 7.9). En las plantas sin bacteria, se observó un aumento en el porcentaje de nitrógeno en los tratamientos de estrés salino y estrés por sequía; lo contrario ocurrió en aquellas plantas que fueron sometidas a estrés por frío, en las cuales el porcentaje disminuyó, respecto a las plantas control. En *D. eriantha* en simbiosis con *A. brasilense* cepa AZ-39 y cepa *ipdC⁻*, hubo una disminución del contenido de nitrógeno en los tratamientos de estrés por frío y salino y un aumento en las plantas sometidas a estrés por sequía, respecto a plantas control (Tabla 7.4).

AGRADECIMENTOS

Al Ms Cs. Oscar Terenti por el análisis estadístico de los datos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abel S, Theologis A (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* 111:9-17.
- Alazem M, Lin NS (2015) Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Mol. Plant Pathol.* 16: 529-540.
- Ali B, Hasnain S (2007) Potential of bacteria indolacetic acid to induce adventitious shoots in plant tissue culture. *Lett. Appl. Microbiol.* 45:128-133.
- Bano A, Fatima M (2009) Salt tolerance in *Zea mays* (L). following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biol. Fert. Soils* 45: 405-413.
- Bashan Y, Holguin G (1998) Proposal for the division of plant promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth- promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.* 30:1225–1228.
- Bashan Y, Salazar B, Moreno M, López R, Linderman R (2012) Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *J Environ Manag* 102:26-36.
- Bent E, Tuzun S, Chanway CP, Enebak S (2001) Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with *Rhizobacterias*. *Can. J. Microbiol.* 47: 793-800.
- Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *Rev. World J. Microbiol. Biotechnol.* 28:1327-1350.
- Breckle JW (2002) Walter's Vegetation of the Earth. The Ecological Systems of the Geobiosphere. Springer, Berlin Heidelberg. New York.

Bot AJ, Natchtergaele FO, Yang A (2000) Land Resource Potential and Constraints at Regional and Country Levels. Land and Water Development Division Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. Pags. 1-114.

Cassán F, Perrig D, Sgroy V, Masciarelli O, Penna C, Luna V (2009) *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). European Journal of Soil Biology 45:28-35.

Cowan AK, Cairns AL, Bartels-Rham B (1999) Regulation of abscisic acid metabolism: towards a metabolic basis for abscisic acid-cytokinin antagonism. *J. Exp. Bot.* 50:595-603.

Davies J, Zhang H (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant Phys.* 42, 55-76.

Dijkstra FA, Carrillo Y, Pendall E, Morgan JA (2014) Rhizosphere priming: a nutrient perspective. *The Microbial Regulation of Global Biogeochemical Cycles*, 183.

Dodd IC, Zinovkina NY, Safronova VI, Belimov AA (2010) Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Ann. Appl. Biol.* 157:361-379.

Esquivel-Cote R, Gavilanes-Ruíz M, Cruz-Ortega R, Huante P (2013) Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una Revisión. *Rev. Fitotec. Mex.* 36:251-258.

FAO (2002). Los Fertilizantes y Su USO una Guía de Bolsillo para los Oficiales de Extensión. IV Edición. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Asociación Internacional de la Industria de los Fertilizantes. Roma. Pp 1-77.

Frommel MI, Nowak J, Lazarovits G (1991) Growth enhancement and development modification of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a non-fluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.* 96:928-936.

Fulchieri M, Frioni L (1994) *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central Argentina. *Soil. Biol. Biochem.* 26:921-923.

Gamalero E, Berta G, Glick R (2009) The use of microorganisms to facilitate the growth of plants in saline soils. En: Khan MS, Zaidi A, Musarrat J (eds) *Microbial strategies for crop improvement*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1-22.

Garbero M., Pedranzani H., Zirulnik F., Molina A., Pérez-Chaca M.V., Vigliocco A., Abdala G (2011). Short-term cold stress in two cultivars of *Digitaria eriantha*: Effects on stress-related hormones and antioxidant defense system. *Acta PhysiolPlant.* 33 (2):497-507

Garbero M, Andrade A, Reinoso H, Fernández-Muñoz B, Cuesta C, Granda V, Escudero C, Abdala G, Pedranzani H (2012). Short-term cold stress differentially affect growth, anatomy and hormone levels in two cultivars of *Digitaria eriantha*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34 (6): 2079-2091.

- Giri B, Kapoor R, Agarwal L, Mukerji KG (2004) Preinoculation with arbuscularmycorrhizae helps *Acacia auriculiformis* grow in a degraded Indian wasteland soil. *Commun Soil Sci. Plant Anal.* 35:193-204.
- Giulietti A, Ruiz O, Pedranzani H, Terenti O (2008) Efecto de cuatro lombricompostos en el crecimiento de plantas de *Digitaria ariantha*, Fhyton (Buenos Aires). 77:137-149, 2008b.
- Giulietti JD, Echeverría JC, Collado AD (2003) Condicionantes históricos de la desertificación en San Luis. In: Aguilera M.O. and Panigatti J.L. (Eds). Con las Metas Claras. pp 11-24.
- Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.
- Glick BR, Todorovic B, Czarny J, Cheng Z, Duan J, McConkey B (2007). Promoción de Plant Growth por Bacterial ACC desaminasa. Revisión crítica en ciencias de las plantas. 26: 227–242.
- Grover M, Ali SZ, Sandhya V, Rasul A, Venkateswarlu B (2011) Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27:1231-1240.
- Hassine AB, Lutts S (2010) Differential responses of saltbush *Atriplex halimus* L. exposed to salinity and water stress in relation to senescing hormones abscisic acid and ethylene. *J. Plant Physiol.* 167:1448-1456.
- Honsel A, Kojima M, Haas R, Frank W, Sakakibara H, Herschbach C, Rennenberg H (2012) Sulphur limitation and early sulphur deficiency responses in poplar: significance of gene expression, metabolites and plant hormones. *J. Exp. Bot.* 63:1873-1893.
- Jain M., Mathur G, Koul S. (2001). Efectos de mejora de la prolina sobre la peroxidación lipídica inducida por estrés salino en líneas celulares de maní (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Rep* 20, 463-468.
- Jha, Y, Subramanian, RB (2014). PGPR regulan la actividad similar a la caspasa, la muerte celular programada y la actividad de la enzima antioxidante en el arroz bajo salinidad. *Physiol Mol Biol Plants* 20, 201-207.
- Johansson JF, Paul LR, Finlay RD (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48:1-13.
- Khan MH, Panda SK (2008). Alteraciones en la peroxidación de lípidos de la raíz y respuestas antioxidantes en dos cultivares de arroz bajo estrés por salinidad de NaCl. *Acta Physiol Plant* 30, 81.
- Kugler A, Köhler, B, Palme, K. (2009). Regulación dependiente de la sal de una subfamilia de canales de GNC en *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* 9, 140.
- Kloepper J W, Hume DJ, Scher FM, Singleton C, Tipping B, Laliberte M, Frauley K, Kutchaw T, Simonson C, Lifdhit R, Zaleska I, Lee, L (1988). Plant growth-promoting rhizobacteria on canola (rapeseed). *Plant Dis*, 72(42), 10-1094.

Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends. Biotechnol.* 7:39-44.

Kondhare KR, Hedden P, Kettlewell PS, Farrel AD, Monaghan JM (2014) Use of the hormone- biosynthesis inhibitors fluoridone and paclobutrazol to determine the effects of altered Abscicic Acid and Giberellin levels on pre-maturatya- α -Amilase Formation in Wheat Grains. *J. Cereal Sci.* 60:210-216.

Levitt J(1980) Responses of Plants to environmental stresses. Vol. 1, Acad. Press, 496.

Lynch JM, Whipps JM (1991) Substrate flow in the rhizosphere. In *The rhizosphere and plant growth* (pp. 15-24). Springer Netherlands.

Milošević A, Marinković B, Tintor B (2012) Mitigating abiotic stress in crop plants by microorganisms. *MaticaSrpska Proceedings for Natural Sciences* 123:17-26.

Miransari M, Smith DL (2014) Plant Hormones and seed germination. *Environ. Exp. Bot.* 99:110-121.

Osses, RG. Simbiosis *Digitaria eriantha* Steudel var. Mejorada INTA- *Azospirillum brasilense* : Efectos sobre producción, crecimiento y tolerancia a estreses. Tesis de Grado para optar al gardo de Ingeniera Agronoma. FICA. UNSL, 90pp

Osses RG, Masciarelli O, Quiroga AM, Terenti OA, Pedranzani HE 2017. *Symbiotic association of two strain of Azospirillum with cultivars of Digitaria eriantha Steudel: responses to abiotic stress*. Revista Avances en Invest. Agropecuaria. REVAIA 2017. 21(1): 19-34 ISSN 0188789-0

Patten CL, Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida*indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microb.* 68: 3795- 3801.

Pedranzani H, Rodríguez Rivera M, Gutiérrez M, Porcel R, House B, Ruiz Lozano JM (2015) Arbuscularmycorrhizal symbiosis regulates physiology and performance of *Digitaria eriantha* plants subjected to abiotic stresses by modulating antioxidant and jasmonate levels *Micorrhyza* 26 (2): 141-152. DOI: 10.1007/s 00572-015-0653-4.

Penrose DM, Glick BR (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol. Plant.* 118: 10-15.

Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci.* 12(3), 99-105.

Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Möenne- Loccoz Y (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for sailborne pathogens and beneficial microorganisms. *PlantSoil*321: 341-361.

Retuerto R, Rodríguez-Roiloa S, Fernández-Lema B, Obeso JR. (2003) Respuestas compensatorias de plantas en situaciones de estrés. *Ecosistemas* 2003/1 (URL: <http://www.aet.org/ecosistemas/031/investigacion4.htm>).

Rodríguez M, Flores R (2004) Elementos esenciales y beneficiosos. Ferti-riego. Tecnologías y programación en agroplasticura, ed. Guzmán-Palomino JM y López-Galvez J, pp 17-24. Almeria: España. CYTED.

Rovira D, Davey B (1974) Biology of the rhizosphere in The Plant Root and its Environment, ed. EW Carson, pp. 153– 204. Charlottesville: Univ. Press VA.

Sairam RK, Tyagi A (2004) Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci. India* 86:407-421.

Saleem M, Arshad M, Hussain S, SaeedBhatti A. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. Volume 34, Issue 10, 1. pp 635–648,

Saravanakumar D, Samiyappan R (2007) ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *J. Appl. Microbiol.* 102:1283-1292.

Sauer M, Robert S, Kleine-Vehn J (2013) Auxin: simply complicated. *J Exp Bot*: 1-13.

Shao HB., Chu LY, C.A. Jaleel y CX. Zhao. (2008) Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *C.R. Biol.* 331, 215-225.

Singh G y Mukerji KG (2006) Root exudates as determinant of rhizospheric microbial biodiversity. In Microbial Activity in the Rhizosphere (pp. 39-53). Springer Berlin Heidelberg.

Stafford WH, Baker GC, Brown SA, Burton SG, Cowan DA (2005) Bacterial diversity in the rhizosphere of *proteaceae* species. *Environ. Microbiol.* 7:1755-1768.

Taiz L Zeiger E. (2006). Plant Physiology, 4ª edición. Sinauer Associates, Sunderland, MA. ISBN 0-87893-856-7.

Terenti OA. Evolución del crecimiento y la calidad de la semilla en *Digitariaeriantha*. Pastos y Forrajes, [S.l.], v. 27, n. 1, feb. 2012. ISSN 2078-8452.

Thuar A, Carlier E, Olmedo C (2005) Efecto de la promoción del crecimiento en un cultivo de trigo inoculado con *A. brasilense* Az39, en dos suelos de la región. VRN Científico Técnica de Biología del Suelo y V Encuentro sobre FBN, San Salvador de Jujuy, Argentina, pp. 37.

Timmusk S, Wagner H (1999) The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 951–959.

Tiwari S, Singh P, Tiwari R, Meena KK, Yandigeri M, Singh DP, Arora DK (2011) Salt-tolerant rhizobacteria-mediated induced tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) and chemical diversity in rhizosphere enhance plant growth. *Biol. Fertil. Soils.* 47:907-916.

Toribio MB, Laborde H, Brevendan RE, Terenti OA (1998) Growth and water relations of *Digitariaeriantha* under soil moisture stress and defoliation. In American Society of Agronomy. Annual Meeting. Abstracts. EE.UU. pp 113-114.

- Turner BL, Frossard E., Oberson A (2006) Enhancing phosphorus availability in low-fertility soils. *Biol. Approach to Sustain Soil. Syst.* pp: 191-205.
- Valladares F (2004) Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante. Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S. A, Madrid, p. 191-223.
- Vella M, Masciarelli O, Grion H, Peman R, Cassán F, Luna V (2005) Evaluación de la germinación, establecimiento y crecimiento temprano de semillas de *Chloris gayana* y *Panicum maximum* inoculadas con *A. brasilense* Az39. VRN Científico Técnica de Biología del Suelo y V Encuentro sobre FBN, San Salvador de Jujuy, Argentina, pp. 40.
- Veneciano JH, Terenti OA, Federigi ME (2002) Factores climáticos y pasturas megatérmicas perennes. *Revista de la Sociedad Rural de Jesús María, Cba.* 130:39-42.
- Wahid, A., Close, TJ (2007). Expresión de deshidrinas bajo estrés por calor y su relación con las relaciones hídricas de las hojas de la caña de azúcar. *Biol Plant* 51, 104-109.
- Xiao-Min L, Huiming Z (2015) The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance. *Frontiers. in Plant. Sci.* 6:1-7.
- Yang DL (2009). Las vías de señalización fitohormonal en las respuestas inmunitarias del arroz y la vía de señalización del jasmonato reprimen la vía de señalización de la giberelina. Doctor. Tesis, Academia de Ciencias de China, China, págs. D2009 - D2118.
- Yang DL, Yang Y, He Z (2013) Roles of plant hormones and their interplay in rice immunity. *Mol. Plant.* 6:675-685.
- Zahir, ZA, Munir A, Asghar HN, Shaharoona B, Arsha M (2008). Effectiveness of Rhizobacteria Containing ACC Deaminase for Growth Promotion of Peas (*Pisum sativum*) Under Drought Conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18(5), 958–963.

CAPITULO 8

El rol de las micorrizas en la mitigación del estrés abiótico por asociación simbiótica con *Digitaria eriantha*

**Hilda PEDRANZANI, Eliana FERNANDEZ, Mariano GUTIERREZ
Cecilia PACHECO INSAUSTI**

Resumen

Este estudio evalúa la respuesta de antioxidantes y la regulación de jasmonatos en plantas de *Digitaria eriantha* cv. Sudafricana, inoculadas (AM) y no inoculadas (NM) con *Rhizophagus irregularis* y sometidas a sequía, frío, o salinidad. La conductancia estomática y la eficiencia fotosintética disminuyeron en plantas AM y NM bajo todas las condiciones de estrés. Sin embargo, las plantas AM sometidas a condiciones de sequía, salinidad o no-estrés, mostraron valores de conductancia estomática significativamente más altos. La acumulación de peróxido de hidrógeno, que fue alta en las raíces de plantas NM bajo todos los tratamientos, aumentó significativamente en las hojas de plantas NM bajo estrés por frío y en plantas AM bajo sequía y control. La peroxidación lipídica aumentó en las raíces de todas las plantas bajo condiciones de sequía. Las plantas AM mostraron consistentemente alta actividad de catalasa (CAT) y de la ascorbatoperoxidasa (APX) en todos los tratamientos. La actividad de glutatión reductasa (GR) y de superóxidodismutasa (SOD) de las plantas AM fue más baja que las plantas NM y aumentó en las hojas. Los niveles endógenos OPDA y JA, aumentaron en plantas AM. *D. eriantha* sensible a condiciones de estrés por sequía, salinidad y frío inoculada con AM regula su fisiología y rendimientos.

Palabras claves: *Digitaria eriantha*, estrés abiótico, micorrizas arbusculares.

Abstracts

This study evaluates antioxidant responses and jasmonate regulation in *Digitaria eriantha* cv. Sudafricana plants inoculated (AM) and non-inoculated (NM) with *Rhizophagus irregularis* and subjected to drought, cold, or salinity. Stomatal conductance and photosynthetic efficiency decreased in AM and non-AM plants under all stress conditions. AM plants subjected to drought, salinity, or non-stress conditions showed significantly higher stomatal conductance values. Hydrogen peroxide accumulation, which was high in non-AM plant roots under all treatments, increased significantly in non-AM plant shoots under cold stress and in AM plants under non-stress and drought conditions. Lipid peroxidation increased in the roots of all plants under drought conditions. AM plants consistently showed high catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) activity under all treatments. Glutathione reductase (GR) and superoxide dismutase

(SOD) activity of AM roots was lower than that of NM plants and increased in shoots. The endogenous levels of OPDA and JA, showed a significant increase in AM plants. *D. eriantha* is sensitive to drought, salinity, and cold stresses and that inoculation with AM fungi regulates its physiology and performance.

Key words: abiotic stress, arbuscular mycorrhizae, *Digitaria eriantha*

INTRODUCCIÓN

Asociaciones Micorrícicas

El estudio de asociaciones micorrícicas involucra muchas disciplinas científicas, tales como: micología (taxonomía, fisiología, desarrollo fúngico, etc.), botánica (la fisiología, nutrición mineral, morfología, etc. de las plantas micorrizas), ecología (ciclo de nutrientes, calidad ambiental, reconstrucción de ecosistema, interacciones bióticas, etc.), humanísticas (el valor económico, alimenticio, médico, etc., de los hongos y plantas asociadas), y disciplinas aplicadas (forestación, agricultura, patología vegetal, etc.)

Mientras que mucha de la investigación actual apunta a enfatizar el potencial de las asociaciones micorrícicas en forestación, agricultura, horticultura, o a proveer nuevos hongos comestibles, es importante recordar que toda ciencia práctica se construye sobre la base de conocimiento fundamental. Por ejemplo, es esencial la información sobre el rol de las micorrizas en ecosistemas naturales para su manipulación en sistemas gestionados y se necesita conocimiento de taxonomía, biología y ecología fúngica para seleccionar aislados superiores de hongos para uso práctico, o para propagarlos eficientemente.

Las micorrizas son asociaciones de tres vías que involucran plantas, hongos y suelos y todos estos aspectos deben considerarse cuando trabajamos con ellas.

Brundrett *et al.* (1996) define a las micorrizas como la asociación mutualista entre hongos del suelo y las raíces de las plantas. En esta asociación están involucrados hongos de los Phylum Basidiomycetes, Acomycetes y Zigomicetes y la mayoría de las plantas vasculares.

El término micorriza implica la asociación de un hongo con la raíz de una planta; asociación comúnmente denominada “asociación micorrícica”, que implica un intercambio bidireccional de nutrientes: el hongo recibe fotosintatos de la planta hospedante y cede nutrientes absorbidos por las hifas desde el suelo (Read y Smith 2008). Frank en 1877 usó la palabra micorriza por primera vez como un término neutral que no implica parasitismo pero sí la coexistencia de dos organismos distintos (del latín *mykes*=hongo y *rhiza*=raíz).

En cuanto al posible origen de este tipo de asociación, Brundrett (2002) en su revisión de la coevolución de hongos y plantas terrestres, demuestra mediante el uso de registros paleobotánicos, estudios morfológicos y análisis de ADN que los hongos han estado asociados con las plantas desde el Devónico temprano (cerca de 400 millones de

años atrás) donde ya los primeros briófitos estaban asociados a hongos micorrícicos arbusculares, aun cuando no habían desarrollado raíces.

Tipos de micorrizas

La bibliografía más reconocida sobre micorrizas coincide en identificar cinco tipos de micorrizas (Haley y Smith, 1983; Brundrett *et al.*, 1996; Read y Smith, 2008):

- 1- Micorrizas Vesículo-Arbuscular, donde el hongo Zygomycetes forma vesículas y arbusculos en el interior de la raíz e hifas fuera de la misma.
- 2- Ectomicorrizas, donde el hongo Basidiomycetes y otros hongos forman un manto externo sobre la raíz y una red de Hartig entre las células radicales.
- 3- Orquideo-micorrizas, el hongo produce hifas dentro de la raíz o tallo de plantas del grupo Orchidaceae.
- 4- Ericoide-micorrizas, involucra hifas del hongo en los pelos radicales de plantas pertenecientes al orden Ericales.
- 5- Ectoendomicorrizas, 6- arbutoide y 7- monotropoide, las cuales son similares a las ectomicorrizas pero tienen caracteres anatómicos especializadas.

Según Singh *et al.* (2011), hay dos grandes clases de hongos simbioses asociados con plantas:

1- **Hongos Endofíticos**, los cuales residen completamente dentro de los tejidos de la planta y pueden estar asociados a raíz, tallos y/o hojas; y solo emerge de la planta para esporular o cuando el tejido senece.

2- **Hongos Micorrícicos**, que residen exclusivamente dentro de las raíces de las plantas, pero se extiende hacia la rizósfera.

Por otro lado, Brundrett (2002), propone tres tipos de micorrizas de acuerdo a la evolución respecto de las plantas terrestres: aquellas de edad similar a las plantas, las de edad similar a las angiospermas y aquellas que no evolucionan con las plantas. En este orden se definen las: **1-Micorrizas Vesículo-Arbuscular; 2-Ectomicorrizas y 3-Ericales**: las micorrizas que forman asociaciones con ericoideas y orquídeas pero que también pueden subsistir sin ellas. Se destaca en este trabajo el hecho de que los Glomales son el único linaje monofilético micorrícico que ha evolucionado con las plantas a lo largo de su historia.

Más recientemente, Barea *et al.* (2011) define tres tipos principales de micorrizas que difieren considerablemente entre sí en su estructura y relación fisiológica con el simbionte:

- 1- **Ectomicorrizas**: el hongo desarrolla una vaina o manto alrededor de la raíz. El micelio penetra entre las células de la raíz formando la red Hartig pero no penetra

intracelularmente. Alrededor del 3% de las plantas vasculares principalmente árboles (Fagaceae, Betulaceae, Pinaceae, Eucalyptus y algunos árboles leguminosos) forman ectomycorrizas. Los hongos involucrados son principalmente Basidiomycota y Ascomycota.

2- **Endomicorrizas:** no se forma vaina o manto y el hongo coloniza la corteza radical de manera inter e intracelular. Unos pocos tipos de endomicorrizas están restringidos en Ericaceae (micorriza ericoide) ó Orquidaceae (micorriza orquídea), pero el tipo más común y distribuido a través de casi todo el reino vegetal son las micorrizas arbusculares (AMF por sus siglas en Ingles: Arbuscular Mycorrhizal Fungi). Este tipo de micorriza se caracteriza porque el hongo forma dentro de las células de la corteza radical estructuras similares a árboles diminutos (arbúsculos) donde se produce la mayor parte del intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta. Este grupo incluye al phylum Zigomicota, orden Glomales aunque Schüssler *et al.* (2001) los ubica ya como un phylum monofilético: Glomericota.

3- **Ectoendomicorriza,** el cual presenta características de ambos grupos es decir forma vaina o manto además de penetrar intracelularmente a las células de la raíz. Incluye grupos de plantas tales como Ericales, Monotropaceae y Cistaceae.

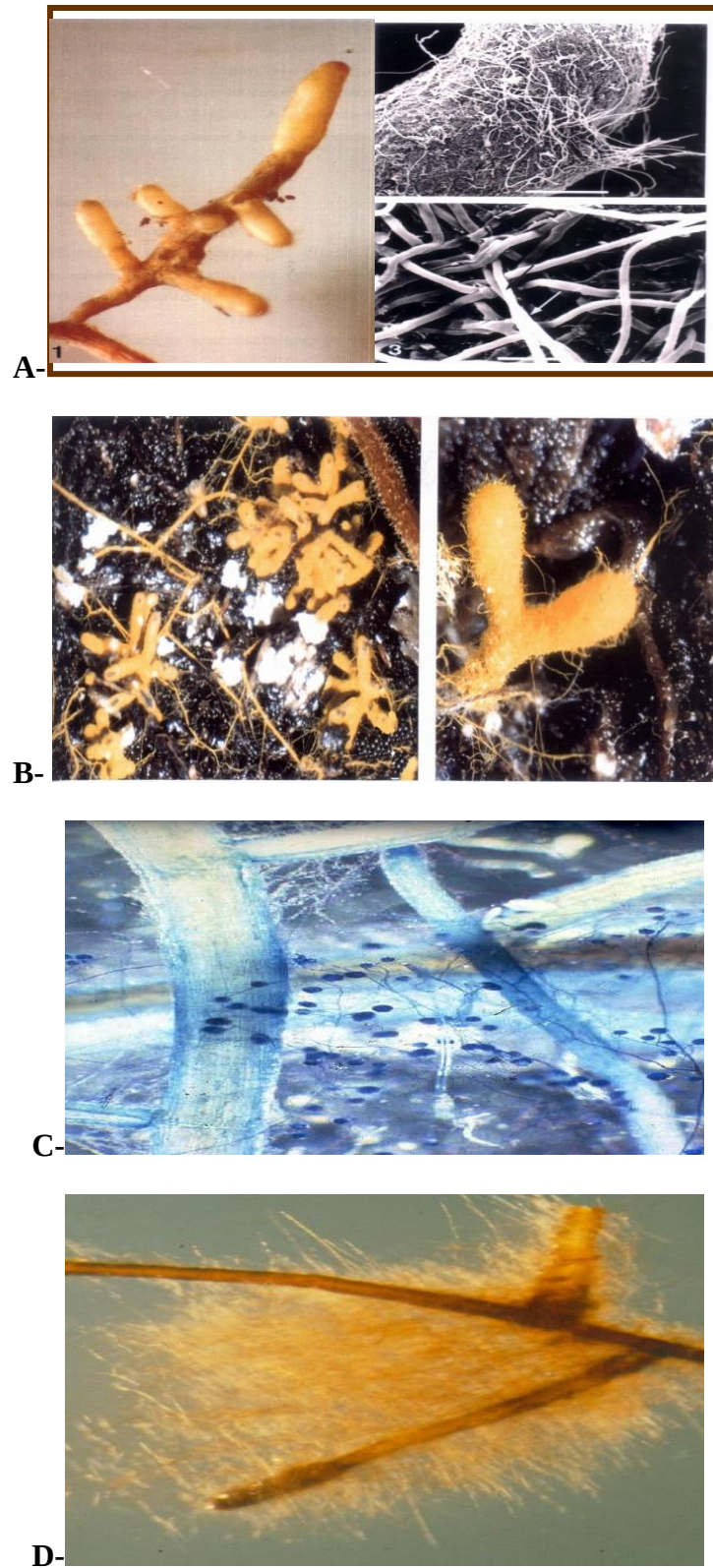


Fig. 8.1: A-Ectomicorrizas arbusculares de *Populus* B- Ectomicorrizas arbusculares de *halepensis*. C- Endomicorrizas arbusculares. Estructuras externas a la raíz: hifas y esporas. Ectoendomycorrizas Fuente: Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture (1996).

Hongos Micorrícicos Arbusculares

Los Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA) comprenden al Phylum Glomericota, orden Glomales (Brundrett, 2002). Los HFM son hongos que colonizan las raíces de más del 80% de las plantas vasculares, incluidas algunas briofitas (Schüßler *et al.*, 2001; Barea *et al.*, 2011), con excepción de miembros de la Familia Brassicaceae, Carophyllaceae, Amaranthaceae (Chenopodiaceae) y Urticaceae (Smith y Read, 2008).

Estos hongos son organismos microscópicos simbioses obligados, que necesitan de un hospedante para completar su ciclo de vida ya que el hongo durante la evolución de su relación simbiótica con las plantas hospedadoras, perdió parte de su capacidad de fijar carbono o la maquinaria genética que la soportaba y se vuelve totalmente dependiente de la planta para suplir la necesidad de carbono (Gadkar *et al.*, 2001). En este sentido, en raíces en crecimiento se ha evidenciado que el hongo potencia su metabolismo catabólico (Becard *et al.*, 2004). Cuando se limitan los recursos la diversidad funcional de los diferentes tipos de micorrizas podría representar una presión competitiva y incrementar el crecimiento y supervivencia de la planta. Recientes estudios han demostrado que la partición del fósforo del suelo entre diferentes árboles micorrizados contribuyen a la coexistencia de bosques subtropicales naturales (Liu *et al.*, 2018). La simbiosis por HFM depende de una sutil y constante diálogo molecular entre las dos partes, de los cuales el reconocimiento del hospedante es el importante primer paso (Bouwmeester *et al.*, 2007). Paszkowski (2006) en su revisión sobre las señales en la micorrización, propone y describe una serie de etapas generales que llevan a la simbiosis con HFM diferenciadas en:

- i) Fase presimbiótica, donde algunos exudados y agentes volátiles de la raíz son captados por el hongo y provocan activación de algunos genes y alteraciones morfofisiológicas que llevan a la germinación de la espora. Luego las hifas crecen en el suelo y si no encuentran un hospedante cesan su crecimiento. Si en las proximidades alcanzan una raíz, los exudados vegetales potencian ese crecimiento y comienza la ramificación aumentando así la posibilidad de contactar con una raíz. La sustancia involucrada en esta etapa, es la estrigolactona de la cual existen varios trabajos que exponen su estructura y actividad biológica (Akiyama y Hayashi, 2006; Yoneyama *et al.*, 2009; García-Garrido *et al.*, 2009).
- ii) Contacto y entrada del hongo dentro de la raíz: aunque no son bien conocidos los detalles de esta etapa, se cree que existen receptores presimbióticos en la raíz y un mecanismo genético de anticipación simbiótica que señala las células o sector donde se iniciará la colonización y penetración de las hifas.

- iii) Proliferación intraradical del hongo: el contacto planta-hongo promueve cambios morfológicos en las hifas del hongo formando así el apresorio, hifa de tipo elíptica, que se adhiere a la raíz. Luego se forman hendiduras radicales por donde penetrarán las hifas con la ayuda de un aparato de prepenetración, tubo que guiará las hifas al lumen celular y genera el reposicionamiento del núcleo
- iv) Invaginación celular y transferencia de nutrientes: el hongo comienza a invaginarse dentro de las células de la corteza radical y forma una estructura denominada arbusculo y comienza el intercambio de nutrientes.

A la aparición del primer arbusculo le sigue el desarrollo de las vesículas, como producto de la invaginación de las hifas entre las células radicales y con funciones de reservar sustancias nutritivas (Brundrett *et al.*, 1996). Después de la colonización el micelio del hongo crece fuera de la raíz explorando el suelo en busca de nutrientes minerales y también pueden colonizar otras raíces susceptibles. El ciclo de vida del hongo se completa con la formación de la clamidospora en el micelio externo (Porcel *et al.*, 2012) (Figura 8.2).

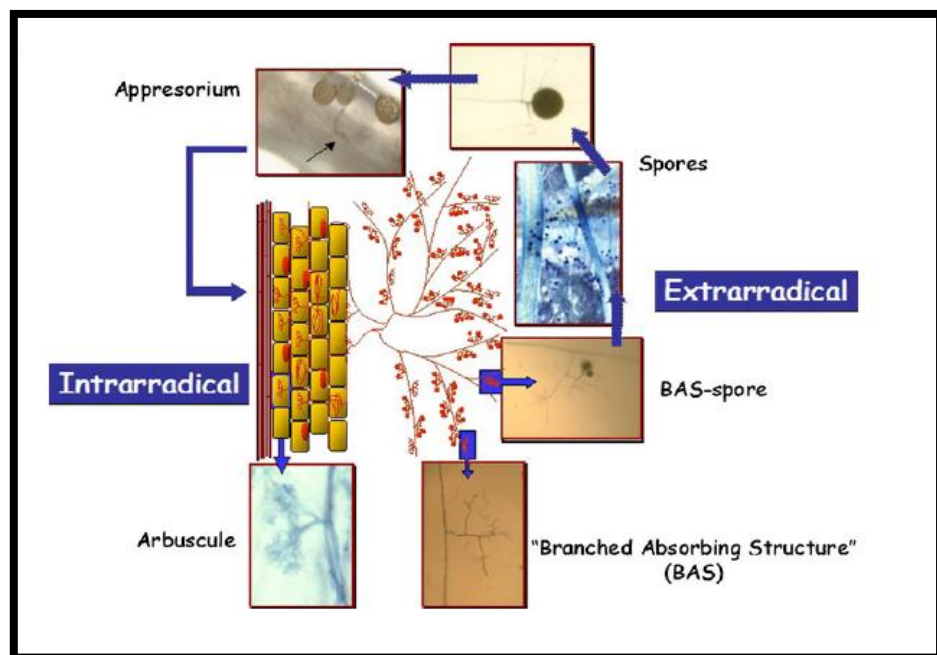


Fig. 8.2: Ciclo de vida del HFM con los distintos estadios morfológicos. Fuente Porcel *et al.*, (2012), Appresorium: Apresorio; Arbuscule: Arbusculo; Spore: Spora; Branched Absorbing Structure: Estructura Absorbente Ramificada. (Porcel *et al.*, 2012)

Las micorrizas arbusculares están presentes y forman parte integral de los sistemas agrícolas existentes. Los hongos formadores de micorrizas son simbioses obligados lo que significa que no pueden completar su ciclo biológico en ausencia de la planta hospedadora y que necesitan estar asociados a la raíz de la planta para obtener los hidratos

de carbono procedentes de la fotosíntesis. A cambio el hongo suministra a la planta nutrientes minerales y agua que extrae del suelo y supone una prolongación de las raíces de la planta más allá de la zona de agotamiento de nutrientes que se crea a su alrededor (Ruiz Lozano, 2003) Los hongos formadores de micorrizas ayudan a la captación de los elementos minerales del suelo mediante dos mecanismos principales: iones como el fosfato, el amonio, el zinc o el cobre son transportados más rápidamente a través de las hifas del hongo que por difusión a través del suelo. El segundo es un mecanismo bioquímico que incrementa la afinidad de la raíz micorrizada por el fosfato soluble de manera que las raíces captan fosfato a partir de concentraciones más bajas en el suelo. Los efectos de la inoculación con hongos micorrizicos (*Glomus mosseae*) sobre la relación del agua y la velocidad de absorción del dióxido de carbono en vid (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) han sido reportados por Nikolaou *et al.* (2003). La simbiosis también favorece la absorción de agua y permite un mejor desarrollo de las plantas en situaciones de sequía, es especial en especies forrajeras de ambientes semidesérticos (Pedranzani *et al.*, 2015 y 2016).

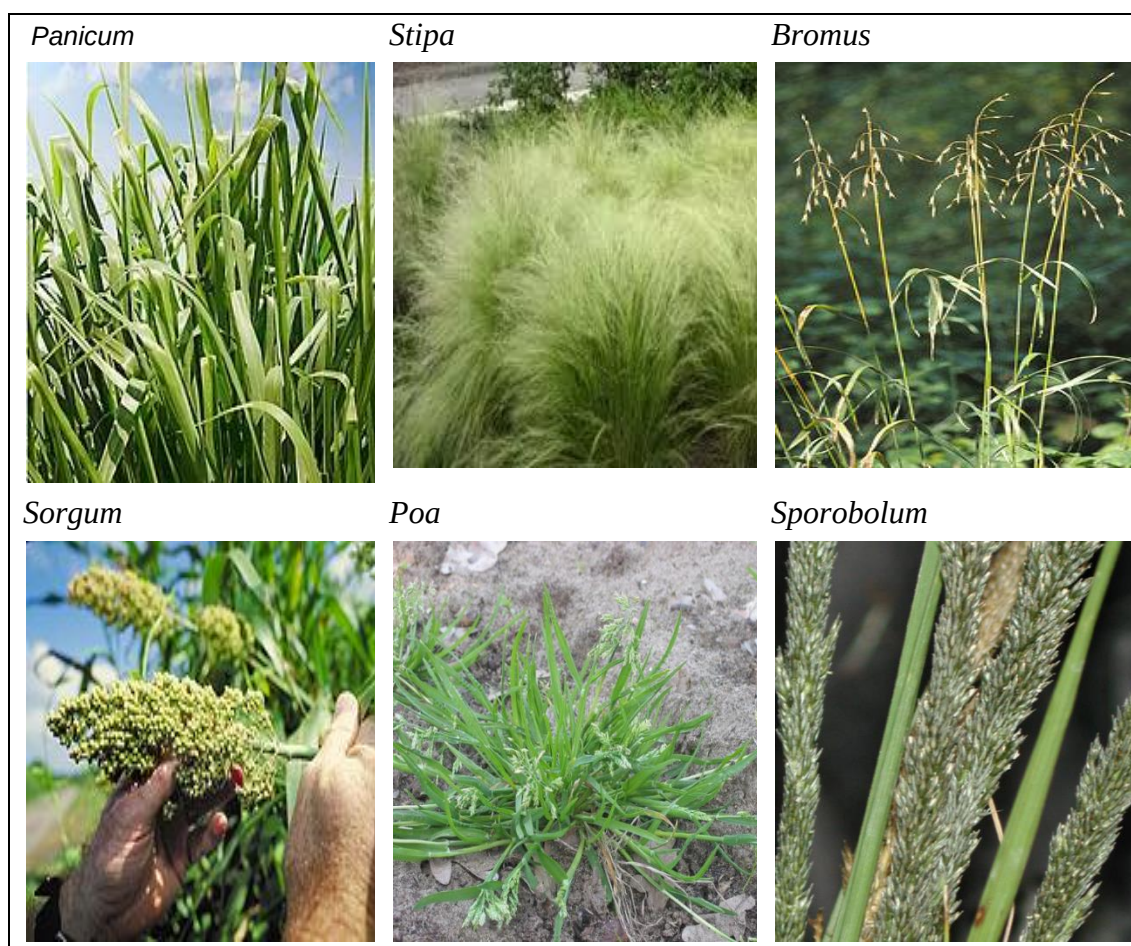


Fig. 8.3: Plantas de interés agronómico donde se han descrito endomicorrizas (Fuente: Pedranzani H, 2015).

Esta asociación simbiótica se establece de forma natural siempre y cuando en el terreno de cultivo se encuentren los propágulos infectivos del hongo formador de micorrizas nativos en cantidades suficientes para colonizar las raíces de la planta introducida y que éstos sean efectivos en las condiciones dadas (Giovannetti y Mosse, 1980).

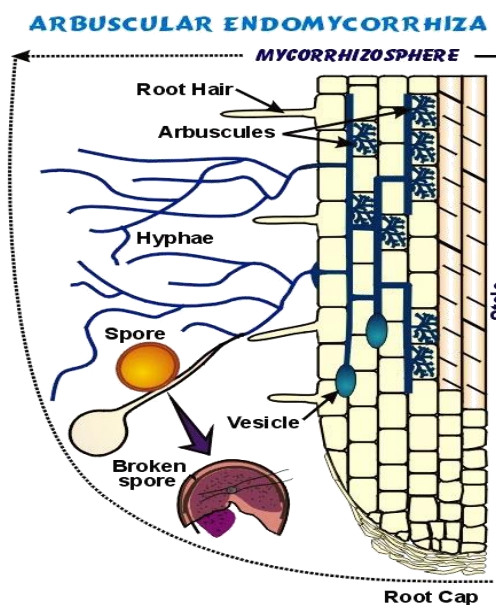


Fig. 8.4: Endomicorrizas arbusculares. Estructuras internas a la raíz: Arbúsculos y vesículas. Estructuras externas a la raíz: hifas y esporas Fuente: Working with Mycorrhizas in forestry and agricultura (1996).

Una vez establecida la simbiosis con la planta huésped, la HFM puede conferir tolerancia contra patógenos radiculares (Pozo *et al.*, 2002), y se ha observado que las plantas micorrizadas son más tolerantes a diversas enfermedades de las raíces. En cuanto a la enfermedad de la podredumbre de la raíz blanca, Aguin-Casal *et al.* (2006) observaron que la inoculación de la vid con el HFM *Glomus aggregatum* dio como resultado un índice de enfermedad reducido de *A. mellea* en varios porta injertos de vid. Se ha demostrado que diversos mecanismos desempeñan un papel en la protección de las plantas debido al HFM, como por ejemplo la nutrición mejorada de las plantas, la compensación de daños, la competencia por sitios de colonización y fotosintatos, cambios en el sistema radicular, cambios en las poblaciones microbianas de la rizósfera y la activación de mecanismos de defensa de las plantas. Se ha observado que varios de estos mecanismos pueden ser operativos simultáneamente (Azcón-Aguilar *et al.*, 2002). Además, la HFM podría provocar respuestas de defensa localizadas en tejidos colonizados y respuestas sistémicas en tejidos no colonizados de plantas micorrizadas. Las diferentes respuestas de las plantas para hacer frente a los estreses ambientales son

reguladas por una ida y vuelta entre hormonas y moléculas señalizadoras. El rol del ácido abscísico (ABA) en respuesta vegetal a estreses abióticos es bien conocido (Hirayama y Shinozaki, 2007). El ácido jasmónico (JA), una hormona vegetal perteneciente a la familia octadecanoica, no sólo está involucrado en la respuesta de la planta a estreses bióticos y abióticos, sino también en la regulación del desarrollo vegetal (Wasternack y Hause, 2013). JA es sintetizado por la oxigenación de ácido α -linolénico a través de una serie de reacciones dentro del cloroplasto y el peroxisoma, siendo el cis 12 ácido oxofitodienoico (OPDA) el principal intermediario de la biosíntesis de JA. JA puede ser convertido en numerosos conjugados y derivados, algunos de los cuales tienen actividad biológica bien descrita, tales como el ester metílico del JA (JAMe), cis-jasmónico, y conjugado JA-isoleucina (JA-Ile) (Wasternack y Hause, 2013).

Por otra parte, durante el estrés abiótico, se desacoplan diferentes rutas metabólicas y los electrones son transferidos a oxígeno molecular formando especies reactivas del oxígeno (ROS) tales como radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), o radicales oxhidrilos ($OH^{\bullet}$) (Noctor *et al.*, 2014). Estas ROS son moléculas tóxicas capaces de causar daño oxidativo a proteínas, ADN, y lípidos (Miller *et al.*, 2010). Los sistemas antioxidantes eliminan el exceso de ROS producidas bajo tales condiciones de estrés (Gill y Tuteja, 2010). La eliminación de ROS se lleva a cabo a través de la acción de diferentes compuestos enzimáticos y no enzimáticos, que incluyen superóxidodismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR), catalasa (CAT), ascorbatoperoxidasa, peroxidasa tiol-dependientes y las enzimas del ciclo del glutatión-ascorbato. Los mecanismos no enzimáticos incluyen compuestos tales como ácido ascórbico, glutatión, y α -tocoferol, capaces de eliminar directamente diversas ROS (Scheibe y Beck 2011).

Los hongos micorrízicos arbusculares han sido usados y estudiados por su influencia en las respuestas antioxidativas de las plantas de importancia agronómica, tales como vid (Alarcon, 2001), soja (Porcel y Ruiz-Lozano, 2004), arroz (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2010), trigo (AbdelLatef, 2010), tomate (Dell'Amico *et al.*, 2002; AbdelLatef y Chaoxing, 2011), o lechuga (Aroca *et al.*, 2008; Baslam y Goicoechea 2012) sometidos a estrés abiótico. En plantas de tomate, la inoculación con hongos AM causó un incremento en las actividades de SOD, CAT, peroxidasa (POC) y ascorbatoperoxidasa (APX) en las hojas afectadas por sales y redujo el daño oxidativo a lípidos, como lo indican el contenido de malondialdehído (MDA) (AbdelLatef y Chaoxing, 2011). A nivel molecular, Aroca *et al.* (2007) encontraron que la simbiosis MA regula las propiedades hidráulicas de la raíz y potencia la tolerancia de *Phaseolus vulgaris* a estrés por sequía, frío y salinidad, siendo la regulación estrechamente relacionada con la regulación de niveles de proteínas PIP2 y estado de fosforilación. Además, dependiendo de la presencia

de hongos MA, se observaron diferentes expresiones de genes PIP estudiados bajo cada estrés.

MA también afectan el sistema de vástago de las plantas, llevando frecuentemente a una tolerancia mayor a estreses abióticos que en aquellos de plantas no-micorrízicas (no-MA). Por ejemplo, la simbiosis MA aumentó la eficiencia fotosintética en más del 40%, indujo la acumulación de glutatión antioxidante, y redujo la acumulación de peróxido de hidrógeno y daño oxidativo a lípidos en plantas de arroz sometidas a estrés por sequía (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2010) o bajo estrés salino (Hajiboland *et al.*, 2010). Se ha encontrado que la mitigación de las inhibiciones metabólicas de la fotosíntesis por simbiosis MA está relacionada a la estimulación del transporte y metabolismo de carbohidratos entre fuente y demanda (Kaschuk *et al.*, 2009). Los hongos MA modulan las relaciones fuente-demanda y pueden estimular suficientemente las velocidades de fotosíntesis para compensar los requerimientos de carbono del hongo (Dodd y Pérez-Alfocea, 2012).

A fin de expandir el uso de *D. eriantha* en Argentina, es necesario mejorar su tolerancia a estreses ambientales tales como frío, sequía y salinidad. Para lograrlo, una estrategia que vale la pena probar es el uso de hongos MA. La elucidación de las respuestas fisiológicas y bioquímicas de una planta comunes a diferentes estreses abióticos cuando se asocian con hongos MA nos ayudará a mejorar las características de esta especie para su crecimiento en hábitats semiáridos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Experimental

El experimento experimental, consistió de un diseño de bloque completamente al azar con diez réplicas por tratamiento. El experimento tuvo dos factores: (1) tratamiento por inoculación, con plantas de control no inoculadas (NM) y plantas inoculadas con el hongo MA *Rhizophagus irregularis* (AM) y (2) aplicaciones de estrés abiótico. Esto significa que un grupo de plantas fue cultivado bajo condiciones óptimas durante la totalidad del experimento, mientras que los otros grupos de plantas fueron sometidos a estrés por sequía, por frío o por salinidad. Por lo tanto, hubo ocho tratamientos, cada uno con diez réplicas, dando un total de 80 macetas (Fig. 8.5)



Fig. 8.5: Macetas con plantas control y micorrizadas. (Foto: Hilda Pedranzani)

Suelo y material biológico

Se recolectó un suelo arcilloso de los terrenos de la Estación Experimental Zaidin (Granada, España). El suelo tenía un pH de 8.1 (medido en agua, 1:5 m/v) 1.5% materia orgánica; concentraciones de nutrientes (g kg^{-1}): N total, 1.9; P total, 1 (NaHCO_3 – P extraíble); y K total, 6.9. El P disponible en el suelo era 27 mg Kg^{-1} . El suelo fue tamizado (5 mm), diluido con arena de cuarzo ($<2 \text{ mm}$) (1:1 suelo/arena, v/v), y esterilizado por vapor (100°C por 1 hora durante 3 días consecutivos).

Semillas de *D. eriantha* Steudel cv. Sudafricana fueron lavadas por 3 min en etanol puro y enjuagadas tres veces con agua destilada. Diez semillas fueron sembradas en macetas de 1000 ml que contenían una mezcla esterilizada de suelo/arena (1:1, v/v) y reducidas a 5 plántulas por maceta luego de la emergencia. El inóculo micorrízico de *R. irregularis* (Schenck y Smith), cepa EEZ 58 (Ri), fue preparada como lo describe Porcel et al. (2006), y se adicionaron 10 g del inóculo a la mitad de las macetas en el momento de la siembra, justo debajo de las semillas. Las macetas no- inoculadas recibieron igual cantidad de inóculo micorrízicoautoclavado junto con 2 ml de filtrado de inóculo MA a fin de proveer una población microbiana general libre de propágulos de MA.

Condiciones de Crecimiento

Las plantas inoculadas (MA) y no inoculadas (NM) fueron cultivadas en invernadero a $24:20^\circ\text{C}$ (día/noche), con fotoperíodo 16:8, humedad relativa de 50-60%, y una densidad promedio de flujo de fotones foto sintéticos de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, según mediciones con un medidor de luz (LICOR, Lincoln, NE, USA, modelo LI-188B). Las plantas fueron regadas a capacidad de campo y mantenidas bajo condiciones óptimas

durante 6 semanas. Luego de ese período, las plantas MA y NM fueron divididas en cuatro grupos. Un grupo se mantuvo como control a 24 °C con suelo a capacidad de campo (bajo condiciones de no-estrés). Los tres restantes grupos fueron sometidos a los siguientes tratamientos: (1) 24 °C y 60% de capacidad de campo durante 1 semana (estrés por sequía), (2) 4 °C durante 72 h (estrés por frío), y (3) 24 °C y suelo irrigado con 200 mMNaCl durante 2 semanas (estrés salino). La duración y niveles de estrés impuestos se basaron en referencias bibliográficas para estos estreses (Pedranzani *et al.* 2005; Aroca *et al.*, 2007; Di Giambatista *et al.*, 2010; Garbero *et al.* 2010, 2012). Las plantas fueron cosechadas luego de los tratamientos de estrés.



Fig. 8.6: a-plántula nacida en arena estéril, b- plántulas trasplantadas y c-plantas tratadas en condiciones de medir los parámetros. (Foto: Hilda Pedranzani)

Desarrollo micorrícico y determinación de producción de biomasa vegetal

La colonización se estimó por inspección visual de estructuras fúngicas luego de clarificar las raíces en 10% KOH y fijar con 0,05% m/v azul tripán en ácido láctico según describen Philips y Hayman (1970). El porcentaje de colonización micorrícica se calculó de acuerdo al método de intersección de cuadrícula (Giovannetti y Mosse, 1980).

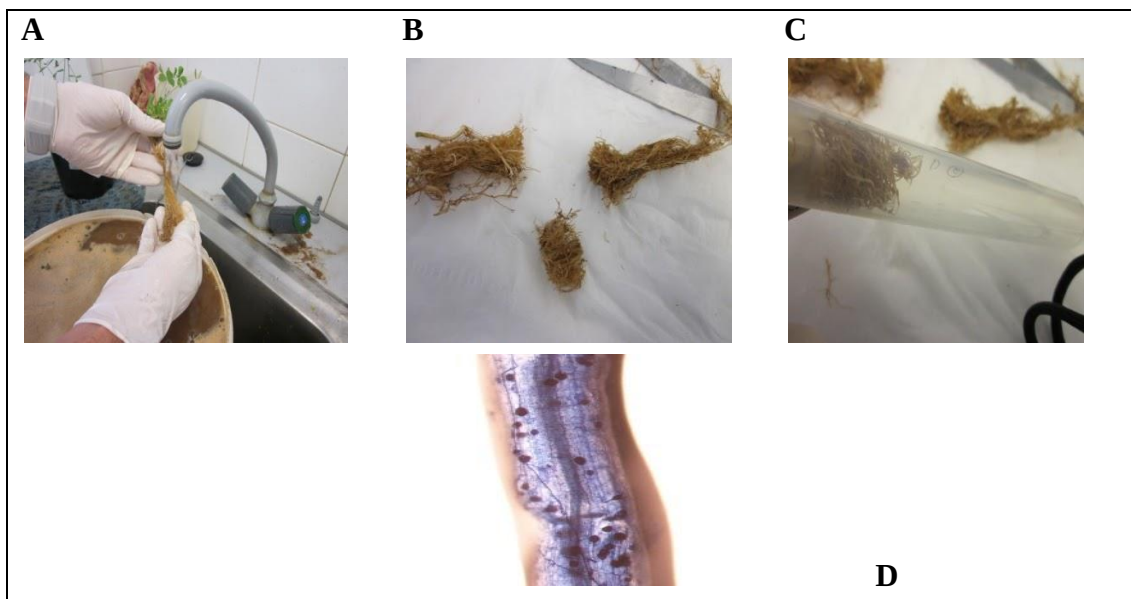


Fig. 8.7: Tratamiento de raíces: Lavado (A) clarificado en 10% KOH (B y C) y fijado con 0,05% m/v azul tripán en ácido láctico según describen Philips y Hayman (1970). Observación de vesículas e hifas de micorrizas en raíces de *Digitaria* (D), (Foto : Hilda Pedranzani) .

Luego de los tratamientos, se cosecharon las plantas MA y NM y se determinaron separadamente el peso fresco (FW) de raíces y de hojas. El peso seco (DW) de hojas y de raíces fue medido luego de secado en estufa de aire caliente forzado a 70 °C durante 2 días. El contenido de materia seca de los vástagos se calculó como $1 - (FW - DW) / fw$ (Marulanda *et al.*, 2007), y se expresó como gramo de peso seco por gramo de peso fresco (g DW / g FW)

Conductancia estomática y eficiencia fotosintética

La conductancia estomática se midió 2 horas después del inicio de la luz usando un sistema de porómetro (Porometer AP4, Delta-T DeviesLtd, Cambridge, UK). Las medidas se realizaron en la primera hoja verdadera de cinco diferentes plantas por tratamiento.

La eficiencia del fotosistema II (Qy) se midió utilizando Fluor Pen FP100 (PhotonSustems Instruments, Brno, CzechRepublic) que permite una evaluación no invasiva del desempeño fotosintético de la planta por medición de la clorofila por fluorescencia Oxborough y Baker (1997). Las medidas se tomaron en la primera hoja verdadera de cinco diferentes plantas para cada tratamiento.

Acumulación de peróxido de hidrógeno y determinación de daño oxidativo a lípidos.

La acumulación de peróxido de hidrógeno en las hojas se determinó utilizando el método de Patterson (Patterson *et al.* 1984) con ligeras modificaciones según describe Aroca *et al.* (2003). 250 mg de peso fresco de hojas se homogeneizó con 5 ml 5% (m/v) ácido tricloroacético (TCA) conteniendo 0.1 g de carbón activado y 1 % (m/v) polivinilpolipirrolidona (PVPP). EL homogenato fue centrifugado a 18.000 g por 10 minutos. El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro Milliporo (0.22 μ m). Se adicionaron un volumen de 1.2 ml de 100 mM solución buffer de fosfato potásico (pH 8.4) y 0.6 ml de reactivo colorimétrico a 130 μ l del sobrenadante. Se obtuvo reactivo colorimétrico fresco mezclando 1:1 (v/v) de 0.6 mM oxalato de potasio y titanio y 0.6 mM 4-2 (2-piridilazo) resorcinol (sal disódica). Las muestras fueron incubadas a 45 °C por 1 h y se registró absorbancia a 508 nm. Se hicieron blancos reemplazando extracto de hojas con 5% TCA. Los valores de concentración fueron expresados como nmol H₂O₂ g⁻¹ FW.

Los peróxidos de lípidos se extrajeron por molienda de 500 mg de hojas y 6 ml de 100 nM solución buffer de fosfato de potasio (pH 7) utilizando un mortero enfriado por hielo. Los homogenatos se filtraron a través de una capa de Miracloth y centrifugadas a 15000 g durante 20 min. Se formó el cromógeno mezclando 200 μ L de sobrenadantes con 1 ml de una mezcla de reacción conteniendo 15 % (m/v) TCA, 0.375 % (m/v) ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), 0.1 % (m/v) butilhidroxitolueno, 0.25 N HCl, e incubando la mezcla a 100 °C durante 30 min (Minotti y Aust, 1987). Luego de enfriar a temperatura ambiente, los tubos fueron centrifugados a 800g durante 5 min, y el sobrenadante se utilizó para medidas espectrofotométricas a 532 nm. Se estimó la peroxidación lipídica como el contenido de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) y se expresó como equivalentes de malondialdehído (MDA) de acuerdo a Halliwell y Gutteridge (1989). La curva de calibración se realizó utilizando MDA en un rango de 0.1 – 10 nmol. Se preparó un blanco reemplazando la muestra por medio de extracción, y controles para cada muestra se prepararon reemplazando TBA por 0.25 N HCl. En todos los casos, se incluyó 0.1 % (m/v) butilhidroxitolueno en todas las mezclas de reacción para prevenir la formación artificial de TBARS durante el paso del ensayo del calentamiento de ácido.

Determinación de las actividades enzimáticas antioxidantes.

Se extrajeron enzimas a 0-4 °C de 1 g de peso fresco de hojas con 50 mg PVPP y 10 ml de 50 mM solución buffer de fosfato de potasio (pH 7.8) conteniendo 0.1 mM EDTA para superóxidodismutasa (SOD), catalasa (CAT), y ascorbatoperoxidasa (APX). Para extracción de la glutatiónreductasa (GR), al buffer se le suministró 10 mM β -

mercaptoetanol (Porcel *et al.*, 2003). Los extractos se filtraron a través de cuatro capas de tela de nylon y centrifugados a 20000 x g a 0-4 °C durante 20 min. Se mantuvieron los sobrenadantes a -70 °C para posteriores ensayos enzimáticos.

La actividad de SOD total (EC 1.15.1.1) se midió de acuerdo al método descrito por Beyer y Fridovich (1987) que se basa en la habilidad del SOD para inhibir la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) por parte de radicales superóxido producidos fotoquímicamente. Una unidad de SOD ha sido definida como la cantidad de enzima que se requiere para inhibir la tasa de reducción de NBT al 50% a 25 °C. La actividad CAT (EC 1.16.1.6) se midió como la desaparición de H₂O₂ (Aebi, 1984). La mezcla de reacción (3 ml) contenía 10.6 mM H₂O₂. La reacción se inició adicionando 25 µl del extracto y monitoreando el cambio de absorbancia a 240 nm y 25 °C durante 3 min. La actividad de APX (EC 1.11.1.11) se midió en una reacción de 1 ml de volumen conteniendo solución buffer de fosfato de potasio 50 mM (pH 7.0), peróxido de hidrógeno 0.1 mM, y ascorbato 0.5 mM. La adición del H₂O₂ inició la reacción, y se registró el descenso de absorbancia a 290 nm durante 1 min para determinar la tasa de oxidación de la ascorbato (Amako *et al.* 1994). Finalmente, la actividad de GR (EC 1.6.4.2) se determinó mediante el procedimiento descrito por Carlberg y Mannervik (1985). La mezcla de reacción (1 ml) contenía HEPES 0.1 M pH 7.8, EDTA 1 mM, MgCl₂ 3 mM, glutatión oxidado 0.5 mM, NADPH 0.2 mM, y 150 µl de extracto de enzima. La tasa de oxidación de NADPH fue monitoreada por el descenso de absorbancia a 340 nm durante 2 min. Se utilizaron dos blancos, uno sin el extracto de enzima y el otro sin el glutatión oxidado.

Extracción, purificación y determinación de jasmonatos.

Se extrajeron ácido 12-cis-oxofitodienoico (OPDA), JA, se pre-purificaron y se determinación por GC-MS de acuerdo a Miersch *et al.* (2008) utilizando 0.5 g (FW) de material de hoja. Se adicionaron (²H₆) JA, (²H₅) OPDA, en cantidades apropiadas, como estándares internos.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron sometidos a análisis ANOVA de dos factores, con tratamiento de inoculación y estrés abiótico como fuentes de variación. Post hoc, se utilizaron comparaciones con la Prueba de Rango Múltiple de Duncan (Duncan, 1955) para determinar diferencias entre los grupos, con la ayuda del programa SAS (Statistical Analytical Software), versión 3.5 (1991).

RESULTADOS

Desarrollo micorrícico

En este estudio, no se observó colonización micorrízica en plantas de *D. eriantha* a las que no se les administró un inóculo MA. Las plantas inoculadas mostraron entre 68 y 72% de colonización micorrízica en las raíces, bajo diferentes tratamientos (no se muestran los datos). Sin embargo, no se detectaron diferencias luego de la aplicación de los estreses abióticos.

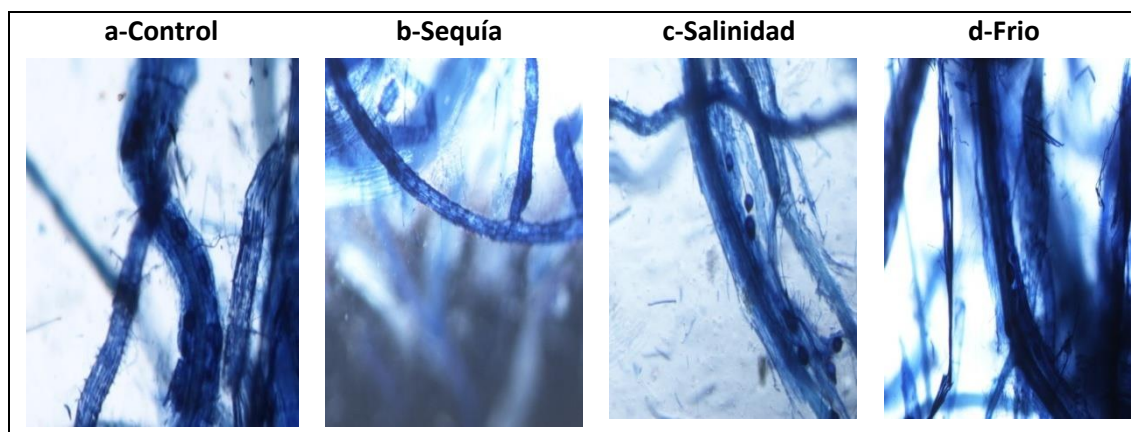


Fig. 8.8: Raíces de *Digitaria eriantha*, teñidas mostrando vesículas e hifas de la micorriza Arbuscular *Rhizophagus irregularis* (AM), bajo los distintos tratamientos (Foto: Hilda Pedranzani)

Conductancia estomática, eficiencia fotosintética y producción de biomasa vegetal

La simbiosis MA puede resultar en tasas alteradas de movimiento de agua dentro, a través y hacia fuera de las plantas huésped, con consecuentes efectos en la hidratación de los tejidos y la fisiología de la hoja (Augé, 2001). Por lo tanto, se determinaron parámetros que reflejaran la fisiología de la hoja relacionada al agua, para elucidar el impacto de la MA sobre las respuestas de *D. eriantha* al estrés.

La conductancia estomática mostró un descenso significativo bajo todas las condiciones de estrés en plantas MA como así también en plantas NM, cuando se compararon con las condiciones de Control. Bajo condiciones de no-estrés, sequía y salinidad, sin embargo, las plantas MA exhibieron conductancia estomática más alta en comparación con plantas no-MA. Los valores más bajos de conductancia estomática se observaron bajo estrés por frío, tanto en plantas MA como plantas NM, mostrando valores similares (Tabla 8.1). La eficiencia del Fotosistema II en plantas NM fue similar tanto en condiciones de no-estrés como de sequía, pero mostraron descenso bajo condiciones de estrés por frío y por salinidad. En las plantas MA, la eficiencia fotosintética descendió

significativamente bajo condiciones de sequía, mientras que, bajo estrés por frío, las plantas MA incrementaron su eficiencia fotosintética cuando se las comparó con plantas NM (Tabla 8.1).

Tabla 8.1: Conductancia estomática, eficiencia fotosintética (Photosystem II) y contenido de materia seca de plantas de *D. eriantha* NM o MA, con el hongo MA *R. irregularis* y cultivado bajo condiciones de estrés por sequía, salinidad, por frío o ningún estrés. (Pedranzani *et al.*, 2015)

	Conductancia estomática mmol m ⁻² s ⁻¹		Eficiencia Fotosintética		Materia seca de tallos (g.)	
	NM	AM	NM	AM	NM	AM
Sin Estrés	26,91±0,08b	35,75±0,58a	0,73±0,01a	0,75±0,01a	0,11±0,01c	0,21±0,05b
Sequía	11,55±0,55d	17,98±1,89c	0,69±0,01a	0,55±0,02d	0,24±0,01b	0,36±0,02a
Salinidad	7,78±0,46c	12,75±0,65d	0,67±0,01b	0,63±0,02b	0,25±0,01b	0,21±0,01bc
Frio	8,59±1,10c	8,75±0,91c	0,58±0,02b	0,67±0,02b	0,16±0,01d	0,21±0,01bc

Medias ± error estándar que muestran diferentes letras son significativamente distintos ($P \leq 0.05$) según Prueba de Rango Múltiple de Duncan ($n = 5$)

Bajo todas las condiciones de crecimiento, las plantas MA mejoraron el contenido de materia seca en las hojas excepto bajo estrés por salinidad, donde no se encontraron diferencias significativas entre plantas MA y NM.

Peróxido de hidrógeno, daño oxidativo a lípidos y actividad enzimática antioxidante

Se sabe muy bien que el estrés por frío, por sequía y por salinidad inducen estrés oxidativo en plantas (AbdelLatef, 2010; Garbero *et al.*, 2010). Las células vegetales poseen una gama de mecanismos de protección y de sistemas de reparación que pueden minimizar la ocurrencia de daño oxidativo causado por especies reactivas del oxígeno (ROS) (Abdel Latef, 2010). Además, la capacidad antioxidante de la planta huésped puede ser activada por la simbiosis MA (AbdelLatef y Chaoxing, 2011). Para elucidar estos efectos de la MA, se determinaron niveles de ROS, daño oxidativo a lípidos y la correspondiente actividad enzimática en plantas NM y MA, control y sometidas a estrés.

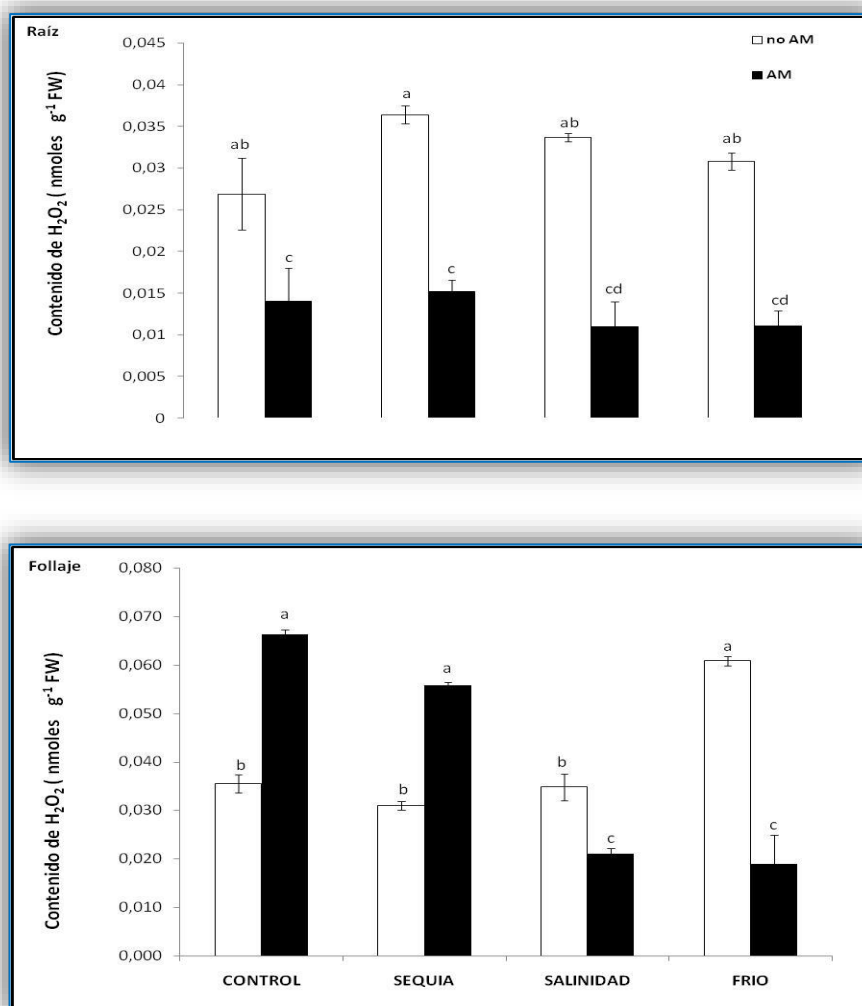


Fig. 8.9: Acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en raíces y hojas de plantas NM o MA de *D. eriantha*, inoculadas con hongo MA *R. irregularis* y cultivados bajo condiciones de estrés por sequía, salinidad, por frío o ningún estrés. Las barras representan media $\pm$ error estándar. Los valores que muestran diferentes letras son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) según Prueba de Rango Múltiple de Duncan ($n = 5$) (Pedranzani *et al.*, 2015).

El nivel de peróxido de hidrógeno acumulado en las raíces fue significativamente mayor en plantas NM que en plantas MA, para todos los tratamientos, alcanzando diferencias máximas de hasta 75 % bajo estrés por sequía (Fig. 8.9), mientras que en plantas MA no se observaron diferencias entre tratamientos. En los vástagos de plantas MA, el H_2O_2 se incrementó en un 95 % bajo condiciones de no-estrés y de estrés por sequía, mientras que, en plantas MA sometidas a salinidad o frío, descendió 40 y 68 %, respectivamente. La acumulación de H_2O_2 aumentó en plantas NM hasta un 40 % bajo condiciones de estrés por frío en comparación con condiciones de no-estrés.

En las raíces, el daño oxidativo a lípidos se incrementó significativamente en un 115 %, sólo como consecuencia de la sequía en ambas, plantas NM y plantas MA, cuando se compararon con plantas no estresadas (Tabla 9.2). Bajo salinidad, el estrés disminuyó significativamente los niveles de MDA en ambas, plantas MA y plantas no-MA. En los vástagos, los niveles de MDA descendieron en plantas MA bajo condiciones de estrés por frío y de no-estrés. Por el contrario, bajo tratamientos de sequía y de salinidad, los niveles de MDA fueron significativamente mayores en plantas MA en comparación con plantas NM.

Tabla 8.2: Malón di aldehído(MDA) Daño oxidativo de lípidos en raíces y follaje de plantas NM o MA de *D. eriantha*, inoculadas con hongo MA *R irregularis* y cultivados bajo condiciones de estrés por sequía, salinidad, frío o ningún estrés (Pedranzani *et al.*, 2015)

	MDA (nmol g ⁻¹ PF)		MDA (nmol g ⁻¹ PF)	
	Raíz		Follaje	
	NM	AM	NM	AM
Sin Estrés	0,70 b	0,69 b	1,70 c	0,75 e
Sequía	1,85 a	1,82 a	2,01 b	3,15 a
Salinidad	0,55 d	0,53d	1,67 c	2,10 b
Frio	1,10 b	1,07 b	2,10 b	1,40 d

Los valores que muestran *diferentes letras* son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) según Prueba de Rango Múltiple de Duncan ($n = 5$)

Entre las enzimas conocidas por estar involucradas en la detoxificación de ROS, se e SOD, CAT, APX y GR y se determinaron sus actividades en las raíces y hojas de todas las plantas (Tabla 9.2). En las raíces, la actividad de SOD fue significativamente más baja en plantas MA que en plantas NM bajo condiciones de estrés por sequía, por salinidad y de no-estrés. Además, sequía y salinidad incrementaron la actividad de SOD en ambas, plantas MA y plantas NM. Por el contrario, el estrés por frío disminuyó drásticamente la actividad de SOD en plantas NM e incrementó esta actividad en plantas MA a niveles similares a aquellos observados en plantas NM no estresadas. En los vástagos, los niveles de actividad de SOD fueron más bajos bajo condiciones de estrés comparados con tratamientos de no –estrés. Sin embargo, las plantas MA mostraron significativamente valores más altos que para plantas NM bajo las diferentes condiciones ensayadas (Tabla 8.3).

La actividad de CAT pareció consistentemente mejorada en ambos, raíces y vástagos de plantas MA bajo condiciones de estrés y de no-estrés (Tabla 8.3). Este incremento fue significativamente más alto en raíces sometidas a estrés por frío y en vástagos sometidos a estrés por sequía. En general, las plantas NM no mostraron

diferencias en la actividad de CAT entre los distintos tratamientos de estrés, comparadas con condiciones de no-estrés.

La actividad de APX fue siempre significativamente más alta en plantas MA que en plantas NM, en ambos, tejidos de raíces y de vástagos bajo todos los tratamientos (Tabla 9.3), especialmente bajo condiciones de sequía y de frío.

Tabla 8.3: Actividades de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, APX, GR) en raíces y hojas s de plantas NM o MA de *D. eriantha*, inoculadas con hongo MA *R. irregularis* y cultivados bajo condiciones de estrés por sequía, salinidad, frío o ningún estrés. (Pedranzani *et al.*, 2015)

Enzimas asociadas a la mitigación del estrés abiótico en follaje					
		Control	Sequia	Salinidad	Frio
SOD	NM	-	-	-	-
	AM	+	+	+	+
CAT	NM	-	-	-	-
	AM	+	+	+	+
APX	NM	-	-	-	-
	AM	+	+	+	+
GR	NM	+	+	+	+
	AM	-	-	-	-
Enzimas asociadas a la mitigación del estrés abiótico en raíces					
		Control	Sequia	Salinidad	Frio
SOD	NM	+	+	+	-
	AM	-	-	-	+
CAT	NM	-	-	-	-
	AM	+	+	+	+
APX	NM	-	-	-	-
	AM	+	+	+	+
GR	NM	+	+	+	+
	AM	-	-	-	-

La actividad de GR fue siempre significativamente más alta en ambos, raíces y vástagos de plantas NM comparados con plantas MA. La actividad de GR en los vástagos de plantas NM descendió alrededor del 43 % bajo condiciones de salinidad y de sequía comparada con condiciones de estrés por frío y de no-estrés (Tabla 8.3).

Jasmonatos

Se sabe que las raíces de plantas MA contienen niveles mayores de jasmonatos (Wasternack y Hause, 2013). Sin embargo, las alteraciones en los niveles de jasmonatos en vástagos de plantas MA en combinación con estreses abióticos, son menos

comprendidas. Por lo tanto, se determinaron los niveles de jasmonatos en los vástagos de plantas MA y NM sometidas a estrés. Los niveles de Ácido Oxo Phyto Dienoico (OPDA) (precursor de JA) fueron significativamente más altos en plantas MA que en plantas NM para todos los tratamientos excepto bajo condiciones de estrés por frío, donde el incremento no fue significativo (Tabla 8.4). En plantas NM, sólo el estrés salino causó diferencias significativas en el contenido de OPDA con respecto a condiciones de no-estrés. Esto recuerda al rol del contenido de OPDA en la respuesta de plantas al estrés salino (Hazman *et al.*, 2015). Estrés por frío y por sequía no mostraron diferencias cuando se los comparó con el tratamiento en plantas NM bajo ningún estrés.

El nivel de JA en las hojas de plantas NM no difirió entre tratamientos de estrés en comparación con condiciones de no-estrés (Tabla 8.4) Sin embargo, los vástagos de plantas MA no estresadas exhibieron niveles de jasmonatos más altos que en los vástagos de plantas NM, con *D. eriantha* mostrando un incremento en JA cuando hubo micorrización. Bajo condiciones de estrés por salinidad, las plantas MA mostraron contenido de JA similar a aquel de condiciones de no-estrés, mientras que el estrés por frío y por sequía disminuyeron los niveles de JA en plantas MA con respecto a aquellas plantas NM no estresadas.

Tabla 8.4: Variación de jasmonatos en raíces y hojas de plantas NM y MA de *D. eriantha*, inoculadas con hongo MA *R. irregularis* y cultivados bajo condiciones de estrés por sequía, salinidad, frío o ningún estrés. ácido 12-cis-oxofitodienoico (OPDA) y ácido jasmónico (JA) (Pedranzani *et al.*, 2015).

Acido Jasmónico y su precursor Acido Oxo Phitodienoico (OPDA) en la mitigación del estrés abiótico en hoja					
		Control	Sequia	Salinidad	Frio
OPDA	NM	-	-	-	-
	AM	+	+	+	-
JA	NM	-	-	-	-
	AM	+	+	+	-

Los + significan que son significativamente mayores a los (-) ($P \leq 0.05$) según Prueba de Rango Múltiple de Duncan ($n = 5$).

DISCUSIÓN

Los hongos MA han demostrado mejorar la tolerancia de las plantas a los estreses abióticos (Ruiz-Lozano y Aroca, 2010). Por lo tanto, los efectos de MA sobre la tolerancia al estrés de *D. eriantha* fueron elucidados en términos de micorrización, producción de biomasa como así también acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y jasmonatos. Para obtener un pantallazo de estos procesos, se aplicaron tratamientos que resultaron en tres diferentes estreses: sequía, salinidad y frío.

Para distintas especies de interés agronómico, hay abundante información en lo referente al vínculo entre estrés abiótico y micorrizas. A la fecha, sin embargo, no hay estudios que vinculen la regulación a través de simbiosis MA de la fisiología y rendimiento vegetal de plantas bajo estreses abióticos con la alteración de niveles de jasmonatos y antioxidantes en la planta huésped, y pocos estudios han investigado mecanismos comunes subyacentes a la tolerancia inducida por MA con los estreses abióticos (Aroca *et al.*, 2007). Para obtener una idea de estos mecanismos, las plantas de *D. eriantha* fueron inoculadas con *Rhizophagus intraradices* y mostraron una tasa de colonización de alrededor del 70 % de colonización en sus raíces. Dado este hallazgo, los valores de colonización observados en *Digitaria* son mayores que aquellos registrados para plantas de tomate (34 %, Dell'Amico *et al.*, 2002 y 55 % AbdelLatef y Chaoxing, 2011), soja (50 %, Porcel y Ruiz-Lozano, 2004), y arroz (45 %, Ruiz-Sánchez *et al.*, 2010), los cuales no fueron sometidos a estrés y fueron inoculados con el mismo hongo. En otros estudios que utilizaron diferentes especies de *Rhizophagus*, la colonización de raíces de vid no superó el 41 % (Alarcón *et al.* 2001). Los porcentajes de colonización en las raíces de *D. eriantha* no fueron afectados por tratamientos de estrés por frío, salinidad o sequía, en comparación al grupo de control no estresado. Esto difiere de otras especies de plantas, tales como tomate, soja, arroz y lechuga, los cuales mostraron un descenso significativo en las tasas de colonización cuando las plantas fueron sometidas a estrés hídrico (Dell'Amico *et al.*, 2002; Porcel y Ruiz-Lozano 2004; Ruiz-Sánchez *et al.*, 2010) o estrés salino (Abdel Latef y Chaoxing, 2011; Aroca *et al.*, 2013). Estos resultados indican que *R. irregularis* es altamente eficiente en términos de asociarse con *D. eriantha* cv. Sudafricana, incluso en las situaciones de estrés abiótico estudiadas.

Las plantas MA mejoraron el contenido de materia seca en vástagos en comparación a las plantas NM bajo todas las condiciones testeadas excepto para salinidad. No obstante, salinidad y bajas temperaturas causaron una disminución en los cocientes de biomasa de vástago/raíces de plantas MA. Esto puede ser debido al descenso en la conductancia estomática y la eficiencia del Photosystem II (PSII), dada la inhabilidad de las plantas para contrarrestar el efecto tóxico de NaCl (Evelin *et al.*, 2009), representando una deshidratación que causa un desorden fisiológico común a los estreses hídricos, por salinidad y por frío (Solanke y Sharpe, 2008). Sin embargo, bajo condiciones de salinidad, la simbiosis MA puede estimular el desarrollo radicular en la planta huésped como una estrategia para lidiar con la salinidad del suelo. De hecho, en un estudio previo que compara la eficiencia simbiótica de dos cepas *Glomus* con adaptación diferencial a salinidad, se encontró que el mecanismo utilizado por *Glomus* sp. para proteger plantas de lechuga de los efectos perjudiciales de la sal está basado en la estimulación del desarrollo radicular, mientras que *Glomus deserticola* llevó a una mejora en la nutrición vegetal (Ruiz-Lozano y Azcón, 2000). Entonces, en este estudio de *D. eriantha* y *R.*

irregularis, el hongo también estimuló el desarrollo radicular en la planta huésped bajo condiciones salinas (datos no mostrados), lo cual resultó en una reducción significativa en el cociente vástago/raíz de estas plantas.

La colonización micorrízica de las raíces ha tenido un efecto marcado sobre el comportamiento estomático de las hojas de la planta huésped, lo cual también favorece el intercambio de CO₂ (Goicoechea *et al.*, 1997; Augé *et al.*, 2007; Ruiz-Lozano y Aroca, 2010). Cuando la conductancia estomática de plantas MA difiere de aquella de plantas no-MA, la simbiosis en las raíces causa un cambio fundamental en la fisiología de la hoja, incluyendo alteraciones en sus propiedades hidráulicas y bioquímicas intrínsecas (Augé, 2000). Las plantas colonizadas por *R. irregularis* presentaron valores más altos de conductancia estomática que en plantas NM (Augé, 2001). En este estudio, plantas MA no estresadas y plantas MA sometidas a sequía y salinidad mostraron valores de conductancia estomática significativamente más altos (30 % en promedio) que en plantas NM de control, un resultado similar al reportado por Augé *et al.* (2014) en un meta-análisis del efecto de la micorrización sobre la conductancia estomática. En contraste, los valores obtenidos bajo condiciones de estrés por frío, no difirieron entre tratamientos, indicando que la micorrización no mitigó el efecto de las bajas temperaturas.

La eficiencia Photosystem II de *D. eriantha* se evaluó utilizando clorofila como fluorescencia. Se ha reportado previamente que las plantas micorrizadas muestran valores más altos bajo sequía (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2010; Birhane *et al.*, 2012) y tratamientos de estrés salino (Ruiz-Lozano *et al.*, 1996; Dell'Amico *et al.*, 2002; Sheng *et al.*, 2008). En el presente estudio, los valores de eficiencia fotosintética para plantas MA y NM disminuyeron significativamente en relación a plantas no estresadas cuando se sometieron a estrés. Sin embargo, la sequía causó una reducción en la eficiencia fotosintética de plantas MA en comparación con plantas NM, mientras que las bajas temperaturas resultaron en un incremento significativo en la eficiencia fotosintética de plantas MA en comparación con plantas NM. Estos resultados sugieren que los estreses abióticos evaluados afectaron el sistema fotosintético reduciendo la eficiencia fotosintética de plantas MA y NM y que el daño al Photosystem II fue más severo en plantas sometidas a sequía y salinidad.

Se ha demostrado una correlación positiva entre tolerancia a estreses abióticos en plantas MA y el mantenimiento de la eficiencia del Photosystem II, lo cual, a su vez, mantiene (Porcel y Ruiz-Lozano, 2004) o incluso incrementa (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2010; Evelin *et al.*, 2009) la productividad de la planta.

El estrés oxidativo, temperaturas extremas, salinidad y sequía, son acompañados por la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como radicales superóxido (O₂•—) y H₂O₂ que dañan membranas y macromoléculas (Miller *et al.* 2010; Noctor *et al.* 2014). Las plantas han desarrollado variadas estrategias antioxidativas para expulsar

estos componentes tóxicos. El mejoramiento de las defensas antioxidantes incrementa la tolerancia a los estreses ambientales (Fuentelba, 2014). En este estudio, las plantas MA redujeron los niveles de peróxido bajo todos los tratamientos de estrés, demostrando así su habilidad para contrarrestar el daño, lo cual está alineado con lo observado en plantas de soja y ryegrass sometidas a sequía (Porcel y Ruiz-Lozano, 2004) y en dos cultivares de tomate bajo condiciones de estrés salino (Hajiboland *et al.*, 2010).

Los niveles de MDA en raíces fueron similares en plantas MA y NM para cada tratamiento de estrés. La sequía incrementó la acumulación de MDA en ambas, plantas MA y NM, mientras que la salinidad redujo su acumulación en relación a plantas de control no estresadas. La reducción en los niveles de H₂O₂ bajo diferentes condiciones de estrés podría ser explicada por el incremento significativo en la actividad de enzimas APX y CAT de plantas MA en comparación con plantas NM con respecto a todos los tratamientos, como lo registraron Porcel y Ruiz-Lozano (2004). Sin embargo, los valores de actividad de GR y SOD fueron más bajos en plantas MA en comparación con plantas NM. No obstante, estas dos enzimas no están directamente involucradas en la remoción de H₂O₂. SOD dismuta radicales superóxido en peróxido de hidrógeno, que luego es convertido en agua y oxígeno molecular por las CATs en los peroxisomas, mientras que GR reduce el dehydroascorbato a ascorbato en el ciclo ascorbato-glutatión (Estrada *et al.*, 2013). El contenido de H₂O₂ en las hojas de plantas NM fue incrementado sólo por estrés por frío, mientras que la simbiosis MA disminuyó significativamente H₂O₂ bajo estrés por frío y por salinidad, similar a lo observado por Hajiboland *et al.* (2010) en plantas de tomate bajo condiciones de salinidad. El contenido de MDA también disminuyó en plantas MA cuando se sometieron a bajas temperaturas, lo cual está alineado a lo observado en plantas de tomate sometidas a salinidad (AbdelLatef y Chaoxing, 2011) y en plantas de arroz y soja sometidas a condiciones de estrés por sequía (Porcel y Ruiz-Lozano, 2004; Ruiz-Sánchez *et al.*, 2010). Sin embargo, bajo condiciones salinas y de sequía, los niveles de MDA permanecieron altos en comparación con plantas NM. El comportamiento errático del daño oxidativo a lípidos observado en *D. eriantha* podría ser explicado por los hallazgos de Porcel y Ruiz-Lozano (2004) quienes señalaron que H₂O₂ está involucrado en casi todas las áreas de la bioquímica aeróbica de la planta, tales como transporte electrónico y la respiración y la fotosíntesis, como así también en la oxidación de la glucosa y se produce en grandes cantidades por varios sistemas enzimáticos incluso bajo condiciones óptimas. Además, bajo ciertas condiciones de estrés, H₂O₂ puede ser utilizado por las plantas como un mecanismo de defensa (Quan *et al.*, 2008).

Con respecto a la actividad enzimática en hojas, Car, APX y SOD mostraron incrementos significativos en plantas MA comparadas con plantas no-MA, mientras que la actividad de GR disminuyó en plantas MA bajo todas las condiciones de estrés estudiadas. Investigación previa también ha reportado incrementos en actividad de APX,

CAT y SOD en plantas MA de tomate sometido a estrés salino (AbdelLatef y Chaoxing, 2011). Además, se han reportado disminuciones en la actividad de GR en las raíces y tallos de plantas MA de soja sometidas a estrés por sequía (Porcel y Ruiz-Lozano, 2004). Las actividades de APX y CAT ambas están involucradas en la eliminación del peróxido de hidrógeno, aunque APX tiene una afinidad por el peróxido mucho mayor que CAT (Estrada *et al.*, 2013). La actividad CAT es menor en los vástagos de plantas sometidas a salinidad que en plantas control no sometidas a estrés, lo cual indica que, en plantas de *D. eriantha* sometidas a salinidad, el peróxido de hidrógeno podría ser eliminado preferentemente por la actividad de APX. En efecto, en estas plantas, la actividad APX es significativamente mayor que en las plantas control no sometidas a estrés.

La intervención de los jasmonatos en la formación y desarrollo de simbiosis micorrízica es ampliamente aceptado (Wasternack y Hause, 2013; Bucher *et al.*, 2014). Se ha mostrado que incrementos en JA están correlacionados con la activación de genes para enzimas de la biosíntesis de esta hormona (Hause *et al.*, 2007). Además, se ha encontrado que plantas de tomate defectuosa en síntesis de JA, exhiben una menor tasa de colonización MA de raíces que en plantas silvestres (Leon-Morcillo *et al.*, 2012). También se encontró que la aplicación de JA o reduce (Ludwig-Muller *et al.*, 2002; Herrera-Medina *et al.*, 2008) o incrementa (Landgraf *et al.*, 2012) la colonización MA de raíces. Entonces, el rol de JA en la simbiosis MA es aún materia de debate. Además, no hay información clara sobre el rol preciso que juega esta fitohormona y su familia de compuestos en las respuestas de plantas asociadas con hongos MA, a estreses abióticos. Nuestros resultados muestran que los niveles de JA en vástagos de plantas NM sometidas a diferentes estreses abióticos no difieren que aquellos en plantas control no estresadas. Sin embargo, en plantas MA, los niveles endógenos de JA se incrementaron significativamente cuando fueron sometidas a estrés salino y por sequía, mientras que bajo estrés por frío, su comportamiento fue más irregular. Los niveles de JA y su precursor OPDA en plantas control fueron significativamente más altos en plantas MA que en plantas NM, lo cual está alineado con los resultados obtenidos para las raíces micorrízicas de muchas plantas por Hause y Schaarschmidt (2009). Los mayores valores de OPDA en relación a JA en todos tratamientos de plantas MA podrían ser explicados por el rol específico de OPDA en la expresión de algunos genes involucrados en las respuestas a estrés (Wasternack y Hause, 2013). El tratamiento de estrés por frío se comportó de distinto modo respecto a los otros estreses, a todos los niveles de jasmonato medidos. Siguiendo el tratamiento por frío, los niveles de JA, OPDA no difirieron entre plantas NM y MA. Si el nivel reducido de JA en plantas estresadas por frío contribuye a respuestas a estrés incrementadas o reducidas, aún permanece sin determinar.

En resumen, los resultados presentados muestran que *D. eriantha* cv. Sudafricana es sensible a estrés por sequía, salinidad y frío, y que la inoculación con hongos MA

regula su fisiología y rendimientos bajo tales de condiciones de estrés. Los efectos de la simbiosis MA sobre las respuestas antioxidantes de la planta y acumulación de jasmonatos dependen de las características intrínsecas del estrés aplicado. En general, el nivel de JA y sus precursores fue mayor en plantas MA bajo diferentes condiciones de estrés, lo que podría ayudar a estas plantas a mitigar las condiciones de estrés.

Agradecimientos ERASMUS MUNDUS EXTERNAL CORPORATION. Beca de Investigación post-doctoral (Hilda Pedranzani) y al Dr. Juan Manuel Ruiz Lozano del Departamento de Microbiología de Suelos del Centro “El Zaidin” del CSIC. Granada España Años 2010-2011.

BIBLIOGRAFIA

Abdel Latef A. 2010. Changes of antioxidative enzymes in salinity tolerance among different wheat cultivars. *Cereal Research Communications*, 38(1): 43-55.

Abdel Latef, A and Chaoping H. 2011. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae*, 127(3): 228-233.

Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.

Aguín Casal O, Montenegro Gregorio D, Mansilla Vázquez JP, do Areeiro EF, Vilariño Rodríguez A, and Saiz Osés MJ. 2006. Grapevine protection against *Armillaria mellea* by inoculation of mycorrhizal fungi. *Viticultura Enología Profesional. Extraordinario (España)*.

Akiyama K, Hayashi H. 2006. Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Annals of botany*, 97(6): 925-931.

Alarcón A, Chávez MG, Cerrato RF and Monter AV. 2001. Efectividad de *Glomus fasciculatum* y *Glomus etunicatum* en el crecimiento de plántulas de *Vitis vinifera* L. obtenidas por micropropagación. *Terra Latinoamericana*, 19(1): 29-35.

Amako K, Che G X, Asada K. 1994. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isoenzymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant and Cell Physiology*, 35: 497-504.

Aroca R, Irigoyen J and Sánchez-Díaz M. 2003. Drought enhances maize chilling tolerance. II. Photosynthetic traits and protective mechanisms against oxidative stress. *Physiol Plant*, 117:540-49.

Aroca R, Porcel P and Ruiz-Lozano JM. 2007. How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist*, 173: 808-816.

Aroca R, Vernieri P, Ruiz-Lozano JM. 2008. Mycorrhizal and non-mycorrhizal *Lactuca sativa* plants exhibit contrasting responses to exogenous ABA during drought stress and recovery. *Journal of Experimental Botany*. 59(8) : 2029–2041.

Aroca R, Ruiz-Lozano JM, Zamarreño ÁM, Paz JA, García-Mina JM, Pozo MJ, López-Ráez JA. 2013. Arbuscular mycorrhizal symbiosis influences strigolactone production under salinity and alleviates salt stress in lettuce plants. *Journal of plant physiology*, 170(1): 47-55.

Augé RM. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3-42.

Augé RM, Toler HD, Moore JL, Cho K, Saxton AM. 2007. Comparing contributions of soil versus root colonization to variations in stomatal behavior and soil drying in mycorrhizal *Sorghum bicolor* and *Cucurbita pepo*. *Journal of plant physiology*, 164(10), 1289-1299.

Augé RM, Toler D y Saxton A. 2014. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza* DOI 10.1007/s00572-014-0585-4

Azcón-Aguilar C, Jaizme-Vega MC and Calvet C. 2002. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. In *Mycorrhizal technology in agriculture* (pp. 187-197). Birkhäuser, Basel.

Barea JM, Palenzuela J, Cornejo P, Sánchez-Castro I, Navarro-Fernández C, López-García A, Estrada B, Azcón R, Ferrol N, Azcón-Aguilar C. 2011. Ecological and functional roles of mycorrhizas in semi-arid ecosystems of Southeast Spain. *Journal of Arid Environments*, 75:1292-1301.

Baslam M and Goicoeche, N. 2012. Water deficit improved the capacity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of antioxidant compounds in lettuce leaves. *Mycorrhiza*, 22(5): 347-359.

Bécard G, Kosuta S, Tamasloukht M, Sejalón-Delmas N, Roux C. 2011. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Canadian Journal of Botany*. 82. 1186-1197. 10.1139/b04-087.

Beyer WF, Fridovich I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161: 559-566.

Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture (Vol. 34, p. 35). Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research.

Brundrett MC, 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New phytologist*, 154(2): 275-304.

Birhane E, Sterck F, Fetene M, Bongers F, Kuyper T. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis, water use efficiency, and growth of frankincense seedlings under pulsed water availability conditions. *Oecologia* 169: 895-904.

Bouwmeester HJ, Roux C, Lopez-Raez JA, and Becard G. 2007. Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in plant science*, 12(5): 224-230.

Bucher M, Hause B, Krajinski F, Küster H. 2014. Through the doors of perception to function in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, 204(4): 833-840.

Carlberg I, Mannervik B. 1985. Glutathione-reductase. *Methods Enzymol*, 113: 484-490.

Di Giambatista G, Garbero M, Ruiz M, Giulietti A y Pedranzani H. 2010. Germinación de *Trichloris crinita* y *Digitaria eriantha* en condiciones de estrés abiótico. *Pastos y Forrajes*, Vol. 33, No. 4.

Dell'Amico J, Rodríguez P, Torrecillas A, Morte A y Sánchez-Blanco M. 2002. Influencia de la micorrización en el crecimiento y las relaciones hídricas de plantas de tomate sometidas a un ciclo de sequía y recuperación. *Cultivos Tropicales*, vol. 23, no.1, p. 29-34.

Dodd IC and Pérez-Alfocea F. 2012. Microbial amelioration of crop salinity stress. *Journal of Experimental Botany*, 63(9), 3415-3428.

Duncan DB. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 11(1), 1-42.

Estrada B, Aroca R, Barea JM, Ruiz-Lozano, JM. 2013. Native arbuscular mycorrhizal fungi isolated from a saline habitat improved maize antioxidant systems and plant tolerance to salinity. *Plant Science*, 201: 42-51.

Evelin H, Kapoor R and Giri B. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of Botany* 104: 1263-1280.

Fuentealba A. 2014. El potencial de las micorrizas arbusculares en la agricultura desarrollada en zonas áridas y semiáridas. *IDESIA (Chile)* 1: 3-8.

Gadkar V, David-Schwartz R, Kunik T, and Kapulnik Y. 2001. Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition. *Plant physiology*, 127(4), 1493-1499.

Garbero M, Pedranzani H, Zirulnik F, Molina A, Pérez-Chaca MV, Vigliocco A and Abdala G. 2010. Antioxidant and jasmonate response under short-term cold stress in two cultivars of *Digitaria eriantha*. *Acta Physiologiae Plantarum*, June, 14: (32): 635-644

Garbero M, Andrade A, Reinoso H, Fernández B, Cuesta C, Granda V, Escudero C, Abdala G and Pedranzani H. 2012. Differential effect of short-term cold stress on growth, anatomy, and hormone levels in cold-sensitive versus -resistant cultivars of *Digitaria eriantha*. *Acta Physiologiae Plantarum*. Vol 34, Number 2.

Gill SS and Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12): 909-930.

Giovannetti M, Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytologist*, 84: 489-500

Goicoechea N, Antolin MC, Sánchez-Díaz M. 1997. Gas exchange is related to the hormone balance in mycorrhizal or nitrogen-fixing alfalfa subjected to drought. *Physiol Plant*, 100:989–997.

Hajiboland R, Aliasgharzadeh N, Laiegh S, Poschenrieder C. 2010 Colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improves salinity tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Plant Soil*, 331: 313-327.

Halliwell B and Gutteridge JM. 1989. Free radicals in biology and medicine. 2nd Ed. Oxford: Clarendon Press.

Hause B, Mrosk C, Isayenkov S, Strack D. 2007. Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry*, 68(1): 101-110.

Harley JL and Smith SE. 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press. London

- Hause B, Schaarschmidt S. 2009. The role of jasmonates in mutualistic symbioses between plants and soil-born microorganisms. *Phytochemistry*, 70(13-14): 1589-1599.
- Hazman M, Hause B, Eiche E, Nick P, Riemann M. 2015. Increased tolerance to salt stress in OPDA-deficient rice ALLENE OXIDE CYCLASE mutants is linked to an increased ROS-scavenging activity. *Journal of experimental botany*, 66(11): 3339-3352.
- Herrera-Medina MJ, Tamayo MI, Vierheilig H, Ocampo, JA, García-Garrido, JM. 2008. The jasmonic acid signalling pathway restricts the development of the arbuscular mycorrhizal association in tomato. *Journal of Plant Growth Regulation*, 27(3): 221-230.
- Hirayama T and Shinozaki K. 2007. Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends in plant science*, 12(8): 343-351.
- Kaschuk G, Kuyper TW, Leffelaar PA, Hungria M and Giller KE. 2009. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biology and Biochemistry*, 41(6): 1233-1244.
- Landgraf R, Schaarschmidt S, Hause B. 2012. Repeated leaf wounding alters the colonization of *Medicago truncatula* roots by beneficial and pathogenic microorganisms. *Plant, Cell & Environment*, 35(7): 1344-1357.
- Latef A. 2010. Changes of antioxidant enzymes activity in salinity tolerance among different wheat cultivars. *Cereal Res. Comm*, 38: 43-55.
- Latef A and Chaoxing H. 2011. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grow under salinity stress. *Scientia Horticulture*, 127: 228-233.
- León-Morcillo RJ, Vierheilig H, Ocampo JA, García-Garrido, JM. 2012. Late activation of the 9-oxylipin pathway during arbuscular mycorrhiza formation in tomato and its regulation by jasmonate signalling. *Journal of experimental botany*, 63(10): 3545-3558.
- Liu XB, Burslem D, Taylor JD, Taylor AFS, Khoo E, Majalap-Lee N. 2018. Partitioning of soil phosphorus among arbuscular and ectomycorrhizal trees in tropical and subtropical forests. *Ecol. Lett.* 21, 713–723. doi: 10.1111/ele.12939
- Ludwig-Müller J, Cohen JD. 2002. Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *Physiologia Plantarum*, 115(2): 320-329.

Marulanda A, Porcel R, Barea JM and Azcón R. 2007. Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive *Glomus* species. *Microbial ecology*, 54(3): 543.

Miller GAD, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz, SULTAN, Mittler RON.2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, cell & environment*, 33(4): 453-467.

Miersch O, Neumerkel J, Dippe M, Stenzel I, Wasternack C. 2008. Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytologist*, 177(1): 114-127.

Minotti G and Aust D. 1987. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 1987; 262:1098-104.

Nikolaou N, Angelopoulos K, Karagiannidis N. (2003), effects of drought stress on mycorrhizal and non-mycorrhizal cabernet sauvignon grapevine, grafted onto various rootstocks. 39: 241–252 Cambridge University Press DOI: 10.1017/S001447970300125X Printed in the United Kingdom

Noctor G, Mhamdi A and Foyer CH. 2014. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant physiology*, 164(4): 1636-1648.

Oxborough K, Baker NR. 1997. Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components: calculation of qP and F'v/F'm without measuring F'o. *Photosynthesis Research*, 54: 135-142.

Paszkowski U, Jakovleva L and Boller T. 2006. Maize mutants affected at distinct stages of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Journal*, 47(2): 165-173.

Patterson BD, Mac Rae EA and Ferguson IB. 1984. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). *Anal Biochem* 1984; 139:487–92.

Philips JM, Hayman DS. 1970. Improved procedure of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transaction of the British Mycological Society*, 55: 158-160.

Pedranzani H, Ruiz M, Garbero M, Terenti O. 2005. Effects of low temperature on different parameters of production in *Digitaria eriantha* cv. Mejorada INTA. *Phyton* 54: 121-126.

Pedranzani, 2015: Cartilla de species forrajeras en simbiosis con micorrizas. FICA. UNSL. 20pp.

Pedranzani H, Rodriguez Rivera M, Gutierrez M, Porcel R y Ruiz Lozano JM. 2015 Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates physiology and performance of *Digitaria eriantha* plants subjected to abiotic stresses by modulating antioxidant and jasmonate levels. *Mycorrhiza* 26 (2): 141–152.

Pedranzani H, Tavecchio N, Gutiérrez M , Garbero M, Porcel R, Ruiz-Lozano JM. 2016. Differential Effects of Cold Stress on the Antioxidant Response of Mycorrhizal and Non-Mycorrhizal *Jatropha curcas* (L.) Plants. *Journal of Agricultural Science* 8 (7): 35-43. ISSN1916-9752E-ISSN1916-9760

Porcel R, Barea JM, Ruiz-Lozano JM. 2003. Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence. *New Phytologist* 157, 135–143.

Porcel R and Ruiz-Lozano JM. 2004. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subject to drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 55: 403,1743-1750.

Porcel R, Aroca R, Azcón R, Ruiz-Lozano JM. 2006. PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance. *Plant Molecular Biology*, 60: 389-404

Porcel R, Aroca R and Ruiz-Lozano JM. 2012. Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1): 181-200.

Pozo M, Jung S, López-Ráez J, Azcon-Aguilar C. 2010. Impact of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis on Plant Response to Biotic Stress: The Role of Plant Defence Mechanisms. 10.1007/978-90-481-9489-6_9.

Quan LJ, Zhang B, Shi WW, Li HY. 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(1): 2-18.

Ruiz-Lozano JM, Azcón R, Gómez M. 1996. Alleviation of salt stress by arbuscular mycorrhizal *Glomus* species in *Lactuca sativa* plants. *Physiol Plant* 98:767-772.

Ruiz-Lozano JM, Azcón R. 2000. Symbiotic efficiency and infectivity of an autochthonous arbuscular mycorrhizal *Glomus* sp. from saline soils and *Glomus deserticola* under salinity. *Mycorrhiza*, 10(3): 137-143.

Ruiz-Lozano JM. 2003. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*, 13(6): 309-317.

Ruiz-Sánchez M, Aroca R, Muñoz Y, Polón R, Ruiz-Lozano JM. 2010. The arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances the photosynthetic efficiency and the antioxidative response of rice plants subjected to drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 167, 862-869.

Scheibe R and Beck E. 2011. Drought, desiccation, and oxidative stress. In *Plant desiccation tolerance* (pp. 209-231). Springer, Berlin, Heidelberg.

Schüßler A and Kluge M. 2001. *Geosiphon pyriforme*, an endocytosymbiosis between fungus and cyanobacteria, and its meaning as a model system for arbuscular mycorrhizal research. In *Fungal associations* (pp. 151-161). Springer, Berlin, Heidelberg.

Sheng M, Tang M, Chen H, Yang B, Zhang F, Huang Y. 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on the root system of maize plants under salt stress. *Can J Microbiol* 55: 879-886.

Solanke A, Sharma A. 2008. Signal transduction during cold stress in plants. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 14 (1 & 2) pp. 69-79.

Singh LP, Gill S and Tuteja N. 2011. Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior* 6:2, 175-191

Wasternack C, and Hause B. 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany* 111: 1021–1058.

Yoneyama K, Xie X, Yoneyama, K and Takeuchi Y. 2009. Strigolactones: structures and biological activities. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 65(5): 467-470.

CAPITULO 9

Lombricompuestos y modulación de la germinación y crecimiento en *Digitaria eriantha* cvs. Sudafricana y Mejorada INTA.

Ada GIULIETTI, Hilda PEDRANZANI, Olga RUÍZ.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de lombricompuestos a partir de estiércol de cabra en la producción, el crecimiento y la biomasa de las plantas de *Digitaria eriantha* cvs. Sudafricana y Mejorada INTA. Se utilizaron diferentes concentraciones de lombricomposto combinado con suelo medanoso en las siguientes proporciones: 1-0: 100, 2-10:90, 3-20:80, 4-30:70, 5-40:60, 6-50:50, 7-100:0 (lombricomposto: tierra). Se consideraron testigo las terrinas con 100 g de suelo y ausencia de lombricomposto. Se sembraron semillas de ambos cultivares y a la tercera semana se midieron los indicadores biológicos: germinación, longitud foliar-radicular y peso seco. Existieron diferencias significativas entre tratamientos y cultivares; el CV. Mejorada INTA se consideró más susceptible a los cambios biológicos y nutricionales del sustrato. Las mezclas de lombricomposto y suelo resultaron beneficiosas para todos los indicadores fisiológicos evaluados. El CV. Mejorada INTA respondió favorablemente a concentraciones de 10 -100% de lombricomposto; mientras que el CV. Sudafricana solo manifestó incrementos con sustratos más enriquecidos (40-100%). Existió una correlación directa entre la concentración del lombricomposto y la respuesta biológica, y la mezcla 7 (100%) fue la mejor opción para ambos cultivares.

Palabras claves: *Digitaria eriantha*, germinación, humus

Abstract

The objective of this study was to assess the effect of different concentrations of worm compost from goat manure on production, growth and biomass of *Digitaria eriantha* cvs. Sudafricana and Mejorada INTA. Dissimilar concentrations of worm compost combined with sandy soil were used with the following rates: 10:100, 2-10:90, 3-20:80, 4-30:70, 5-40:60, 6-50:50, 7-100:0 (worm compost: soil). The terrines with 100 g soil and absence of worm compost were considered control. Seeds from both cultivars were sown and on the third week the biological parameters were measured: germination, leaf-root length and dry weight. There were significant differences among treatments and cultivars and the CV. Mejorada INTA was more susceptible to biological and nutritional substratum changes. Worm compost and soil mixtures proved to be beneficial to all the assessed physiological parameters. The CV. Mejorada INTA responded favorably to worm compost concentrations from 10 to 100% while the CV. Sudafricana only displayed increases with more enriched substrata (40-100%). There existed a direct correlation between worm compost and biological response, being mixture 7 (100%) the best option for both cultivars.

Key words: *Digitaria eriantha*, germination, worm compost

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el ambiente natural ha recibido un creciente aporte de residuos de los más variados orígenes y composición, lo cual constituye un problema real para el ecosistema. Ante la demanda de un mundo sano, existe la necesidad de buscar alternativas que beneficien directamente los sistemas de producción a partir de los materiales biodegradables (Atiyeh, *et al.*, 2000b; Álvarez *et al.*, 2001). Por otra parte, y debido a que las reglamentaciones para la aplicación y disposición del estiércol se han vuelto cada vez más rigurosas, en los últimos años ha crecido el interés por utilizar las lombrices de tierra (*Eisenia foetida* Sav.) como un sistema ecológicamente seguro para manejar el estiércol, ya que diversos estudios han demostrado la capacidad de algunas lombrices para utilizar una amplia gama de residuos orgánicos, estiércol, residuos de cultivos, desechos industriales y aguas negras (Atiyeh *et al.*, 2000a; Atiyeh *et al.*, 2000b; Bansal y Kapoor, 2000).

Los vermicompuestos son compuestos derivados de la degradación biológica de los desechos orgánicos que mejoran la formación y el crecimiento de las plantas sin efectos secundarios negativos (Prasad y Maher, 2001; Álvarez *et al.*, 2001; Arancon y Edwards, 2005; Belda *et al.*, 2013). Además, los vermicompuestos pueden desempeñar un papel innovador para disminuir la huella de C, al reemplazar sustratos a base de turba (Christopher Marble *et al.*, 2012).

Existen escasos estudios respecto a indicadores tradicionales de los parámetros de calidad de plantas comerciales y de aquellos parámetros relacionados con la resistencia al estrés por sequía y estrés por bajas temperaturas (Landis *et al.*, 2010; Santagostini *et al.*, 2014).

Por su parte, la lombricultura es una actividad centrada en la cría y producción de lombrices y el tratamiento de residuos orgánicos para su reciclaje, dando como resultado humus de lombriz o lombricomposto. Es una actividad de importancia económica y social, ya que a nivel mundial existe la necesidad de eliminar los residuos urbanos y agroindustriales. Una solución podría ser una correcta selección de basura que con la ayuda de las lombrices es posible transformarla en su totalidad en fertilizante orgánico (Mirabelli, 2008).

El humus de lombriz es un fertilizante orgánico (Larink *et al.*, 2001) y se obtiene de deyecciones de lombrices; de ellas las más utilizadas son las rojas californianas (Ferruzzi, 1987; Fuentes-Yagüe, 1987; Cerisola, 1989). Se le valora como un abono completo y eficaz para mejorar los suelos.

El lombricomposto tiene un aspecto terroso, suave e inodoro, lo cual facilita su manipulación. Sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas varían considerablemente según el alimento con que se nutran las lombrices (Medina *et al.*,

2003). Presenta entre 25-55% de materia orgánica y nutrientes esenciales: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, cobre, cinc y molibdeno (Medina *et al.*, 2001). Por otra parte, el nitrógeno y el fósforo orgánico se transforman fácilmente en formas más asimilables (Agramonte *et al.*, 1998). Además de ser un excelente fertilizante, se caracteriza por presentar un alto porcentaje de ácidos húmicos y fúlvicos, que permiten una entrega inmediata de nutrientes asimilables y un efecto regulador de la nutrición, cuya actividad residual en el suelo llega hasta cinco años; posee además una alta carga microbiana (40 mil millones por gramo seco) que restaura la actividad biológica y mejora la estructura del suelo, lo que incrementa la retención de agua y la capacidad para almacenar y liberar los nutrientes requeridos por las plantas en forma sana y equilibrada (Tomati y Galli, 1995; Doube *et al.*, 1997). Debido a su pH neutro se puede aplicar en cualquier dosis sin ningún riesgo de quemar las plantas (Ravera *et al.*, 2003). Es un producto inofensivo para la salud, por no ser transmisor de ningún agente patógeno (Díaz *et al.*, 2002; Medina *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2004).

En el presente estudio se utilizó la especie *Digitaria eriantha* Steudel subespecie *Eriantha*, en dos tipos de germoplasma: uno proveniente de Sudáfrica, nativo y adaptado a altas temperaturas, que germina a 32°C, denominado CV Sudafricana; y otro sintético, CV. Mejorada INTA, adaptado a temperaturas inferiores (entre 22 y 30°C).

Los estudios previos demostraron un comportamiento diferente de estos dos cultivares en el porcentaje de germinación, el estrés abiótico por bajas temperaturas y el estrés osmótico (Quiroga, 2003; Di Giambattista, 2006). También se observaron diferencias en los indicadores de producción, tales como la longitud de las plantas y el peso seco en condiciones normales de crecimiento y bajo estrés abiótico (Di Giambattista, 2006).

En la actualidad el cultivo orgánico y las nuevas biotecnologías son utilizados para mitigar los efectos del estrés ambiental. El reemplazo del suelo por sustratos provenientes de estiércoles transformados por la acción de las lombrices, presenta una posibilidad de mitigación del estrés abiótico y esta enmienda depende, sin dudas, de la identidad genética de la especie o cultivar.

El objetivo del presente trabajo fue probar la efectividad del lombricomposto obtenido a partir de estiércol de cabra, en diferentes concentraciones, en dos cultivares de *D. eriantha* Steudel.

MATERIALES Y MÉTODOS

El sustrato utilizado consistió en un lombricompuesto originado a partir de estiércol de cabra en concentraciones crecientes, combinado con tierra de jardín en las siguientes proporciones: 1) 0:100, 2) 10:90, 3) 20:80, 4) 30:70, 5) 40:60, 6) 50:50 y 7) 100:0 (lombricomposto: tierra). El testigo consistió en 100 g de suelo y ausencia de lombricomposto (tratamiento 1).

Para la obtención del humus de lombriz se trabajó con la lombriz roja californiana y como alimento se utilizó estiércol de cabra previamente descompuesto por un período de tres meses. La producción del material se realizó en cajoneras de 0,40 m por 0,60 m de largo, cubiertas con media sombra, para evitar la exposición directa al sol. Se extrajo el humus a los tres meses de iniciada la diseminación de las lombrices. La composición química de este lombricomposto fue la siguiente: N: 0,090%; P: 35,99 mg/kg⁻¹; MO: 1,88%, pH: 7,75. Los sustratos se obtuvieron con distintas proporciones de tierra medanosa, cuyas características principales son: N: 0,0004%; P: 10,02 mg/kg⁻¹; MO: 0,011%; pH: 6,50.

El material vegetal consistió en semillas de *D. eriantha* cvs. Sudafricana y Mejorada INTA, los cuales se sembraron en una dosis de 0,25 g por bandeja. Para cada tratamiento se realizaron tres repeticiones y las bandejas se colocaron en cámara de germinación con 8 h luz a 30°C y 16 h oscuridad a 20°C. Se regaron semanalmente con 5 ml de agua destilada hasta capacidad de campo en todos los tratamientos.

Los indicadores considerados fueron: el número de semillas germinadas por gramo de semillas sembradas (NG), la longitud foliar y radicular (LF y LR), y el peso seco (PS) de las hojas y las raíces. Los datos se analizaron separadamente por variedad, por el método estadístico SAS General Linear Models Procedure y los rangos múltiples de Duncan. Este test controla errores de tipo I donde $\alpha = 0,05$, los asteriscos en las barras de las figuras representan diferencias significativas de los tratamientos con respecto al control. Las medias con diferente letra en la misma fila de la tabla 1, indican diferencias significativas entre cultivares para cada indicador medido.

RESULTADOS

Número de semillas germinadas

En la tabla 9.1 se observa el comportamiento de ambos cultivares con relación al número de semillas germinadas por gramo de semilla sembrada. En el cv. Sudafricana los tratamientos 5 y 6 difirieron significativamente del testigo (tierra común), el sustrato 6 mostró el más alto número de semillas germinadas y el sustrato 5 ocupó el segundo lugar.

En el cv. Mejorada INTA los tratamientos del 3 al 7 difirieron significativamente del testigo. Los sustratos con mayor cantidad de semillas germinadas fueron el 6 y el 4, seguidos de los tratamientos 7 y 5 (Tabla 9.1). La combinación 5 (40:60) y la 6 (50:50) fueron las óptimas para ambos cultivares en este indicador.

Tabla: 9.1: Número promedio de semillas germinadas en sustratos con diferente concentración de lombricomposto de cabra (Giulietti *et al.*, 2007)

Tratamiento	Número de semillas germinadas (g)	
	Cv Sudafricana	Cv Mejorada INTA
1	318,7 gh	353,3 fgh
2	274,4 h	449,3 ef
3	309,3 gh	568,0 cd
4	345,3 fgh	760,0 a *
5	446,7 ef *	625,3 bc *
6	640,0 bc *	805,3 a *
7	396,0 efg *	706,7 ab *

a, b, c, d, e, f, g, h, i. Valores con índices no comunes difieren a $P < 0,05$ (Duncan, 1955)

* Indican diferencias significativas con respecto al testigo ($P \leq 0,05$)

Longitud foliar y radicular

La longitud foliar se incrementó en el cv Sudafricana en todos los tratamientos de lombricomposto, con diferencias significativas respecto al testigo. El mejor sustrato fue el 7, como intermedios se ubicaron los tratamientos 3, 4 y 6, y el de menor rendimiento fue el 2 (Tabla 9. 2).

El cv. Mejorada INTA solo manifestó diferencias significativas en los tratamientos 2, 3 y 7. En los otros tratamientos hubo un bajo desarrollo de las plántulas,

ya que germinaron, pero el incremento en la altura fue poco significativo (Tabla 10.2). En este cultivar el mejor sustrato también fue el 7, intermedio el 2 y menor el 3. El sustrato 7 (100% de lombricomposto) resultó el mejor para el indicador crecimiento foliar en ambos cultivares (Tabla 9.2).

El contenido de materia orgánica y sales húmicas de los sustratos, por estar en contacto con las raíces y ser la vía directa de ingreso a la planta, podría incidir en su crecimiento. Al medir la longitud radicular el cv. Sudafricana no presentó diferencias significativas con respecto al testigo. El cv. Mejorada INTA, en cambio, manifestó incrementos significativos de longitud en los tratamientos 4, 5, 6 y 7 con respecto al testigo, el 6 y el 7 resultaron los mejores, e intermedios el 4 y el 5 (Tabla 9.2).

Tabla 9.2: Longitud foliar y radicular promedio (cm) en sustratos con diferente concentración de lombricomposto de cabra (Giulietti *et al.*, 2007).

Tratamiento	Longitud foliar promedio (cm)		Longitud radicular promedio (cm)	
	cv Sudafricana	cv Mejorada INTA	cv Sudafricana	cv Mejorada INTA
1	15,333d	20,667c	33,000	28,000
2	21,000c *	37,000ab *	32,000	27,000
3	32,000b *	32,333b *	28,000	29,000
4	33,333b *	26,000c *	31,000	38,000 *
5	25,667c *	22,333c	32,000	39,000 *
6	32,333b *	26,333c	33,000	53,000 *
7	39,000a *	40,000a *	29,000	41,000 *

a, b, c, d, e, f, g, h, i. Valores con índices no comunes difieren a $P < 0,05$ (Duncan, 1955)

* Indican diferencias significativas con respecto al testigo ($P \leq 0,05$)

Peso seco foliar y radicular

Para estimar la producción de los dos cultivares y su respuesta a la nutrición mineral y orgánica de los lombricompostos, se tomó el peso seco de las hojas y las raíces como una medida de los procesos de crecimiento, acumulación de biomasa y activación de la fotosíntesis.

En ambos cultivares el peso seco foliar se incrementó significativamente con el secuencial aumento de lombricomposto en los sustratos 5, 6 y 7, con respecto al testigo,

y en el caso del cv. Mejorada INTA también aumentó en el sustrato 4 (Tabla 9. 3). En el cv. Sudafricana el mejor sustrato resultó el 7 y en segundo término las mezclas 5 y 6. Para el cv. Mejorada INTA el 7 fue muy bueno, intermedio el 6 y como bajos las mezclas 5 y 4. En la tabla 10.3 se observa el comportamiento del PS radical en el cv. Sudafricana, que se incrementó en forma significativa con respecto al testigo solo en la mezcla 7; en cambio, para el cv. Mejorada INTA el PS aumentó en las mezclas 4, 5, 6 y 7.

El lombricompuesto 7 resultó el mejor para la variable PS foliar y radical en ambos cultivares.

Tabla 9.3: Peso seco foliar y radical promedio (g) en sustratos con diferente concentración de lombricompuesto de cabra. (Giulietti *et al.*, 2007)

Tratamiento	Peso Seco Foliar Promedio (g)		Peso Seco Radicular Promedio (g)	
	cv Sudafricana	cv Mejorada INTA	cv Sudafricana	cv Mejorada INTA
1	0,006fgh	0,005i	0,026	0,011
2	0,005fgh	0,003fg	0,008	0,006
3	0,005fgh	0,006 ^a	0,007	0,012
4	0,005a	0,009d *	0,008	0,017 *
5	0,009c *	0,011b *	0,011	0,019 *
6	0,009c *	0,027c *	0,016	0,049 *
7	0,012f *	0,037gh *	0,030 *	0,058 *

* Indican diferencias significativas con respecto al testigo ($P \leq 0,05$)

Comparación entre cultivares para cada mezcla de lombricompuesto y su acción en los distintos indicadores evaluados

Se estableció una comparación estadística de los indicadores fisiológicos entre los cultivares y para cada tratamiento. En el número de semillas germinadas se observaron diferencias significativas en todos los tratamientos, excepto en el testigo. En todos los casos fue superior el cv. Mejorada INTA y mostró una gran sensibilidad ante el nivel nutricional de los sustratos (Tabla 9.1). En relación con la longitud foliar se encontraron diferencias significativas en los tratamientos 1 (testigo), 2 (10:90), 4 (30:70) y 6 (50:50). En las mezclas con mayor proporción de humus, como la 4 y la 6, el cv. Sudafricana tuvo un mejor crecimiento que el cv. Mejorada INTA, y en aquellos con menor proporción de

humus la diferencia fue positiva para el cv. Mejorada INTA. El crecimiento foliar en el cv. Sudafricana fue más sensible al contenido nutricional de los sustratos.

En el PS foliar existieron diferencias significativas entre ambos cultivares en los sustratos del 3 al 7, y los valores de PS fueron superiores para el cv. Mejorada INTA, lo que indica que la eficiencia fotosintética en iguales condiciones ambientales varía según el genotipo del cultivar.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el estudio de dos cultivares de una forrajera introducida en Argentina, *D. eriantha*, y su respuesta al lombricomposto de cabra como enmienda orgánica, en diferentes concentraciones, se observaron notorias diferencias entre tratamientos y cultivares.

En la germinación de las semillas se demostró que los mayores porcentajes de lombricomposto (incluso puro) resultaron beneficiosos en ambos cultivares; sin embargo, el cv. Mejorada INTA incrementó la germinación con la concentración de 20% (Tabla 9.1) y mostró superioridad con relación al cv. Sudafricana, e incluso en algunos casos lo duplicó (Tabla 9.1). El efecto benéfico de los ácidos húmicos del lombricomposto también ha sido reportado en plantas de tomate, pimentón y fresa, cultivadas tanto en vivero como en el campo (Arancon *et al.*, 2004).

Como factor de crecimiento y desarrollo se midió la longitud foliar y radicular, se observó que, a diferencia del indicador anterior, la longitud de las hojas es muy sensible a la composición del sustrato, ya que ambos cultivares respondieron positivamente ante pequeñas cantidades de lombricomposto y en todos los casos incrementaron el crecimiento en largo de la parte aérea. Aunque se encontraron diferencias significativas entre cultivares no se puede afirmar que uno fue superior al otro, ya que la diferencia dependió del tratamiento (Tabla 9.2). Trindade *et al.*, 2001, detectaron una mayor altura de las plantas de lechosa (*Carica papaya* L.) var. Sunrise al final de la etapa de vivero, al aumentar la proporción de abono orgánico en el sustrato. Atiyeh *et al.*, 2000a, concluyeron que la aplicación de lombricomposto a los sustratos en invernadero, tiene un gran potencial para favorecer el crecimiento de diversos cultivos hortícolas.

En *C. papaya* se ha descrito el efecto positivo del lombricomposto en el desarrollo del área foliar de las plantas, con una dosis de 25% (Acevedo y Pire, 2004).

En el crecimiento radicular el cv. Sudafricano no fue sensible a la composición del sustrato; en cambio, el cv. Mejorada INTA evidenció incrementos a partir de un 30% de lombricomposto en el sustrato. Canellas *et al.*, 2000, plantearon que los ácidos húmicos presentes en cantidades apreciables en el lombricomposto, pueden estimular el crecimiento tanto de las raíces como de la parte aérea en las plantas de maíz. Díaz *et al.* (2004) demostraron que el humus de lombriz, como componente del sustrato utilizado en

invernáculo en la aclimatación de la caña de azúcar, favoreció el crecimiento radicular pero no la longitud de la planta.

El PS foliar y radicular, evaluados como indicadores del desarrollo, el crecimiento y la actividad fotosintética, se incrementaron en ambos cultivares. El cv. Sudafricana incrementó PS en las concentraciones altas de lombricompuesto, en cambio el cv. Mejorada INTA, más sensible, respondió positivamente a bajas concentraciones. Hubo diferencias significativas entre cultivares cuando se evaluó el PS foliar, que se manifestó favorable al cv. Mejorada INTA, el cual alcanzó el doble del PS en concentraciones de 50 y 100%. En estudios comparativos del efecto del lombricompuesto y la fertilización con N a largo plazo (90-180 días) en *C. papaya* L., el primer tratamiento superó al del fertilizante químico para todas las variables de crecimiento de la planta, en especial el PS (Acevedo y Pire, 2004).

Existen antecedentes relacionados con la mejora en la producción y desarrollo de plantas cultivadas con el empleo de lombricompuestos, pero se ha encontrado poca información para las especies forrajeras.

Las causas de dicha mejora en las plantas son variadas. Kale *et al.*, 1992, señalaron que el efecto del lombricompuesto no es inmediato, sino que la respuesta de la planta puede tomar cierto tiempo, ya que hay inmovilización del N por parte de los microorganismos presentes en la enmienda; ello reduce la cantidad del nutriente aprovechable por la planta, el cual posteriormente es liberado al sustrato (Alexander, 1977). Hidalgo (2001) describió los efectos benéficos del uso del lombricompuesto como enmendante de sustratos, que tienden a disminuir con las dosis altas; asimismo, el efecto combinado de ambas fuentes de N puede actuar en forma complementaria para proveer nutrientes a la planta en las diferentes etapas de su crecimiento, independientemente del efecto producido por los nutrientes esenciales del sustrato.

Por otro lado, la biota desarrollada en el sustrato es la responsable de los beneficios biológicos en las plantas. Pérez (1994) mencionó la presencia de microorganismos con propiedades biofertilizantes en el lombricompuesto, los cuales actúan de manera similar a los biofertilizantes a base de bacterias y micorrizas (Rani y Sathiamoorthy, 1997), o a la inoculación por micorrizas realizada en vivero, que favoreció el desarrollo de las plantas, redujo la cantidad de biofertilizante utilizado (Gasparotto *et al.*, 1998) e incrementó la resistencia al estrés durante el trasplante. En este sentido, Toyota y Kimura (2000) encontraron un predominio de estas bacterias asociadas al lombricompuesto, lo cual podría explicar sus ventajas como enmendante de sustrato.

Por lo antes expuesto, se puede atribuir al lombricompuesto ventajas como enmienda de sustratos debido a su efecto en el crecimiento vegetativo de las plantas jóvenes, entre cuyas propiedades se destaca el aporte de sustancias (de naturaleza química o biológica) capaces de estimular el crecimiento.

Las mezclas de lombricompost y suelo fueron beneficiosas para todos los indicadores fisiológicos evaluados.

El cv. Sudafricana incrementó la germinación, la longitud foliar y el PS foliar y radicular en los sustratos que contenían de 40 a 100% de lombricompost.

El cv. Mejorada INTA respondió positivamente a la composición del sustrato, a pequeñas y altas concentraciones de humus de lombriz (10 y 100%, respectivamente), mediante el incremento del porcentaje de germinación, la longitud foliar, la longitud radicular y el PS de las hojas y las raíces.

También se observó correlación entre el aumento de la concentración del lombricompost y la respuesta biológica. La mezcla 7 (100%) representó la mejor opción para ambos cultivares.

BIBLIOGRAFIA

Acevedo IC y Pire R. 2004. Efectos del lombricompost como enmienda de un sustrato para el crecimiento del lechoso (*Carica papaya* L.). *Interciencia. Revista de Ciencia y Tecnología de América* 29 (5): 274

Agramonte D, Jiménez F, Dita MA. 1998. Aclimatización. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. (Ed. J.N. Pérez Ponce). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. p 193

Alexander M. 1977. Introduction to soil microbiology. Wiley. Nueva York, USA. 467 p

Álvarez JA, Del Campo F, Sancho F. 2001. Research and technological development of composting processes and its application in the agriculture and forestry sectors. *Bioprocessing of Solid Waste & Studge*. 1:1

Arancon NQ, Edwards CA, Bierman P, Metzger J, Lee S, Welch C. 2004. Effects of vermicomposts on growth and marketable fruits of field-grown tomatoes, peppers and strawberries. *Pedobiologia*. 47 (5): 731

Arancon N, Edwards C. 2005. Effects of vermicompost on plant growth. Proceedings of International Symposium Workshop on Vermi Technologies for Developing Countries (ISWVT). Pp 1-25

Atiyeh RM, Arancon N, Edwards CA, Metzger JD. 2000a. Influence of earthworm processed pig manure on the growth and yield of greenhouse tomatoes. *Bioresources Technol*. 75: 175

- Atiyeh RM, Subler S, Edwards CA, Bachman G, Metzger JD, Shuster W. 2000b. Effects of vermicomposts on plant growth in horticultural container media and soil. *Pedobiologia*. 44: 579
- Bansal S, Kapoor K. 2000. Vermicomposting of crop residues and cattle dung with *Elisenia foetida*. *Bioresources Technol*. 73: 95
- Belda RM, Mendoza Hernandez D, Fornes F. 2013. Nutrient-rich compost versus nutrient-poor vermicompost as growth media for ornamental-plant production. *J. Plant Nutr. Soil Sci*. 176 (6), 827-835
- Canellas LP, Olivares FL, Okorokova AL, Facaña AR. 2000. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, lateral root development, and plasma H-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol*. 130: 1951
- Cerisola C. 1989. Lecciones de agricultura biológica. Ediciones Mundi Prensa. España p. 163
- Christopher Marble S, Prior SA, Brett Runion, G, Allen Torbert H, Gilliam CH, Fain GB, Sibley JL, Knight PR. 2012. Effects of fertilizer placement on trace gas emissions from nursery container production. *Hort Science* 47, 1056-1062
- Díaz LP, Medina LF, Latife J, Digonzelli PA, Sosa SB. 2004. Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz. *Revista RIA*. 33 (2):115
- Díaz L, Sopena R, Rago A. 2002. Implantación de semilleros de caña de azúcar. *Revista Horizonte Agroalimentario*. 6: 13
- Di Giambattista GA. 2006. Efecto del estrés por frío; sequía en parámetros morfofisiológicos de dos especies forrajeras (*Trichloris crinita* "nativa" y *Digitaria ariantha* "introducida"). Tesis de Grado. Facultad de Ingeniería y Ciencias Económico y Sociales. Universidad Nacional de San Luis, Argentina. 101 p
- Doube BM, Williams PML, Willmott RJ. 1997. The influence of two species of earthworm (*Aporrectodea trapezoides* and *Aporrectodea rosea*) on the growth of wheat, barley and faba beans in three soil types in the greenhouse. *Soil Biology and Biochemistry*. 29: 503
- Ferruzzi C. 1987. Manual de Lombricultura. Ediciones Mundi Prensa. España. 138 p

FuentesYague JL. 1987. La crianza de la lombriz roja. Hojas Divulgadoras N° 1. Servicio de Extensión Agraria del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. p 30

Gasparotto L, Feldmann F, Araujo R, Moraes R, Lieberei R. 1998. Recultivation of cleared and abandoned sites in the Amazon by agroforestry systems, a shift-proyect. In: Sustainable agriculture for food, energy and industry. (El Basam, N., Ed.). James & James, London, UK. Vol. 2, p. 1146

Giulietti A, Pedranzani HE, Ruiz OM, Garbero MM, Terenti OA. 2007. Respuesta biológica de cultivares de *Digitaria eriantha* a la enmienda en suelos con humus de lombriz. Revista Pastos y Forrajes. ISSN 0864-0394. Vol. 30: 119-131

Hidalgo P.2001. Vermicompost as a substrate amendment for poinsettia and chrysanthemum production. Thesis. Mississippi University. USA. 162 p

KaleR, MalleshB, Kubra B, Bagyaraj D. 1992. Influence of vermicompost application on the available macronutrients and selected microbial populations in a paddy field. *Soil Biol.Biochem.* 12: 1317

Landis T, Dumroese R, Haase D. 2010. The container Tree Nursery Manual: Volume 7, Seedling Processing, Storage, and Outplanting. 45 pp

LarinkO, WernerD, Langmaack M, SchraderS. 2001.Regeneration of compacted soil aggregates by earthworm activity. *Biology and Fertility of Soils.* 33: 395

Medina LF, Jaime M, Chueca C, Bocanera B, Toro F, Mascaro P. 2001.Presencia y cuantificación de *Azotobacter sp.* y *Azospirillum sp.* En lombricompuesto. Segunda Reunión de Producción Vegetal del NOA. San Miguel de Tucumán, Argentina

MedinaLF, Jaime M, Colacelli N, Mascaro P, Chueca C. 2003.Característicasfísicoquímicas de tres tipos de lombricompuesto. Tercera Reunión de Producción Vegetal y Primera de Producción Animal del NOA. San Miguel de Tucumán, Argentina

Mirabelli E. 2008. El compostaje proyectado a la lombricultura. Hemisferio Sur. 324 p

Pérez H. 1994. Producción de biofertilizantes con la cría de la lombriz roja californiana (*Eiseniafoetida*), utilizando cuatro tipos de sustratos diferentes en condiciones semicontroladas. *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología.* 12: 88

Prasad M, Maher MJ. 2001.The use of composted green waste (cgw) as a growing médium component. *Acta Hortic.* 107-114

- Quiroga AM. 2003. Respuestas morfofisiológicas de *Digitaria eriantha* Steudel subs. *Eriantha* y producción de callos como germoplasma factible para seleccionar plantas resistentes al frío. Tesis de grado. Facultad de Ingeniería y Ciencias Económico y Sociales. Universidad Nacional de San Luis, Argentina. 101 p
- Rani M, Sathiamoorthy S. 1997. Effect of the organic and biofertilizers on root enzyme activity, nematode, total biomass and growth enhancement of papaya cv. Co. 6. *South Indian Horticult.* 45: 217
- Ravera AR, De Sanzo CA, Covas H. 2003. Como criar lombrices rojas californianas. 3ra. Edición. Editorial Programa de Autosuficiencia Regional S.A. Argentina
- Santagostini P, Demotes-Mainard S, Huche-Thelier L, Leduc N, Bertheloot J, Guerin V, Bourbeillon J, Sakr S, Boumaza R. 2014. Assessment of the visual quality of ornamental plants: comparison of three methodologies in the case of the rosebush. *Sci. Hortic.* 168, 17-26
- Tomati U, Galli E. 1995. Earthworms, soil fertility and plant productivity. *Acta Zoological Fennica.* 196: 11
- Toyota K, Kimura M. 2000. Microbial community indigenous to the earthworm. *Biol. Soils.* 31: 489
- Trindade AV, Siqueira JO, De Almeida FP. 2001. Dependencia micorrizica de variedades comerciales de mamoeiro. *Pesq. Agropec. Bras.* 12: 14