



*Universidad Nacional de Córdoba*  
*Facultad de Ciencias Agropecuarias*  
*Escuela para Graduados*



---

**IMPLICANCIAS DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LA  
CALIDAD FORRAJERA DE *CENCHRUS CILIARIS* L.  
Y SU RELACIÓN CON LA ANATOMÍA FOLIAR Y  
EL METABOLISMO DE LA LIGNINA**

**Iliana Magalí Carrizo**

Tesis

Para optar al Grado Académico de  
Doctor en Ciencias Agropecuarias.

*Córdoba, 2022*

**IMPLICANCIAS DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LA CALIDAD FORRAJERA DE  
*CENCHRUS CILIARIS* L. Y SU RELACIÓN CON LA ANATOMÍA FOLIAR Y EL  
METABOLISMO DE LA LIGNINA**

Iliana Magalí Carrizo

**Comisión Asesora de Tesis**

**Director:** Dra. Eliana López Colomba

**Asesores:** Biól. (Dra.) Karina Grunberg (Codirector)

Ing. Agr. (Dra.) Marta Ojeda

**Tribunal Examinador de Tesis**

Dra. Vanina Davidenco

Dr. Rodrigo Tabaré Zarza Fuentes

Dr. Ariel Sebastián Odorizzi

**Presentación Formal Académica**

Septiembre de 2022

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios, por guiarme en este camino.*

*A mi familia, Martín y Guillermina, por ser el motor de mis días.*

*A mis padres, Vilma y Walter, por su apoyo incondicional.*

*A la Dra. Eliana López Colomba, por su enseñanza, paciencia e inspiración.*

*A la Dra. Karina Grunberg, por poner a disposición desde el día cero su grupo de trabajo, su experiencia y consejos.*

*A mis compañeros de trabajo Exequiel Tommasino, Sabrina Griffa, Andrea Ribotta, Mariana Quiroga, Edgardo Carloni, Urys Hernández y Miguel Sánchez, de quienes aprendo permanentemente.*

*A mis compañeros y amigos del “INTA” con los que compartí el “backstage” de esta tesis y las suyas.*

*A Graciela Bollati, por compartirme desinteresadamente su conocimiento y experiencia.*

*Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y al Consejo nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).*

*A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba (FCA-UNC).*

*A la escuela para graduados de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.*

*A mi comisión asesora de Tesis.*

## RESUMEN

*Cenchrus ciliaris* L. es una importante gramínea forrajera distribuida en regiones áridas y semiáridas del mundo para la alimentación de ganado vacuno. En Argentina, esta especie ha sido introducida en el noroeste del país. La falta de precipitaciones en esta zona es uno de los principales factores abióticos que provocan pérdidas de persistencia, rendimiento y valor nutritivo. La calidad del forraje está estrechamente relacionada con la anatomía foliar y sus tejidos constituyentes, las condiciones ambientales y la etapa de crecimiento. Los constituyentes de la pared celular representan la fibra del forraje, siendo la lignina el principal determinante en la disminución de la digestibilidad y cuya biosíntesis estaría modulada en respuesta al estrés. En esta investigación, proporcionamos un estudio integral sobre los mecanismos de adaptación involucrados en la tolerancia y/o susceptibilidad de dos genotipos contrastantes de *C. ciliaris* en su respuesta al estrés hídrico: "RN51" tolerante y "RN1" susceptible, la capacidad de recuperación de estos y las implicancias en el proceso de lignificación y la calidad forrajera. Ambos genotipos pudieron tolerar el estrés hídrico y se recuperaron de dicha condición. Sin embargo, difirieron en su respuesta, la cual se acentuó al incrementar el tiempo de exposición al estrés. El mejor comportamiento de RN51 estuvo dado por una mayor capacidad de mitigar el daño oxidativo y el mantenimiento de un balance hídrico favorable. Estos cambios, se acompañaron de características adaptativas foliares, como un gran desarrollo de células buliformes y una lignificación tisular pronunciada. Esto último, se correlacionó con la detección temprana de un aumento en la expresión de genes de enzimas clave en la biosíntesis de la lignina. El impacto del estrés hídrico en la producción de biomasa fue menor en el genotipo tolerante, a costa de procesos de lignificación y consecuentemente una menor digestibilidad. La comprensión de los mecanismos de adaptación involucrados en la tolerancia al estrés hídrico, y el impacto sobre el balance entre producción y calidad de la materia seca, contribuirá a los procesos tempranos de selección para el desarrollo de creaciones fitogenéticas que respondan a las demandas de la actividad ganadera.

**Palabras clave:** Buffel grass; Déficit Hídrico; Estrategias adaptativas; Recuperación; Lignificación de tejidos; Calidad forrajera

## ABSTRACT

*Cenchrus ciliaris* L. is an important forage grass distributed in arid and semi-arid regions of the world for feeding cattle. In Argentina, this species has been introduced in the northwest of the country. The lack of rainfall in this area is one of the main abiotic factors that cause losses of persistence, yield and nutritional value in this species. Forage quality is closely related to leaf anatomy and its constituent tissues, environmental conditions, and growth stage. The forage fiber is represented by the constituents of the cell wall, among which lignin is the main determinant in the decrease in digestibility and whose biosynthesis would be modulated in response to stress. In this research, we provide a comprehensive study on the adaptive mechanisms involved in the tolerance and/or susceptibility of two contrasting genotypes of *C. ciliaris* in their response to water stress: "RN51" tolerant and "RN1" susceptible, the ability to recover and the implications in the lignification process and forage quality. Both genotypes tolerated drought stress and recovered from it. However, they differed in their response, which was accentuated by increasing the time of exposure to stress. The best performance of RN51 was given by a greater capacity to mitigate oxidative damage and maintenance of a favorable water balance. These changes were accompanied by adaptive foliar characteristics and pronounced tissue lignification. The latter was correlated with the early detection of an increase in the expression of genes of key enzymes in the biosynthesis of lignin. The impact of drought stress on biomass production was lower in the tolerant genotype, at the expense of lignification processes and consequently lower digestibility. The understanding of the adaptation mechanisms involved in tolerance to drought stress, and the impact on the balance between production and quality of dry matter, will contribute to the early selection processes for the development of phylogenetic creations that respond to the demands of livestock activity.

**Key Words:** Buffel grass; Drought; Adaptive strategies; Water stress recovery; Tissue lignification; Forage quality

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS .....	XII
LISTA DE FIGURAS .....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVII
CAPÍTULO I.....	18
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	18
Ganadería y limitaciones agroclimáticas.....	18
<i>Cenchrus ciliaris</i> L. (Buffel grass) .....	20
Estrés hídrico (general) .....	22
Lignina .....	24
Calidad Forrajera .....	25
HIPÓTESIS .....	27
OBJETIVO GENERAL .....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
BIBLIOGRAFIA .....	29
CAPÍTULO II.....	34
EFFECTO DE TIEMPOS CORTOS Y PROLONGADOS DE ESTRÉS HÍDRICO Y RECUPERACIÓN EN <i>CENCHRUS CILIARIS</i> .....	34
INTRODUCCIÓN .....	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36

<b>Material Vegetal</b> .....	36
ENSAYO A TIEMPO CORTO DE ESTRÉS .....	37
<b>Condiciones generales de crecimiento y tratamientos</b> .....	37
Tratamiento de estrés hídrico.....	38
Tratamiento de recuperación .....	39
ENSAYO A TIEMPO LARGO DE ESTRÉS HIDRICO .....	40
<b>Condiciones generales de crecimiento y tratamientos</b> .....	40
Tratamiento de estrés hídrico.....	41
Tratamiento de recuperación .....	42
<b>Evaluación de parámetros fisiológicos</b> .....	42
Evapotranspiración .....	43
Fluorescencia de la clorofila y parámetros JIP test .....	43
<b>Evaluación de parámetros bioquímicos</b> .....	44
Determinación del contenido de malondialdehído (MDA) .....	44
Poder reductor total mediante la medición de la capacidad reductora férrica del ensayo de plasma (FRAP) .....	44
Determinación de actividades enzimáticas.....	45
<b>Evaluación de parámetros moleculares</b> .....	46
Expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de lignina .....	46
Aislamiento de ARN y PCR en tiempo real (qPCR) .....	47
<b>Observaciones Anatómicas</b> .....	48

<b>Evaluación de parámetros morfológicos</b> .....	49
<b>Análisis Estadístico</b> .....	49
RESULTADOS .....	50
ENSAYO A TIEMPO CORTO DE ESTRÉS HIDRICO .....	50
<b>Evaluación de Parámetros Fisiológicos</b> .....	50
Contenido Relativo de Agua.....	50
Evapotranspiración .....	51
Fluorescencia de la Clorofila.....	52
<b>Evaluación de parámetros bioquímicos</b> .....	54
Contenido en Malondialdehído (MDA) .....	54
Poder reductor total mediante la capacidad reductora férrica del ensayo de plasma (FRAP)/ actividad antioxidante total.....	56
Actividad enzimática antioxidante.....	57
<b>Evaluación de parámetros moleculares</b> .....	60
Expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de la lignina.....	60
<b>Observaciones Anatómicas</b> .....	62
<b>Evaluación de parámetros morfológicos</b> .....	64
ENSAYO A TIEMPO LARGO DE ESTRÉS HÍDRICO .....	67
<b>Evaluación de Parámetros Fisiológicos</b> .....	67
Contenido Relativo de Agua (CRA) .....	67
Fluorescencia de la clorofila.....	68



<b>Evaluación de parámetros bioquímicos</b> .....	70
Contenido en Malondialdehído (MDA) .....	70
Poder reductor total mediante la capacidad reductora férrica del ensayo de plasma (FRAP)/ actividad antioxidante total.....	71
<b>Evaluación de parámetros moleculares</b> .....	71
Expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de la lignina.....	72
<b>Observaciones Anatómicas</b> .....	74
<b>Evaluación de parámetros morfológicos</b> .....	78
<b>DISCUSIÓN</b> .....	81
<b>CONCLUSIONES</b> .....	87
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	88
<b>CAPÍTULO III</b> .....	94
<b>EFFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO Y RECUPERACIÓN EN PARÁMETROS DE CALIDAD FORRAJERA</b> .....	94
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	94
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO</b> .....	96
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	96
<b>Material Vegetal</b> .....	96
<b>ENSAYO A CAMPO</b> .....	97
<b>Condiciones generales de crecimiento y tratamientos</b> .....	97
<b>Datos climáticos durante el período del ensayo</b> .....	98

Tratamiento de estrés hídrico.....	99
Tratamiento de recuperación .....	100
<b>Evaluación de parámetros fisiológicos.....</b>	<b>101</b>
<b>Evaluación de parámetros bioquímicos.....</b>	<b>101</b>
Determinación del contenido de malondialdehído (MDA) y del Poder reductor total mediante la medición de la capacidad reductora férrica del ensayo de plasma (FRAP).....	101
Contenido de azúcares solubles .....	101
Relación Hoja:Tallo y Número de macollos .....	102
<b>Evaluación de parámetros de calidad forrajera mediante tecnología</b>	
<b>Espectroscopía en Infrarrojo Cercano (NIRS).....</b>	<b>102</b>
<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>103</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>104</b>
Contenido Relativo de Agua.....	104
Fluorescencia de la clorofila y parámetros JIP test.....	105
Contenido en Malondialdehído (MDA) .....	108
Poder reductor total mediante la capacidad reductora férrica del ensayo de plasma (FRAP)/ actividad antioxidante total.....	109
Contenido de azúcares solubles .....	109
<b>Evaluación de parámetros morfológicos .....</b>	<b>110</b>
Relación Hoja: Tallo y número de macollos .....	113
Peso Seco Radicular.....	114

<b>Evaluación de parámetros de calidad forrajera</b> .....	115
DISCUSIÓN .....	118
CONCLUSIÓN.....	124
BIBLIOGRAFÍA .....	126
CAPÍTULO IV .....	131
ASOCIACIONES ENTRE VARIABLES MORFOLÓGICAS, ANATÓMICAS Y DE CALIDAD FORRAJERA Y TOLERANCIA A ESTRÉS HÍDRICO .....	131
INTRODUCCIÓN .....	131
RESULTADOS .....	134
<b>Asociaciones entre parámetros fisiológicos-bioquímicos, moleculares, anatómicos y de crecimiento</b> .....	134
Ensayo a tiempo corto .....	134
Ensayo a tiempo largo .....	136
<b>Asociaciones entre parámetros fisiológicos, bioquímicos, morfológicos y de calidad forrajera en condiciones de estrés hídrico y recuperación en Cenchrus ciliaris.</b> .....	140
DISCUSIÓN .....	144
CONCLUSIÓN.....	147
BIBLIOGRAFÍA .....	149
CAPITULO V .....	151
CONCLUSIONES GENERALES.....	151

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 2.1</b> Parámetros de fluorescencia medidos en dos genotipos de <i>Cenchrus ciliaris</i> (RN51 y RN1) bajo condiciones control y estrés hídrico a los 21 días de iniciado el estrés. Los valores representan las medias $\pm$ SE. ....	54
<b>Tabla 2.2.</b> Expresión de los genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de lignina en los genotipos <i>C. ciliaris</i> (RN51 y RN1) en relación al control sin estrés según análisis de RT-PCR en tiempo real, medida a las 24 horas del inicio del tratamiento de sequía y recuperación. ....	61
<b>Tabla 2.3.</b> Parámetros anatómicos medidos en la sección transversal de la lámina de dos genotipos contrastantes de <i>C. ciliaris</i> (RN51 y RN1) en dos contenidos hídricos del suelo (80% y 20% CHS) al cabo de 21 días de la imposición del estrés hídrico. Se midieron los tejidos comprendidos entre los dos haces vasculares a ambos lados del haz central. Los valores representan la media $\pm$ EE. ...	63
<b>Tabla 2.4.</b> Parámetros de fluorescencia medidos en dos genotipos de <i>Cenchrus ciliaris</i> (RN51 y RN1) bajo condiciones control y estrés hídrico. Los valores representan las medias $\pm$ EE. ....	69
<b>Tabla 2.5.</b> Expresión de los genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de lignina en los genotipos <i>C. ciliaris</i> (RN51 y RN1) en relación al control, según análisis de RT-PCR en tiempo real, medida a las 24 horas del inicio del tratamiento de sequía y recuperación. ....	73
<b>Tabla 2.6.</b> Parámetros anatómicos medidos en la sección transversal de la hoja de genotipos de <i>C. ciliaris</i> (RN51 y RN1) bajo condiciones de control y estrés hídrico. Se midieron los tejidos comprendidos entre los dos haces vasculares a ambos lados del haz central. Los valores representan la media $\pm$ EE. ....	75
<b>Tabla 2.7.</b> Parámetros anatómicos medidos en la sección transversal de la lámina de dos genotipos contrastantes de <i>C. ciliaris</i> (RN51 y RN1) en el tratamiento control y recuperación. Se midieron los tejidos comprendidos entre los dos haces vasculares a ambos lados del haz central. Los valores representan la media $\pm$ EE. ....	77
<b>Tabla 3.1.</b> Parámetros de fluorescencia medidos en dos genotipos contrastantes de <i>Cenchrus ciliaris</i> (RN51 y RN1) en condiciones control y estrés hídrico. Los valores representan las medias $\pm$ EE. ....	106
<b>Tabla 3.2.</b> Parámetros de fluorescencia medidos en genotipos contrastantes de <i>Cenchrus ciliaris</i> (RN51 y RN1) en condiciones control y recuperación. Los valores representan las medias $\pm$ EE.	107

La Tabla 4.1 describe las correlaciones canónicas entre variables fisiológicas y bioquímicas (CRA, Fv/Fm y MDA) con las variables anatómicas y moleculares (Área esclerenquimática, Parénquima

total, expresión génica de las enzimas CCoAOMT y CCR) medidas en el ensayo a tiempo corto y largo de estrés hídrico. ....	138
<b>Tabla 4.1.</b> Correlaciones canónicas entre variables fisiológicas y bioquímicas con variables anatómicas y moleculares medidas en el ensayo a tiempo corto y largo de estrés hídrico.....	139
<b>Tabla 4.2.</b> Correlaciones canónicas entre variables fisiológicas y bioquímicas con variables morfológicas medidas en el ensayo a tiempo corto y largo de estrés hídrico.....	140
<b>Tabla 4.3.</b> Correlaciones canónicas entre variables fisiológicas y bioquímicas con variables variables de calidad.....	143
<b>Tabla 4.4.</b> Correlaciones canónicas entre variables fisiológicas y bioquímicas con variables morfológicas.....	144

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 2.1.** Imágenes del ensayo de estrés hídrico a tiempo corto en cámara de cría. A. Macetas con plantas de los genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) en cámara de cría. B. Macetas con plantas de RN51 y RN1 bajo condiciones de control y de estrés hídrico, respectivamente. ....38
- Fig. 2.2.** Esquema representativo de los tiempos de muestreo correspondientes al ensayo a tiempo corto de estrés hídrico y la posterior recuperación.....39
- Fig. 2.3.** Imágenes del ensayo de estrés hídrico a tiempo largo en invernadero. A. Almacigos con plantas de los genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) en invernadero. B. Macetas en condiciones control y en condiciones de estrés hídrico. ....41
- Fig. 2.4.** Esquema representativo de los tiempos de muestreo correspondientes al ensayos tiempo largo de estrés hídrico y la posterior recuperación.....42
- Fig. 2.5.** Contenido relativo de agua en genotipos contrastantes de *C. ciliaris* (RN51 y RN1) para dos contenidos hídricos del suelo (80% y 20% CHS).....51
- Fig. 2.6.** Evapotranspiración como agua suministrada (g) en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) durante condiciones de estrés hídrico y recuperación.....52
- Fig. 2.7.** Contenido de malondialdehído (MDA) y poder reductor total cuantificado mediante el ensayo FRAP en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) en condiciones de estrés hídrico y de recuperación a las 24 y 72 horas de muestreo.....56
- Fig. 2.8.** Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) evaluada a las 24 y 72 h en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) expuestos a condiciones de estrés hídrico (A) y recuperación (B). ....58
- Fig. 2.9.** Efecto de condiciones de estrés hídrico en las enzimas catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) evaluadas a las 24 y 72 horas en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) en condiciones control y estrés hídrico.....60
- Fig. 2.10.** Efecto de las condiciones de estrés hídrico y recuperación sobre las observaciones anatómicas. Sección transversal de la lámina y haz vascular central de genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) bajo condiciones de control y estrés hídrico.....64
- Fig. 2.11.** Efecto de estrés hídrico y condiciones de recuperación posterior sobre parámetros relacionados al crecimiento. Peso fresco aéreo (A), Peso seco aéreo (B) y Altura de la planta (C) en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1).....66
- Fig. 2.12.** Efecto del estrés hídrico a tiempo corto sobre el fenotipo de los genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* RN51 y RN1, bajo condiciones de control y estrés hídrico.....67
- Fig. 2.13.** Contenido relativo de agua en RN51 y RN1 bajo condiciones de estrés por hídrico (A) y recuperación (B). ....68

<b>Fig. 2.14.</b> Contenido en Malondialdeído (MDA) (A) y poder reductor total (FRAP) (B) en RN51 y RN1 bajo condiciones de estrés hídrico y recuperación. ....	71
<b>Fig. 2.15.</b> Efecto del tratamiento de estrés hídrico y control sobre las observaciones anatómicas. Sección transversal de la lámina y haz vascular central de genotipos contrastantes de <i>Cenchrus ciliaris</i> (RN51 y RN1) en condiciones de control y estrés hídrico. ....	76
<b>Fig. 2.16.</b> Efecto del estrés hídrico y recuperación en el Peso Fresco Aéreo (A), Peso Seco Aéreo (B) y Altura de planta (C) en los genotipos contrastantes de <i>Cenchrus ciliaris</i> , RN51 y RN1.....	79
<b>Fig. 2.17.</b> Efecto del estrés hídrico a tiempo largo sobre el fenotipo en los genotipos contrastantes de <i>Cenchrus ciliaris</i> , RN51 y RN1, en condiciones control y de estrés hídrico.....	80
<b>Fig. 2.18.</b> Ensayo de estrés hídrico a tiempo largo en los genotipos contrastantes de <i>Cenchrus ciliaris</i> , RN51 y RN1, en condiciones control y de estrés hídrico. ....	80
<b>Fig. 3.1.</b> Ensayo a campo con estructura rain-out shelter. A. Genotipos contrastantes de <i>Cenchrus ciliaris</i> L., (RN51 y RN1) en macetas dentro de la estructura rain-out shelter. B. Detalle de las plantas en el momento de muestreo. ....	98
<b>Fig. 3.2.</b> Trasplante en macetas del ensayo a campo bajo estructura rain-out shelter. A. Pesaje de macetas. B. Trasplante de los genotipos contrastantes de <i>Cenchrus ciliaris</i> L., (RN51 y RN1) en macetas dentro de la estructura rain-out shelter.....	98
<b>Fig. 3.3.</b> Datos climáticos semanales registrados durante el ensayo. Temperatura (°C) media, máxima y mínima, humedad relativa (%) y velocidad del viento (Km/h). ....	99
<b>Fig.3.4.</b> Esquema representativo de los tiempos de muestreo correspondientes al ensayo a campo de estrés hídrico y recuperación. ....	100
<b>Fig. 3.5.</b> Contenido relativo de agua en genotipos contrastantes de <i>Cenchrus ciliaris</i> (RN51 y RN1) en condiciones de estrés hídrico (A) y recuperación (B). ....	104
<b>Fig. 3.6.</b> Contenido en Malondialdeído (MDA) en dos genotipos contrastantes de <i>Cenchrus ciliaris</i> (RN51 y RN1) para dos contenidos hídricos del suelo (80% y 20% CHS) en condiciones de estrés hídrico (A) y recuperación (B) a las 24 y 72 h.....	108
<b>Fig. 3.7.</b> Poder reductor total cuantificado mediante el ensayo FRAP en dos genotipos contrastantes de <i>Cenchrus ciliaris</i> (RN51 y RN1) en condiciones de estrés hídrico (A) y de recuperación (B) a las 24 y 72 horas de muestreo.....	109
<b>Fig. 3.8.</b> Contenido de azúcares solubles ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de PF) en dos genotipos contrastantes de <i>Cenchrus ciliaris</i> (RN51 y RN1) en condiciones de estrés hídrico y de recuperación. ....	110
<b>Fig. 3.9.</b> Efecto del estrés hídrico en parámetros asociados al crecimiento. Peso Fresco Aéreo (A), Peso Seco Aéreo (B) y Altura de planta (C) en dos genotipos contrastantes de <i>Cenchrus ciliaris</i> (RN51 y RN1).....	112
<b>Fig. 3.10.</b> Efecto del estrés hídrico sobre parámetros morfológicos en los genotipos de <i>Cenchrus ciliaris</i> RN51 y RN1, bajo en condiciones de control y estrés hídrico .....	113
<b>Fig. 3.11.</b> Efecto del estrés hídrico en la relación Hoja:Tallo (A) y número de macollos (B) en en dos genotipos contrastantes de <i>Cenchrus ciliaris</i> (RN51 y RN1). ....	113

- Fig. 3.12.** Efecto del estrés hídrico en parámetros asociados al crecimiento radicular. Peso Seco de Raíces en dos genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1)..... 114
- Fig. 3.13.** Efecto del estrés hídrico sobre el desarrollo radicular de los genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* RN51 y RN1, en condiciones de control y estrés hídrico. .... 115
- Fig. 3.14.** Efecto del estrés hídrico en parámetros de calidad forrajera, FDN (A), FDA (B), Lignina (C) y Digestibilidad de la materia seca (D) en tallos de los genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris*, RN51 y RN1, en condiciones de estrés hídrico y recuperación..... 116
- Fig. 3.15.** Efecto del estrés hídrico en parámetros de calidad forrajera, FDN (A), FDA (B), LDA (C) y Digestibilidad de la materia seca (D) en láminas de los genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris*, RN51 y RN1, en condiciones de estrés hídrico y recuperación..... 118
- Fig. 4.1.** Biplot que muestra el comportamiento diferencial entre los genotipos de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) en condiciones de estrés hídrico y recuperación en el ensayo a tiempo corto. .... 136
- Fig. 4.2.** Biplot que muestra el comportamiento diferencial entre los genotipos de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) en condiciones de estrés hídrico y recuperación en ensayo a tiempo largo. .... 138
- Fig. 4.3.** Biplot mostrando las diferencias en el performance de genotipos contrastantes de *C. ciliaris* (RN51 y RN1) en condiciones de estrés hídrico y recuperación en ensayo a campo. .... 142



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A</b>	altura
<b>ACP</b>	análisis de componentes principales
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ANAVA</b>	Análisis de la Variancia
<b>APX</b>	ascorbato peroxidasa
<b>°C</b>	grados centígrados
<b>CAT</b>	catalasa
<b>CCoAOMT</b>	cafeoil-CoA O-metiltransferasa
<b>CCR</b>	cinamoil-CoA reductasa
<b>CHS</b>	contenido hídrico del suelo
<b>CIAP</b>	centro de investigaciones agropecuarias
<b>cm</b>	centímetros
<b>COMT</b>	ácido cafeico-O-metiltransferasa
<b>CRA</b>	contenido relativo de agua
<b>EDTA</b>	ácido etileno di amino tetra acético
<b>ERO</b>	especie reactiva de oxígeno
<b>ET</b>	evapotranspiración
<b>FDA</b>	fibra detergente ácida
<b>FDN</b>	fibra detergente neutro
<b>Fig</b>	figura
<b>FRAP</b>	ferric reducing ability of plasma
<b>Fv/Fm</b>	eficiencia cuántica máxima
<b>g</b>	gramos
<b>H</b>	hora
<b>ha</b>	hectárea
<b>IFRGV</b>	Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales
<b>INTA</b>	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

<b>kg</b>	kilogramos
<b>M</b>	Molar
<b>m<sup>2</sup></b>	metro cuadrado
<b>MDA</b>	malondialdehído
<b>mg</b>	miligramos
<b>min.</b>	minutos
<b>mL</b>	mililitro
<b>mM</b>	mili molar
<b>mm</b>	milímetros
<b>NBT</b>	nitro blue tetrazolium
<b>nm</b>	nano moles
<b>NOA</b>	noroeste argentino
<b>P</b>	parénquima
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>PFA</b>	peso fresco aéreo
<b>PSA</b>	peso seco aéreo
<b>PSII</b>	fotosistema II
<b>PVPP</b>	poli vinil poli pirrolidona
<b>RN</b>	register number
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>S</b>	esclerénquima
<b>SOD</b>	superóxido dismutasa
<b>T°</b>	temperatura
<b>TBA</b>	ácido thiobarbitúrico
<b>TCA</b>	ácido tri-cloro-acético
<b>USOD</b>	unidades de superóxido dismutasa
<b>Xc</b>	promedio tratamiento control
<b>Xs</b>	promedio tratamiento estrés

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### **Ganadería y limitaciones agroclimáticas**

En nuestro país podemos distinguir cinco regiones productivas ganaderas, la región Pampeana, Noroeste Argentino (NOA), Noreste Argentino (NEA), Semiárida Central y Patagónica. En cada una de estas regiones la dinámica de los sistemas ganaderos ha estado sujeta a cambios a través del tiempo que inciden en la oferta de animales. Esta variación se da en función de los precios de mercado, las oportunidades de comercialización, las políticas implementadas y las condiciones climáticas particulares de cada año (Rearte, 2011). Estos factores pueden llevar a cambiar de tipo de explotación (agrícola, ganadera o mixta). Sin embargo, existen otros cambios más profundos (no coyunturales) que ejercen acciones en los sistemas de producción. El avance de la agricultura debido a su mayor rentabilidad hizo que la superficie ganadera disminuyera en la región núcleo (Pampeana) (Rearte, 2011). Como contrasentido, se ve el incremento del stock ganadero en las provincias del Litoral y del Norte argentino, que comenzó a incorporar genética y tecnología en la aplicación de pasturas, complementando la forma extensiva de engorde en campos caracterizados en su mayoría por monte y pastizales naturales degradados (Milano, 2011).

La ganadería de la región del NOA se desarrolla principalmente en la gran llanura chaqueña semiárida, que, con centro en la provincia de Santiago del Estero, abarca el este de Salta, el Oeste de Chaco y Formosa, pequeñas fracciones orientales de Jujuy y Tucumán, el este de Catamarca y La Rioja y la fracción noroeste de Córdoba, según

información suministrada por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). En esta región, las condiciones de clima y suelo imponen restricciones naturales a la producción agrícola extensiva (Karlin *et al.*, 2013) disminuyendo su competitividad. Así, la actividad ganadera predominante se caracteriza por la producción a base de pasturas en sistemas extensivos, con una baja carga animal, cuyo principal objetivo es hacer coincidir a lo largo del año la máxima demanda animal con la máxima oferta forrajera, esta última, altamente estacional. El suelo, las temperaturas y las lluvias son las principales características ambientales que limitan las posibilidades productivas de la región (Avila *et al.*, 2014; Karlin, 2013). Más aún, la escasez de lluvias es uno de los principales factores abióticos que ocasionan graves pérdidas de rendimiento, persistencia y valor nutricional de las pasturas tanto naturales como implantadas (Ruiz y Terenti, 2012). La distribución espacial de las precipitaciones es muy irregular, consecuencia de la fuerte orografía de la región (Volante *et al.*, 2005), con precipitaciones anuales que varían de 450 mm al Este (Noroeste de Córdoba) a 200 mm al Oeste (Este de San Juan), concentradas en los meses estivales (régimen de tipo Monzónico) (Tommasino, 2018). La gran mayoría de los suelos corresponden a entisoles, con escasa participación de aridisoles en zonas bajas, mientras que los suelos de piedemonte son sueltos, permeables, franco arenoso de arenas gruesas. Las temperaturas en verano son elevadas, con una media mensual del mes más cálido de 26 °C. Suelen presentarse 20 a 25 días con temperaturas superiores a los 40 °C y máximas absolutas que sobrepasan los 45 °C (Tommasino, 2018). Teniendo en cuenta las características edafoclimáticas mencionadas, el balance hídrico del suelo como porcentaje de agua útil de la capa arable, de acuerdo con el balance hidrológico operativo para el agro (BHOA), suele ser negativo gran parte del año (Fernández Long *et al.*, 2012). Asimismo, los escenarios climáticos registran y prevén más días con temperaturas más altas y precipitaciones más erráticas, lo que lleva a un aumento en la frecuencia de condiciones de sequía severa (Basu *et al.*, 2016; IPCC, 2018).

En este contexto, estudios realizados demuestran que la incorporación de pasturas cultivadas, como buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L. Syn. *Pennisetum ciliare* Link), resulta ser una herramienta eficiente para incrementar la producción y calidad de forraje, permitiendo incrementar la receptividad animal por hectárea y mejorar los índices productivos y reproductivos. Más aún, complementa estratégicamente a la producción del

pastizal natural en el NOA (De León, 2004; Ferrando *et al.*, 2003; Griffa *et al.*, 2017; Namur *et al.*, 2014).

### ***Cenchrus ciliaris* L. (Buffel grass)**

*Cenchrus ciliaris* L. es una importante gramínea forrajera apomíctica (Kumar, 2017) originaria de África oriental y el sudeste asiático y ampliamente distribuida en regiones áridas y semiáridas del mundo para la alimentación del ganado bovino y ovino (Bowen y Chudleigh 2017; de Albuquerque *et al.*, 2019). En el noroeste de Argentina, se ha introducido como alimento forrajero para el ganado bovino debido a su fácil implantación, buen valor forrajero para dichas regiones áridas (6-9% de proteína cruda y 50% de digestibilidad) y conocida tolerancia a condiciones de estrés hídrico (Guevara *et al.*, 2009; Arroquy *et al.*, 2014). Es una pastura perenne con metabolismo fotosintético C4, que pertenece al complejo agámico de *Cenchrus-Pennisetum*, tribu Paniceae, subfamilia Panicoideae (Hanselka *et al.*, 2004). Posee un hábito de crecimiento primavera-verano y alcanza una altura entre 50 y 150 centímetros según el cultivar (Namur *et al.*, 2014). Prefiere suelos profundos de textura liviana, sueltos y no tolera inundaciones ni anegamientos prolongados (Avila *et al.*, 2014). Su cultivo es posible hasta 2000 metros de altura sobre el nivel del mar, y el régimen de precipitaciones requerido varía desde 305 a 890 mm anuales. Tiene un buen comportamiento ante las sequías, pudiendo soportar algunos cultivares ambientes con solo 300-350 mm de precipitaciones anuales, con variabilidad en dicha tolerancia entre diferentes genotipos (Mansoor *et al.*, 2002; Tommasino *et al.*, 2018). La introducción del Buffel Grass en los campos ganaderos, ha permitido incrementar la producción de materia seca desde 800-1500 kgMs/ha/año (producción de las pasturas naturales) a 2500-5000 kgMs/ha (producción de un lote de buffel ya implantado) (Giraud, 2003).

*Cenchrus ciliaris* es una especie tetraploide ( $4x=36$ ), con manifestación de aneuploidia y pseudogamia, siendo conocida su condición de apomictica obligada (Snyder *et al.*, 1955; Hignight *et al.*, 1991; Jessup *et al.*, 2002; Ozias-Akins *et al.*, 2003; Ozias-Akins,

2006). Esta condición de apomixis (modo asexual de reproducción a través de semillas) produce progenies genéticamente idénticas al progenitor femenino, mientras que los genotipos sexuales son raros (Burson *et al.*, 2012). Diversos cultivares apomícticos de *Cenchrus ciliaris* fueron introducidos (Ayerza, 1981), siendo los más difundidos en la actualidad Texas, Biloela, Molopo y Americana (Pérez, 2005).

El Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV) dependiente del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), dispone de una colección activa de diferentes genotipos apomícticos, la cual es utilizada en un programa de mejoramiento genético tendiente a la obtención de nuevo germoplasma con tolerancia incrementada a diferentes tipos de estrés abiótico. Con respecto al cv. Biloela, éste fue introducido a través de recolecciones realizadas en Dodoma, Tanzania, en 1937, por CSIRO, Australia (centro de introducción de plantas) y testado en Rockhampton, Queensland (Lopez Colomba, 2009). Por otro lado, el INTA dispone además, de una estirpe sexual introducida, material proporcionado por el banco de germoplasma de Texas A&M University College Station (Quiroga *et al.*, 2013). Este germoplasma tetraploide sexual probablemente derivó del clon B-1s, la planta "fuera de tipo" originalmente estudiada por Bashaw y colaboradores (Bashaw y Hoff, 1962), la cual constituye una de las dos únicas fuentes sexuales existentes a nivel mundial para ser utilizada como parental femenino en cruzamientos controlados.

En evaluaciones previas de nuestro grupo de trabajo, los cultivares Americana y Biloela mostraron buen comportamiento frente a estrés salino en hidroponía (menor daño en caracteres morfológicos), mientras que el cultivar Texas 4464 y la fuente sexual, tuvieron comportamiento opuesto (susceptible) en iguales condiciones (Tomassino *et al.*, 2012). En términos de daño oxidativo, el mismo comportamiento fue observado en el genotipo Sexual y Biloela respectivamente, cuando fueron sometidos a estrés por sequía, estrés térmico y ambos estreses combinados (Tomassino *et al.*, 2018).

Sin embargo, falta conocimiento acerca de la vinculación de los mecanismos de adaptación implicados en la tolerancia y/o susceptibilidad en condiciones de estrés hídrico y recuperación de dichos genotipos, con la calidad forrajera, íntimamente ligada a la lignificación de los tejidos (Amiri, 2012; Grabber *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2012).

## **Estrés hídrico (general)**

El estrés hídrico causado por sequía es una forma fisiológica de déficit hídrico, donde la disponibilidad de agua del suelo es menor que la demanda de la planta, lo que resulta en un cambio negativo en el estado hídrico de la misma que se aleja de un estado de referencia (Kumar *et al.*, 2018). Frente a las condiciones de estrés hídrico, las plantas tienen tres estrategias adaptativas principales, revisadas recientemente por Volaire (2018): escape, evitación y tolerancia a la deshidratación. Dichas estrategias a menudo se combinan de forma consecutiva o simultánea y son las más documentadas en la mayoría de las especies (Voltaire, 2018). Las especies herbáceas perennes, como muchas gramíneas forrajeras, entre las que se menciona *C. ciliaris*, constituyen el tipo biológico posiblemente con la gama más amplia de estrategias. En este sentido, Siddiqui *et al.*, (2016) mencionaron que esta especie tiene la capacidad de tolerar largos periodos de sequía en condiciones de suelo variables, lo que indica cierto grado de tolerancia a la deshidratación.

Existe una amplia variedad de respuestas bioquímicas, fisiológicas, anatómicas y moleculares a nivel celular y de organismo que han sido descritas como diferentes tipos de estrategias empleadas por las plantas en ambientes restrictivos (Basu *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018). La sensibilidad y el tiempo de respuesta varían según la especie, el genotipo y la duración e intensidad del estrés (Basu *et al.*, 2016; Abid *et al.*, 2018). En general, se acepta que el estrés hídrico genera cambios fisiológicos en las plantas superiores, incluida la pérdida de turgencia, el ajuste osmótico y la reducción del potencial hídrico de las hojas para mantener un buen balance hídrico (Le Gall *et al.*, 2015). La respuesta inmediata al estrés hídrico es el cierre de estomas, que da como resultado cambios en las vías metabólicas, como la fotosíntesis y la respiración (Basu *et al.*, 2016).

El estrés hídrico causa, no solo daños importantes a los pigmentos fotosintéticos, sino que también conduce al deterioro de las membranas de tilacoides y la reducción del contenido de clorofila. Se cree que los pigmentos fotosintéticos presentes en los dos fotosistemas (PSI y PSII) son dañados por el estrés abiótico, lo que da como resultado

una reducción de la eficiencia de absorción de luz de ambos fotosistemas y, por lo tanto, una capacidad fotosintética reducida (Asharf y Harris, 2013). Además, el PSII, con su complejo generador de oxígeno (OEC), se considera el componente del aparato fotosintético más sensible al estrés hídrico mediante la reducción de la máxima eficiencia cuántica ( $F_v / F_m$ ; Fracasso *et al.*, 2016).

En presencia de estrés hídrico, se inhibe la tasa de transporte de electrones y se incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (EAO) (Basu *et al.*, 2016), lo que genera daño a los lípidos de la membrana, proteínas y ADN que resulta en la muerte celular (Waszczak *et al.*, 2018). Las plantas poseen un complejo sistema antioxidante enzimático y no enzimático para regular los niveles de EAO producidos en los tejidos y, así, mitigar el daño oxidativo. Enzimas clave como superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GR) (You y Chang, 2015; Kumar *et al.*, 2018) se mencionan en el sistema enzimático y se han correlacionado positivamente en plantas con tolerancia al estrés abiótico (Laxa *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2019). Estudios previos de nuestro grupo indicaron que los niveles más altos de actividad de la enzima antioxidante CAT podrían contribuir a una mejor tolerancia a la sequía al aumentar la capacidad de protección contra el daño oxidativo (Tommasino *et al.*, 2018).

Las plantas expuestas a déficit hídrico presentan cambios morfológicos como resultado de modificaciones en la pared celular (Hameed *et al.*, 2010; 2012; Al-Maskri *et al.*, 2014). La disminución del grosor de la lámina de la hoja, el aumento de la capa epidérmica, la reducción del área del metaxilema y el tamaño de los estomas se mencionan como las modificaciones más importantes en los tejidos de numerosas especies forrajeras bajo estrés hídrico (Hameed *et al.*, 2010; 2012; Arias *et al.*, 2018; Mustafa *et al.*, 2019). En *C. ciliaris*, el grosor de las láminas y la deposición de cutículas acompañadas de una capa epidérmica gruesa se incluyeron como modificaciones cuando las plantas estuvieron expuestas a diversos regímenes de estrés hídrico (Nawazish *et al.*, 2006, Mansoor *et al.*, 2019).



## Lignina

La lignina es un polímero polifenólico que constituye la pared celular y es necesario para reforzar las células vasculares. Desplaza la fase acuosa de la pared celular, que recubre la celulosa y los polisacáridos de la matriz y proporciona mayor resistencia mecánica y una barrera impermeable al agua (Liu *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2019).

El polímero de lignina se genera a través de la oxidación de principalmente tres alcoholes hidroxicinámicos (monolignoles) que difieren en su grado de metoxilación, alcoholes p-cumarílico, coniferílico y sinapílico, cuya incorporación produce unidades de p-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S) (Cesarino, 2019). Se ha demostrado que varios estreses abióticos inducen la biosíntesis de un polímero de lignina más condensado que contiene una mayor proporción de enlaces C-C entre unidades y de unidades H. El enriquecimiento de lignina con unidades H podría ser consecuencia de una rápida inducción de lignificación en condiciones de estrés, favoreciendo la incorporación de un monómero de lignina cuya ruta biosintética requiere menos pasos catalíticos, lo que permite una respuesta más rápida (Cesarino, 2019).

Debido a que la vía biosintética de la lignina parece estar altamente conservada entre las especies de plantas, muchas de las estrategias de ingeniería genética que demostraron ser exitosas en especies modelo, como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*, también se han aplicado a materias primas lignocelulósicas. Sin embargo, varios estudios muestran que la modificación de la biosíntesis de lignina puede alterar el metabolismo de los fenilpropanoides y ocasionar cambios en la forma en que las plantas responden a estreses bióticos y abióticos (Baxter y Stewart, 2013).

Algunas enzimas clave del proceso de lignificación incluyen ácido cafeico O-metiltransferasa (COMT), 4-cumarato CoA ligasa (4CL), cinamoil CoA reductasa (CCR) y cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) (Moura *et al.*, 2010; Stabile *et al.*, 2012; Baxter y Stewart, 2013). Varios estudios mencionaron que el metabolismo de la lignina se incrementó bajo diversos factores de estrés ambiental, como el estrés por sequía (Liu *et al.*, 2018). En líneas endogámicas de maíz, los niveles de expresión de genes relacionados

con la biosíntesis de lignina (CAD y COMT) se correlacionaron significativamente de manera positiva con la tolerancia a la sequía (Moura-Sobczak *et al.*, 2011). Además, en trébol blanco, el aumento de los sistemas de captación de ROS y el metabolismo de la lignina podrían estar asociados con mayor tolerancia a la sequía durante el estrés y la recuperación posterior a la misma (Li *et al.*, 2013). Por otro lado, en las gramíneas, se ha demostrado que la expresión de genes que codifican enzimas de la vía fenilpropanoide participa en la modulación de la tasa de síntesis de lignina (Ralph *et al.*, 2004), y su expresión se ha asociado negativamente con la degradabilidad de la pared celular (Fu *et al.*, 2011; Stabile *et al.*, 2012).

Sin embargo, hasta el momento, la información disponible sobre las implicancias del estrés hídrico y la recuperación posterior en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de lignina en *C. ciliaris* es nula.

## **Calidad Forrajera**

La calidad de una pastura está asociada con la anatomía foliar y sus tejidos constituyentes y el contenido de pared celular (determinante de la rigidez), que a su vez pueden variar según las condiciones ambientales y el estadio de crecimiento (Batistoti *et al.*, 2012). Las paredes secundarias de las células de algunos tejidos cuentan con un predominio de lignina, hemicelulosa y celulosa, que contribuyen al basamento estructural de la planta y componen la fibra del forraje (Abideen *et al.*, 2011). La fibra detergente neutro (FDN) caracteriza a la fracción de la materia seca del forraje compuesta por hemicelulosa, celulosa y lignina, mientras que la fibra detergente ácida (FDA) caracteriza el contenido de celulosa y lignina en el material vegetal. Las fracciones FDN y FDA son parcialmente digeribles, dependiendo de la especie forrajera y etapa de madurez. Sin embargo, un alto contenido de FDN y FDA no solo reduce la ingesta, sino que disminuye la eficiencia de conversión energética (Habermann *et al.*, 2019). La lignina es el componente de la fibra que produce el mayor impacto en la digestibilidad (Batistoti *et al.*, 2012; Hugues *et al.*, 2014). Al respecto, el entrelazamiento de la lignina con los hidratos

de carbono estructurales (hemicelulosa y celulosa) actúa como una barrera física para las enzimas microbianas que digieren los polisacáridos de pared (Jung and Casler, 2006; Giordano *et al.*, 2014); debido a la asociación de la lignina con ácidos fenólicos (p-cumárico y ferúlico), ésta no es fácilmente biodegradable; por lo que resulta ser menos eficiente en término de conversión de bioenergía y ganancias de peso para el animal (Abideen *et al.*, 2011; Batistoti *et al.*, 2012; Jung and Casler, 2006; Giordano *et al.*, 2014). Es por ello que se ha considerado a la lignina como uno de los factores que correlaciona negativamente con la degradabilidad de las paredes celulares (Barrière *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2011; Stabile *et al.*, 2012; Fukushima *et al.*, 2015).

El valor nutritivo de una pastura es altamente variable influenciado por la especie, variedad, época del año y prácticas de manejo (Juan *et al.*, 2020). Aunque estos efectos son importantes para la producción, generalmente son de menor magnitud que el efecto sobre el rendimiento del forraje. La variación de factores ambientales como la temperatura, la radiación solar, los nutrientes del suelo y el déficit de agua, ejercen su mayor influencia en la calidad del forraje al alterar la relación hoja/tallo, pero también provocan modificaciones en el desarrollo de la planta y cambios en la composición química en los tejidos de la planta (Buxton, 1996). Esto puede alterar la etapa de madurez óptima para la recolección de forrajes de una determinada calidad. Asimismo, conocer el balance entre producción de materia seca y digestibilidad de la misma es importante en términos de producción forrajera e impacto en la producción animal. Más aún, en condiciones de estrés hídrico, conocer el balance entre calidad-rendimiento-tolerancia contribuye a la toma de decisiones en la producción y manejo de pasturas.

La comprensión de algunos de los mecanismos de adaptación implicados en la tolerancia y/o susceptibilidad en condiciones de estrés hídrico y recuperación, y su relación con la calidad forrajera, proporcionará nuevas herramientas que asistan a los procesos de selección temprana y desarrollo de nuevas creaciones fitogenéticas de mayor tolerancia y calidad forrajera que respondan a las demandas del sector pecuario y, consecuentemente, contribuyan a transformar dicha actividad en un sistema eficiente y rentable (Stabile *et al.*, 2012).

Por lo anteriormente expuesto se plantean las siguientes hipótesis y objetivos:

## **HIPÓTESIS**

Hipótesis 1. El tiempo de exposición a estrés hídrico modula la expresión génica de enzimas que participan en el proceso de lignificación y acentúa cambios anatómicos y morfo-fisiológicos en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris*

Hipótesis 2. En condiciones de estrés hídrico se observan cambios en la composición química del forraje, el contenido de fibra y la calidad nutricional de genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris*

Hipótesis 3. Existe asociación entre variables morfológicas, anatómicas y de calidad forrajera y tolerancia a estrés hídrico en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris*

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto del estrés hídrico en la anatomía foliar, en el proceso de lignificación y su impacto en la calidad forrajera de genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* L en su respuesta a estreses abióticos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Objetivo 1. Evaluar el efecto de tiempos cortos y prolongados de estrés hídrico a nivel anatómico, morfo-fisiológico y en la expresión génica de enzimas que participan en el proceso de lignificación en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris*

Objetivo 2. Determinar el efecto del estrés hídrico en parámetros relacionados con calidad forrajera: Fibra Detergente Neutra (FDN), Fibra Detergente Ácida (FDA), Lignina Detergente Ácida (LDA), Proteína Bruta (PB) y digestibilidad de la materia seca (DMS), en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris*

Objetivo 3. Establecer asociaciones entre anatomía foliar, metabolismo de la lignina, calidad forrajera y tolerancia a estrés hídrico en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris*

## BIBLIOGRAFIA

- Abid M., Ali S., Qi L. K., Zahoor R., Tian Z., Jiang D., Snider J. L., Dai T. 2018. Physiological and biochemical changes during drought and recovery periods at tillering and jointing stages in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Scientific Reports* 8: 4615.
- Abideen Z., Ansari R. and Khan M. A. 2011. Halophytes: Potential source of ligno-cellulosic biomass for ethanol production. *Biomass and Bioenergy* 35: 1818-1822.
- Al-Maskri A., Hameed M., Ashraf M., Khan M. M., Fatima S., Nawaz T., Batool R. 2014. Structural features of some wheat (*Triticum* spp.) landraces/cultivars under drought and salt stress. *Arid Land Research and Management* 28: 355-370.
- Amiri, F. 2012. Comparison of nutritive values of grasses and legume species using forage quality index. *Songklanakarin Journal of Science & Technology* 34.
- Arias C., Serrat X., Moysset L., Perissé P., Nogués S. 2018 Morpho-physiological responses of *Alamo switchgrass* during germination and early seedling stage under salinity or water stress conditions. *Bioenergy Research* 11: 677-688.
- Arroquy J., Berruhet F., Martinez Ferrer J., Pasinato A., Brunetti M., Pasinato A., Pordomingo A. 2014. Uso de subproductos del destilado de granos en bovinos para carne. In: *Jornada Nacional de Forrajes Conservados (1a., 2014, Manfredi). Recopilación de presentaciones técnicas. Córdoba, INTA, pp. 1-43*
- Ashraf M. and Harris P. J. C. 2013. Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* 51: 163-190.
- Avila R., Barbera P., Blanco L., Burghi V., De Battista J., Frasinelli C., ... y Lauric M. 2014. Gramíneas forrajeras para el subtrópico y el semiárido central de la Argentina. Ediciones INTA, 72 pp.
- Ayerza, R. 1981. El Buffel grass: utilidad y manejo de una promisorio gramínea.
- Barrière Y., Mechin V., Lafarguette F., Manicacci D., Guillon F., Wang H., ... and Tatout C. 2009. Toward the discovery of maize cell wall genes involved in silage quality and capacity to biofuel production. *Maydica* 54: 161-198.
- Bashaw E. C. and Hoff B. J. 1962. Effects of Irradiation on Apomictic Common Dallasgrass1. *Crop science* 2.
- Basu S., Ramegowda V., Kumar A., Pereira A. 2016. Plant adaptation to drought stress. *F1000Research* 5: 1554.
- Batistoti C., Lempp B., Jank L., Morais M. D. G., Cubas A. C., Gomes R. A., and Ferreira M. V. B. 2012. Correlations among anatomical, morphological, chemical and agronomic characteristics of leaf blades in *Panicum maximum* genotypes. *Animal Feed Science and Technology* 171: 173-180.
- Baxter H. L., Stewart Jr C. N. 2013. Effects of altered lignin biosynthesis on phenylpropanoid metabolism and plant stress. *Biofuels* 4: 635-650.
- Bowen M. K. and Chudleigh F. 2017. Productivity and profitability of a range of alternative steer growth paths resulting from manipulating the pasture feed base in central Queensland—a modelling approach.

- Burson B. L., Atkinson J. M., Hussey M. A., Jessup R. W. 2012. Ploidy determination of buffel grass accessions in the USDA National Plant Germplasm System collection by flow cytometry. *South African Journal of Botany* 79: 91–95.
- Buxton D. R. 1996. Quality-related characteristics of forages as influenced by plant environment and agronomic factors. *Animal feed science and technology* 59: 37-49.
- Cesarino I. 2019. Structural features and regulation of lignin deposited upon biotic and abiotic stresses. *Current opinion in biotechnology* 56: 209-214.
- Chen X., Wang H., Li X., Ma K., Zhan Y., Zeng F. 2019. Molecular cloning and functional analysis of 4-Coumarate: CoA ligase 4 (4CL-like 1) from *Fraxinus mandshurica* and its role in abiotic stress tolerance and cell wall synthesis. *BMC Plant Biology* 19: 231.
- de Albuquerque F. S., Macías-Rodríguez M. Á., Búrquez A., Astudillo-Scalia Y. 2019. Climate change and the potential expansion of buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L., Poaceae) in biotic communities of Southwest United States and northern Mexico. *Biological Invasions* 21: 3335-3347.
- De León M. 2004. Las pasturas subtropicales en la región semiárida central del país. Informe técnico N°1. Ampliando la frontera ganadera. Estación Experimental Agropecuaria Manfredi INTA.
- Fernández Long M. E., Spescha L. B., Barnatán I. E., Murphy G. M. 2012. Modelo de balance hidrológico operativo para el agro (BHOA). *Agronomía y Ambiente* 32: 31-47.
- Ferrando C., Namur P., Berone G., Oriente E., Blanco L. 2003. Del peladal a la producción de carne. *Revista Super Campo* 1:56-59.
- Fracasso A., Trindade L., Amaducci S. 2016. Drought tolerance strategies highlighted by two *Sorghum bicolor* races in a dry-down experiment. *Journal of Plant Physiology* 190: 1-14.
- Fu C., Xiao X., Xi Y., Ge Y., Chen F., Bouton J., Dixon R. A., Wang Z. Y. 2011. Downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) leads to improved saccharification efficiency in switchgrass. *BioEnergy Research* 4: 153-164.
- Fukushima R. S., Kerley M. S., Ramos M. H., Porter J. H., Kallenbach R. L. 2015. Comparison of acetyl bromide lignin with acid detergent lignin and Klason lignin and correlation with in vitro forage degradability. *Animal Feed Science and Technology* 201: 25-37.
- Giordano A., Liu Z., Panter S. N., Dimech A. M., Shang Y., Wijesinghe H., Spangenberg G. C. 2014. Reduced lignin content and altered lignin composition in the warm season forage grass *Paspalum dilatatum* by down-regulation of a Cinnamoyl CoA reductase gene. *Transgenic Research* 23: 503-517.
- Giraud M. 2003. Buffel grass, el pasto. *Marca Líquida Agropecuaria* 13: 17-21.
- Grabber J. H., Ralph J., Lapierre C., Barrière Y. 2004. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin–cell wall matrix interactions. *Comptes Rendus: Biologies* 327: 455-465.
- Griffa S., Biderbost E., Grunberg K., Ribotta A., López Colomba E., Tommasino E. 2017. Descriptores morfológicos para la conducción de ensayos de distinción, homogeneidad y estabilidad en Buffel Grass (*Cenchrus ciliaris* L.). Ediciones INTA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 36 pp.
- Guevara J. C., Grünwaldt E. G., Estevez O. R., Bisigato A. J., Blanco L. J., Biurrun F. N., Ferrando C. A., Chirino C. C., Morici E., Fernández E., Allegretti L. I., Passera C.

- B. 2009. Range and livestock production in the Monte Desert, Argentina. *Journal of Arid Environments* 73: 228-237.
- Habermann E., Dias de Oliveira E. A., Contin D. R., Delvecchio G., Viciado D. O., de Moraes M. A. 2019. Warming and water deficit impact leaf photosynthesis and decrease forage quality and digestibility of a C4 tropical grass. *Physiologia Plantarum* 165: 383–402.
- Hameed M., Ashraf M., Naz N., Al-Qurainy F. 2010. Anatomical adaptations of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. from the Salt Range Pakistan to salinity stress. I. Root and stem anatomy. *Pakistan Journal of Botany* 42: 279-289.
- Hameed M., Batool S., Naz N., Nawaz T., Ashraf M. 2012. Leaf structural modifications for drought tolerance in some differentially adapted ecotypes of blue panic (*Panicum antidotale* Retz.). *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 1479-1491.
- Hanselka W. C., Hussey M. A., Ibarra F. F. 2004. Buffelgrass. In: Moser, L.E. (Ed.), *Warmseason (C4) Grasses: Agronomy Monograph*, 45. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI, pp. 477–502.
- Hignight K. W., Bashaw E. C., Hussey M. A. 1991. Cytological and morphological diversity of native apomictic buffelgrass, *Pennisetum ciliare* (L.) Link. *Botanical Gazette* 152: 214-218.
- Hughes M., Mlambo V., Jennings P. G. A., Lallo C. H. O. 2014. The accuracy of predicting in vitro ruminal organic matter digestibility from chemical components of tropical pastures varies with season and harvesting method. *Tropical Agriculture* 91: 135-146.
- IPCC 2018. Global warming of 1.5 °C. An IPCC special report on the impacts of global warming of 1.5 °C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change.
- Jessup R.W., Burson B. L., Burow G. B., Wang Y. W., Chang C., Li Z., Paterson A. H., Hussey M. A. 2002. Disomic inheritance, suppressed recombination, and allelic interactions govern apospory in buffelgrass as revealed by genome mapping. *Crop Science* 42: 1688–1694.
- Juan N. A., Bollati G. P., Ortiz D.A., Ribotta A., Griffa S. y Lopez Colomba E. 2020. *Revista Argentina de producción Animal* 40: 39- 170.
- Jung H. G. and Casler M. D. 2006. Maize stem tissues: impact of development on cell wall degradability. *Crop science* 46: 1801-1809.
- Jung H. J. G., Samac D. A., Sarath G. 2012. Modifying crops to increase cell wall digestibility. *Plant Science* 185: 65-77.
- Karlin M. S. 2013. Cambio climático en zonas semiáridas: El caso Chaco Árido. Editorial Académica Española. 177 pp.
- Kumar S., Sachdeva S., Bhat K. V., Vats S. 2018. Plant responses to drought stress: physiological, biochemical and molecular basis. In *Biotic and abiotic Stress tolerance in plants*. Springer, Singapore, pp 1-25
- Kumar S. 2017. Epigenetic control of apomixis: a new perspective of an old enigma. *Advances in Plants & Agriculture Research* 7: 10-15406
- Laxa M., Liebthal M., Telman W., Chibani K., Dietz, K. J. 2019. The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants* 8: 94.
- Le Gall H., Philippe F., Domon J., Gillet F., Pelloux J., Rayon C. 2015. Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants* 4: 112-166.



- Li Z., Peng Y., Ma X. 2013. Different response on drought tolerance and post-drought recovery between the small-leafed and the large-leafed white clover (*Trifolium repens* L.) associated with antioxidative enzyme protection and lignin metabolism. *Acta physiologiae Plantarum* 35: 213-222.
- Liu D., Llusia J., Ogaya R., Estiarte M., Llorens L, Yang X., Penuelas J. 2016. Physiological adjustments of a Mediterranean shrub to long-term experimental warming and drought treatments. *Plant Science* 252: 53-61.
- Liu Q., Luo L., Zheng L. 2018. Lignins: biosynthesis and biological functions in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 335.
- Liu Y., Wu Q., Ge G., Han G., Jia Y. 2018. Influence of drought stress on alfalfa yields and nutritional composition. *BMC Plant Biology* 18: 13.
- Lopez Colomba E. 2009. Inducción de variabilidad genética mediante técnicas de cultivo in vitro para tolerancia a estrés abiótico en *Cenchrus ciliaris* L. Tesis Doctoral. Córdoba
- Mansoor U., Fatima S., Hameed M., Naseer M., Ahmad M. S. A., Ashraf M., Ahmad F., Waseem M. 2019. Structural modifications for drought tolerance in stem and leaves of *Cenchrus ciliaris* L. ecotypes from the Cholistan Desert. *Flora* 261: 151485.
- Mansoor U., Hameed M., Wahid A. and Rao A. R. 2002. Ecotypic variability for drought resistance in *Cenchrus ciliaris* L. germplasm from Cholistan Desert in Pakistan. *International Journal of Agriculture & Biology* 4:392- 397.
- Milano, R. 2011. Revista de la Bolsa de Comercio de Rosario <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/informacion/informes-y-estadisticas>
- Moura J. C. M. S., Bonine C. A. V., Viana J. O. F., Dornelas M. C., Mazzafera P. 2010. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 360–376.
- Moura-Sobczak J., Souza U., Mazzafera P. 2011. Drought stress and changes in the lignin content and composition in Eucalyptus. *BMC Proceedings* 5, P103.
- Mustafa F., Ahmad F., Hameed M., Sadia B. 2019. Anatomical adaptations for drought tolerance in *Lasiurus scindicus* from Punjab, Pakistan. *International Journal of Agriculture and Biology* 22: 290-298.
- Namur P., Tessi Jose M., Avila R. E., Rettore H. A., Ferrando C. A. 2014. Buffel grass Generalidades, implantación y manejo para recuperación de áreas degradadas. Ediciones INTA. La Rioja, Argentina, 20 pp.
- Nawazish S., Hameed M., Naurin S. 2006. Leaf anatomical adaptations of *Cenchrus ciliaris* L. from the Salt Range, Pakistan against drought stress. *Pakistan Journal of Botany* 38: 1723-1730.
- Ozias-Akins P. 2006. Apomixis: developmental characteristics and genetics. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25: 199-214.
- Ozias-Akins P., Akiyama Y., Hanna W. W. 2003. Molecular characterization of the genomic region linked with apomixis in *Pennisetum/Cenchrus*. *Functional & Integrative Genomics* 3: 94-104.
- Pérez H. 2005. Características de las especies forrajeras adaptadas a las condiciones del Noroeste del país. *Forrajes*. Córdoba, 33-41.
- Quiroga M., Grunberg K., Ribotta A., Colomba E. L., Carloni E., Tommasino E., Griffa S. 2013. Obtaining sexual genotypes for breeding in buffel grass. *South African Journal of Botany* 88: 118-123.

- Ralph J., Guillaumie S., Grabber J. H., Lapierre C., Barrière Y. 2004. Genetic and molecular basis of grass cell-wall biosynthesis and degradability. III. Towards a forage grass ideotype. *Comptes Rendus Biologies* 327: 467-479.
- Rearte D. 2011. Asociación Latinoamericana de Producción Animal. ISSN 1022-1301.19: 46-49.
- Ruiz M., Terenti O. 2012. Germinación de cuatro pastos bajo condiciones de estrés salino. *Phyton (Buenos Aires)* 81: 169-176.
- Siddiqui Z. S., Shahid H., Cho J. I., Park S. H., Ryu T.H., Park S. C. 2016. Physiological responses of two halophytic grass species under drought stress environment. *Acta Botanica Croatica* 75: 31-38.
- Snyder L. A., Hernandez A. R., Warmke H. E. 1955. The mechanism of apomixis in *Pennisetum ciliare*. *Botanical Gazette* 3: 209-221.
- Stabile S. D. S., Bodini A. P., Jank L., Rennó F. P., Santos M. V. D., Silva L. F. P. 2012. Expression of genes from the lignin synthesis pathway in guineagrass genotypes differing in cell-wall digestibility. *Grass and Forage Science* 67: 43-54.
- Tommasino E. 2018. Utilización del Estrés oxidativo y la defensa antioxidante para la caracterización e identificación temprana de genotipos de *Cenchrus Ciliaris* L. tolerantes al estrés abiótico. Tesis Doctoral. Edición de Autor.
- Tommasino E., Griffa S., Grunberg K., Ribotta A., Lopez Colomba E., Carloni E., Quiroga M., Luna C. 2012. Malondialdehyde content as a potential biochemical indicator of tolerant *Cenchrus ciliaris* L. genotypes under heat stress treatment. *Grass and Forage Science* 67: 456-459.
- Tommasino E., López Colomba E., Carrizo M., Grunberg K., Quiroga M., Carloni E., Griffa S., Ribotta A., Luna C. 2018. Individual and combined effects of drought and heat on antioxidant parameters and growth performance in Buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) genotypes. *South African Journal of Botany* 119: 104-111.
- Volaire F. 2018. A unified framework of plant adaptive strategies to drought: crossing scales and disciplines. *Global Change Biology* 24: 2929-2938.
- Volante J. N., Bianchi A. R., Paoli H. P., Noé Y. E., Elena H. J., Cabral C. M. 2005. Análisis de la dinámica del uso del suelo agrícola del Noroeste Argentino mediante teledetección y sistema de información geográfica. Período 2000-2005. Pro. Re. NOA. Ediciones INTA. Salta. Argentina, p. 1-64.
- Waszczak C., Carmody M., Kangasjärvi J. 2018. Reactive oxygen species in plant signaling. *Annual Review of Plant Biology* 69: 209-236.
- Xie X., He Z., Chen N., Tang Z., Wang Q., Cai Y. 2019. The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. *Hindawi Biomed Research International*
- You J., Chan Z. 2015. ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Frontier in Plant Science* 6: 1092.

## CAPÍTULO II

### EFFECTO DE TIEMPOS CORTOS Y PROLONGADOS DE ESTRÉS HÍDRICO Y RECUPERACIÓN EN *CENCHRUS CILIARIS*

#### INTRODUCCIÓN

En el contexto ambiental de campo, siempre hay un intervalo de ocurrencia de eventos de sequía y/o rehidratación y más aún, sus frecuencias se han incrementado frente a las actuales condiciones de cambio climático que se suscitan a nivel global (de la Casa y Ovando, 2014; Nasca *et al.*, 2015). La adaptabilidad a la sequía se define como la capacidad integral que incluye tanto la resistencia a la sequía como la recuperación para la adaptación al estrés por sequía y la rehidratación (Chen *et al.*, 2016). Al respecto, la recuperación rápida de las plantas dañadas y el retorno del crecimiento de nuevos tejidos después del estrés son de suma importancia en los pastos perennes (Bakhtiari *et al.*, 2019). Luego de la eliminación del estrés hídrico, la disponibilidad de incluso una pequeña cantidad de lluvia puede tener un efecto significativo en las funciones fisiológicas de la planta, que incluyen respuestas a nivel de planta entera, bioquímicas y moleculares (Vandegeer *et al.*, 2020). La optimización de las relaciones hídricas de las plantas en condiciones de baja disponibilidad de agua y la posterior recuperación de la funcionalidad luego de dicho estrés, son los indicadores fisiológicos clave que contribuyen a la sostenibilidad del rendimiento en los escenarios de estrés por sequía, seguidos de la disponibilidad de agua, comúnmente denominados como “estrés cíclico por sequía” (Chen *et al.*, 2016). Las plantas en sus hábitats naturales se adaptan al estrés hídrico a través de una variedad de mecanismos, que van desde respuestas transitorias a la baja humedad del suelo hasta importantes mecanismos de supervivencia de escape por floración temprana en ausencia de las lluvias estacionales. La resistencia al estrés hídrico

es un término amplio que se aplica a las especies de plantas con características adaptativas que les permite escapar, evitar o tolerar dicho estrés (Basu *et al.*, 2016).

La reducción del daño asociado al estrés hídrico en los sistemas fotosintéticos de las plantas es la base de una rápida recuperación luego de la rehidratación (Chen *et al.*, 2016). Por otro lado, el mantenimiento de un alto nivel de actividad enzimática antioxidante puede contribuir a la tolerancia a la sequía al aumentar la capacidad y mejorar los mecanismos de protección contra el daño oxidativo. Sin embargo, los cambios en la actividad enzimática antioxidante bajo estrés hídrico dependen de la especie de planta, el cultivo y la intensidad y duración del estrés (Bian and Jian, 2009). Al respecto, Abid *et al.*, (2018), observaron en cultivares de trigo, que el estrés hídrico causó una disminución reversible en las relaciones de agua de las hojas, estabilidad de membrana y actividad fotosintética, lo que llevó a una mayor generación de especies reactivas de oxígeno (EAO), peroxidación de lípidos y daño de membrana. Por otro lado, las plantas exhibieron un ajuste osmótico a través de la acumulación de azúcares solubles, prolina y aminoácidos libres y un aumento de las actividades antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. Después de volver a regar, el potencial hídrico de las hojas, la estabilidad de la membrana, los procesos fotosintéticos, la generación de EAO, las actividades antioxidantes, la peroxidación de lípidos y el potencial osmótico mostraron una completa recuperación en las plantas con estrés moderado, mientras que, las plantas con estrés severo no se recuperaron. Por otro lado, Fu y Huang, (2001), trabajando en forrajeras perennes como Kentucky bluegrass y Festuca, encontraron que la actividad de enzimas del sistema antioxidante fue diferencial bajo distintas intensidades de sequía, aumentaron bajo condiciones prolongadas de secado superficial del suelo, mientras que disminuyeron con el aumento del período de estrés bajo secado completo del suelo. Hui *et al.*, (2018), demostraron en *Panicum virgatum* que, si bien es un pasto tolerante a la sequía, cuando el estrés hídrico es severo, el crecimiento y la biomasa se reducen significativamente, y que las altas precipitaciones estimulan su fotosíntesis y crecimiento.

El aumento de ROS va acompañado de un aumento de la acumulación de lignina principalmente alrededor de los haces vasculares. En genotipos contrastantes de *Trifolium repens* L., Li *et al.*, (2013), estudiaron la tolerancia a la sequía y posterior recuperación asociada a la protección enzimática antioxidante y metabolismo de la lignina. Con

respecto a este último, la actividad de enzimas relacionadas con la lignificación, aumentaron simultáneamente con la duración del período de estrés hídrico, para luego disminuir hacia el final de este período y posterior recuperación. Sin embargo, falta aún profundizar sobre los mecanismos implicados en la relación entre la tolerancia a la sequía y recuperación con el metabolismo de la lignina en las plantas (Li *et al.*, 2013). Comprender cómo responden las plantas a los episodios de sequía y rehidratación y el mecanismo subyacente, es muy útil para implementar prácticas de manejo de la vegetación en el contexto de cambio climático (Xu, 2010).

Si bien existe alguna evidencia de adaptaciones morfofisiológicas de *C. ciliaris* en condiciones de estrés hídrico (Siddiqui *et al.*, 2016; Amari *et al.*, 2017; Mansoor *et al.*, 2019) como base para mejorar la producción y la calidad del forraje, no hay antecedentes de un estudio integral sobre las respuestas bioquímicas, fisiológicas, anatómicas y moleculares frente a condiciones de estrés hídrico y el proceso posterior de rehidratación, así como también, falta información sobre la relación entre la lignificación de tejidos y la tolerancia a dicho estrés.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Evaluar el efecto de tiempos cortos y prolongados de estrés hídrico y recuperación sobre aspectos anatómicos, morfo-fisiológicos y en la expresión génica de enzimas que participan en el proceso de lignificación en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* L.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material Vegetal**

En estos experimentos se utilizaron dos genotipos de *Cenchrus ciliaris* L., cuyos números de registro son 51 (RN51; cv. Originario de Dodoma, Tanganika, África) y 1 (RN1; una fuente sexual introducida de Texas, EE.UU.). En estudios previos del grupo de genotecnia del IFRGV-CIAP-INTA, estos materiales han presentado respuestas contrastantes a diferentes estreses abióticos, siendo RN51 el genotipo tolerante y RN1 el genotipo sensible (Lanza Castelli *et al.*, 2010; Tommasino *et al.*, 2012, 2018).

## **ENSAYO A TIEMPO CORTO DE ESTRÉS**

### **Condiciones generales de crecimiento y tratamientos**

El ensayo se realizó en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas: temperatura de  $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , fotoperíodo (16/8 h luz/oscuridad), humedad (60%) y densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PAR) ( $250\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ) (Fig. 2.1). Para todos los tratamientos, se sembraron 0,2 g de semillas de cada genotipo en macetas (cantidad equivalente a 250 semillas aproximadamente, con un 52% de poder germinativo, trilladas previamente garantizando la eliminación del involucro, el cual posee inhibidores, y garantizando un 100% de pureza). Las macetas (25 cm de diámetro  $\times$  15 cm de profundidad) contenían 3 kg de sustrato de arena y suelo (1:1) previamente secado en estufa a  $105\text{ °C}$  durante 48 h para eliminar el contenido de humedad. El contenido hídrico del suelo (CHS) se determinó por método gravimétrico. Previamente se determinaron las constantes hídricas del sustrato, para lo cual las macetas se regaron hasta la saturación y una vez que se completó el drenaje del agua, se registró el peso (3,87 kg). Este peso se consideró como capacidad de campo (CC), es decir la cantidad máxima de agua capaz de ser retenida por el sustrato, la cual representa el 100% del contenido de agua del suelo (CHS) y teniendo en cuenta el peso seco del sustrato (3 kg), se calculó el contenido de agua a CC (29%). Posteriormente se suspendió el riego de las macetas y

luego que las plantas mostraran síntomas de marchitez, se las colocó 24 horas en un ambiente saturado de humedad (cámara). Al no mostrar recuperación, se pesaron (3,14 kg) y teniendo en cuenta el peso seco del sustrato (3 kg), se determinó el contenido de agua al punto de marchitez permanente PMP (4,66%).

Se realizó un diseño completamente al azar con seis repeticiones (donde cada maceta se considera una unidad experimental) por genotipo y tratamiento en tres eventos independientes para garantizar la reproducibilidad de los experimentos.



**Fig. 2.1.** Imágenes del ensayo de estrés hídrico a tiempo corto en cámara de cría. A. Macetas con plantas de los genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51- Biloela y RN1- Sexual) en cámara de cría. B. Macetas con plantas de RN51- Biloela y RN1- Sexual bajo condiciones de control y de estrés hídrico, respectivamente.

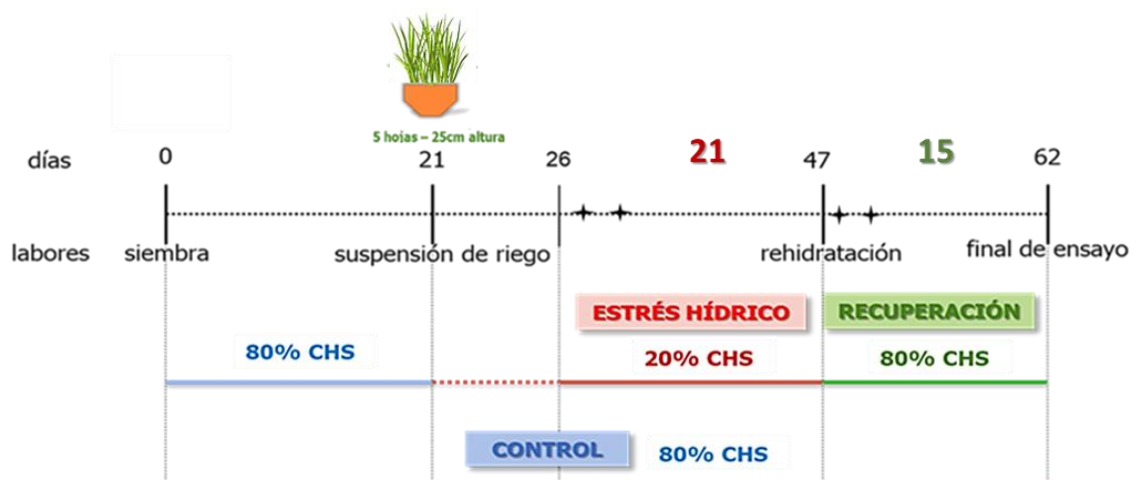
### *Tratamiento de estrés hídrico*

Los ensayos de estrés hídrico se aplicaron siguiendo el protocolo descrito por Tommasino *et al.*, (2018) con modificaciones menores. Luego de la siembra de las plantas, las macetas se regaron diariamente al 80% de CHS. Las plántulas emergieron después de 10 días de la siembra y se realizaron raleos sucesivos dejando 35 plántulas en cada maceta. Treinta días después de la siembra, cuando las plantas alcanzaron 20 cm de altura y al estadio de cinco hojas desplegadas, las macetas se dividieron en dos grupos uniformes: 1) plantas control: las plantas se regaron diariamente al 80% CHS durante

todo el período experimental y 2), plantas en tratamiento de estrés hídrico: se suspendió el riego de las macetas hasta alcanzar el 20% de CHS y se mantuvieron durante 20 días en esta condición. Con la finalidad de evaluar parámetros bioquímicos y moleculares, se tomaron cinco plantas de cada tratamiento, a las 24 y 72 h luego de haber alcanzado el 20% de CHS. Los parámetros fisiológicos, anatómicos y morfológicos, se evaluaron cumplidos los 21 días de estrés hídrico (Fig. 2.2).

### *Tratamiento de recuperación*

El tratamiento de recuperación se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Beloni *et al.*, (2017). Cumplidos los 20 días de estrés hídrico, la mitad de las macetas de plantas en tratamiento de estrés hídrico se volvieron a regar para llegar al 80% del CHS, condición hídrica que se mantuvo durante 15 días. A fin de evaluar parámetros bioquímicos y moleculares, se tomaron cinco plantas de cada tratamiento, control y recuperación, a las 24 y 72 h luego de haber iniciado el tratamiento de recuperación. Los parámetros fisiológicos, anatómicos y morfológicos, se evaluaron cumplidos los 15 días de recuperación (Fig. 2.2).



**Fig. 1.2.** Esquema representativo de los tiempos de muestreo correspondientes al ensayo a tiempo corto de estrés hídrico y la posterior recuperación.



## **ENSAYO A TIEMPO LARGO DE ESTRÉS HIDRICO**

### **Condiciones generales de crecimiento y tratamientos**

El ensayo se realizó en invernadero bajo condiciones controladas de: temperatura de  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo (16/8 h luz / oscuridad), humedad (60%) y densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PAR) ( $250\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ). Se sembraron 0,2 g de semillas de cada genotipo en almácigos (las propiedades físicas del lote de semillas fueron similares a las descritas en el ensayo anterior), y cuando las plantas alcanzaron los 15 cm de altura y un estadio de tres hojas desplegadas fueron trasplantadas.

Para todos los tratamientos, se trasplantaron tres plantas de cada genotipo en macetas (20 cm de diámetro  $\times$  30 cm de profundidad) que contenían 4 kg de sustrato de arena y suelo (1:1) previamente secado en estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 h para eliminar el contenido de humedad (Fig. 2.3). El contenido hídrico del suelo (CHS) se determinó por método gravimétrico. Después del trasplante, las macetas se regaron hasta saturación y una vez que se completó el drenaje del agua, se registró el peso. Este peso se consideró como capacidad de campo (CC), es decir la cantidad máxima de agua capaz de ser retenida por el sustrato, la cual representa el 100% del contenido de agua del suelo (CHS).

Se realizó un diseño completamente al azar con diez repeticiones (donde cada maceta fue considerada como unidad experimental) por genotipo y tratamiento en dos eventos independientes para garantizar la reproducibilidad de los experimentos.



**Fig. 2.2.** Imágenes del ensayo de estrés hídrico a tiempo largo en invernadero. A. Almacigos con plantas de los genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) en invernadero. B. Macetas en condiciones control (izquierda) y en condiciones de estrés hídrico (derecha).

### *Tratamiento de estrés hídrico*

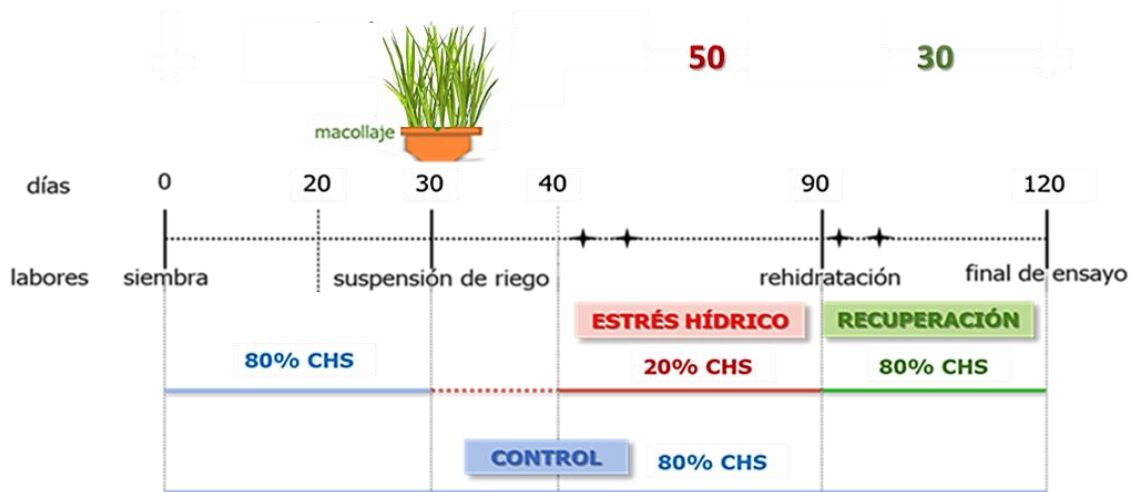
Luego de la siembra de los almacigos, los mismos se regaron diariamente al 80% del CHS. Las plántulas emergieron 10 días después. A los treinta días de la siembra, cuando las plantas alcanzaron 15 cm de altura (altura medida con hoja extendida) y un estadio de tres hojas desplegadas, se realizó el trasplante de tres plantas por maceta las cuales se dividieron en dos grupos uniformes: 1) plantas control: las plantas se regaron diariamente al 80% del CHS durante todo el período experimental y 2), plantas en tratamiento de estrés hídrico: en este tratamiento se suspendió el riego de las macetas hasta alcanzar el 20% del CHS y se mantuvieron durante 50 días en esta condición.

Con la finalidad de evaluar parámetros bioquímicos, fisiológicos y moleculares, se tomaron muestras de plantas de cada tratamiento, control y estrés hídrico, a las 24 y 72 h luego de haber alcanzado el 20% de CHS. Los parámetros fisiológicos, anatómicos y morfológicos se evaluaron a los 50 días después de haber alcanzado el 20% de CHS (Fig. 2.4).

### Tratamiento de recuperación

El tratamiento de recuperación se realizó siguiendo el protocolo descrito por Beloni *et al.*, (2017) con pequeñas modificaciones: las macetas con plantas en tratamiento de estrés hídrico se regaron al 80% de CHS durante un total de 30 días para el tratamiento de recuperación.

A fin de evaluar parámetros bioquímicos y moleculares, se tomaron muestras de plantas de cada tratamiento, control y recuperación, a las 24 y 72 h luego de haber alcanzado la condición de recuperación. Los parámetros morfológicos, fisiológicos y anatómicos se evaluaron cumplidos los 30 días de recuperación (Fig. 2.4).



**Fig. 2.4.** Esquema representativo de los tiempos de muestreo correspondientes al ensayo a tiempo largo de estrés hídrico y la posterior recuperación.

### Evaluación de parámetros fisiológicos

#### *Determinación del Contenido Relativo de Agua*

Contenido Relativo de Agua (CRA): se determinó siguiendo el modelo de Barr y Weatherley, (1962), con algunas modificaciones. Para ello, la tercera y cuarta hoja de dos plantas por maceta se cortaron en fragmentos de 7 cm de largo, estableciéndose el peso fresco (PF). Luego, los fragmentos se sumergieron en agua destilada durante 24 horas y se registró el peso de turgencia (PT). Finalmente, las muestras se secaron a 60 °C en

estufa de aire forzado hasta alcanzar peso seco constante (PS). El CRA fue estimado mediante la ecuación propuesta por Turner (1986):  $CRA = [(PF - PS) / (PT - PS)] * 100$ .

### *Evapotranspiración*

El agua perdida por evapotranspiración (ET) se calculó como la cantidad de agua (g/día) necesaria de ser repuesta para el mantenimiento diario del contenido de agua del suelo de las macetas teniendo en cuenta cada tratamiento (80% y 20% CHS). Para lo cual, antes y después de los riegos, se pesaron las macetas para determinar la tasa de ET promedio diaria (Lo Bianco *et al.*, 2017).

### *Fluorescencia de la clorofila y parámetros JIP test*

Las mediciones de los parámetros de fluorescencia de la clorofila *a* se tomaron utilizando un fluorómetro portátil Pocket PEA (Analizador de eficiencia de plantas, Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn), entre las 10:00 y las 14:00 h.

Antes de la medición, las hojas se adaptaron completamente a la oscuridad durante 30 minutos para lograr la oxidación completa de los transportadores de electrones primarios (F0). Luego, se procedió a medir cinco plantas por genotipo, tratamiento y repetición. La inducción de la fluorescencia de la clorofila fue provocada por un pulso de luz roja de 3 s (longitud de onda máxima de 637 nm) emitido por una lámpara LED filtrada por un filtro NIR. Este pulso se emitió con una irradiancia de saturación máxima de  $3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Es posible diferenciar elementos individuales durante el aumento de fluorescencia. Los picos de la cinética de la curva de inducción se indican con las letras O, J, I, P; donde O es la fluorescencia mínima (F<sub>o</sub>), P es la fluorescencia máxima (F<sub>m</sub>) y J e I son puntos de inflexión intermedios (Strasser *et al.*, 2004). A partir de estos dos valores absolutos, el parámetro F<sub>v</sub> (fluorescencia variable) puede calcularse como la diferencia entre dichos puntos y el valor de F<sub>m</sub> puede observarse como función del parámetro F<sub>v</sub> para establecer el parámetro F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> (eficiencia cuántica máxima; Maxwell y Johnson, 2000; Ploschuk *et*

*al.*, 2014; Rasouli y Kiani-Pouya, 2015). Para obtener más detalles sobre los términos utilizados por la prueba JIP, se presenta la tabla complementaria en la sección Anexo.

## **Evaluación de parámetros bioquímicos**

### *Determinación del contenido de malondialdehído (MDA)*

La peroxidación de lípidos de membrana en hojas se estableció a través de la medición del contenido de MDA, según lo descrito por Heath y Packer, (1968), con modificaciones menores para *C. ciliaris* (Tommasino *et al.*, 2018). Alrededor de 100 mg del material congelado en nitrógeno líquido se molió en 1,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 0,1% seguido de centrifugación a 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Una alícuota de 0,5 ml del sobrenadante se mezcló con 0,5 ml de TCA al 20% que contenía ácido tiobarbitúrico al 0,5% (TBA) y se incubó durante 20 min a 90 ° C. Después de eso, la mezcla resultante se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C. La absorbancia del sobrenadante se midió a 532 nm. Las mediciones se corrigieron por turbidez inespecífica restando la absorbancia a 600 nm. Cada muestra tenía un control sin TBA (Hodges *et al.*, 1999). El contenido de MDA se calculó usando un coeficiente de extinción de 155 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Los resultados se expresaron como nmol MDA por g de peso fresco.

### *Poder reductor total mediante la medición de la capacidad reductora férrica del ensayo de plasma (FRAP)*

Este parámetro se midió utilizando el método descrito por Benzie y Strain, (1996), con modificaciones propuestas para *C. ciliaris* (Tommasino *et al.*, 2018). Dicha técnica permite determinar el poder reductor total a través de la medición de la reducción de ión férrico a la forma ferrosa en presencia de componentes antioxidantes. El reactivo FRAP consistió en 525 ml de buffer de acetato (300 mmol/L pH 3.6), 50 ml de 2,4,6-Tris (2-piridil) -s-triazina (10 mmol/L) y 25 ml de FeCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O (200 mmol/L). Aproximadamente

100 mg del material congelado en nitrógeno líquido se molieron en 1 ml de alcohol etílico al 95% seguido de centrifugación a 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se mezcló una alícuota de 30 µl del sobrenadante con 270 µl de reactivo FRAP y luego de 40 min se registró la densidad óptica a 600 nm. Los resultados se expresaron como µmol Fe (II)/g por g de peso fresco.

#### *Determinación de actividades enzimáticas*

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se estimó de acuerdo con el método descrito por Beauchamp y Fridovich, (1973), que se basa en la capacidad de esta enzima para inhibir la reducción del nitro blue tetrazolio (NBT). Las muestras se procesaron siguiendo el protocolo descrito por Tommasino *et al.*, (2018). La mezcla de reacción (1 ml) consistió en 30 µl de extracto enzimático y buffer fosfato (50 mM, pH 7,4) que incluyó metionina 13 mM, NBT 75 µM y EDTA 1 µM. La reacción comenzó al agregar 4 µM de riboflavina a la mezcla y colocándola debajo de lámparas UV durante 9min. Una mezcla de reacción completa sin extracto enzimático, que dio el color máximo, sirvió como control de la reacción. La reacción se detuvo manteniendo los tubos en una habitación oscura. La absorbancia de la mezcla de reacción se registró a 560 nm, y una unidad de actividad enzimática se consideró como la cantidad de enzima que reduce la densidad óptica al 50% del control (falta la mezcla de reacción enzima). La actividad enzimática específica se expresó como unidades SOD (USOD) por mg de proteína. El contenido de proteínas en los extractos enzimáticos se cuantificó de acuerdo con el método de Bradford, (1976).

La actividad de la enzima catalasa (CAT) se midió a través del consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm (Aebi, 1984). Las muestras se procesaron siguiendo el protocolo descrito por Tommasino *et al.*, (2018). El procedimiento consistió en moler 100 mg de muestras de hojas congeladas en nitrógeno líquido para obtener un polvo fino y se homogeneizaron en 1,5 ml de buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 7,4), que contiene Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y 1% (25 mg) polivinilpolipirrolidona (PVPP). Esto fue seguido por centrifugación a 12.000 rpm a 4 ° C durante 30 min. Luego, el sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de proteínas y la actividad enzimática antioxidante. Una unidad de actividad de CAT se definió como la cantidad de enzima requerida para catalizar la conversión de 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua por minuto. Los

resultados se expresaron como  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  extinto por minuto por  $\text{mg}$  de proteína. El contenido de proteínas en los extractos de enzimas se determinó según el método descrito por Bradford, (1976).

Con la finalidad de medir la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (APX), se maceraron muestras de hojas congeladas (0.1 g) en nitrógeno líquido. Posteriormente, se agregó medio de extracción que contenía  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM (pH 7.4), EDTA 1 mM, polivinilpirrolidona al 5% (PVPP) y ascorbato (AsA) 1 mM (Mizuno *et al.*, 1998). La actividad APX se analizó después de la reacción del extracto en presencia de buffer de fosfato de potasio 50 mM (pH 7,4) y AsA 0,5 mM. La reacción se inició mediante la adición de 0,1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 mM, y la absorbancia decreciente a 290 nm se controló durante 30 s (Nakano y Asada, 1981). La actividad APX se estimó considerando el coeficiente de extinción molar del ascorbato ( $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y los valores obtenidos se expresaron en  $\mu\text{mol}$  AsA por minuto por  $\text{mg}$  de proteína (Silva *et al.*, 2010).

## **Evaluación de parámetros moleculares**

### *Expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de lignina*

Los cebadores utilizados se diseñaron con el software Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) y AmplifiX (v.1.7.0 (<http://crn2m.univ-mrs.fr/pub/amplifix>)) sobre las secuencias de ARNm depositadas en GenBank para *Setaria italica* (Tabla 1). Los códigos de los genes analizados para las enzimas involucradas en la biosíntesis de monolignoles fueron: 4-cumarato CoA ligasa (4CL) (GenBank: XM\_004985609.2), cinamoil CoA reductasa (CCR) (GenBank: XM\_004983487.3), cafeoil-CoA O-metiltransferasa (CCoAOMT) (GenBank: XM\_004957087.2), cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) (GenBank: XM\_004976726.1), fenilalanina amonio liasa (PAL) (GenBank: XM\_004953099.2) y O-metiltransferasa del ácido cafeico (COMT) (GenBank: XM\_004972743.3). Se utilizaron

tres réplicas biológicas para cada combinación de tratamiento\*genotipo con cada par de cebadores. Todos los cebadores utilizados (Tabla 1) se ordenaron a Ruralex (Buenos Aires, Argentina). Los tamaños de los productos amplificados se confirmaron mediante electroforesis en gel de agarosa y después de su purificación se secuenciaron para confirmar las secuencias reales.

#### *Aislamiento de ARN y PCR en tiempo real (qPCR)*

El ARN se extrajo de tejidos foliares cosechados a las 24 y 72 h después del tratamiento de estrés hídrico. Las hojas muestreadas se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido tras la recolección y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Se aisló ARN total de alta calidad a partir de 100 mg de tejido congelado usando el reactivo TRIzol™, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina). El ADN genómico se eliminó después del tratamiento con DNasa I durante 30 minutos a temperatura ambiente usando DNasa I (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina). La concentración de ARN se midió usando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, EE. UU.). La calidad del ARN aislado se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm, y su integridad se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (w/v). La primera cadena del ADN complementario (cADN) se sintetizó usando *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) transcriptasa reversa (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En un volumen de reacción total de 25 µL, se cebaron 2 µg de ARN libre de DNasa total con 1 µg d (T) 20 (Ruralex). Para realizar la técnica de qPCR, las reacciones se llevaron a cabo en una mezcla de reacción de 15 µL que contenía 250 nM de cada cebador, 1 µL de muestra de ADNc y 2X iQ SYBR Green Supermix (BioRad). Se incorporaron controles en cada una de las amplificaciones. Las reacciones qPCR se realizaron utilizando un termociclador iQ5 (BioRad). El perfil térmico se ajustó a 95 °C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 30 s, 61 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s. La especificidad del amplicón se verificó mediante análisis de curva de fusión (55 a 95 °C) después de 40 ciclos de PCR.

El ensayo qPCR se realizó utilizando tres réplicas biológicas para cada tratamiento y dos réplicas técnicas para cada réplica biológica. Se seleccionaron como genes de referencia, el factor de elongación 1 alfa (EF1 $\alpha$ ) y el factor de iniciación eucariota 4A



(EIF4 $\alpha$ ) previamente caracterizados en *C. ciliaris* (Simon *et al.*, 2013) por su mayor expresión y estabilidad en tejidos. Las eficiencias de amplificación se determinaron para cada gen siguiendo las recomendaciones de Svec *et al.*, (2015). Los valores de eficiencia estuvieron entre 90 y 100% para todos los cebadores, con excepción de PAL, CAD y 4CL. Los perfiles de expresión de estos genes se estimaron en relación a los genes de referencia utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2020) siguiendo las recomendaciones de Pfaffl *et al.*, (2002). Los datos muestran el aumento o disminución relativa del nivel de expresión génica en cada muestra tratada en comparación con los niveles de expresión génica en la muestra control.

### **Observaciones Anatómicas**

El protocolo de corte y tinción se realizó siguiendo las recomendaciones de Carloni *et al.*, (2014). Se fijaron segmentos de 2 cm desde la base de la tercera hoja completamente expandida en una mezcla de etanol: agua: formaldehído: ácido acético glacial (FAA, 5: 3.5: 1: 0.5) durante 48 h. Posteriormente, se colocaron en etanol al 70% (v/v) hasta su procesamiento. Las muestras se deshidrataron en una serie de diluciones de etanol (70%, 96%, 100% v/v) y los cortes de las hojas se incluyeron en parafina utilizando la técnica convencional de D'Ambrogio de Argüesio (1986). Las secciones (10  $\mu$ m) obtenidas con un micrótopo rotativo (Accu-Cut® modelo SRM 200 CW) se tiñeron con Safranina y Fast Green (al 1% y 0,1%, respectivamente), un método de tinción simple y diferencial para identificar tejidos lignificados y no lignificados. Las secciones lignificadas (teñidas de rojo) y los tejidos celulósicos (teñidos de verde) se observaron utilizando un microscopio óptico (Jia *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016).

Las imágenes con aumentos de x10 y x40 se analizaron utilizando ImageJ (Procesamiento y análisis de imágenes en Java) (Arias *et al.*, 2018). Las mediciones se realizaron en seis réplicas biológicas (seis secciones transversales por muestra), para lo cual se tuvieron en cuenta los dos haces vasculares hacia ambos lados del haz central, tal como se describe en Arias *et al.*, (2018). Se midieron las variables: espesor y área total

transversal de la hoja, espesor de la epidermis, área del tejido vascular, área esclerenquimática y parenquimática y el área de células buliformes. A partir de las áreas de parénquima (P) y esclerénquima (S), se calculó la relación P:S.

### **Evaluación de parámetros morfológicos**

La evaluación de los parámetros morfológicos se realizó en cinco plantas (sin parte radical) seleccionadas al azar por cada tratamiento y genotipo finalizado el tiempo de estrés hídrico y el de recuperación (54 y 69 días desde la siembra, respectivamente). En dichas plantas se midieron los siguientes caracteres: altura de planta (a hoja extendida), peso fresco y seco aéreo (A, PFA y PSA, respectivamente). Las plantas se secaron luego en una estufa de aire forzado a 60 °C hasta obtener un peso seco constante (72h).

Los valores porcentuales que se muestran en los resultados representan el aumento o la disminución del valor promedio del tratamiento de estrés en comparación con el valor promedio del tratamiento control. Los mismos se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

Valor (%) =  $[(X_s * 100 / X_c)] - 100$ . Donde,  $X_s$  y  $X_c$  son los valores medios para cada genotipo obtenido de los tratamientos de estrés y control, respectivamente.

### **Análisis Estadístico**

Para las comparaciones entre medias en las variables CRA, evapotranspiración, PSII, análisis molecular, parámetros anatómicos y morfológicos, se utilizaron modelos lineales, mixtos y generales y se aplicó ANAVA para un modelo bifactorial con interacción entre los factores genotipo y contenido hídrico en un diseño completamente aleatorizado. Para MDA, FRAP y las enzimas (CAT, SOD y APX), se aplicaron interacciones de dos y tres

vías (genotipo x contenido hídrico x tiempo de medición). Se realizó como *test a posteriori*, la prueba de Fisher al 5% de nivel de significancia ( $P \leq 0,05$ ) utilizando el paquete estadístico InfoStat (InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com>. Arkansas). El error estándar se representó en todas las figuras.

En todos los parámetros medidos donde se observaron diferencias significativas para la doble interacción, los cambios (en términos de valor porcentual), entre las plantas en condiciones de estrés hídrico y las plantas de control correspondientes, se calcularon utilizando la siguiente fórmula: Cambio porcentual (%) =  $[(X_c - X_s) / X_c] \times 100$ . Donde,  $X_c$  y  $X_s$  denotan plantas de control y estresadas por estrés hídrico.

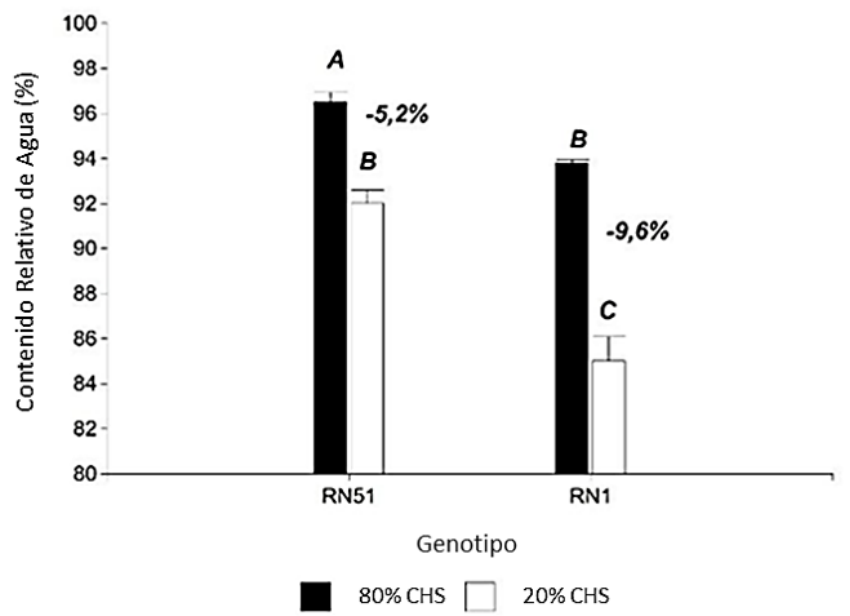
## **RESULTADOS**

### **ENSAYO A TIEMPO CORTO DE ESTRÉS HIDRICO**

#### **Evaluación de Parámetros Fisiológicos**

##### *Contenido Relativo de Agua*

Al cabo de 21 días de exposición a estrés hídrico, el CRA manifestó diferencias significativas ( $P \leq 0,0021$ ) para la doble interacción genotipo x tratamiento. En el tratamiento control, el genotipo RN51 mostró el valor más alto (96,5%) seguido de RN1 (93,8%) (Fig. 2.5); en concordancia, bajo estrés hídrico, RN1 fue el genotipo que registró el valor más bajo de CRA (85%) seguido de RN51 (92%). Si bien ambos genotipos se diferenciaron significativamente de sus respectivos controles, esta diferencia fue menor en el genotipo tolerante.

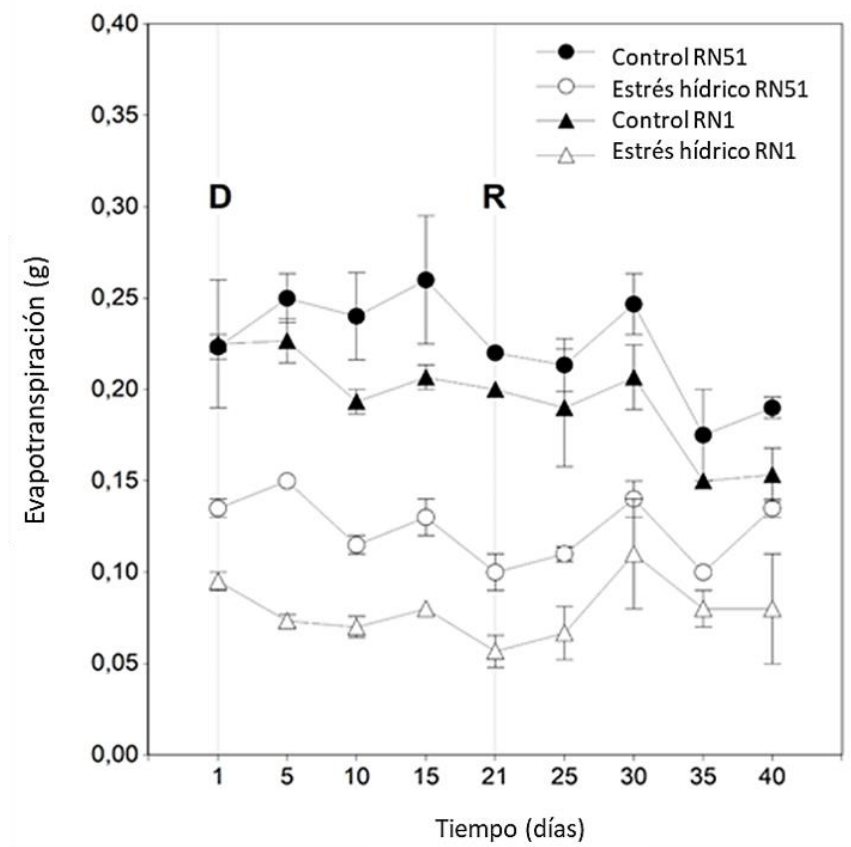


**Fig. 2.3.** Contenido relativo de agua en genotipos contrastantes de *C. ciliaris* (RN51 y RN1) para dos contenidos hídricos del suelo (80% y 20% CHS) al cabo de 21 días de exposición a estrés hídrico. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Las barras de error indican error estándar. Los valores porcentuales en negrita representan la disminución en el valor promedio del tratamiento con respecto al valor promedio del control.

### *Evapotranspiración*

Este parámetro, medido como el agua perdida por evapotranspiración (g/día), no mostró diferencias significativas en la doble interacción ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre genotipos y entre contenido hídrico ( $P \leq 0,0001$ ). RN51 siempre tuvo mayor ET, independientemente del contenido hídrico. El valor promedio durante los 21 días de tratamiento registrado en el genotipo RN51 fue de 0,18 g, mientras que para el genotipo RN1 fue de 0,14 g. Por otro lado, la falta de agua redujo la ET a más de la mitad. El valor promedio para las condiciones de control y estrés hídrico fue de 0,22 g y 0,10 g, respectivamente. Como se muestra en la Figura 2.6, el día 21 denota el final del tratamiento de sequía y el comienzo del tratamiento de recuperación. Si bien, la misma tendencia mencionada anteriormente para el ensayo de

estrés hídrico se observó en el tratamiento de recuperación, exhibiendo diferencias significativas entre genotipos y contenido hídrico ( $P \leq 0,0001$ ), esta mostró una caída importante, luego de un pequeño pico. Al final de este período, el valor promedio más alto se registró en el genotipo RN51 (0,16 g) mientras que el valor promedio más bajo se encontró en el genotipo RN1 (0,13 g). Con respecto al contenido hídrico, el valor promedio para control y estrés hídrico fue de 0,19 g y 0,10 g, respectivamente.



**Fig. 2.6.** Evapotranspiración como agua suministrada ( $\text{g día}^{-1}$ ) en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) durante condiciones de estrés hídrico y recuperación. Las líneas muestran el inicio de las condiciones de estrés hídrico (D) y recuperación (R). Las barras de error indican error estándar.

### Fluorescencia de la Clorofila

En relación a la variable  $F_v/F_m$ , no se observaron diferencias significativas en la interacción doble genotipo x contenido hídrico. Sin embargo, se observaron diferencias

significativas entre tratamientos ( $P \leq 0,05$ ). El valor registrado en el tratamiento control (0,78) fue significativamente mayor que el registrado en condiciones de estrés hídrico (0,76). Asimismo, se observó un aumento significativo ( $P \leq 0,05$ ) del tiempo para alcanzar  $F_m$  (t para  $F_m$ ) en ambos genotipos bajo estrés por sequía, con respecto a sus respectivas plantas control, y este aumento fue significativamente mayor en RN1 (230%) que en RN51 (92%). El área de la curva OJIP (área) y el índice de desempeño total (PI total) disminuyeron significativamente ( $P \leq 0,05$ ) cuando se impuso estrés hídrico en comparación con el tratamiento control, pero sin diferencias entre genotipos. En cuanto a los flujos de energía específicos (por centro de reacción), la absorción (ABS<sub>o</sub>/RC) y la captura/secuestro (TR<sub>o</sub>/RC) de energía se incrementaron considerablemente en RN1 (31,6% y 26,6%, respectivamente) bajo el tratamiento de estrés hídrico en comparación con las condiciones de control, mientras que en RN51, los incrementos fueron menores (10,5% y 26,6%, respectivamente). Se observó la misma tendencia para la disipación de energía luminosa como calor latente (representado por DI<sub>o</sub>/RC). Las plantas de RN1 en condiciones de estrés hídrico aumentaron la disipación de energía lumínica en un 36% en comparación con las plantas de control, mientras que RN51 solo aumentó un 12,5%.

**Tabla 2.1** Parámetros de fluorescencia medidos en dos genotipos de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) bajo condiciones control y estrés hídrico a los 21 días de iniciado el estrés. Los valores representan las medias  $\pm$  SE.

Parámetros de fluorescencia	Control				Estrés hídrico			
	RN51		RN1		RN51		RN1	
t for Fm (**)	185,29 $\pm$ 39,11	c	193 $\pm$ 50,99	c	355 $\pm$ 46,75	b	636 $\pm$ 4,72	a
Area (*)	269124,35 $\pm$ 10632,6	A	238860,8 $\pm$ 13863,2	A	171642,33 $\pm$ 12655,3	B	139995,3 $\pm$ 12158,80	B
Fo (**)	4523,94 $\pm$ 152,1	a	4557,3 $\pm$ 198,3	a	4398,25 $\pm$ 180,9	a	3131,77 $\pm$ 173,89	b
Fm (**)	20713,24 $\pm$ 692,87	a	20508,1 $\pm$ 903,39	a	19345,1 $\pm$ 824,7	a	13179,23 $\pm$ 792,33	b
Fv (**)	16189,29 $\pm$ 547,70	a	15950,8 $\pm$ 714,11	a	14946,8 $\pm$ 651,9	a	10047,5 $\pm$ 626,31	b
Fv/Fm (*)	0,78 $\pm$ 0,01	A	0,78 $\pm$ 0,02	A	0,77 $\pm$ 0,03	B	0,76 $\pm$ 0,03	B
ABS/RC (**)	19,39 $\pm$ 0,47	c	19,68 $\pm$ 0,61	bc	20,95 $\pm$ 0,61	b	24,59 $\pm$ 0,54	a
DIo/RC (**)	0,42 $\pm$ 0,02	c	0,44 $\pm$ 0,02	bc	0,48 $\pm$ 0,02	b	0,6 $\pm$ 0,02	a
TRo/RC (**)	15,15 $\pm$ 0,3	c	15,31 $\pm$ 0,4	c	16,14 $\pm$ 0,4	b	19 $\pm$ 0,4	a
ETo/RC (*)	1 $\pm$ 0,02	A	0,97 $\pm$ 0,03	A	0,87 $\pm$ 0,03	B	0,78 $\pm$ 0,03	B
PI total (**)	16,53 $\pm$ 0,92	a	7,53 $\pm$ 1,85	b	0,99 $\pm$ 0,7	c	0,19 $\pm$ 0,03	c

Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para la doble interacción (\*\*) y letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0,05$ ) (\*) para variables donde la doble interacción no fue significativa ( $P > 0,05$ ).

## Evaluación de parámetros bioquímicos

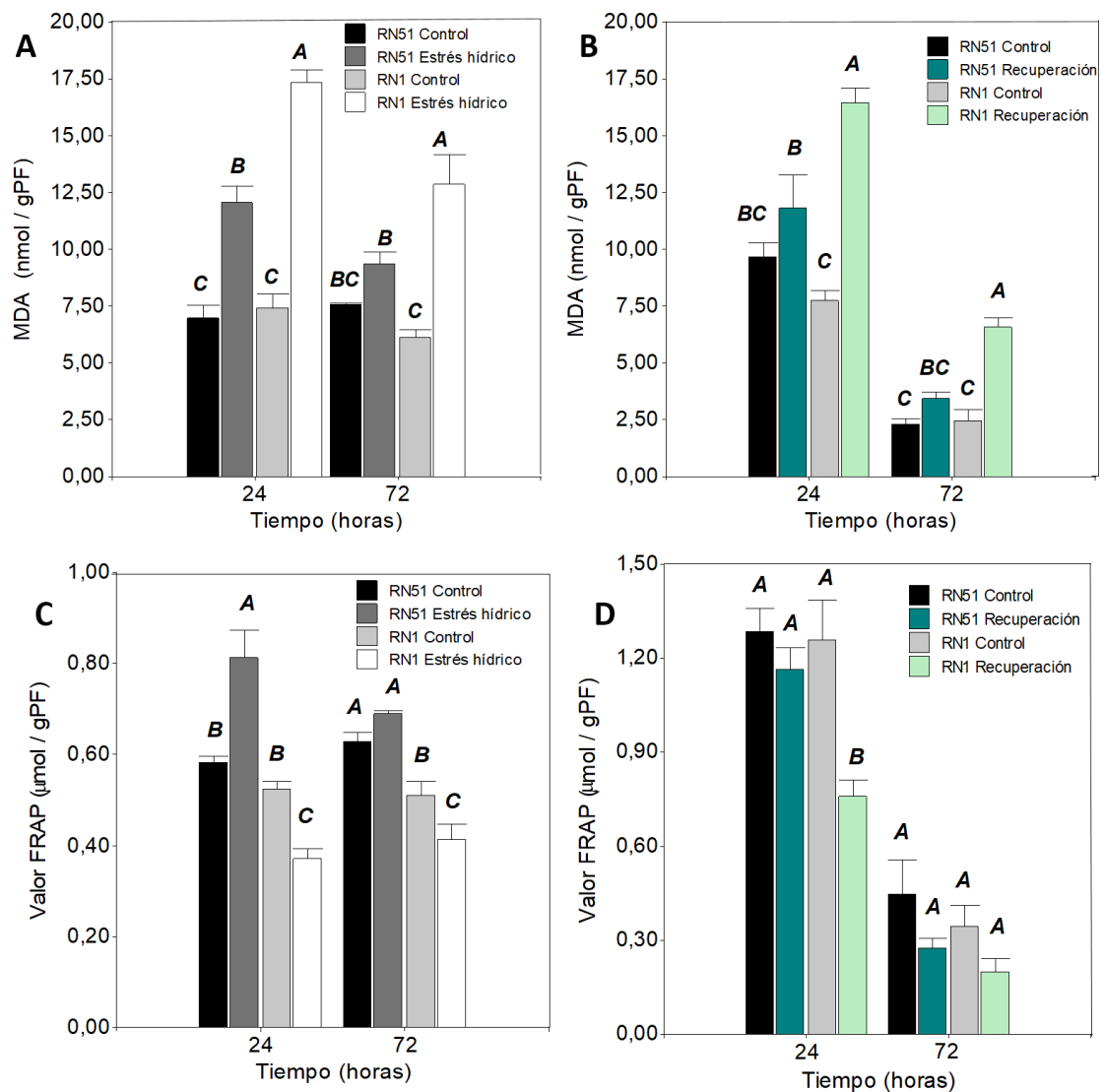
### Contenido en Malondialdehído (MDA)

En condiciones de estrés hídrico, no se observaron diferencias significativas en la triple interacción (genotipo x tratamiento x tiempo de muestreo). Sin embargo, para la doble interacción (genotipo x tratamiento) se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en ambos tiempos de muestreo. A las 24 horas, en condiciones de estrés hídrico, se

registraron los valores más altos. RN1 mostró un aumento del 133% en el contenido de MDA en comparación con su control (17,36 nmol g<sup>-1</sup> FW y 7,43 nmol g<sup>-1</sup> FW, respectivamente), seguido del genotipo RN51 con un aumento significativamente menor (84%) entre el tratamiento de estrés hídrico y el control (12,85 nmol g<sup>-1</sup> FW y 6,97 nmol g<sup>-1</sup> FW, respectivamente; figura 2.7A). En cuanto a las 72 horas de tiempo de muestreo, el genotipo RN1 en el tratamiento de sequía mostró el valor más alto (12,85 nmol g<sup>-1</sup> FW), lo que representó un incremento del 110,65% respecto a su control. Por el contrario, el genotipo RN51 mostró sólo un aumento del 23,5% en el valor de MDA entre las condiciones de estrés hídrico y control (9,37 y 7,59 nmol g<sup>-1</sup> FW respectivamente). El último resultado permite evidenciar que el genotipo RN51 tuvo menor daño oxidativo que el RN1 (Fig. 2.7A).

Luego de la rehidratación durante el tratamiento de recuperación, no se observaron diferencias significativas en la triple interacción (genotipo x tratamiento x tiempo de muestreo) (Fig. 2.7B). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) para la interacción entre genotipos y tratamientos, en ambos tiempos de muestreo. El contenido de MDA disminuyó en las plantas recuperadas de ambos genotipos, pero aún mantuvieron diferencias con sus respectivos controles. Sin embargo, la recuperación del genotipo RN51 (3,4 nmol g<sup>-1</sup> PF) fue mayor, el cual alcanzó un valor próximo a su control (2,3 nmol g<sup>-1</sup> PF), mientras que las plantas recuperadas del genotipo RN1 (6,6 nmol g<sup>-1</sup> PF) mantuvieron una alta diferencia del 127% con respecto a su control (2,7 nmol g<sup>-1</sup> PF).





**Fig. 2.7.** Contenido de malondialdehído (MDA) y poder reductor total cuantificado mediante el ensayo FRAP en genotipos contrastantes de *Cnchrus ciliaris* (RN51 y RN1) en condiciones de estrés hídrico (A, C) y de recuperación (B, D) a las 24 y 72 horas de muestreo. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en cada momento. Las barras de error indican error estándar.

*Poder reductor total mediante la capacidad reductora férrica del ensayo de plasma (FRAP)/ actividad antioxidante total*

Durante el tratamiento de estrés hídrico, no se registró ningún efecto significativo para la triple interacción (genotipo x tratamiento x tiempo de muestreo). Como se muestra en la Fig. 2.7C, se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para la doble interacción (genotipo x tratamiento) en ambos tiempos de muestreo. A las 24 horas en que los dos

genotipos de *C. ciliaris* fueron expuestos al tratamiento de estrés hídrico, el genotipo RN51 aumentó significativamente en un 40% la actividad antioxidante total (de 0.58 a 0,81  $\mu\text{mol g}^{-1}$  FW), mientras que RN1 redujo en un 30% dicha actividad en comparación con su control (de 0,53 a 0,37  $\mu\text{mol g}^{-1}$  FW). A las 72 horas de muestreo, RN51 presentó el mayor valor de FRAP (0,69  $\mu\text{mol g}^{-1}$  FW) sin diferencias respecto a su control (0,63  $\mu\text{mol g}^{-1}$  FW), mientras que RN1 (0,41  $\mu\text{mol g}^{-1}$  FW) mostró un valor 24% menor que su control (0,51  $\mu\text{mol g}^{-1}$  FW).

Durante el tratamiento de recuperación, no se encontraron diferencias significativas para la triple interacción, mientras que se observaron diferencias significativas entre genotipos, tratamientos y tiempo de muestreo ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 2.7D). RN51 mostró valores superiores a RN1, con una media de 0,85  $\mu\text{mol g}^{-1}$  PF y 0,69  $\mu\text{mol g}^{-1}$  PF, respectivamente. Por su parte, las plantas control y las plantas recuperadas mostraron un valor promedio de 0.88  $\mu\text{mol g}^{-1}$  PF y 0.61  $\mu\text{mol g}^{-1}$  PF, respectivamente. En cuanto al tiempo de muestreo, el valor de FRAP registrado a las 24 h fue de 1,13 y de 0,33  $\mu\text{mol g}^{-1}$  PF a las 72 h de tiempo de muestreo.

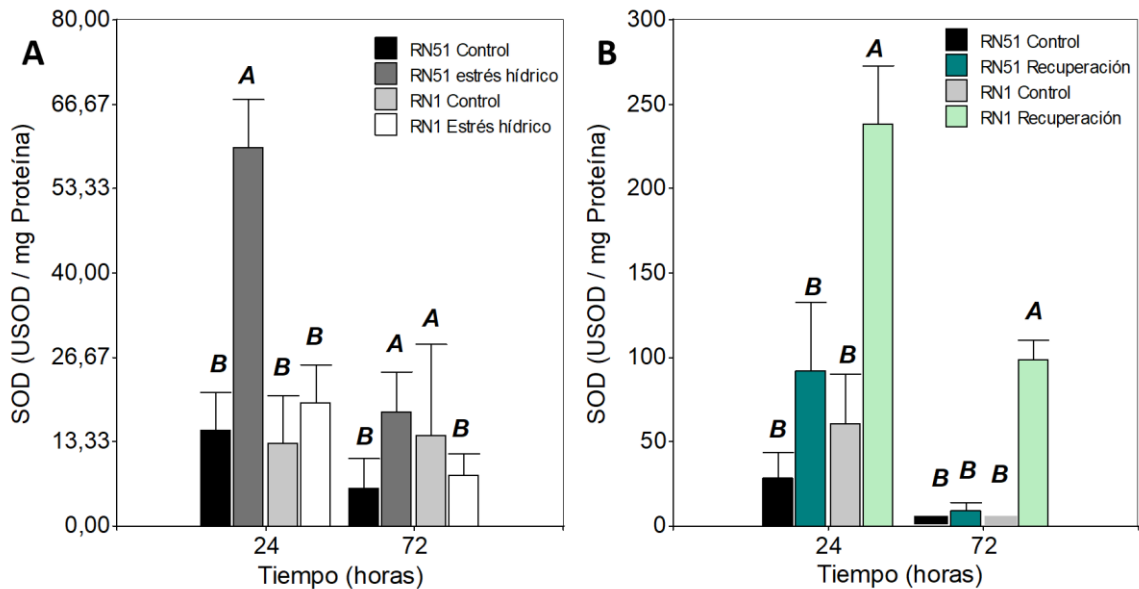
#### *Actividad enzimática antioxidante*

##### *Actividad Superóxido Dismutasa (SOD)*

Durante el tratamiento de estrés hídrico (Fig. 2.8A), no hubo diferencias significativas en la triple interacción (genotipo x tratamiento x tiempo de muestreo;  $P > 0,05$ ). La actividad SOD mostró efecto significativo de la doble interacción genotipo x contenido hídrico ( $P \leq 0,0001$ ) solo en el tiempo de muestreo de 24 horas. En este momento, el nivel más alto de SOD se registró en el genotipo RN51 en condiciones de estrés hídrico con un valor promedio de 59,79 USOD  $\text{mg}^{-1}$  de proteína, que fue un 295% más alto que su control. Por el contrario, aunque RN1 mostró un ligero aumento respecto a su control, el mismo no fue significativo.

Durante el tratamiento de recuperación, (Fig. 2.8B), se observaron diferencias significativas para la doble interacción genotipo x contenido hídrico ( $P \leq 0,05$ ). El

genotipo RN1 mostró la mayor actividad de SOD en plantas recuperadas con un valor promedio de 238.58 USOD mg<sup>-1</sup> proteína después de 24 horas, un 298% mayor que su control. La misma tendencia se observó a las 72 horas de muestreo. Por su parte, RN51 no mostró efecto significativo de la exposición a estrés hídrico para esta variable ni a las 24, ni a las 72 horas.



**Fig. 2.8.** Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) evaluada a las 24 y 72 h en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) expuestos a condiciones de estrés hídrico (A) y recuperación (B). Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en cada momento. Las barras de error indican error estándar.

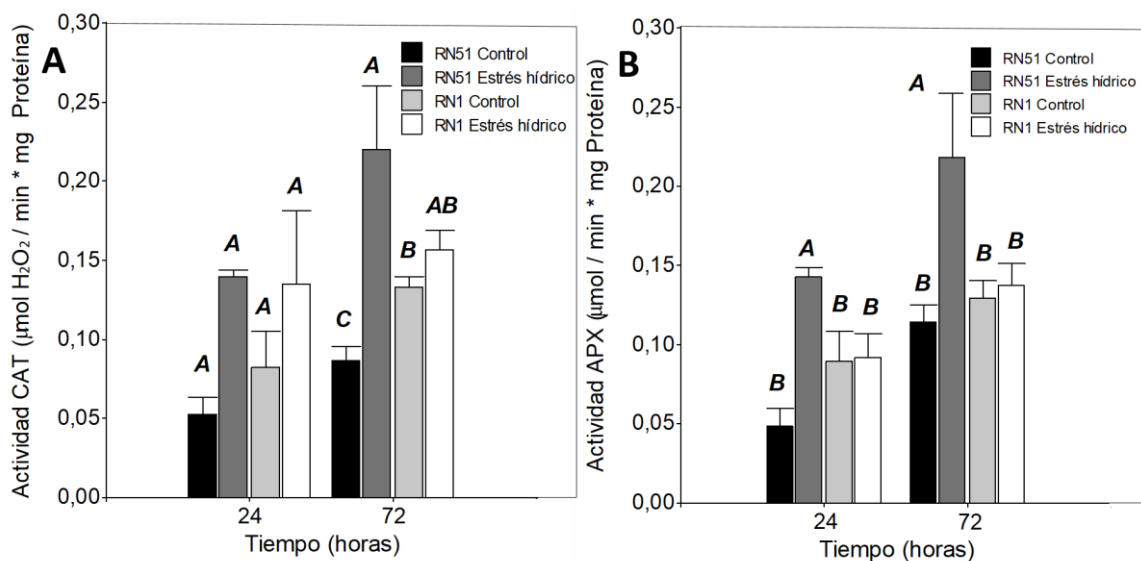
#### Actividad Catalasa (CAT)

En el tratamiento de estrés hídrico, la triple interacción (genotipo x contenido hídrico x tiempo de muestreo) no fue significativa ( $P > 0,05$ ). A las 24 h del tratamiento de estrés hídrico, la actividad CAT sólo mostró diferencias significativas entre contenido hídrico ( $P \leq 0,05$ ). Se registró mayor actividad en condiciones de estrés hídrico (con un valor medio de  $0,14 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína) en comparación con el tratamiento de control ( $0,07 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). Sin embargo, a las 72 horas, la actividad CAT mostró interacciones dobles (genotipo x contenido hídrico) significativas ( $P \leq 0,05$ ). Las plantas del genotipo RN51 expuestas a condiciones de estrés hídrico mostraron el mayor incremento en la actividad CAT (con un valor promedio de  $0,22 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína), lo que representó un incremento del 175% en comparación con su control (Fig.

2.9A). Contrariamente, posterior a la rehidratación y a las 72 hs de muestreo, fue RN1 en condiciones de estrés hídrico el que mostró los valores más altos (interacción genotipo x contenido hídrico significativa;  $P \leq 0,05$ ).

#### *Actividad Ascorbato Peroxidasa (APX)*

En el tratamiento de estrés hídrico, la interacción triple (genotipo x tratamiento x tiempo de muestreo) no fue significativa ( $P > 0,05$ ). En el tiempo de muestreo de 24 horas, la actividad APX presentó interacción doble (genotipo x tratamiento) significativa ( $P < 0,05$ ), con el valor más alto registrado en plantas del genotipo RN51 expuestas a condiciones de estrés hídrico ( $0,14 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína), excediendo el valor de su control en un 180%. La misma tendencia se observó a las 72 horas de tiempo de muestreo, con la mayor actividad APX observada en RN51 ( $0,22 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína), con un valor 100% superior al de su control (Fig. 2.9B). Después de la rehidratación, se observó interacción triple significativa ( $P < 0,05$ ). Plantas de RN51 que estuvieron expuestas al estrés hídrico, exhibieron el mayor valor de APX a las 72 hs ( $0,05 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). RN1 por su parte mostró siempre valores bajos de actividad, independientemente del contenido hídrico y del momento de muestreo.



**Fig. 2.9.** Efecto de condiciones de estrés hídrico en las enzimas catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX). Actividad de CAT (A) y actividad de APX (B), evaluadas a las 24 y 72 horas en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) en condiciones control y estrés hídrico. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en cada momento. Las barras de error indican error estándar.

## Evaluación de parámetros moleculares

### *Expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de la lignina*

En general, los genes que codifican enzimas involucradas en la vía biosintética de la lignina modificaron su expresión en ambos genotipos. Sin embargo, sólo se vieron diferencias a las 24 horas de iniciado el período de estrés y el de recuperación. Con respecto al tratamiento de estrés hídrico, la expresión del gen CCoAOMT se suprimió significativamente en las hojas de ambos genotipos (RN51 y RN1) con respecto al tratamiento control (relación = -2,185;  $p = 0,0466$  y relación = -9,24;  $p = 0,0143$ , respectivamente) (Tabla 2.2). Promediando los genotipos, la expresión de esta enzima se redujo significativamente en condiciones de estrés hídrico (relación: -4,17;  $p = 0,0261$ ). Por otra parte, la expresión del gen COMT mostró disminución leve en ambos genotipos y no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Con respecto a la expresión del gen CCR, bajo estrés hídrico aumentó significativamente su valor en el genotipo RN51 con respecto al tratamiento de control (relación = 1,93;  $p = 0,0231$ ), mientras que RN1 no

mostró diferencias significativas en la expresión de este gen (Tabla 2.2). Cuando comparamos ambos genotipos en condiciones de estrés hídrico, la expresión de este gen se redujo significativamente (relación: -1,2;  $p = 0,0206$ ).

**Tabla 2.2.** Expresión de los genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de lignina en los genotipos *C. ciliaris* (RN51 y RN1) en relación al control sin estrés según análisis de RT-PCR en tiempo real, medida a las 24 horas del inicio del tratamiento de sequía y recuperación.

Gen	Secuencia de los cebadores (5' - 3') Forward /Reverse	Tamaño del producto (bp)	Genotipos	Tratamiento	Log2 (Ratio)	R <sup>2</sup>	p-valor
CCoAOMT	AGCAAAAGCAGTCGTCATAGG CACGGTGGATTCCAGAATC	138	RN51	Estrés hídrico	-2,185	99,6	0,0466
			RN1	Estrés hídrico	-9,24		0,0143
			RN51:RN1	Estrés hídrico	-4,17		0,0261
			RN51	Recuperación	0,68		0,1174
			RN1	Recuperación	0,41		0,1961
			RN51:RN1	Recuperación	-4,51		0,0289
COMT	TCGAGTTCTACACGGGCTTC AAGTTGACGCCCTTGATCTG	115	RN51	Estrés hídrico	-0,21	99,2	0,4273
			RN1	Estrés hídrico	-1,46		0,2275
			RN51:RN1	Estrés hídrico	-1,11		0,2288
			RN51	Recuperación	1,42		0,0451
			RN1	Recuperación	-4,2		0,0442
			RN51:RN1	Recuperación	-4,4		0,0399
CCR	CCACCAAGTGATGAGCTGAA CCCTAATCCACTCCCCGTAT	106	RN51	Estrés hídrico	1,93	99,7	0,0231
			RN1	Estrés hídrico	0,41		0,423
			RN51:RN1	Estrés hídrico	-1,2		0,0206
			RN51	Recuperación	0,96		0,0376
			RN1	Recuperación	-0,85		0,2536
			RN51:RN1	Recuperación	1,5		0,0415

En relación al tratamiento de recuperación, los genes CCR y COMT mostraron diferencias significativas en ambos genotipos, siendo la expresión de estos genes incrementada en el genotipo RN51 (relación: 0,96;  $p = 0,0376$  y relación: 1,42;  $p = 0,045$ , respectivamente) mientras que el genotipo RN1 mostró el comportamiento opuesto (tabla 2). El gen CCoAOMT no mostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en ambos genotipos.

### **Observaciones Anatómicas**

El promedio y error estándar para los parámetros anatómicos medidos (espesor y áreas de esclerénquima, células bulliformes y tejidos de parénquima y epidermis) se presentan en la Tabla 2.3. La interacción doble (genotipo x tratamiento) fue significativa ( $P \leq 0,05$ ) en la mayoría de los parámetros. En condiciones de estrés hídrico, RN51 incrementó el área de esclerénquima, el área de la vaina parenquimatosa y el grosor de la epidermis adaxial en comparación a su control, en 111, 110 y 82%, respectivamente (Fig. 2.10C, D; Tabla 2.3). En contraposición, RN1 disminuyó tales parámetros bajo condiciones de estrés hídrico, lo cual permitió diferenciar significativamente a ambos genotipos en su respuesta anatómica.

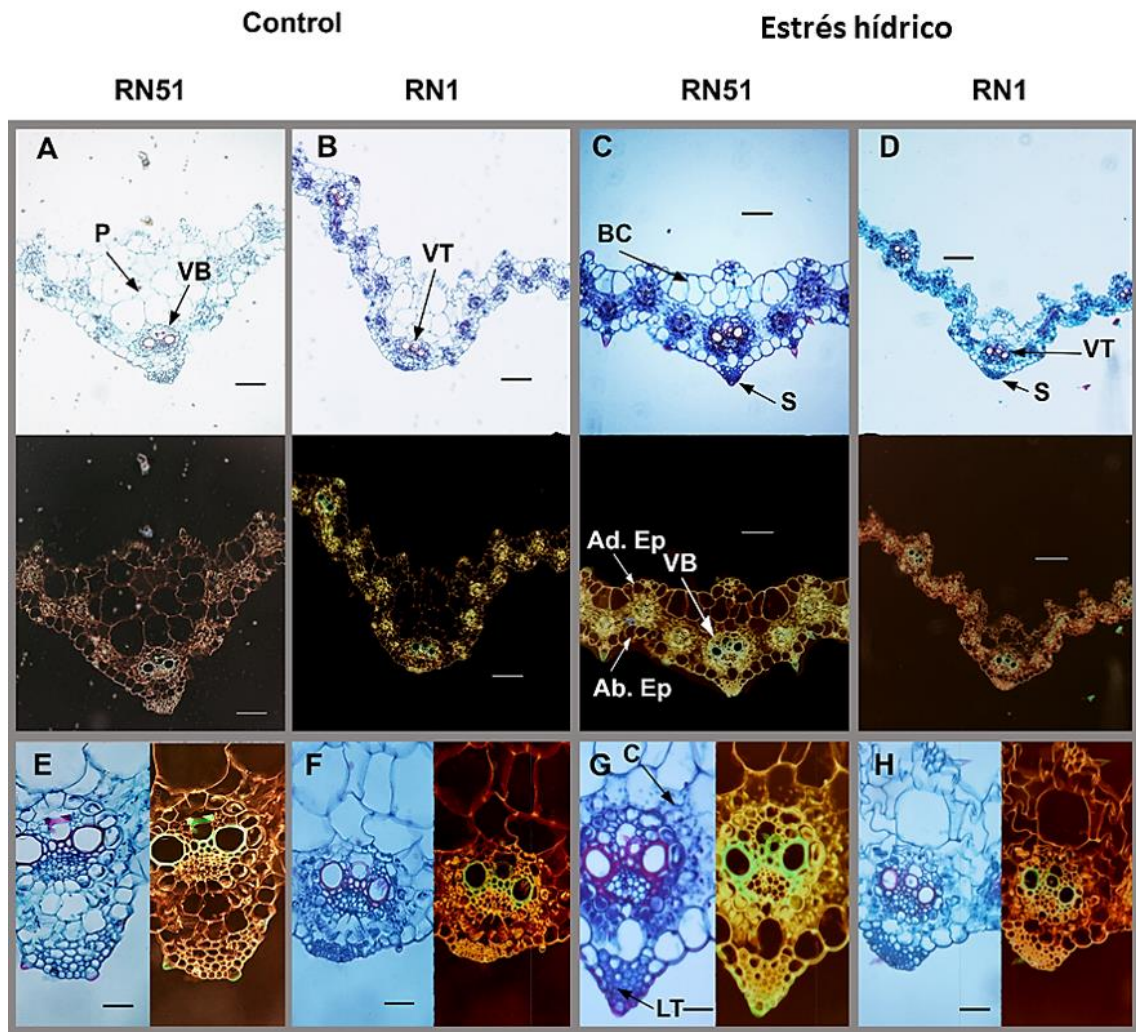
Cuando el genotipo RN51 se expuso a condiciones de estrés hídrico, se pudo observar, hacia ambos lados de la nervadura central, grupos de cuatro a cinco células incoloras en la epidermis adaxial (en forma de abanico), conocidas como células bulliformes, que cubrieron un área de  $9,33 \pm 0,82 * 10^3 \mu\text{m}^2$  (Fig. 2.10C). Por el contrario, el genotipo sensible (RN1) en dichas condiciones de estrés no mostró desarrollo de células bulliformes y disminuyó significativamente el grosor de la sección transversal de la lámina en un 42% en comparación con su control (Tabla 2.3; Figura 2.10D). Con respecto a la relación parénquima: esclerénquima (P: S), las plantas de RN51 expuestas a estrés hídrico mostraron el valor más alto (8,74) mientras que las plantas de RN1 el más bajo (6,96).

**Tabla 2.3.** Parámetros anatómicos medidos en la sección transversal de la lámina de dos genotipos contrastantes de *C. ciliaris* (RN51 y RN1) en dos contenidos hídricos del suelo (80% y 20% CHS) al cabo de 21 días de la imposición del estrés hídrico. Se midieron los tejidos comprendidos entre los dos haces vasculares a ambos lados del haz central. Los valores representan la media  $\pm$  EE.

Parámetros Anatómicos	Control		Estrés hídrico	
	RN51	RN1	RN51	RN1
Espesor total ( $\mu\text{m}$ )**	(2,2 $\pm$ 0,3) x 10 <sup>2</sup> <b>a</b>	(2,17 $\pm$ 0,07) x 10 <sup>2</sup> <b>a</b>	(2 $\pm$ 0,16) x 10 <sup>2</sup> <b>a</b>	(1,22 $\pm$ 0,01) x 10 <sup>2</sup> <b>b</b>
Area esclerenquimática (E) ( $\mu\text{m}^2$ )**	(27,37 $\pm$ 3,9) x 10 <sup>2</sup> <b>b</b>	(33,7 $\pm$ 3,34) x 10 <sup>2</sup> <b>b</b>	(57,9 $\pm$ 7,5) x 10 <sup>2</sup> <b>a</b>	(26,8 $\pm$ 1,67) x 10 <sup>2</sup> <b>b</b>
Área de células buliformes ( $\mu\text{m}^2$ )**	-----	-----	(9,33 $\pm$ 0,82) x 10 <sup>3</sup>	-----
Vaina parenquimática y clorénquima radiado ( $\mu\text{m}^2$ )**	(13,1 $\pm$ 1,78) x 10 <sup>3</sup> <b>b</b>	(12,65 $\pm$ 0,88) x 10 <sup>3</sup> <b>b</b>	(27,53 $\pm$ 0,73) x 10 <sup>3</sup> <b>a</b>	(7,1 $\pm$ 0,13) x 10 <sup>3</sup> <b>c</b>
Parénquima incoloro ( $\mu\text{m}^2$ )**	(95 $\pm$ 7,6) x 10 <sup>3</sup> <b>a</b>	(33,179 $\pm$ 6,4) x 10 <sup>3</sup> <b>b</b>	(18 $\pm$ 6,9) x 10 <sup>3</sup> <b>bc</b>	(10,3 $\pm$ 6,9) x 10 <sup>3</sup> <b>c</b>
Area parenquimática (P) ( $\mu\text{m}^2$ )**	(112,3 $\pm$ 8,35) x 10 <sup>3</sup> <b>a</b>	(47,5 $\pm$ 7,6) x 10 <sup>3</sup> <b>b</b>	(44,94 $\pm$ 8,3) x 10 <sup>3</sup> <b>bc</b>	(17,72 $\pm$ 7,05) x 10 <sup>3</sup> <b>c</b>
Área total de la hoja ( $\mu\text{m}^2$ )*	(123,6 $\pm$ 21) x 10 <sup>3</sup> <b>A</b>	(80,95 $\pm$ 5,93) x 10 <sup>3</sup> <b>B</b>	(72,17 $\pm$ 8,51) x 10 <sup>3</sup> <b>A</b>	(44,46 $\pm$ 1,36) x 10 <sup>3</sup> <b>B</b>
P : E **	41,34 $\pm$ 4,32 <b>a</b>	14,41 $\pm$ 2,26 <b>b</b>	8,74 $\pm$ 0,59 <b>c</b>	6,96 $\pm$ 0,46 <b>d</b>
Espesor de la epidermis abaxial ( $\mu\text{m}$ )*	25,52 $\pm$ 1,83 <b>A</b>	20,09 $\pm$ 1,83 <b>B</b>	25,95 $\pm$ 1,83 <b>A</b>	19,76 $\pm$ 1,83 <b>B</b>
Espesor de la epidermis adaxial ( $\mu\text{m}$ )**	16,72 $\pm$ 1,4 <b>c</b>	21,24 $\pm$ 1,38 <b>b</b>	31,23 $\pm$ 1,38 <b>a</b>	19,43 $\pm$ 1,83 <b>bc</b>

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para la interacción doble (\*\*). Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los genotipos ( $p \leq 0,0001$ ) (\*) dentro de los tratamientos para variables donde la interacción doble no fue significativa ( $p > 0,05$ ).



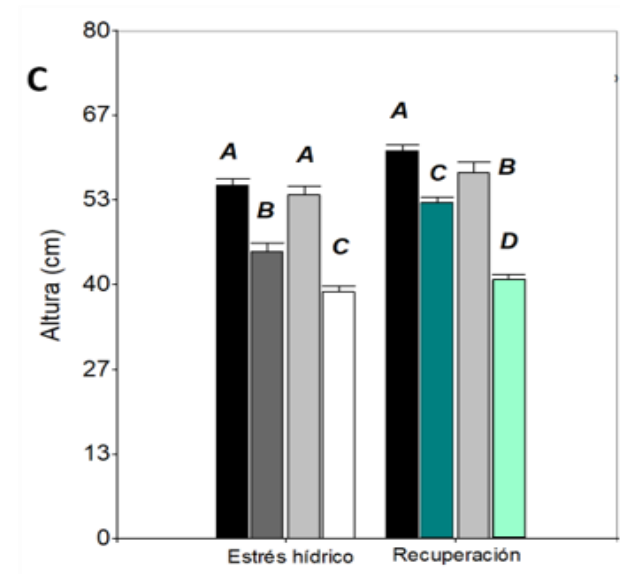
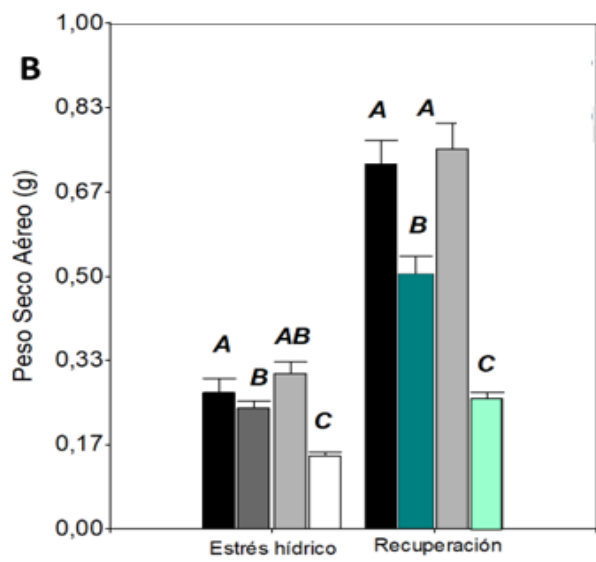
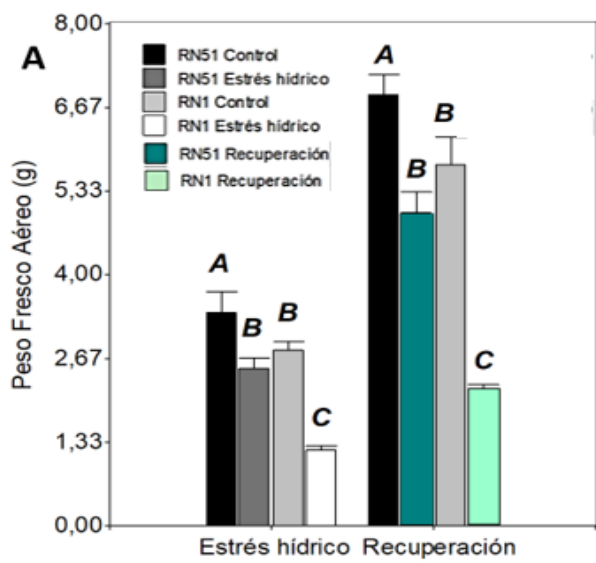


**Fig. 2.10.** Efecto de las condiciones de estrés hídrico y recuperación sobre las observaciones anatómicas. Sección transversal de la lámina (A, B, C, D - barra de escala de 100  $\mu$ m) y haz vascular central (E, F, G, H - barra de escala de 50  $\mu$ m) de genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) bajo condiciones de control y estrés hídrico. P. parénquima; VB. haz vascular; VT. tejido vascular; BC. células bulliformes; S. esclerénquima; Ad. Ep. epidermis adaxial; Ab. Ep. epidermis abaxial; C. clorénquima; LT. tejido lignificado.

### Evaluación de parámetros morfológicos

En general, cuando se aplicó el tratamiento de estrés hídrico, ambos genotipos de *C. ciliaris* mostraron disminución en todos los parámetros morfológicos respecto al tratamiento control; sin embargo, RN1 fue el genotipo que registró la mayor reducción.

Se mostraron efectos permanentes del estrés en RN1, a diferencia de RN51 que respondió a las mejoras en el ambiente hídrico durante la rehidratación, recuperando su comportamiento de manera significativa, aunque sin alcanzar el nivel del control. En condiciones de estrés hídrico, el peso fresco aéreo (PFA) mostró diferencias significativas en la interacción doble genotipo x contenido hídrico ( $P \leq 0,05$ ). El genotipo RN51 exhibió disminución del 26% con respecto a su control, mientras que RN1 exhibió una reducción del 56%. La misma tendencia se observó en el tratamiento de recuperación. Los porcentajes de disminución en RN51 y RN1 con respecto a su control, fueron 27% y 62%, respectivamente (Fig. 2.11A). Asimismo, el peso seco aéreo (PSA) mostró diferencias significativas en la interacción doble genotipo x contenido hídrico ( $P \leq 0,05$ ). RN1 registró la mayor disminución para este parámetro (46% con respecto a su control) cuando estuvo expuesto a estrés hídrico, y en el tratamiento de recuperación la reducción fue aún más pronunciada (65%) (Fig. 2.11B). Se registró el mismo comportamiento para la variable altura de la planta (A), mostrando diferencias significativas en la interacción doble genotipo x contenido hídrico ( $P \leq 0,05$ ). En condiciones de estrés hídrico, la reducción observada fue de 20% y 28% para RN51 y RN1, respectivamente, y 13% y 29% en el tratamiento de recuperación (Fig. 2.11C).



**Fig. 2.11.** Efecto de estrés hídrico y condiciones de recuperación posterior sobre parámetros relacionados al crecimiento. Peso fresco aéreo (A), Peso seco aéreo (B) y Altura de la planta (C) en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para la doble interacción (genotipo x tratamiento). Las barras de error indican error estándar.



**Fig. 2.12.** Efecto del estrés hídrico a tiempo corto sobre el fenotipo de los genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* RN51 (Biloela) y RN1 (Sexual), bajo condiciones de control y estrés hídrico, respectivamente.

## **ENSAYO A TIEMPO LARGO DE ESTRÉS HÍDRICO**

Los cambios generales ocurridos respecto al ensayo de tiempo corto permitieron una mejor discriminación entre los genotipos evaluados. Si bien la intensidad del estrés hídrico fue la misma en los distintos ensayos, al prolongarse la duración del estrés, se acentuaron las diferencias entre tratamientos.

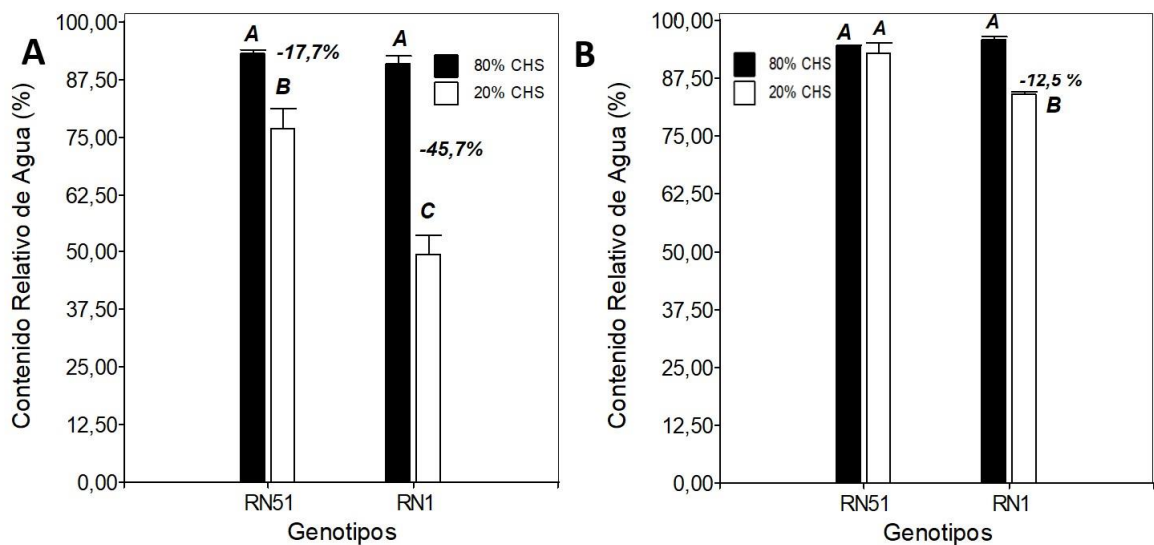
### **Evaluación de Parámetros Fisiológicos**

#### *Contenido Relativo de Agua (CRA)*

Para esta variable evaluada, hubo diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para la doble interacción genotipo x contenido hídrico, en condiciones de estrés hídrico y recuperación. En el primer caso (Fig. 2.13A), el genotipo RN51 mostró el valor más alto de CRA (93,32%) en condiciones de control, disminuyendo un 17,7% en condiciones de estrés hídrico (76,83%), mientras que RN1 fue el genotipo que registró el valor más bajo de

CRA en condiciones de estrés hídrico (49,5%), mostrando una disminución significativa del 45,7% respecto a su control (91,1%).

En el tratamiento de recuperación (Fig. 2.13B), el genotipo tolerante RN51 proveniente del tratamiento de estrés hídrico, recuperó el valor de CRA (92,97%) asemejándose a su respectivo control (94,31%), mientras que el genotipo susceptible RN1 mostró un leve aumento del valor de CRA (83,94%) pero mantuvo una diferencia significativa del 12,5% respecto a su control (95,93%).



**Fig. 2.13.** Contenido relativo de agua en RN51 y RN1 bajo condiciones de estrés por hídrico (A) y recuperación (B). Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Las barras de error indican el error estándar.

### *Fluorescencia de la clorofila*

En relación a la variable  $F_v/F_m$ , se observaron diferencias significativas en la interacción doble genotipo x tratamiento ( $P \leq 0,05$ ). El valor registrado en RN1 para el tratamiento de estrés hídrico (0,61) fue significativamente menor que el registrado en el resto de los tratamientos. Asimismo, en este genotipo se observó un aumento significativo ( $P \leq 0,05$ ) del tiempo para alcanzar  $F_m$  (t para  $F_m$ ) en condiciones de estrés hídrico (187% mayor respecto a las plantas en condiciones control), mientras que RN51 no mostró diferencias significativas. El área de la curva OJIP (área) y el índice de desempeño total (PI total) disminuyeron marcadamente en RN1 cuando se impuso el

estrés hídrico en comparación con el tratamiento control, sin embargo, no se discriminaron significativamente. En cuanto a los flujos de energía específicos (por centro de reacción), la absorción (ABS<sub>o</sub>/RC) se incrementó considerablemente en RN1 (42%) en el tratamiento de estrés hídrico en comparación con las condiciones de control. Se observó la misma tendencia para la disipación de energía luminosa como calor latente (representado por DI<sub>o</sub>/RC). Las plantas de RN1 en condiciones de estrés hídrico aumentaron la disipación de energía lumínica en más del 1000% en comparación con las plantas control, mientras que RN51 no mostró diferencias significativas entre contenido hídrico.

**Tabla 2.4.** Parámetros de fluorescencia medidos en dos genotipos de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) bajo condiciones control y estrés hídrico. Los valores representan las medias  $\pm$  EE.

Parámetros de fluorescencia	Control		Estrés por sequía					
	RN51	RN1	RN51	RN1				
t for Fm (**)	235 $\pm$ 136,89	b	203 $\pm$ 74,54	b	231 $\pm$ 49,32	b	582 $\pm$ 257,8	a
Area (*)	299235 $\pm$ 71441,48	A	295648,4 $\pm$ 38358,69	B	338617,7 $\pm$ 56763,23	A	268748 $\pm$ 56316,48	B
Fo (**)	4799,8 $\pm$ 612,38	B	5569,9 $\pm$ 480,87	A	5302,5 $\pm$ 277,5	B	6821 $\pm$ 280	A
Fm (**)	21192,9 $\pm$ 1900,09	b	23653,2 $\pm$ 1738,79	a	21593,6 $\pm$ 1468,62	b	17639,5 $\pm$ 2648,56	c
Fv (**)	16393,1 $\pm$ 1596,21	ab	18083,3 $\pm$ 1532,11	a	16291,1 $\pm$ 1260,95	b	10818,5 $\pm$ 3015,47	c
Fv/Fm (*)	0,77 $\pm$ 0,02	a	0,76 $\pm$ 0,02	ab	0,75 $\pm$ 0,01	ab	0,61 $\pm$ 0,1	b
ABS/RC (**)	18,28 $\pm$ 2,29	b	20,41 $\pm$ 1,77	b	18,68 $\pm$ 1,37	b	28,95 $\pm$ 7,62	a
DI <sub>o</sub> /RC (**)	0,42 $\pm$ 0,09	b	0,48 $\pm$ 0,07	b	0,46 $\pm$ 0,04	b	8,51 $\pm$ 9,24	a
TR <sub>o</sub> /RC (**)	14107,3 $\pm$ 1470,87	c	15577,9 $\pm$ 1124,81	B	14086,5 $\pm$ 1006,88	C	16940,6 $\pm$ 1594,54	A
ET <sub>o</sub> /RC (**)	0,86 $\pm$ 0,06	a	2,76 $\pm$ 0,06	a	0,9 $\pm$ 0,06	a	0,85 $\pm$ 0,13	a
PI total (*)	24,13 $\pm$ 17,82	A	12,87 $\pm$ 6,93	B	22,64 $\pm$ 9,21	A	2,56 $\pm$ 4,2	B

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para la doble interacción (\*\*) y letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0,05$ ) (\*) para variables donde la doble interacción no fue significativa ( $P > 0,05$ ).

Con respecto al tratamiento de recuperación, la mayoría de los parámetros mostraron valores semejantes al tratamiento control cuando se repuso el CHS, sin embargo, se registraron diferencias significativas en el tiempo para alcanzar Fm (t para Fm), mostrando un valor 27% mayor en el tratamiento de recuperación con relación al control, sin registrarse diferencias entre genotipos. Por otro lado, si bien ambos genotipos mostraron una recuperación del valor de Fv/Fm, RN1 (0,78) continuó diferenciándose significativamente del resto de los tratamientos (0,80).

## **Evaluación de parámetros bioquímicos**

### *Contenido en Malondialdehído (MDA)*

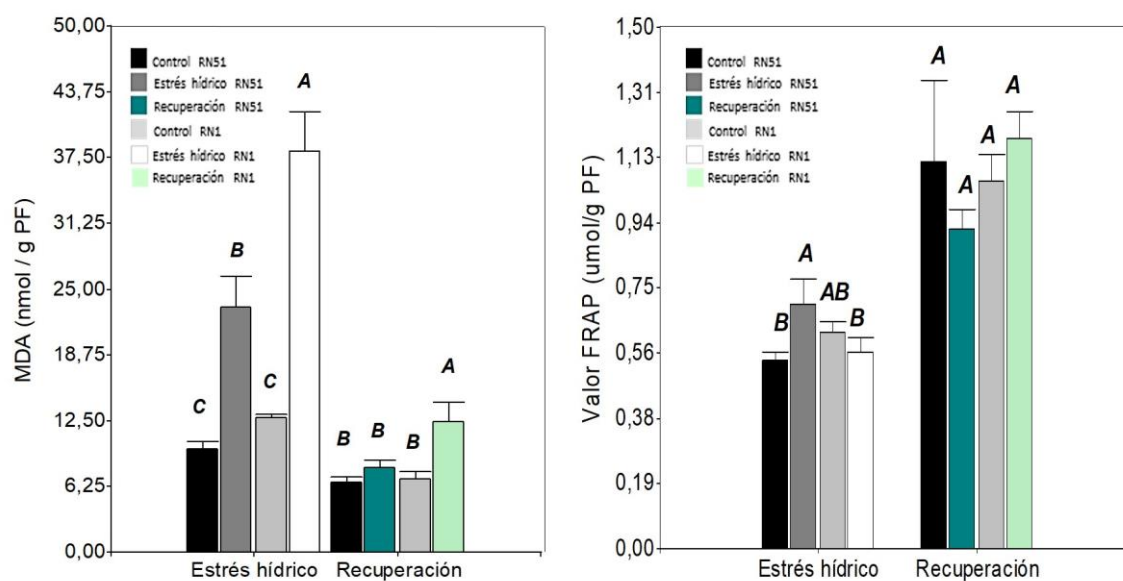
En condiciones de estrés hídrico, se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en la doble interacción (genotipo x tratamiento). RN1 mostró un aumento del 200% en el contenido de MDA en comparación con su control (38,14 nmol g<sup>-1</sup> FW y 12,72 nmol g<sup>-1</sup> FW, respectivamente), seguido del genotipo RN51 con un aumento significativamente menor (138%) entre el tratamiento de estrés hídrico y el control (23,24 nmol g<sup>-1</sup> FW y 9,78 nmol g<sup>-1</sup> FW, respectivamente; figura 2.14A). El último resultado permite evidenciar que el genotipo RN51 tuvo menor daño oxidativo que el RN1.

En cuanto al tratamiento de recuperación (Fig. 2.14B), el genotipo RN1 mostró el valor más alto (12,34 nmol g<sup>-1</sup> FW), lo que representó un incremento significativo ( $P \leq 0,05$ ) del 78% respecto a su control. Por el contrario, el genotipo RN51 mostró incremento, aunque no significativo ( $P > 0,05$ ), en el valor de MDA entre las condiciones de recuperación y control (8,02 y 6,67 nmol g<sup>-1</sup> FW, respectivamente).

*Poder reductor total mediante la capacidad reductora férrica del ensayo de plasma (FRAP)/ actividad antioxidante total*

Durante el tratamiento de estrés hídrico, como se muestra en la Fig. 2.14C, se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para la doble interacción (genotipo x tratamiento). El genotipo RN51 aumentó significativamente ( $P \leq 0,05$ ) la actividad antioxidante total ( $0,7 \mu\text{mol g}^{-1} \text{PF}$ ) representando un 30%, mientras que RN1 ( $0,57 \mu\text{mol g}^{-1} \text{PF}$ ) la redujo en un 8%, en comparación con sus correspondientes plantas control ( $0,54$  y  $0,62 \mu\text{mol g}^{-1} \text{PF}$  para RN51 y RN1, respectivamente).

En el tratamiento de recuperación (Fig. 2.14D), RN51 y RN1 mostraron valores semejantes a sus respectivos controles ( $0,91$ .,  $1,1$  y  $1,13$ .,  $1,05 \mu\text{mol g}^{-1} \text{PF}$ , respectivamente) sin diferencias significativas entre ellos.



**Fig. 2.14.** Contenido en Malondialdeído (MDA) (A) y poder reductor total (FRAP) (B) en RN51 y RN1 bajo condiciones de estrés hídrico y recuperación. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ). Las barras de error indican el error estándar.

## Evaluación de parámetros moleculares



### *Expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de la lignina*

Los genes que codifican enzimas involucradas en la vía biosíntesis de la lignina modificaron su expresión en ambos genotipos, observándose diferencias significativas a las 24 horas del tratamiento de estrés hídrico y del tratamiento de recuperación. Con respecto al tratamiento de estrés hídrico, la expresión del gen CCoAOMT se suprimió significativamente en las hojas del genotipo RN1 con respecto al tratamiento control (relación = -4,69;  $p = 0,0149$ ) (Tabla 2.5). Cuando se compararon ambos genotipos en condiciones de estrés hídrico, la expresión de esta enzima se redujo significativamente (relación: -3,98;  $p = 0,0197$ ). En cuanto a la expresión del gen COMT, ésta se incrementó significativamente en el genotipo RN51 y disminuyó significativamente en RN1 respecto a su control (relación: 3,16;  $p = 0,0165$  y relación: -2,87;  $p = 0,0314$ , respectivamente). Por otro lado, la expresión del gen CCR, bajo estrés por sequía aumentó significativamente su valor en el genotipo RN51 con respecto al tratamiento de control (relación = 1,84;  $p = 0,0492$ ), mientras que RN1 no mostró diferencias significativas en la expresión de este gen (Tabla 2.5).

**Tabla 2.5.** Expresión de los genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de lignina en los genotipos *C. ciliaris* (RN51 y RN1) en relación al control, según análisis de RT-PCR en tiempo real, medida a las 24 horas del inicio del tratamiento de sequía y recuperación.

Gen	Secuencia de los cebadores (5' - 3') Forward /Reverse	Tamaño del producto (bp)	Genotipos	Tratamiento	Log2 (Ratio)	R <sup>2</sup>	p-valor
CCoAOMT	AGCAAAAGCAGTCGTCATAGG CACGGTGGATTCCAGAATC	138	RN51	Estrés hídrico	1,85	99,6	0,1913
			RN1	Estrés hídrico	-4,69		0,0149
			RN51:RN1	Estrés hídrico	-3,98		0,0197
			RN51	Recuperación	0,74		0,0939
			RN1	Recuperación	4,15		0,0375
			RN51:RN1	Recuperación	2,27		0,0899
COMT	TCGAGTTCTACACGGGCTTC AAGTTGACGCCCTTGATCTG	115	RN51	Estrés hídrico	3,16	99,2	0,0165
			RN1	Estrés hídrico	-2,87		0,0314
			RN51:RN1	Estrés hídrico	-2,18		0,0515
			RN51	Recuperación	0,85		0,3056
			RN1	Recuperación	-0,18		0,3967
			RN51:RN1	Recuperación	-0,01		0,4869
CCR	CCACCAAGTGATGAGCTGAA CCCTAATCCACTCCCCGTAT	106	RN51	Estrés hídrico	1,84	99,7	0,0492
			RN1	Estrés hídrico	-0,91		0,2569
			RN51:RN1	Estrés hídrico	-1,47		0,1042
			RN51	Recuperación	-0,87		0,1566
			RN1	Recuperación	-3,91		0,1774
			RN51:RN1	Recuperación	-0,34		0,3164

Con relación al tratamiento de recuperación, sólo se observaron diferencias en la expresión del gen CCoAOMT. El genotipo RN1, incrementó significativamente su expresión respecto al control (relación: 4,15;  $p = 0,0375$ ), mientras que no se observaron diferencias significativas en la expresión de los restantes genes asociados a la biosíntesis de la lignina entre los tratamientos de recuperación y control.

## Observaciones Anatómicas

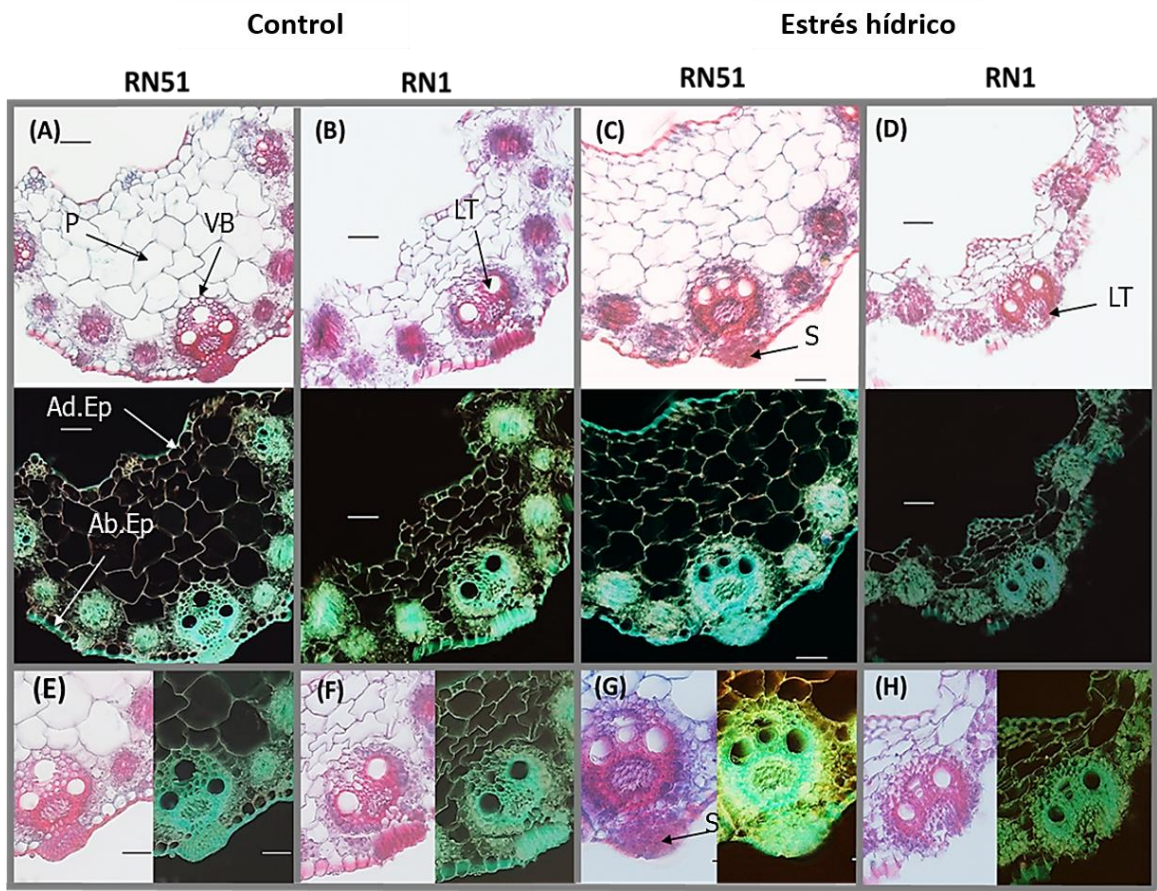
El promedio y error estándar para los parámetros anatómicos medidos (espesor y áreas de esclerénquima, tejidos de parénquima y epidermis) se presentan en la Tabla 2.6. La interacción doble (genotipo x contenido hídrico) fue significativa ( $P \leq 0,05$ ) en la mayoría de los parámetros evaluados. En condiciones de estrés hídrico, RN51 incrementó significativamente el área de esclerénquima y el espesor total de la lámina en comparación a su control, en un 31,3 y 16,6 %, respectivamente (Fig. 2.15C; Tabla 2.6). A diferencia de este genotipo, RN1, disminuyó significativamente en los parámetros anatómicos antes mencionados respecto a su control y también mostró una reducción significativa del área de parénquima y área total de la lámina en un 60,3 % y 49,7 %, respectivamente en relación con el tratamiento control (Fig. 2.15D).

Cuando el genotipo RN51 se expuso a condiciones de estrés hídrico se pudo observar, al igual que en el ensayo de tiempo corto, un gran desarrollo de células buliformes hacia ambos lados de la nervadura central. Sin embargo, en el ensayo de tiempo largo las células buliformes escaparon del campo de observación debido al gran desarrollo alcanzado por las láminas alrededor de la nervadura central. Con respecto a la relación parénquima: esclerénquima (P: E), las plantas de RN51 expuestas a estrés hídrico mostraron el valor más bajo (4,5) mientras que las plantas de RN1 bajo la misma condición, el más alto (7,9) (Tabla 2.6).

**Tabla 2.6.** Parámetros anatómicos medidos en la sección transversal de la hoja de genotipos de *C. ciliaris* (RN51 y RN1) bajo condiciones de control y estrés hídrico. Se midieron los tejidos comprendidos entre los dos haces vasculares a ambos lados del haz central. Los valores representan la media  $\pm$  EE.

Parámetros Anatómicos	Control		Estrés hídrico	
	RN51	RN1	RN51	RN1
Espesor Total ( $\mu\text{m}$ )**	(4,34 $\pm$ 0,5) x 10 <sup>2</sup> <b>ab</b>	(4,3 $\pm$ 0,5) x 10 <sup>2</sup> <b>ab</b>	(5,05 $\pm$ 0,5) x 10 <sup>2</sup> <b>a</b>	(2,9 $\pm$ 0,5) x 10 <sup>2</sup> <b>b</b>
Área esclerenquimática ( $\mu\text{m}^2$ )**	(24,88 $\pm$ 3,3) x 10 <sup>3</sup> <b>ab</b>	(18,72 $\pm$ 3,3) x 10 <sup>3</sup> <b>bc</b>	(32,66 $\pm$ 3,3) x 10 <sup>3</sup> <b>a</b>	(10,7 $\pm$ 3,3) x 10 <sup>3</sup> <b>c</b>
Vaina parenquimática y clorénquima radiado ( $\mu\text{m}^2$ )**	(51,82 $\pm$ 4,46) x 10 <sup>3</sup> <b>a</b>	(44,74 $\pm$ 4) x 10 <sup>3</sup> <b>a</b>	(47,3 $\pm$ 4,5) x 10 <sup>3</sup> <b>a</b>	(20,9 $\pm$ 3,9) x 10 <sup>3</sup> <b>b</b>
Parénquima incoloro ( $\mu\text{m}^2$ )*	143,9 $\pm$ 23,06) x 10 <sup>3</sup> <b>A</b>	(147,45 $\pm$ 23) x 10 <sup>3</sup> <b>A</b>	(143,8 $\pm$ 26,6) x 10 <sup>3</sup> <b>B</b>	(49,74 $\pm$ 20,6) x 10 <sup>3</sup> <b>B</b>
Área parenquimática (P) ( $\mu\text{m}^2$ )**	(203,22 $\pm$ 26) x 10 <sup>3</sup> <b>a</b>	(191,7 $\pm$ 26,2) x 10 <sup>3</sup> <b>a</b>	(210,2 $\pm$ 26,2) x 10 <sup>3</sup> <b>a</b>	(76,15 $\pm$ 26) x 10 <sup>3</sup> <b>b</b>
Área total de la hoja ( $\mu\text{m}^2$ )**	(348,14 $\pm$ 21) x 10 <sup>3</sup> <b>a</b>	(336,34 $\pm$ 27) x 10 <sup>3</sup> <b>a</b>	(300 $\pm$ 21) x 10 <sup>3</sup> <b>a</b>	(169,21 $\pm$ 23,5) x 10 <sup>3</sup> <b>b</b>
P : E *	15 $\pm$ 2,2 <b>A</b>	10 $\pm$ 1,9 <b>A</b>	4,5 $\pm$ 1,9 <b>B</b>	7,9 $\pm$ 2 <b>B</b>
Espesor de epidermis abaxial ( $\mu\text{m}$ )*	41 $\pm$ 2,4 <b>A</b>	34 $\pm$ 3,4 <b>B</b>	41 $\pm$ 2,6 <b>A</b>	23 $\pm$ 3 <b>B</b>
Espesor de epidermis adaxial ( $\mu\text{m}$ )*	42 $\pm$ 2,9 <b>A</b>	29 $\pm$ 3,6 <b>B</b>	45 $\pm$ 3,6 <b>A</b>	23 $\pm$ 3,6 <b>B</b>

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para la interacción doble (\*\*). Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los genotipos ( $P \leq 0,0001$ ) (\*) dentro de los tratamientos para variables donde la interacción doble no fue significativa ( $P > 0,05$ ).



**Fig. 2.4.** Efecto del tratamiento de estrés hídrico y control sobre las observaciones anatómicas. Sección transversal de la lámina (A, B, C, D - barra de escala de 100  $\mu$ m) y haz vascular central (E, F, G, H - barra de escala de 50  $\mu$ m) de genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) en condiciones de control y estrés hídrico. P. parénquima; VB. haz vascular; S. esclerénquima; Ad. Ep. epidermis adaxial; Ab. Ep. epidermis abaxial; LT. tejido lignificado.

En el tratamiento de recuperación, la interacción doble (genotipo x tratamiento) fue significativa ( $P \leq 0,05$ ) en la mayoría de los parámetros. Si bien, las diferencias anatómicas observadas fueron similares a las anteriormente mencionadas, éstas se acentuaron, diferenciándose aún más cada genotipo de su respectivo control. En condiciones de estrés hídrico, RN51 incrementó significativamente ( $P \leq 0,05$ ) el área de esclerénquima y el espesor total de la hoja en comparación a su control, en un 176 y 40,7 %, respectivamente (Tabla 2.7). Además, también aumentó el área parenquimática y el área total de la hoja en un 156 y 88 %, respectivamente. A diferencia de este genotipo, RN1, disminuyó significativamente ( $P \leq 0,05$ ) respecto a su control en los parámetros anatómicos antes mencionados. Con respecto a la relación parénquima: esclerénquima (P:

S), las plantas de RN1 en el tratamiento de recuperación mostraron el valor más bajo (4,33) mientras que las plantas de RN51 un valor similar a su control (8,1).

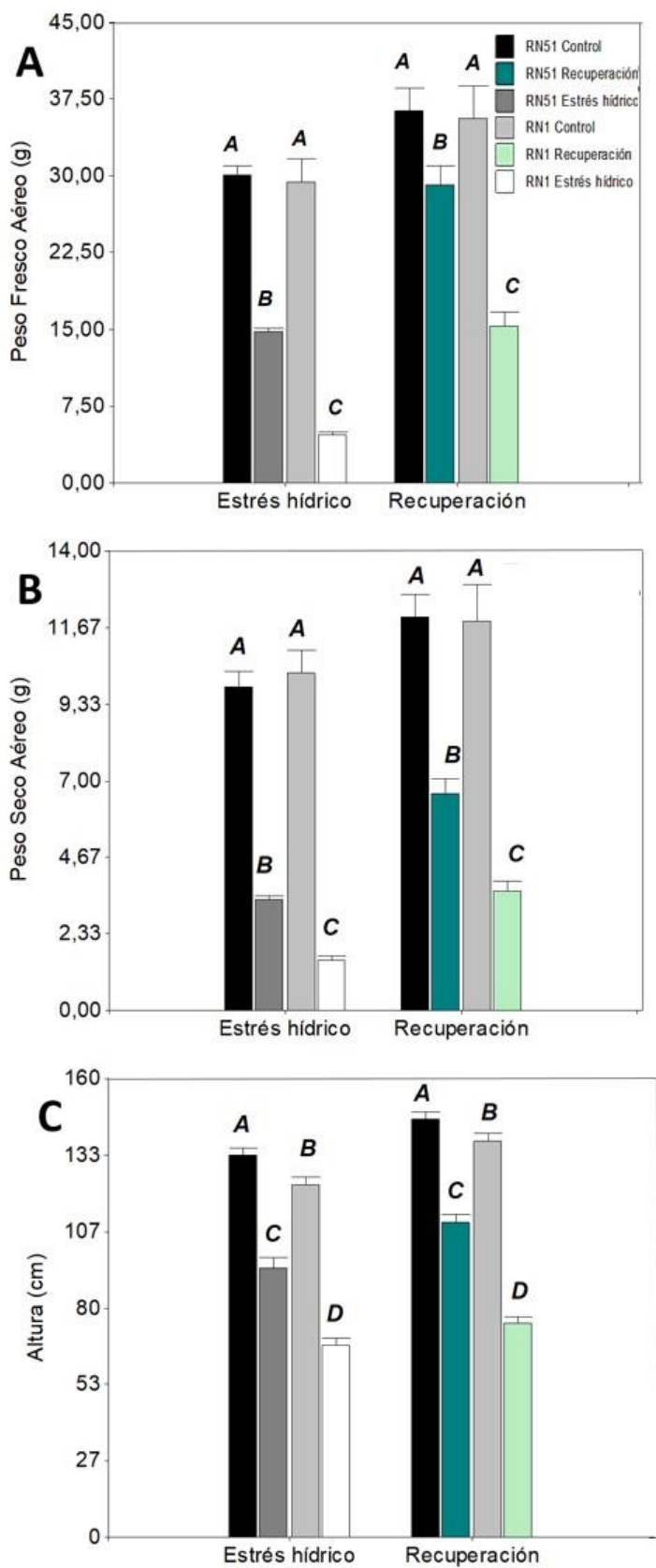
**Tabla 2.7.** Parámetros anatómicos medidos en la sección transversal de la lámina de dos genotipos contrastantes de *C. ciliaris* (RN51 y RN1) en el tratamiento control y recuperación. Se midieron los tejidos comprendidos entre los dos haces vasculares a ambos lados del haz central. Los valores representan la media  $\pm$  EE.

Parámetros Anatómicos	Control		Recuperación	
	RN51	RN1	RN51	RN1
Espesor Total ( $\mu\text{m}$ )**	$(5.06 \pm 0.6) \times 10^2$	$(4.6 \pm 0.5) \times 10^2$	$(7.12 \pm 0.57) \times 10^2$	$(2.25 \pm 0.6) \times 10^2$
Área esclerenquimática ( $\mu\text{m}^2$ )**	$(18.5 \pm 2.48) \times 10^3$	$(18.68 \pm 2.5) \times 10^3$	$(51.02 \pm 2.4) \times 10^3$	$(8.53 \pm 2.5) \times 10^3$
Vaina parenquimática y clorénquima radiado ( $\mu\text{m}^2$ )*	$(26.94 \pm 10.46) \times 10^3$	$(32.08 \pm 10.01) \times 10^3$	$(67.28 \pm 10.1) \times 10^3$	$(22.05 \pm 10) \times 10^3$
Parénquima incoloro ( $\mu\text{m}^2$ )**	$133.77 \pm 30.81) \times 10^3$	$(127.41 \pm 31) \times 10^3$	$(343.89 \pm 30.9) \times 10^3$	$(14.7 \pm 30.8) \times 10^3$
Área parenquimática (P) ( $\mu\text{m}^2$ )**	$(160.7 \pm 26.77) \times 10^3$	$(159.48 \pm 27) \times 10^3$	$(411.16 \pm 26) \times 10^3$	$(36.73 \pm 26.8) \times 10^3$
Área total de la hoja ( $\mu\text{m}^2$ )*	$(287.23 \pm 48) \times 10^3$	$(293.2 \pm 48.2) \times 10^3$	$(540.34 \pm 48.1) \times 10^3$	$(123.71 \pm 48.17) \times 10^3$
P : E **	$8.91 \pm 1.1$	$8.38 \pm 1.1$	$8.1 \pm 1.1$	$4.33 \pm 1.1$
Espesor de epidermis abaxial ( $\mu\text{m}$ )*	$37.43 \pm 6.31$	$31.62 \pm 6$	$47.46 \pm 6.3$	$22.48 \pm 6.31$
Espesor de epidermis adaxial ( $\mu\text{m}$ )**	$46.35 \pm 6.37$	$24.4 \pm 6.4$	$59.7 \pm 6$	$39.1 \pm 6.4$

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para la interacción doble (\*\*). Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los genotipos ( $P \leq 0,0001$ ) (\*) dentro de los tratamientos para variables donde la interacción doble no fue significativa ( $P > 0,05$ ).

## Evaluación de parámetros morfológicos

Al aplicar el tratamiento de estrés hídrico a tiempo largo, de manera similar que, en el tratamiento a tiempo corto, ambos genotipos de *C. ciliaris* mostraron disminución en todos los parámetros morfológicos evaluados respecto al tratamiento control. Sin embargo, RN1 fue el genotipo que registró la mayor reducción a diferencia de RN51. En condiciones de estrés hídrico, el peso fresco aéreo (PFA) mostró diferencias significativas en la doble interacción genotipo x contenido hídrico ( $P \leq 0,05$ ). El genotipo RN51 exhibió una disminución significativa ( $P \leq 0,05$ ) del 50,89% con respecto a su control, mientras que RN1 exhibió una reducción del 84,18%. La misma tendencia se observó en el tratamiento de recuperación. Los porcentajes de disminución en RN51 y RN1 con respecto a su control, fueron 19,74% y 57%, respectivamente (Fig. 2.16A). De la misma manera, el PSA mostró diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en la doble interacción genotipo x contenido hídrico. RN1 registró la mayor reducción para este parámetro (85,21% con respecto a su control) cuando estuvo expuesto a estrés hídrico mientras que, en el tratamiento de recuperación, la reducción fue también pronunciada (69,5%) (Fig. 2.16B). Se registró el mismo comportamiento para la variable altura de la planta (A), mostrando diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en la doble interacción genotipo x contenido hídrico. En condiciones de estrés hídrico, la reducción observada fue de 29,52% y 45,54% para RN51 y RN1, respectivamente, y 24,6% y 46% en el tratamiento de recuperación, para RN51 y RN1, respectivamente (Fig. 2.16C).

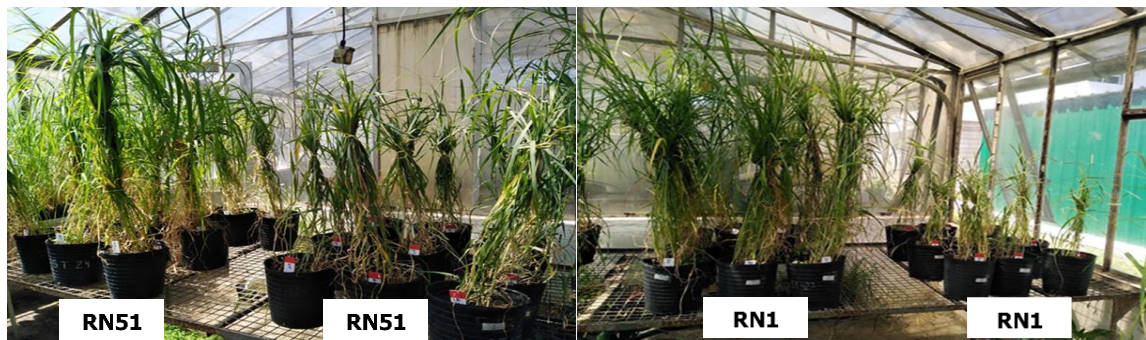


**Fig. 2.16.** Efecto del estrés hídrico y recuperación en el Peso Fresco Aéreo (A), Peso Seco Aéreo (B) y Altura de planta (C) en los genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris*, RN51 y RN1. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para la interacción doble genotipo x tratamiento. Las barras de error indican error estándar.





**Fig. 2.17.** Efecto del estrés hídrico a tiempo largo sobre el fenotipo en los genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris*, RN51 y RN1, en condiciones control y de estrés hídrico, respectivamente. De izquierda a derecha, RN51 y RN1 en el tratamiento control y estrés hídrico, respectivamente.



**Fig. 2.18.** Ensayo de estrés hídrico a tiempo largo en los genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris*, RN51 y RN1, en condiciones control y de estrés hídrico, respectivamente.

## DISCUSIÓN

Los genotipos contrastantes evaluados en este estudio emplearon mecanismos de adaptación divergentes para hacer frente a las condiciones de estrés hídrico. Estos mecanismos incluyeron el mantenimiento de las relaciones de agua de las láminas, la capacidad fotosintética, la desintoxicación de EAO y los cambios en la anatomía de la lámina. De esta forma, las plantas de *C. ciliaris* pudieron evadir el daño inducido por la sequía, permitiendo que los genotipos tolerantes recuperen más fácilmente sus funciones fisiológicas después de la rehidratación. Si bien la intensidad del estrés hídrico fue la misma en los distintos ensayos, al prolongarse la duración del estrés, se acentuaron las diferencias entre tratamientos, permitiendo una mejor discriminación entre los genotipos evaluados.

Mantener un estado hídrico adecuado, es crucial para una función fisiológica y crecimiento óptimos (Chen *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017). En este sentido, el parámetro CRA muestra el equilibrio entre el agua absorbida por la planta y la pérdida por transpiración, por lo que se considera un buen indicador de tolerancia o adaptación a la sequía en diversas especies vegetales, incluidos los cereales (Rampino *et al.*, 2006, Siddiqui *et al.*, 2016). En nuestro estudio, el estrés hídrico provocó reducción en el CRA de las láminas de *C. ciliaris*. En particular, la reducción fue mayor en el genotipo sensible (RN1) que en el genotipo tolerante (RN51). Es ampliamente conocido que las plantas reaccionan al déficit hídrico con un cierre rápido de los estomas debido a la disminución de la turgencia foliar y la presión de vapor atmosférico (Ashraf y Harris, 2013), evitando así una mayor pérdida de agua por transpiración (Huseynova *et al.*, 2012, Habermann *et al.*, 2019). Al respecto, cabe destacar que el genotipo tolerante siempre tuvo mayor ET, independientemente del nivel hídrico. Sin embargo, en condiciones de recuperación, la ET disminuyó en ambos genotipos, a pesar de estar todas las plantas con un nivel hídrico casi óptimo, esto podría deberse a una menor demanda atmosférica de agua por una saturación de humedad del ambiente (ensayo en cámara).

Nuestros resultados sugieren que el genotipo tolerante podría tener mejor capacidad para regular las relaciones hídricas intracelulares que el genotipo susceptible y, por lo

tanto, mantener un mejor crecimiento durante la restricción de agua. Además, ha sido ampliamente documentado que la reducción del CRA está relacionada con las propiedades de la membrana celular y su adaptabilidad a los cambios ambientales (Amari *et al.*, 2017). Chen *et al.*, (2016) y Jian *et al.*, (2012), encontraron resultados similares y mencionaron que regresar al estado anterior al estrés es crucial para la recuperación, ya que implica la reordenación de las vías metabólicas para reparar el daño inducido por el estrés hídrico y reanudar el crecimiento de las plantas. Sin embargo, en nuestro estudio al aumentar el tiempo en que las plantas estuvieron expuestas al estrés, el genotipo susceptible no alcanzó a retornar a los valores de su control durante la rehidratación.

El daño al PSII es a menudo la primera manifestación de estrés (Maxwell y Johnson, 2000). Las mediciones de fluorescencia de clorofila se han convertido en un método ampliamente utilizado para investigar el daño del aparato fotosintético y una herramienta poderosa para estudiar las respuestas de las plantas al estrés ambiental (Ings *et al.*, 2013; Kalaji *et al.*, 2017), incluidos los ensayos de estrés hídrico (Silva *et al.*, 2010, Siddiqui *et al.*, 2016, Lone *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2019). En este estudio, cuando las plantas estuvieron expuestas al tratamiento de estrés hídrico, se observaron alteraciones en la mayoría de las mediciones de fluorescencia de la clorofila (los parámetros de la prueba OJIP).  $F_v / F_m$  mostró valores inferiores a 0,83, lo que sugirió que las plantas crecían en condiciones de estrés y que los centros de reacción de PSII estaban dañados (Kalaji *et al.*, 2017). A diferencia de  $F_v/F_m$ , que utiliza sólo valores extremos de fluorescencia de clorofila, el índice de desempeño (PI) es un indicador de la vitalidad de la planta que incorpora múltiples parámetros, que incluyen absorción, captura de la energía de excitación, transporte de electrones más allá de la plastoquinona primaria y disipación de la energía de excitación (Ings *et al.*, 2013). En nuestro estudio, este parámetro se vio significativamente afectado en el genotipo susceptible, lo que sugiere una reducción del suministro de energía de los pigmentos captadores de luz hacia los centros de reacción (RC). Además, el genotipo susceptible tuvo la mayor absorción de energía por centro de reacción ( $ABS / RC$ ) en condiciones de estrés hídrico, seguido de un aumento de la disipación de calor por centro de reacción ( $DI_o / RC$ ), lo que sugiere que los centros de reacción de PSII se dañaron y la energía de luz excesiva fue acumulada en proporciones más altas que en el genotipo tolerante. Varios autores encontraron resultados similares (Huseynova *et al.*, 2012, Lepeduš *et al.*, 2012, Luna *et al.*, 2018, Zhao *et al.*, 2019). Con

respecto a todos los parámetros medidos, el genotipo tolerante mostró mejor capacidad para mantener la integridad del aparato fotosintético cuando fue expuesto al estrés hídrico. En particular, después de la rehidratación durante la etapa de recuperación, los valores de la mayoría de los parámetros de fluorescencia de la clorofila se restauraron a valores similares a los del tratamiento de control en ambos genotipos. Sin embargo, cuando el tiempo de exposición al estrés fue mayor, el genotipo susceptible mantuvo las diferencias respecto a su control en algunos parámetros. Esto último podría sugerir que la reducción de los daños asociados al tratamiento de estrés hídrico en los sistemas fotosintéticos de las plantas es la base de una rápida recuperación después de la rehidratación, reflejado en este caso por el comportamiento del genotipo tolerante.

El contenido de MDA ha sido considerado un indicador de daño oxidativo en varios cultivos, incluidos las gramíneas forrajeras (Bi *et al.*, 2016). En este trabajo se observó asociación negativa entre el contenido de MDA y el valor de FRAP, indicando menor peroxidación lipídica en láminas y mayor poder antioxidante total en el genotipo tolerante (RN51) en concordancia con las observaciones realizadas por Tommasino *et al.* (2018) bajo estrés térmico por calor. Los valores absolutos registrados fueron mayores con el incremento de la duración del estrés, acentuando la diferencia entre tratamientos.

Está bien establecido que las enzimas antioxidantes son extremadamente importantes como estrategia de adaptación general utilizada por las plantas para superar el estrés oxidativo al desintoxicar las EAO. Al respecto, nuestros resultados mostraron que cuando los genotipos fueron expuestos al estrés hídrico, el genotipo tolerante presentó mayor actividad de SOD. En base a trabajos anteriores de nuestro grupo (Lanza Castelli *et al.*, 2010, López Colomba *et al.*, 2013, Tommasino *et al.*, 2018), el genotipo tolerante podría tener mayor y más prolongada capacidad para catalizar la dismutación/secuestro de  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  bajo condiciones de estrés, que es el primer paso para eliminar EAO. Además, podría sugerir que la enzima SOD puede desempeñar un papel importante a través de procesos de señalización en la protección antioxidante del daño causado por la reducción en la disponibilidad hídrica. Berwal y Ram (2018) mencionaron similares comentarios. Sin embargo, el genotipo sensible (RN1) mostró el valor más alto en esta enzima antioxidante a las 24 horas después de la rehidratación. Resultado que también se observó en Kentucky bluegrass (Bian *et al.*, 2009) y trigo (Abid *et al.*, 2018) bajo estrés hídrico.

Este comportamiento podría sugerir que el proceso de recuperación después de la rehidratación no necesariamente limitó la producción de EAO en el genotipo sensible, por lo tanto, la defensa antioxidante todavía estaba activa.

Se han reportado diferentes resultados sobre la actividad de la enzima CAT, como inducción, reducción o actividad CAT estable bajo estrés hídrico y recuperación (Bian *et al.*, 2009, Gill y Tuteja 2010, Anwar Hossain *et al.*, 2013, Boaretto *et al.*, 2014, Bi *et al.*, 2016, Jin *et al.*, 2016). En este trabajo, durante el período de estrés, el genotipo tolerante mostró mayor actividad CAT en las láminas de *C. ciliaris* en comparación con el genotipo sensible, lo que sugiere que, a pesar de la afinidad relativamente baja por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la enzima CAT podría eliminar eficientemente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fotorrespiratorio y mantener las concentraciones estimadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peroxisomal. En consideración de los resultados aquí obtenidos, CAT podría ser considerada una enzima clave para superar el estrés oxidativo impuesto por el estrés hídrico (Waszczak *et al.*, 2018, Xie *et al.*, 2019). Wang y col. (2016) mencionaron conclusiones similares en trigo. Después de la rehidratación, la tendencia mencionada anteriormente se revirtió. En comparación con el control, una mayor magnitud de aumento en la concentración de la enzima CAT en las láminas del genotipo susceptible en comparación con las del genotipo tolerante podría indicar la posible necesidad de eliminar EAO cuando las plantas se rehidratan. Estas diferencias específicas de cultivares en la capacidad de inducir la enzima antioxidante podrían explicar parcialmente las diferencias en la tolerancia al estrés hídrico, lo que condice con el trabajo realizado en trigo por Abid *et al.*, (2018).

El ciclo glutatión-ascorbato (AsA-GSH) involucra cuatro enzimas, entre ellas, APX es la alternativa con un mecanismo de desintoxicación más efectivo frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, operando tanto en cloroplastos como en el citosol (Pandey *et al.*, 2017). En este trabajo, se observó mayor actividad de APX en el genotipo tolerante bajo estrés hídrico y en el tratamiento de recuperación, mientras que el genotipo susceptible no mostró actividad después de la rehidratación. Sofo *et al.*, (2015) mencionaron en su estudio que los genes que codifican APX son particularmente importantes para mantener dos antioxidantes no enzimáticos (ascorbato y glutatión) y que están directa o indirectamente involucrados en el mantenimiento de altas tasas de fotosíntesis en plantas en condiciones ambientales adversas. De esta manera, el mejor desempeño del RN51 para hacer frente al estrés

hídrico podría estar relacionado con mayores cantidades de estos antioxidantes. Además, el ascorbato participa en otras funciones, como el crecimiento de las plantas, la regulación genética y la modulación de varias enzimas. De esta manera, estudios complementarios sobre la expresión génica de los genes APX serían necesarios para establecer su papel en la tolerancia de *C. ciliaris*.

Las modificaciones en las relaciones hídricas de las láminas, la capacidad fotosintética y el sistema de defensa antioxidante observadas en el tratamiento de estrés hídrico tanto en el genotipo tolerante como en el susceptible, estuvieron acompañadas de cambios en los tejidos foliares y su lignificación. Varios estudios han demostrado que el estrés abiótico conduce a la activación rápida de la expresión de enzimas relacionadas con la vía de biosíntesis de lignina (Chen *et al.*, 2019) y más de una docena de enzimas están involucradas tales como CCR, COMT y CCoAOMT, las cuales juegan un papel importante en el proceso de regulación de lignificación (Liu *et al.*, 2018, Christensen y Rasmussen, 2019). En este estudio, el nivel de transcripción del gen CCoAOMT disminuyó en el genotipo susceptible, mientras que la expresión del gen CCR aumentó en los tejidos de la lámina del genotipo tolerante al ser expuestos al estrés hídrico tanto a tiempos cortos como prolongados del mismo. Por otro lado, la expresión diferencial del gen COMT, sólo fue detectada cuando el estrés hídrico fue de mayor duración, la cual se incrementó en el genotipo tolerante y disminuyó en el genotipo susceptible. Los estudios realizados en maíz y caña de azúcar han demostrado que la reducción en la expresión de genes que codifican las enzimas CCoAOMT, CCR y COMT conduce a una disminución en el contenido de lignina (Christensen y Rasmussen, 2019). Teniendo en cuenta los resultados aquí mencionados, un mejor desempeño del genotipo tolerante bajo estrés hídrico y rehidratación podría estar relacionado con el aumento de la lignificación de los tejidos foliares a través de un aumento de los genes involucrados en la biosíntesis de la lignina. Por otra parte, diversos estudios han mencionado que los tejidos lignificados son el factor más relevante en la reducción de la calidad del forraje (Grabber *et al.*, 2004, Stabile *et al.*, 2011, El Hage *et al.*, 2018). Sin embargo, posteriores estudios serán necesarios para determinar el efecto de los períodos de estrés hídrico y recuperación sobre parámetros de calidad del forraje en los genotipos aquí evaluados, como se profundizará en el próximo capítulo.

Las plantas se adaptan al estrés hídrico del medio ambiente a través de una variedad de mecanismos (Basu *et al.*, 2016). En este sentido, la arquitectura de las láminas juega un papel vital en la resistencia a una variedad de factores estresantes, incluido el estrés hídrico (Hameed *et al.*, 2012). Además, las modificaciones estructurales, como el grosor de la lámina y la epidermis y el desarrollo de células bulliformes, pueden estar directamente relacionadas con la tolerancia al estrés hídrico (Hameed *et al.*, 2010, 2012; Arias *et al.*, 2018; Mustafa *et al.*, 2019 Selim *et al.*, 2019). También se ha mencionado que el estrés hídrico provoca aumento en las células del esclerénquima y en el grosor de la pared celular (Basu *et al.*, 2016; de Paula *et al.*, 2019). En este trabajo, después de 21 días de permanecer en condiciones de estrés hídrico, el área del esclerénquima del genotipo tolerante aumentó significativamente y las células bulliformes mostraron gran desarrollo, cambios anatómicos que se intensificaron aún más al prolongarse el período de estrés. Estas adaptaciones a la restricción en la disponibilidad de agua podrían sugerir estrategias para aumentar el almacenamiento de la misma y prevenir la pérdida a través del desarrollo de células bulliformes, y fortalecer los haces vasculares a través de la esclerificación de los tejidos. Debido a la presencia de estas células de paredes delgadas que contienen agua, las hojas pueden enrollarse durante el estrés hídrico (Fang *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2018; Cal *et al.*, 2019). En la bibliografía se describen conclusiones similares para diversas especies (Basu *et al.*, 2016; Mustafa *et al.*, 2019; Shehzadi *et al.*, 2019), incluida *C. ciliaris* (Nawazish *et al.*, 2006; Mansoor *et al.*, 2019).

En la producción de forrajes, es importante mantener el equilibrio entre calidad (considerada como digestibilidad de la pared celular) y rendimiento de biomasa (como producción de materia seca), que podría verse alterado por el estrés abiótico y la capacidad de recuperación de las plantas. Se ha establecido que el estrés hídrico es una restricción muy limitante en el crecimiento de estas y la producción de cultivos (Amari *et al.*, 2017). En el presente estudio y de acuerdo con los resultados obtenidos en *C. ciliaris* por otros autores (Amari *et al.*, 2017; Tommasino *et al.*, 2018), los parámetros morfológicos evaluados relacionados con el crecimiento se vieron afectados notablemente en condiciones de hídrico. A pesar de que los dos genotipos (susceptible y tolerante) no murieron cuando se expusieron tanto a tiempos cortos como prolongados de estrés hídrico, el genotipo sensible mostró la mayor reducción en dichos parámetros, diferencia que fue mantenida durante la rehidratación.

## **CONCLUSIONES**

Los dos genotipos que fueron evaluados pudieron tolerar el estrés hídrico y se recuperaron de la condición de estrés a la que fueron expuestos. Sin embargo, ambos genotipos difirieron significativamente en su respuesta. Los resultados obtenidos indican que existen varios mecanismos de adaptación mediante los cuales los genotipos tolerantes hacen frente al estrés hídrico. La capacidad para regular la peroxidación de lípidos y mitigar el daño oxidativo en respuesta al estrés hídrico y la posterior rehidratación, así como el mantenimiento de un contenido relativo de agua en niveles altos y la manifestación de características adaptativas foliares (grosor de la epidermis adaxial, células buliformes bien desarrolladas), y una lignificación tisular pronunciada.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abid M., Ali S., Qi L. K., Zahoor R., Tian Z., Jiang D., Snider J. L., Dai T. 2018. Physiological and biochemical changes during drought and recovery periods at tillering and jointing stages in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Science Reports* 8: 4615.
- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- Amari T., Saidi I., Taamali M., Abdelly C. 2017. Morphophysiological changes in *Cenchrus ciliaris* and *Digitaria commutata* subjected to water stress. *International Journal of Plant Research* 7: 12-20.
- Anwar Hossain M., Golam Mostofa M., Fujita M. 2013. Heat-shock positively modulates oxidative protection of salt and drought-stressed mustard (*Brassica campestris* L.) seedlings. *Journal of plant science molecular breeding* 2: 2
- Arias C., Serrat X., Moysset L., Perissé P, Nogués S. 2018. Morpho-physiological responses of *Alamo switchgrass* during germination and early seedling stage under salinity or water stress conditions. *Bioenergy Research* 11: 677-688.
- Ashraf M., Harris P. J. C. 2013. Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* 51: 163-190.
- Bakhtiari M. A., Saeidnia F., Majidi M. M., Mirlohi A. 2019. Growth traits associated with drought survival, recovery and persistence of cocksfoot (*Dactylis glomerata*) under prolonged drought treatments. *Crop and Pasture Science* 70: 85-94.
- Barr H. D., Weatherley P. E. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* 15: 413-428.
- Basu S., Ramegowda V., Kumar A., Pereira A. 2016. Plant adaptation to drought stress. *F1000Research* 5: 1554.
- Beauchamp C. O., Fridovich I. 1973. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 317: 50-64.
- Beloni T., Pezzopane C. D. G., Rovadoscki G. A., Fávero A. P., Dias-Filho M. B., Santos P. M. 2017. Morphological and physiological responses and the recovery ability of *Paspalum* accessions to water deficit and waterlogging. *Grass and Forage Science* 72(4), 840-850.
- Benzie I. F., Strain J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76.
- Berwal M. K., Ram C. 2018. Superoxide dismutase: a stable biochemical marker for abiotic stress tolerance in higher plants. In: Shanker, A. (Ed.), *Abiotic Stress*. INTECH Open Access Publisher
- Bi A., Fan J., Hu Z., Wang G., Amombo E., Fu J., Hu T. 2016. Differential acclimation of enzymatic antioxidant metabolism and photosystem II photochemistry in tall fescue under drought and heat and the combined Stresses. *Frontiers in Plant Science* 7: 453.
- Bian S., Jiang Y. 2009. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. *Scientia Horticulturae* 120: 264-270.

- Boaretto L., Carvalho G., Borgo L., Creste S., Landell M. G. A., Mazzafera P., Azevedo R. A. 2014. Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry* 74: 165–175.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cal A. J., Sanciangco M., Rebolledo M. C., Luquet D., Torres R. O., McNally K. L., Henry A. 2019. Leaf morphology, rather than plant water status, underlies genetic variation of rice leaf rolling under drought. *Plant Cell and Environment* 42: 1532-1544.
- Carloni E., Ribotta A., Colomba E. L., Griffa S., Quiroga M., Tommasino E., Grunberg K. 2014. Somatic embryogenesis from in vitro anther culture of apomictic buffel grass genotypes and analysis of regenerated plants using flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 117: 311-322.
- Chen D., Wang S., Cao B., Cao D., Leng G., Li H., Yin L., Shan L., Deng X. 2016. Genotypic variation in growth and physiological response to drought stress and re-watering reveals the critical role of recovery in drought adaptation in maize seedlings. *Frontiers in Plant Science* 6: 1241.
- Chen X., Wang H., Li X., Ma K., Zhan Y., Zeng F. 2019. Molecular cloning and functional analysis of 4-Coumarate: CoA ligase 4 (4CL-like 1) from *Fraxinus mandshurica* and its role in abiotic stress tolerance and cell wall synthesis. *BMC Plant Biology* 19: 231.
- Christensen C. S., Rasmussen S. K. 2019. Low lignin mutants and reduction of lignin content in grasses for increased utilization of lignocellulose. *Agronomy* 9: 256.
- D'Ambrogio de Argüeso A 1986. Manual de técnicas en Histología vegetal. Hemisferio Sur S.A, Buenos Aires.
- de la Casa A. C., Ovando G. G. 2014. Climate change and its impact on agricultural potential in the central region of Argentina between 1941 and 2010. *Agricultural and Forest Meteorology* 195: 1-11.
- de Paula L. F., Kolb R. M., Porembski S., Silveira F. A., Rossatto D. R. 2019. Rocks and leaves: Can anatomical leaf traits reflect environmental heterogeneity in inselberg vegetation? *Flora* 250: 91-98.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C. W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- El Hage F., Legland D., Borrega N., Jacquemot M. P., Griveau Y., Coursol S., Méchin V., Reymond M. 2018. Tissue lignification, cell wall p-coumaroylation and degradability of maize stems depend on water status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66: 4800-4808.
- Fang Y., Xiong L. 2015. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72: 673-689.
- Fu J., Huang B. 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 45: 105-114.
- Gill S. S., Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.

- Grabber J. H., Ralph J., Lapierre C., Barrière Y. 2004. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin–cell wall matrix interactions. *Comptes Rendus Biologies* 327: 455-465.
- Habermann E., Dias de Oliveira E. A., Contin D.R., Delvecchio G., Viciado D. O., de Moraes M. A., de Mello Prado R., de Pinho Costa K. A., Braga M. R., Martinez C. A. 2019. Warming and water deficit impact leaf photosynthesis and decrease forage quality and digestibility of a C4 tropical grass. *Physiologia Plantarum* 165: 383-402.
- Hameed M., Ashraf M., Naz N., Al-Qurainy F. 2010. Anatomical adaptations of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. from the Salt Range Pakistan to salinity stress. I. Root and stem anatomy. *Pakistan Journal of Botany* 42: 279-289.
- Hameed M., Batool S., Naz N., Nawaz T., Ashraf M. 2012. Leaf structural modifications for drought tolerance in some differentially adapted ecotypes of blue panic (*Panicum antidotale* Retz.). *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 1479-1491.
- Heath R. L., Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Hodges D. M., DeLong J. M., Forney C. F., Prange R. K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611.
- Hui D., Yu C. L., Deng Q., Dzantor E. K., Zhou S., Dennis S., Luo Y. 2018. Effects of precipitation changes on switchgrass photosynthesis, growth, and biomass: A mesocosm experiment. *PloS One*, 13(2), e0192555.
- Huseynova I. M. 2012. Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817: 1516-1523.
- Ings J., Mur L. A., Robson P. R., Bosch M. 2013. Physiological and growth responses to water deficit in the bioenergy crop *Miscanthus x giganteus*. *Frontiers in Plant Science* 4: 468.
- Jia X. L., Wang G. L., Xiong F., Yu X. R., Xu Z. S., Wang F., Xiong A. S. 2015. De novo assembly, transcriptome characterization, lignin accumulation, and anatomic characteristics: novel insights into lignin biosynthesis during celery leaf development. *Scientific Reports* 5: 8259.
- Jiang Y., Yao Y., Wang Y. 2012. Physiological response, cell wall components, and gene expression of switchgrass under short-term drought stress and recovery. *Crop Science* 52: 2718-2727.
- Jin R., Wang Y., Liu R., Gou J., Chan Z. 2016. Physiological and metabolic changes of purslane (*Portulaca oleracea* L.) in response to drought, heat, and combined stresses. *Frontiers in Plant Science* 6: 1123.
- Kalaji H. M., Schansker G., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Ferroni L., Goltsev V., Guidi L., Jajoo A., Li P., Losciale P., Mishra V. K., Misra A. N., Nebauer S. G., Pancaldi S., Penella C., Pollastrini M., Suresh K., Tambussi E., Yannicari M., Zivcak M., Cetner M. D., Samborska I. A., Stirbet A., Olsovska K., Kunderlikova K., Shelonzek H., Rusinowski S., Bałba W. 2017. Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynthesis Research* 132: 13-66.
- Lanza Castelli S., Grunberg K., Muñoz N., Griffa S., Colomba E. L., 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.
- Lepeduš H., Brkić I., Cesar V., Jurković V., Antunović J., Jambrović A., Brkić J., Šimić D. 2012. Chlorophyll fluorescence analysis of photosynthetic performance in seven maize inbred lines under water-limited conditions. *Periodicum Biologorum* 114: 73-76.
- Li Z., Peng Y., Ma X. 2013. Different response on drought tolerance and post-drought recovery between the small-leafed and the large-leafed white clover (*Trifolium repens* L.) associated with antioxidative enzyme protection and lignin metabolism. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 213-222.
- Liu Q., Luo L., Zheng L. 2018. Lignins: biosynthesis and biological functions in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 335.
- Liu Y., Wu Q., Ge G., Han G., Jia Y. 2018. Influence of drought stress on alfalfa yields and nutritional composition. *BMC Plant Biology* 18: 13.
- Lo Bianco R., Scalisi A. 2017. Water relations and carbohydrate partitioning of four greenhouse-grown olive genotypes under long-term drought. *Trees* 31: 717-727.
- Lone A. A., Jumaa S. H., Wijewardana C., Taduri S., Redona E. D., Reddy K. R. 2019. Drought stress tolerance screening of elite American breeding rice genotypes using low-cost pre-fabricated mini-hoop modules. *Agronomy* 9: 199.
- López Colomba E., Tommasino E., Luna C., Griffa S., Carloni E., Ribotta A., Quiroga M., Grunberg K. 2013. Differential salt-stress response during germination and vegetative growth in in vitro selected somaclonal mutants of *Cenchrus ciliaris* L. *South African Journal of Botany* 87: 157-163.
- Luna D. F., Pons A. B. S., Bustos D., Taleisnik E. 2018. Early responses to Fe-deficiency distinguish *Sorghum bicolor* genotypes with contrasting alkalinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 155: 165-176.
- Mansoor U., Fatima S., Hameed M., Naseer M., Ahmad M. S. A., Ashraf M., Ahmad F., Waseem M. 2019. Structural modifications for drought tolerance in stem and leaves of *Cenchrus ciliaris* L. ecotypes from the Cholistan Desert. *Flora* 261: 151485.
- Maxwell K., Johnson G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
- Mizuno M., Kamei M., Tsuchida H. 1998. Ascorbate peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low-temperature storage. *IUBMB Life* 44: 717-726.
- Mustafa F., Ahmad F., Hameed M., Sadia B. 2019. Anatomical adaptations for drought tolerance in *Lasiurus scindicus* from Punjab, Pakistan. *Int J Agric Biol* 22: 290-298.
- Nakano Y., Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880.
- Nasca J. A., Feldkamp C. R., Arroquy J. I., Colombatto D. 2015. Efficiency and stability in subtropical beef cattle grazing systems in the northwest of Argentina. *Agricultural Systems* 133: 85-96.
- Nawazish S., Hameed M., Naurin S. 2006. Leaf anatomical adaptations of *Cenchrus ciliaris* L. from the Salt Range, Pakistan against drought stress. *Pakistan Journal of Botany* 38: 1723-1730.
- Pandey S., Fartyal D., Agarwal A., Shukla T., James D., Kaul T., Negi Y.K., Arora S., Reddy M. K. 2017. Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase. *Frontiers in Plant Science* 8: 581.

- Pfaffl M. W., Horgan G. W., Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30: e36
- Ploschuk E. L., Bado L. A., Salinas M., Wassner D. F., Windauer L. B., Insausti P. 2014. Photosynthesis and fluorescence responses of *Jatropha curcas* to chilling and freezing stress during early vegetative stages. *Environmental and Experimental Botany* 102: 18-26.
- Rasouli F., Kiani-Pouya A. 2015. Photosynthesis capacity and enzymatic defense system as bioindicators of salt tolerance in triticale genotypes. *Flora* 214: 34-43.
- Rampino P., Pataleo S., Gerardi C., Mita G., Perrotta C. 2006. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant Cell and Environment* 29: 2143-2152.
- Selim D. A. F. H., Nassar R. M. A., Boghdady M. S., Bonfill M. 2019. Physiological and anatomical studies of two wheat cultivars irrigated with magnetic water under drought stress conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 135: 480-488.
- Shehzadi A., Akram N. A., Ali A., Ashraf M. 2019. Exogenously applied glycinebetaine induced alteration in some key physio-biochemical attributes and plant anatomical features in water stressed oat (*Avena sativa* L.) plants. *Journal of Arid Land* 11: 292-305.
- Siddiqui Z. S., Shahid H., Cho J. I., Park S. H., Ryu T. H., Park S. C. 2016. Physiological responses of two halophytic grass species under drought stress environment. *Acta Botanica Croatica* 75: 31-38.
- Silva E. N., Ferreira-Silva S. L., de Vasconcelos Fontenele A., Ribeiro R. V., Viégas R. A., Silveira J. A. G. 2010. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. *Journal of Plant Physiology* 167: 1157-1164.
- Simon B., Conner J. A., Ozias-Akins P. 2013. Selection and validation of reference genes for gene expression analysis in apomictic and sexual *Cenchrus ciliaris*. *BMC Research Notes* 6: 397.
- Sofa A., Scopa A., Nuzzaci M., Vitti A. 2015. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 13561-13578.
- Stabile S. D. S., Bodini A. P., Jank L., Rennó F. P., Santos M. V. D., Silva L. F. P. 2012. Expression of genes from the lignin synthesis pathway in guineagrass genotypes differing in cell-wall digestibility. *Grass and Forage Science* 67: 43-54.
- Strasser R. J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. 2004. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In Papageorgiou, G.C., Govindjee (Eds.), *Chlorophyll a fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Springer, Netherlands, Dordrecht, pp. 321–362.
- Svec D., Tichopad A., Novosadova V., Pfaffl M. W., Kubista M. 2015. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification* 3: 9-16.
- Tommasino E., Griffa S., Grunberg K., Ribotta A., Lopez Colomba E., Carloni E., Quiroga M., Luna C. 2012. Malondialdehyde content as a potential biochemical indicator of tolerant *Cenchrus ciliaris* L. genotypes under heat stress treatment. *Grass and Forage Science* 67: 456-459.
- Tommasino E., López Colomba E., Carrizo M., Grunberg K., Quiroga M., Carloni E., Griffa S., Ribotta A., Luna C. 2018. Individual and combined effects of drought

- and heat on antioxidant parameters and growth performance in Buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) genotypes. *South African Journal of Botany* 119: 104-111.
- Turner N. C. 1986. Crop water deficit: a decade of progress. *Advances in Agronomy* 39: 1-51.
- Vandegeer R. K., Tissue D. T., Hartley S. E., Glauser G., Johnson S. N. 2020. Physiological acclimation of a grass species occurs during sustained but not repeated drought events. *Environmental and Experimental Botany* 171: 103954.
- Wang G. L., Huang Y., Zhang X. Y., Xu Z. S., Wang F., Xiong A. S. 2016. Transcriptome-based identification of genes revealed differential expression profiles and lignin accumulation during root development in cultivated and wild carrots. *Plant Cell Reports* 35: 1743-1755.
- Waszczak C., Carmody M., Kangasjärvi J. 2018. Reactive oxygen species in plant signaling. *Annual Review of Plant Biology* 69: 209-236.
- Xie X., He Z., Chen N., Tang Z., Wang Q., Cai Y. 2019. The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. *Hindawi BioMed Research International*
- Xu P., Ali A, Han B., Wu X. 2018. Current advances in molecular basis and mechanisms regulating leaf morphology in Rice. *Front Plant Sci* 9: 1528.
- Xu Z., Zhou G., Shimizu H. 2010. Plant responses to drought and rewatering. *Plant signaling & behavior* 5: 649-654.
- Zhao J., Lang Y., Zhang S., Zhao Q., Zhang C., Xia J. 2019. Photosynthetic characteristics and chlorophyll a fluorescence transient in *Lonicera japonica* under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 41: 124.
- Zhou Y., Huang L., Wei X., Zhou H., Chen X. 2017. Physiological, morphological, and anatomical changes in *Rhododendron agastum* in response to shading. *Plant Growth Regulation* 81: 23-30.

## **CAPÍTULO III**

### **EFFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO Y RECUPERACIÓN EN PARÁMETROS DE CALIDAD FORRAJERA**

#### **INTRODUCCIÓN**

Los escenarios climáticos futuros predicen fenómenos meteorológicos extremos, particularmente en las regiones secas subtropicales y de latitudes medias, con aumento de la frecuencia, intensidad y duración de las olas de calor, inundaciones y sequías (IPCC, 2018). El aumento en la frecuencia de sequías durante la temporada de crecimiento de las pasturas impacta en las características físicas y químicas de los forrajes, ya que acelera la senescencia de tejidos y disminuye fuertemente su calidad (Dumont *et al.*, 2015). En tal sentido, las plantas forrajeras cultivadas en regiones más cálidas y secas serían de menor calidad nutritiva que las cultivadas en regiones más frías y húmedas, contendrían mayores proporciones de fibra y lignina, y estarían asociadas con valores de digestibilidad más bajos (Giordano *et al.*, 2014; Hughes *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2018).

La calidad del forraje está directamente relacionada con el nivel de nutrientes que la planta proporciona a los animales (Mahyuddin *et al.*, 2008), lo cual depende de su composición química (Hughes *et al.*, 2014). La composición del forraje está influenciada por la fenología de la planta, las condiciones de crecimiento y el manejo (Batistoti *et al.*, 2012; Hugues *et al.*, 2014; Moura *et al.*, 2010). Las condiciones de crecimiento normalmente se ven afectadas por la temperatura y la lluvia, lo que produce una variación estacional en la tasa de crecimiento, la biomasa y la calidad del forraje (Haberman *et al.*, 2018).

El mejor parámetro que caracteriza la calidad del forraje es su digestibilidad, la cual se considera como la proporción de forraje que come un animal y que utiliza para satisfacer sus necesidades de nutrientes (Buxton *et al.*, 1995), es decir la proporción de materia seca ingerida que no aparece en heces. Comúnmente, a medida que aumenta el contenido de fibra del forraje, su valor nutricional disminuye (Ball *et al.*, 2001; El Hage *et al.*, 2018; Grabber *et al.*, 2004; Stabile *et al.*, 2012). La fibra forrajera es un material heterogéneo que incluye hemicelulosa, celulosa y una menor cantidad de lignina. En este sentido, la fibra detergente neutro (FDN) caracteriza la fracción de materia seca del forraje compuesta por hemicelulosa, celulosa y lignina, mientras que la fibra detergente ácido (FDA) el contenido de celulosa y lignina (Habermann *et al.*, 2018). Estos componentes tienen una correlación negativa con la digestibilidad del forraje. De hecho, se le atribuye a la lignina el mayor impacto individual en la digestibilidad, siendo el principal factor que limita la digestión de los polisacáridos de la pared celular en el rumen (Stabile *et al.*, 2012; Baxter and Stewart, 2013; Batistoti *et al.*, 2012; Hugues *et al.*, 2014; Mahyuddin *et al.*, 2008). Ésta actúa como una barrera física para las enzimas microbianas responsables de la degradación de la celulosa y hemicelulosa, limitando así, la energía digerible disponible para el animal (Giordano *et al.*, 2014). Al respecto, Van Soest (1994) señaló que la digestibilidad está inversamente relacionada con la lignificación.

Frente a condiciones de estrés hídrico, las plantas sufren modificaciones morfo-anatómicas como resultado de modificaciones de la pared celular vegetal (Hameed *et al.*, 2012; Al-Maskri *et al.*, 2014). En *C. ciliaris*, diversos autores mencionan que en condiciones de estrés hídrico se observaron cambios anatómicos, entre ellos una mayor lignificación de la pared celular reforzando los haces vasculares (Mansoor *et al.*, 2019). En el estudio mostrado en el capítulo II, el mayor contenido en lignina manifestado en el genotipo tolerante, estuvo acompañado también por un aumento de la expresión génica de enzimas de la biosíntesis de lignina (Carrizo *et al.*, 2021).

La mayoría de los métodos de evaluación de alimentos implican la determinación de la composición química y estimación de la digestibilidad (Mahyuddin *et al.*, 2008). Las estimaciones de laboratorio de la digestibilidad del forraje, particularmente los ensayos de digestibilidad ruminal *in vitro*, son costosos, consumen mucho tiempo y requieren animales fistulados donantes de fluido ruminal (Hugues *et al.*, 2014). Más aún, el análisis del valor nutritivo por técnicas de laboratorio convencional implica altos costos en



tiempo y equipamiento y la manipulación de drogas peligrosas. Una alternativa es la tecnología NIRS (Espectroscopía en Infrarrojo Cercano), un método instrumental de rápida respuesta, no destructivo y bajo costo operativo que se basa en la propiedad única de cada muestra para absorber energía infrarroja, que a su vez está relacionada a su composición química. La tecnología NIRS permite estimar el valor nutritivo del forraje en forma rápida, con alta precisión y bajo costo operativo, lo que las hace particularmente apropiadas para su empleo en los programas de mejoramiento genético de especies forrajeras (Juan *et al.*, 2020).

Un estudio integral, en el que se tenga en cuenta todas las estrategias adaptativas, bioquímicas, fisiológicas, anatómicas y morfológicas, que contribuyen a la tolerancia al estrés hídrico en *C. ciliaris*, teniendo en cuenta el impacto sobre la calidad forrajera, no se ha llevado a cabo hasta el momento. Es por ello, que en este trabajo se planteó el siguiente objetivo:

### **OBJETIVO ESPECÍFICO**

Determinar el efecto del estrés hídrico en parámetros relacionados con calidad forrajera: Fibra Detergente Neutra (FDN), Fibra Detergente Ácida (FDA), Lignina Detergente Ácida (LDA), Proteína Bruta (PB) y digestibilidad de la materia seca (DMS), en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* L.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Material Vegetal**

En este experimento, se utilizaron los genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* L., (RN51 y RN1) (Lanza Castelli *et al.*, 2010; Tommasino *et al.*, 2012; 2018) descritos en el Capítulo II.

## **ENSAYO A CAMPO**

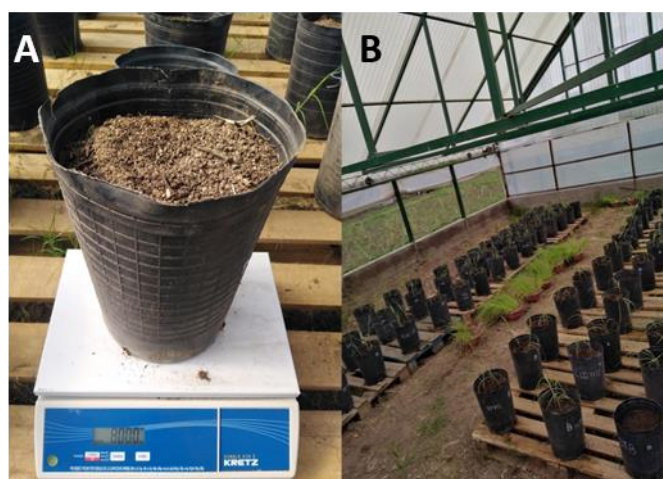
### **Condiciones generales de crecimiento y tratamientos**

El ensayo se realizó en el predio del CIAP-INTA (31° 28' 3.900" S, 64° 8' 51.864" O), durante el período noviembre de 2019 a febrero de 2020, para lo cual se utilizó una estructura rain-out shelter (Fig. 3.1), la misma al poseer el techo removible sobre rieles, permitió excluir el agua de las precipitaciones al cubrir las unidades experimentales y de esta manera controlar el contenido hídrico del suelo (CHS) en cada tratamiento.

Se sembraron semillas de cada genotipo en almácigos, y cuando las plantas alcanzaron los 15 cm de altura (hoja extendida) y un estadio de tres hojas completamente desplegadas fueron trasladadas para su rusticación al lugar donde posteriormente fueron trasplantadas. Para todos los tratamientos, se trasplantaron dos plantas de cada genotipo en macetas (20 cm de diámetro × 40 cm de profundidad) que contenían 8 kg de sustrato de arena y suelo (1:1) previamente secado en estufa a 105 °C durante 48 h para eliminar el contenido de humedad (Fig. 3.2). El CHS se determinó por método gravimétrico, de igual manera a la descrita en el capítulo II. Después del trasplante, las macetas se regaron a capacidad de campo (CC), la cual representa el 100% del CHS y luego se mantuvieron al 80% del CHS hasta el inicio de los tratamientos.



**Fig. 3.1.** Ensayo a campo con estructura rain-out shelter. A. Genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* L., (RN51 y RN1) en macetas dentro de la estructura rain-out shelter. B. Detalle de las plantas en el momento de muestreo.

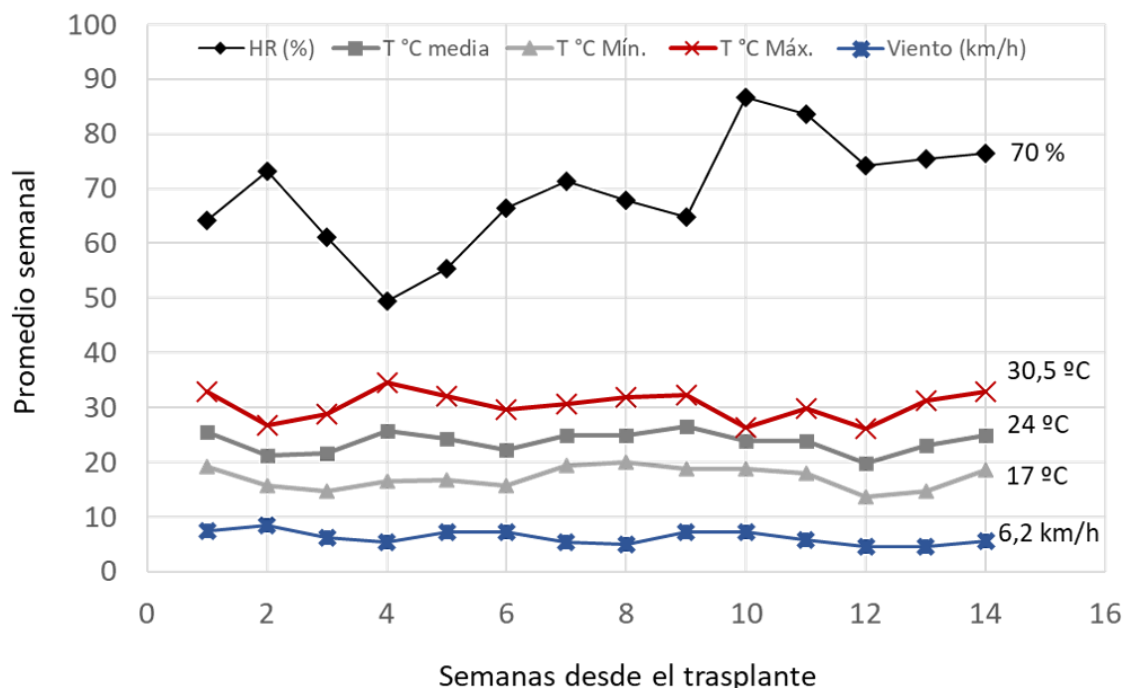


**Fig. 3.2.** Trasplante en macetas del ensayo a campo bajo estructura rain-out shelter. A. Pesaje de macetas. B. Trasplante de los genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* L., (RN51 y RN1) en macetas dentro de la estructura rain-out shelter.

### *Datos climáticos durante el período del ensayo*

Los datos promedio semanales se obtuvieron a través de datos públicos proporcionados por el Ministerio de Agricultura y Ganadería de Córdoba (Gestión de estaciones meteorológicas CLIMA (OMIXOM). Estación Camino 60 cuadras AgriculturaCba: 30057. (<https://magenta.omixom.com/accounts/login/?next=/>)). La temperatura media promedio registrada durante el ensayo fue de 23,8 °C, con una temperatura máxima promedio de 30,5 °C y una mínima de 17,1 °C, mientras que la

humedad relativa y la velocidad del viento promedio fueron de 69,3% y 6,23 km/h, respectivamente (Fig. 3.3).



**Fig. 5** Datos climáticos semanales registrados durante el ensayo. Temperatura (°C) media, máxima y mínima, humedad relativa (%) y velocidad del viento (Km/h).

#### *Tratamiento de estrés hídrico*

Luego del trasplante, las macetas se dividieron en dos grupos: 1) plantas control: las plantas se regaron diariamente al 80% del CHS durante todo el período experimental y 2), plantas en tratamiento de estrés hídrico: en este tratamiento se suspendió el riego de las macetas hasta alcanzar el 20% del CHS y se mantuvieron durante 40 días en esta condición.

Con la finalidad de evaluar parámetros bioquímicos, se tomaron muestras de hojas de plantas de cada tratamiento, control y estrés hídrico, a las 24 y 72 h luego de haber alcanzado el 20% de CHS (Fig. 3.4). Los parámetros fisiológicos, morfológicos y de

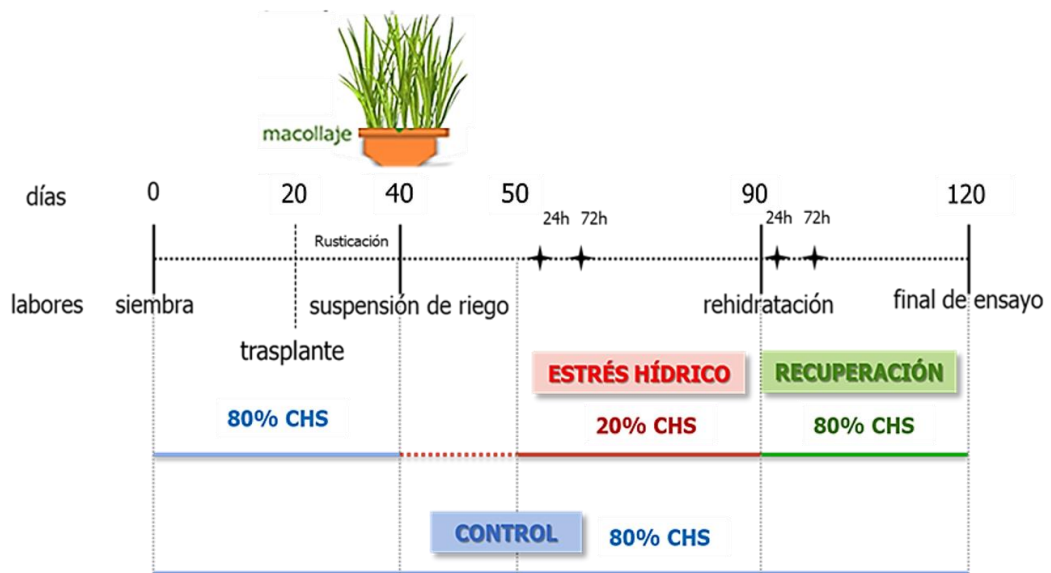
calidad forrajera se evaluaron cumplidos los 40 días de estrés hídrico (a los 90 días desde la siembra).

### *Tratamiento de recuperación*

El tratamiento de recuperación se realizó siguiendo el protocolo descrito en el capítulo II (ensayo a tiempo largo). Las macetas con plantas en tratamiento de estrés hídrico se regaron al 80% de CHS durante un total de 30 días.

A fin de evaluar parámetros bioquímicos, se tomaron muestras de plantas de cada tratamiento, control y recuperación, a las 24 y 72 h luego de haber alcanzado las macetas nuevamente el 80% de CHS. Los parámetros fisiológicos, morfológicos y de calidad forrajera se evaluaron cumplidos los 30 días de recuperación.

Se realizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones, donde cada repetición a su vez se compuso por ocho macetas (subrepeticiones), por genotipo y tratamiento.



**Fig. 3.4.** Esquema representativo de los tiempos de muestreo correspondientes al ensayo a campo de estrés hídrico y recuperación.

## **Evaluación de parámetros fisiológicos**

La determinación del Contenido Relativo de Agua (CRA) y la medición de parámetros asociados a la Fluorescencia de la clorofila y JIP test, se realizaron siguiendo las técnicas descritas en el Capítulo II.

## **Evaluación de parámetros bioquímicos**

*Determinación del contenido de malondialdehído (MDA) y del Poder reductor total mediante la medición de la capacidad reductora férrica del ensayo de plasma (FRAP)*

La determinación del contenido de malondialdehído (MDA) y del Poder reductor total mediante la medición de la capacidad reductora férrica del ensayo de plasma (FRAP) se realizaron siguiendo las metodologías de Heath y Packer (1968) y Benzie y Strain (1996), respectivamente, descritas en el Capítulo II.

*Contenido de azúcares solubles*

Para establecer el contenido de azúcares totales se molieron aproximadamente 100 mg de la muestra, en mortero con aire líquido, con 1 ml de buffer ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES). El extracto formado se centrifugó a 4 °C, durante 30 minutos, a 12000 rpm. Luego se mezcló 0,5 ml de sobrenadante con 1 ml del reactivo de Antrona al 0,2% (Fales, 1951). Posteriormente, se incubó a 100 °C durante 5 min, y luego se enfriaron los tubos a temperatura ambiente. El extracto obtenido se cuantificó por absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU640B. Los valores de absorbancia a 620 nm fueron referidos a una curva de sacarosa al 0,6 mg/ml, con un valor de  $R^2$  superior al 0,95. Los resultados fueron expresados en  $\mu\text{g}$  de sacarosa por mg de peso fresco.

### ***Evaluación de parámetros morfológicos***

La evaluación de los parámetros morfológicos se realizó en cuatro plantas (sin parte radical) por cada tratamiento, genotipo y repetición después de 90 días después de la siembra y al final del tratamiento de recuperación (120 días después de la siembra). En dichas plantas se midieron los siguientes caracteres: altura de planta y peso fresco y seco aéreo (A, PFA y PSA, respectivamente) utilizando la metodología descrita en el Capítulo II (ensayo a tiempo largo). Por otro lado, se registró el peso seco radicular de dichas plantas. Los valores porcentuales en los resultados representan el aumento o la disminución del valor promedio del tratamiento de estrés en comparación con el valor promedio del tratamiento control. Los mismos se calcularon utilizando la fórmula descrita en el Capítulo II.

### ***Relación Hoja:Tallo y Número de macollos***

Al final de cada tratamiento, se recolectaron muestras de planta entera y se secaron en estufa a 60°C. De las plantas enteras, se separaron láminas y tallos (tallos+vainas) y se registró el peso seco de cada una de las partes para establecer la relación Hoja:Tallo. Al mismo tiempo se contabilizó el número de macollos de cada tratamiento, genotipo y repetición.

### **Evaluación de parámetros de calidad forrajera mediante tecnología Espectroscopía en Infrarrojo Cercano (NIRS)**

La tecnología NIRS (Espectroscopía en Infrarrojo Cercano), es un método instrumental de rápida respuesta, se basa en la propiedad única de cada muestra para absorber energía infrarroja, que a su vez está relacionada a su composición química (Juan *et al.*, 2020) Previo al uso de NIRS, se desarrollaron en *Cenchrus ciliaris*, modelos predictivos (calibraciones), para cada constituyente de la materia seca, que relacionan los espectros de absorción NIRS con la concentración del constituyente medida por técnicas de laboratorio.

Las muestras separadas en láminas y tallos (tallos+vainas), se molieron con molino a cuchillas a 2 mm. La absorción de radiación en infrarrojo cercano de cada muestra se recogió por duplicado con un equipo FOSS DS-2500, modo reflectancia, rango 400-2500 nanómetros con mediciones cada 0,5 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de la materia seca de lámina y tallo por separado, siendo éstos los que se mencionan a continuación: FDN (celulosa, hemicelulosa y lignina), FDA (celulosa y lignina), Lignina y Digestibilidad de la materia seca (DMS).

### **Análisis estadístico**

Para las comparaciones entre medias en las variables CRA, PSII, contenido de azúcares solubles, parámetros morfológicos y de calidad forrajera, se utilizaron modelos lineales, mixtos y generales y se aplicó ANAVA para un modelo bifactorial con interacción entre los factores genotipo y tratamiento en un diseño completamente aleatorizado con ocho repeticiones. Para MDA y FRAP, se aplicaron interacciones de dos y tres vías (genotipo x tratamiento x tiempo de medición). Se realizó como *test a posteriori*, la prueba de Fisher al 5% de nivel de significancia ( $P \leq 0,05$ ) utilizando el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2020). Las barras de error en los gráficos indican el error estándar.

En todos los parámetros medidos donde se observaron diferencias significativas para la doble interacción genotipo x contenido hídrico, los cambios (en términos de valor porcentual) relativos a las plantas en condiciones control se calcularon utilizando la fórmula descrita en el Capítulo II.



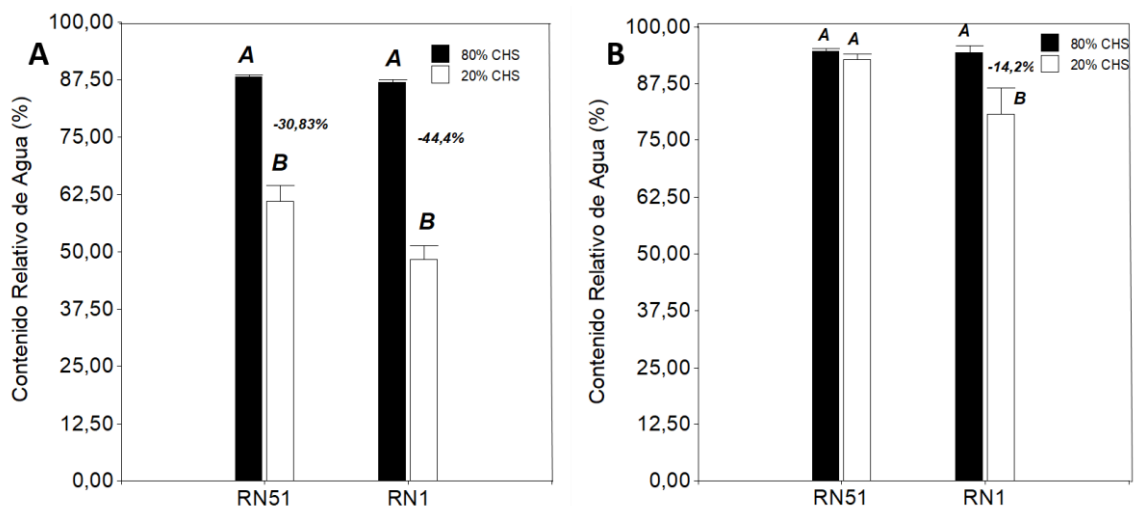
## RESULTADOS

### *Evaluación de Parámetros Fisiológicos*

#### *Contenido Relativo de Agua*

Para esta variable evaluada, hubo diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para la doble interacción genotipo x contenido hídrico bajo condiciones de estrés hídrico y recuperación. En el primer caso (Fig. 3.5A), el genotipo RN51 en condiciones de control mostró el valor más alto de CRA (88,15%), registrando una disminución del 30,83% respecto a condiciones de estrés hídrico (61%). Por otro lado, RN1 fue el genotipo que registró el valor más bajo para esta variable (48,34%), mostrando una reducción significativa ( $P \leq 0,05$ ) del 44,4% respecto a su control (87%).

En el tratamiento de recuperación (Fig. 3.5B), el genotipo tolerante RN51, recuperó el valor de CRA (93%) sin mostrar diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) con su respectivo control (94,66%). Por otro lado, si bien el genotipo susceptible RN1 incrementó el valor de CRA (80,93%), mantuvo una diferencia significativa ( $P \leq 0,05$ ) del 14,5% respecto a su control (94,33%).



**Fig. 3.5.** Contenido relativo de agua en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) en condiciones de estrés hídrico (A) y recuperación (B). Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Las barras de error indican el error estándar.

### *Fluorescencia de la clorofila y parámetros JIP test*

En la Tabla 3.8, se presentan el promedio y error estándar para cada parámetro de fluorescencia en condiciones de estrés hídrico. En relación con la variable  $F_v/F_m$ , se observaron diferencias significativas en la doble interacción genotipo x contenido hídrico ( $P \leq 0,05$ ). El genotipo RN1 durante el estrés hídrico registró el menor valor (0,56), diferenciándose en un 25% al valor obtenido en condiciones control (0,75). Por otro lado, el genotipo RN51 frente al estrés hídrico, no mostró diferencias significativas respecto a su control. En cuanto a los flujos de energía específicos (por centro de reacción), la absorción de energía ( $ABS_o/RC$ ) se incrementó considerablemente en RN1 (33%) en el tratamiento de estrés hídrico en comparación con las condiciones de control, mientras que RN51 en el tratamiento de estrés hídrico no se diferenció significativamente respecto a su control. La misma tendencia se observó para la disipación de energía luminosa como calor latente (representado por  $DI_o/RC$ ). En condiciones de estrés hídrico sólo el genotipo RN1 aumentó significativamente  $DI_o/RC$  ( $> 1000\%$ ) en comparación con las plantas control.

**Tabla 3.1.** Parámetros de fluorescencia medidos en dos genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) en condiciones control y estrés hídrico. Los valores representan las medias  $\pm$  EE.

Parámetros de fluorescencia	Control				Estrés hídrico			
	RN51		RN1		RN51		RN1	
t for Fm (*)	191,67 $\pm$ 34,92	B	228,33 $\pm$ 34,92	A	182,5 $\pm$ 30,24	B	296 $\pm$ 38,25	A
Area (*)	240520,33 $\pm$ 43898,68	A	247661,33 $\pm$ 43898,68	$\pm$ A	265844,5 $\pm$ 38017,37	A	140389,6 $\pm$ 48088,6	$\pm$ A
Fo (*)	4226,5 $\pm$ 138,25	B	4383,17 $\pm$ 138,25	B	4571,88 $\pm$ 119,73	A	5022,6 $\pm$ 151,45	$\pm$ A
Fm (**)	15873,17 $\pm$ 628,07	ab	17782,83 $\pm$ 628,07	a	15768,13 $\pm$ 543,93	b	11849,6 $\pm$ 688,02	$\pm$ c
Fv (**)	11746,67 $\pm$ 666,08	ab	13399,67 $\pm$ 666,08	a	11196,25 $\pm$ 576,84	b	6827 $\pm$ 729,65	c
Fv/Fm (**)	0,73 $\pm$ 0,02	a	0,75 $\pm$ 0,02	a	0,71 $\pm$ 0,02	a	0,56 $\pm$ 0,02	b
ABS/RC (**)	21,56 $\pm$ 1,28	ab	18,67 $\pm$ 1,28	b	21,33 $\pm$ 1,11	ab	24,83 $\pm$ 1,4	a
DIo/RC (**)	0,57 $\pm$ 1,41	b	0,46 $\pm$ 1,41	b	0,63 $\pm$ 1,23	b	9,07 $\pm$ 1,55	a
TRo/RC (*)	15,85 $\pm$ 0,55	A	14,05 $\pm$ 0,55	B	14,98 $\pm$ 0,48	A	13,44 $\pm$ 0,61	B
ETo/RC (*)	7,69 $\pm$ 1,86	A	2,44 $\pm$ 1,86	B	5,97 $\pm$ 1,61	A	0,68 $\pm$ 2,04	B
PI total (*)	14,75 $\pm$ 4,43	A	14,15 $\pm$ 4,43	A	16,22 $\pm$ 3,84	A	0,58 $\pm$ 4,86	A

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para la doble interacción (\*\*) y letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0,05$ ) (\*) para variables donde la doble interacción no fue significativa ( $P > 0,05$ ).

**Tabla 3.2.** Parámetros de fluorescencia medidos en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) en condiciones control y recuperación. Los valores representan las medias  $\pm$  EE.

Parámetros de fluorescencia	Control				Recuperación			
	RN51		RN1		RN51		RN1	
t for Fm (**)	172,5 $\pm$ 22,52	a	142,5 $\pm$ 14,88	b	167,5 $\pm$ 24,93	ab	188,75 $\pm$ 45,49	a
Area	139094,75 $\pm$ 20974,86	a	156100,63 $\pm$ 38873	a	135605,5 $\pm$ 17760,12	a	123101,88 $\pm$ 67200,55	a
Fo	3888,13 $\pm$ 212,17	a	4052 $\pm$ 195,68	a	4170,38 $\pm$ 234,72	a	3982,88 $\pm$ 1259,56	a
Fm	14883,13 $\pm$ 1405,4	a	13844,63 $\pm$ 1478,8	a	15581,63 $\pm$ 1337,55	a	13213 $\pm$ 4864,4	a
Fv	10995 $\pm$ 1305,8	a	9792,63 $\pm$ 1330,1	a	11411,25 $\pm$ 1358,02	a	9230,13 $\pm$ 3911,75	a
Fv/Fm (*)	0,74 $\pm$ 0,02	A	0,71 $\pm$ 0,03	B	0,73 $\pm$ 0,03	A	0,68 $\pm$ 0,08	B
ABS/RC (*)	20,79 $\pm$ 2,4	B	25,74 $\pm$ 3,36	B	19,8 $\pm$ 1,76	A	24,95 $\pm$ 5,23	A
DIo/RC	0,55 $\pm$ 0,08	a	2,11 $\pm$ 3,99	a	0,54 $\pm$ 0,11	a	3,98 $\pm$ 6,17	a
TRo/RC (*)	15,32 $\pm$ 1,78	B	18,08 $\pm$ 1,59	A	14,42 $\pm$ 0,78	B	16,56 $\pm$ 1,77	A
ETo/RC	0,77 $\pm$ 0,07	a	2,12 $\pm$ 3,48	a	0,72 $\pm$ 0,02	a	0,76 $\pm$ 0,08	a
PI total	1,8 $\pm$ 3,45	a	3,84 $\pm$ 6,22	a	0,53 $\pm$ 0,15	a	3,39 $\pm$ 5,63	a

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para la doble interacción (\*\*) y letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0,05$ ) (\*) para variables donde la doble interacción no fue significativa ( $P > 0,05$ ).

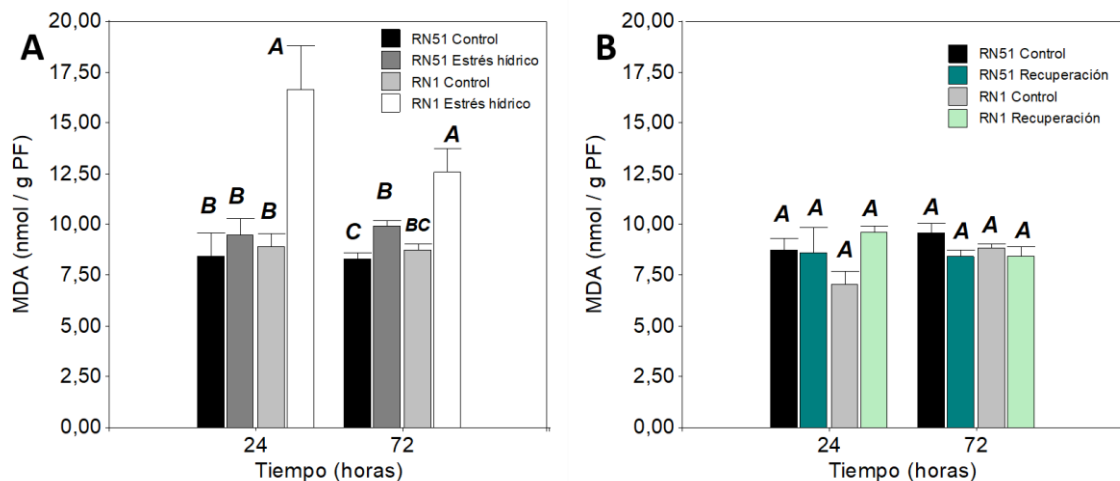
Con respecto al tratamiento de recuperación (Tabla 3.9), la mayoría de los parámetros mostraron valores semejantes al tratamiento control cuando se repuso el CHS, sin embargo, se registraron diferencias significativas en el tiempo para alcanzar Fm (t para Fm), mostrando el genotipo RN1 un valor 32% mayor en el tratamiento de recuperación respecto a su control. Por otro lado, si bien no se encontraron diferencias significativas para el parámetro Fv/Fm, RN1 fue el genotipo que registró el menor valor (0,68) (Tabla 3.9).

## Evaluación de parámetros bioquímicos

### Contenido en Malondialdeído (MDA)

En condiciones de estrés hídrico, se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en la doble interacción (genotipo x contenido hídrico). A las 24 horas, RN1 mostró un aumento del 86,54% en el contenido de MDA en comparación con su control (16,64 nmol g<sup>-1</sup> FW y 8,92 nmol g<sup>-1</sup> FW, respectivamente) diferenciándose significativamente ( $P \leq 0,05$ ) del mismo y registrando el mayor daño oxidativo. Por otro lado, el genotipo RN51 no mostró aumento significativo ( $P > 0,05$ ) del contenido de MDA entre el tratamiento de estrés hídrico y el control (9,48 nmol g<sup>-1</sup> FW y 9,43 nmol g<sup>-1</sup> FW, respectivamente; figura 3.6A). A las 72 horas se observó el mismo comportamiento en ambos genotipos.

En cuanto al tratamiento de recuperación (Fig. 3.6B), el contenido de MDA disminuyó en ambos genotipos, no registrándose diferencias significativas ( $P > 0,05$ ).

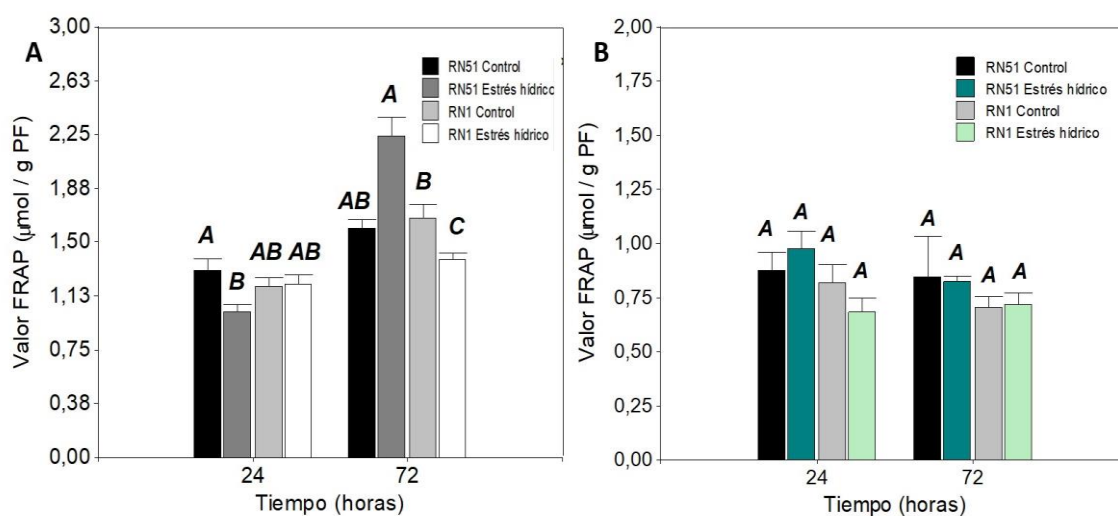


**Fig. 3.6.** Contenido en Malondialdeído (MDA) en dos genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) para dos contenidos hídricos del suelo (80% y 20% CHS) en condiciones de estrés hídrico (A) y recuperación (B) a las 24 y 72 h. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en cada tiempo de muestreo. Barras de error indican el error estándar.

*Poder reductor total mediante la capacidad reductora férrica del ensayo de plasma (FRAP)/ actividad antioxidante total*

Como se muestra en la Fig. 3.7A, a las 72 horas del tratamiento de estrés hídrico, y a diferencia de la hora 24, se observaron las mayores diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en esta variable para la doble interacción (genotipo x contenido hídrico). El genotipo RN51 aumentó la actividad antioxidante total en un 41% ( $2,24 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF), mientras que RN1 ( $1,38 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF) redujo la misma en un 17,4%, en comparación con sus correspondientes plantas control ( $1,59$  y  $1,67 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF para RN51 y RN1, respectivamente).

En el tratamiento de recuperación (Fig. 3.7B) en ambos tiempos de muestreo, si bien RN51 registró el mayor valor ( $0,98 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF) y RN1 el menor valor ( $0,69 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF), no se diferenciaron significativamente ( $P > 0,05$ ) de sus respectivos controles.

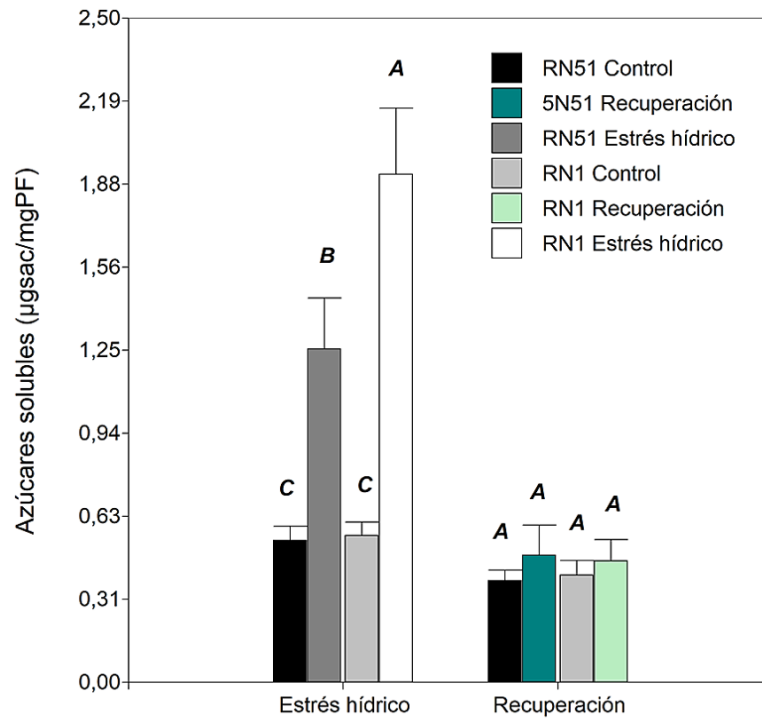


**Fig. 3.7.** Poder reductor total cuantificado mediante el ensayo FRAP en dos genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) en condiciones de estrés hídrico (A) y de recuperación (B) a las 24 y 72 horas de muestreo. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para cada tiempo de muestreo. Las barras de error indican error estándar.

*Contenido de azúcares solubles*

Frente a condiciones de estrés hídrico, ambos genotipos de *C. ciliaris* se diferenciaron significativamente ( $P \leq 0,05$ ) en el contenido de azúcares totales solubles respecto al tratamiento control; sin embargo, RN1 fue el genotipo que registró el mayor incremento

(73,3%). En relación con el tratamiento de recuperación, no se registraron diferencias significativas en la doble interacción genotipo x contenido hídrico ( $P > 0,05$ ), mostrando ambos genotipos similares valores en el contenido de azúcares solubles a sus respectivos controles (Fig. 3.8).



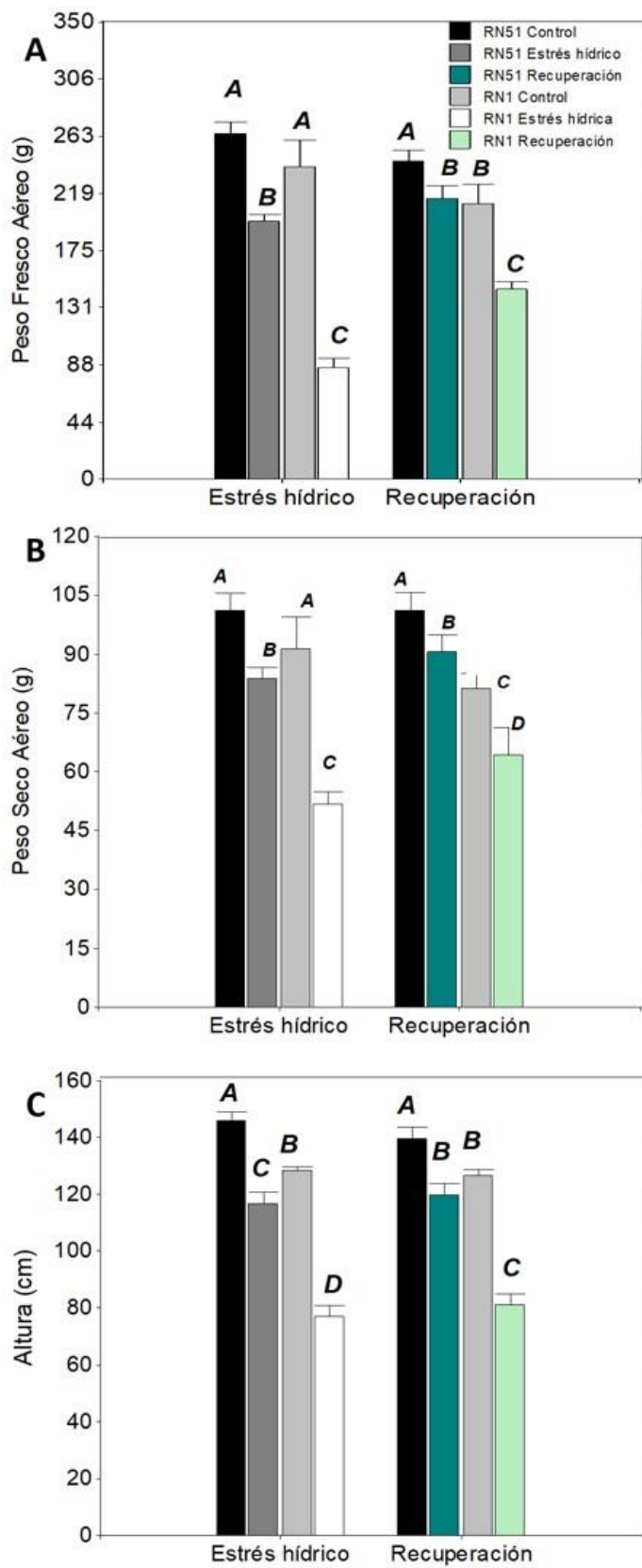
**Fig. 3.8.** Contenido de azúcares solubles ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de PF) en dos genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) en condiciones de estrés hídrico y de recuperación. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para cada condición de muestreo. Las barras de error indican error estándar.

### Evaluación de parámetros morfológicos

En general, cuando se aplicó el tratamiento de estrés hídrico, ambos genotipos de *C. ciliaris* mostraron disminución en todos los parámetros morfológicos respecto al tratamiento control; sin embargo, RN1 fue el genotipo que registró la mayor reducción. En condiciones de estrés hídrico, el PFA, PSA y A, mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en la doble interacción genotipo x contenido hídrico. El genotipo RN51 disminuyó su PFA un 25,3% respecto a su control, mientras que RN1 exhibió una reducción del 211,25%. La misma tendencia se observó en el tratamiento de

recuperación. Los porcentajes de disminución en RN51 y RN1 con respecto a su control, fueron 11,88% y 31,27%, respectivamente (Fig. 3.9A). Respecto al PSA, en condiciones de estrés hídrico, el genotipo RN51 exhibió disminución del 17,28% con respecto a su control, mientras que RN1 exhibió una reducción del 43,15%. La misma tendencia se observó en el tratamiento de recuperación. Los porcentajes de disminución en RN51 y RN1 con respecto a su control, fueron 10,5% y 20,8%, respectivamente (Fig. 3.9B). Se registró el mismo comportamiento respecto a la variable altura de la planta (A), siendo RN1 el genotipo que registró la mayor diferencia (40%) respecto a su control, la cual se mantuvo durante el tratamiento de recuperación (Fig. 3.9C).





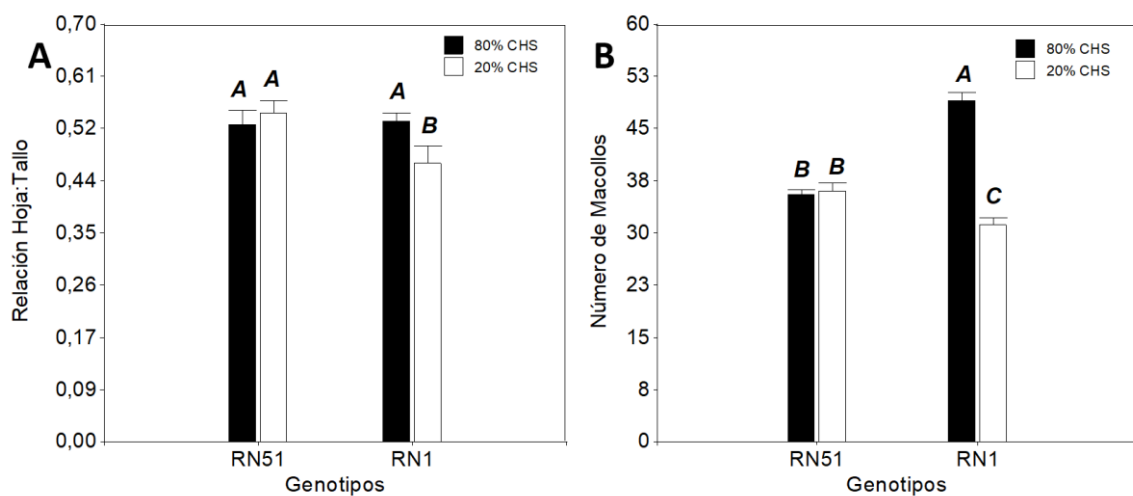
**Fig. 3.9.** Efecto del estrés hídrico en parámetros asociados al crecimiento. Peso Fresco Aéreo (A), Peso Seco Aéreo (B) y Altura de planta (C) en dos genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para la interacción entre genotipo y tratamiento. Las barras de error indican el error estándar.



**Fig. 3.10.** Efecto del estrés hídrico sobre parámetros morfológicos en los genotipos de *Cenchrus ciliaris* RN51 y RN1, bajo en condiciones de control y estrés hídrico, respectivamente.

#### *Relación Hoja: Tallo y número de macollos*

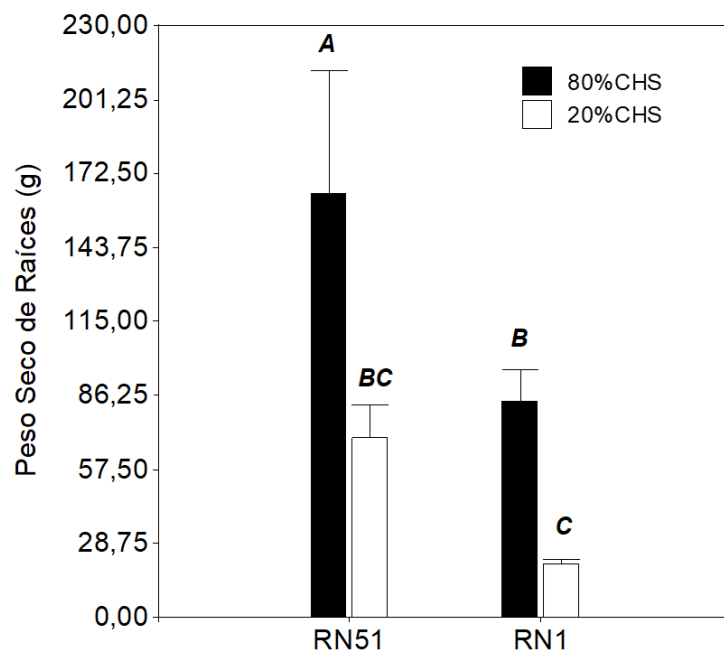
En cuanto a la relación Hoja:Tallo, durante el tratamiento de estrés hídrico, el genotipo RN1 mostró una disminución significativa de 13% respecto a su control, mientras que RN51 no se diferenció significativamente ( $P > 0,05$ ) del mismo (Fig. 3.11A). Similar tendencia fue observada para la variable Número de macollos, registrando el genotipo RN1 un descenso marcado del 36,4% respecto a su control, mientras que RN51 no mostró diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) (Fig. 3.11B).



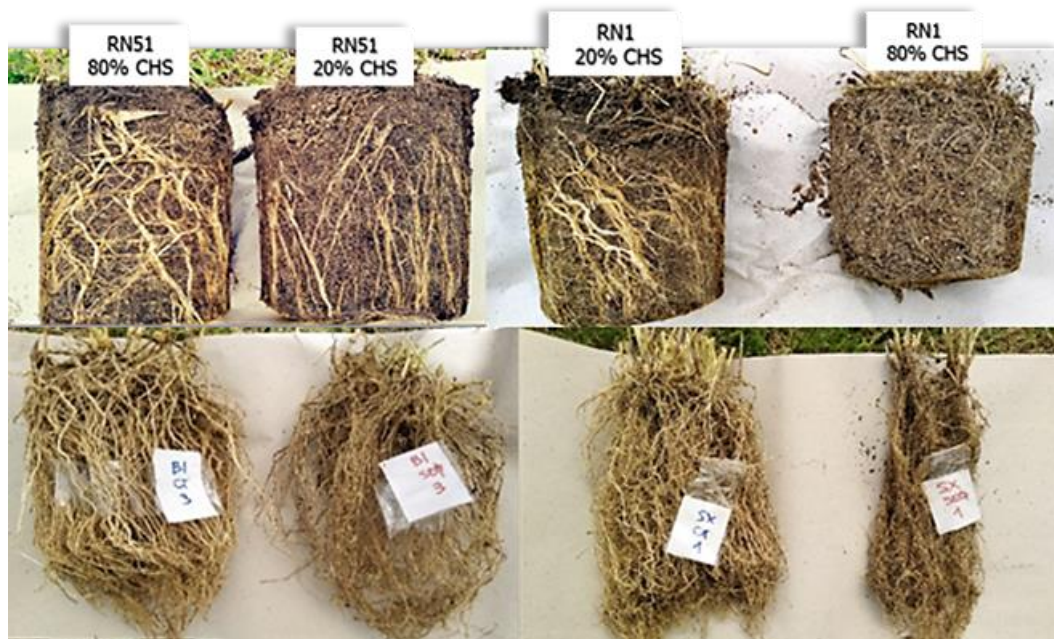
**Fig. 3.11.** Efecto del estrés hídrico en la relación Hoja:Tallo (A) y número de macollos (B) en dos genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para la interacción entre genotipo y tratamiento. Las barras de error indican el error estándar.

### *Peso Seco Radicular*

En condiciones de estrés hídrico, el peso seco radicular mostró diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en la doble interacción genotipo x tratamiento (Fig. 3.12). El genotipo RN51 disminuyó un 57,5% respecto a su control, mientras que RN1 exhibió una reducción del 76,3 %.



**Fig. 3.12.** Efecto del estrés hídrico en parámetros asociados al crecimiento radicular. Peso Seco de Raíces en dos genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para la interacción entre genotipo y tratamiento. Las barras de error indican el error estándar.



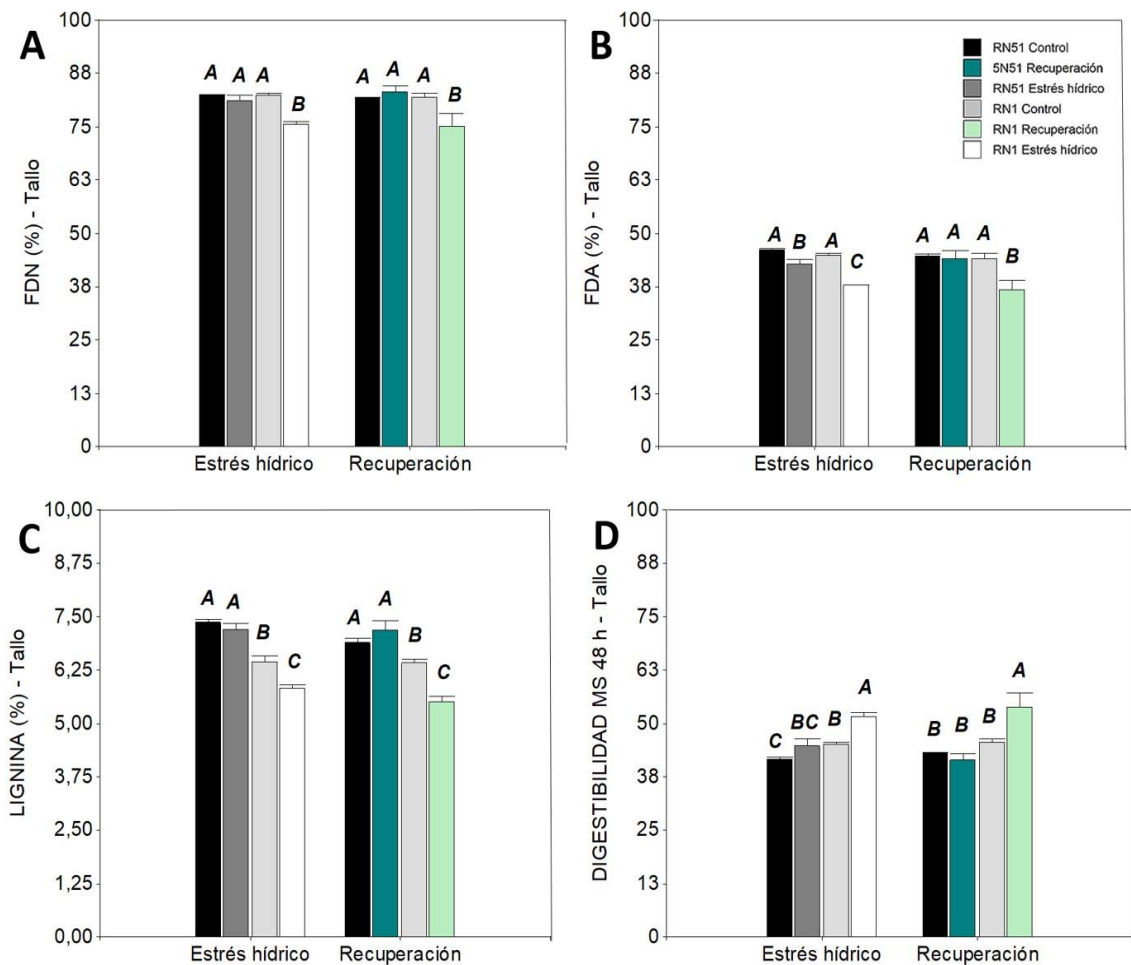
**Fig. 3.13.** Efecto del estrés hídrico sobre el desarrollo radicular de los genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* RN51 y RN1, en condiciones de control y estrés hídrico, respectivamente.

### **Evaluación de parámetros de calidad forrajera**

En general, en condiciones de estrés hídrico y recuperación, las variables de calidad evaluadas en tallo mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en la doble interacción genotipo x tratamiento. Con respecto al contenido de FDN, en condiciones de estrés hídrico, RN1 disminuyó un 8,4% respecto a su control, mientras que RN51 no se diferenció significativamente ( $P > 0,05$ ), observándose similar comportamiento en el tratamiento de recuperación (Fig. 3.14A). En cuanto al contenido de FDA, RN51 mostró disminución significativa respecto a su control (7,05%) en condiciones de estrés, siendo esta diferencia mayor en el genotipo RN1 (16%). En el tratamiento de recuperación el contenido de FDA aumentó en RN51, asemejándose a su control, mientras que RN1 mantuvo la diferencia con su control inicialmente observada en el tratamiento de estrés hídrico (Fig. 3.14B). Por otro lado, el mayor valor porcentual de LDA observado, fue en el genotipo RN51 (7%), sin mostrar diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre

tratamientos, mientras que, el menor valor fue registrado en RN1 (5,5%), registrándose una diferencia significativa ( $P \leq 0,05$ ) respecto a su control del 9,63% en condiciones de estrés hídrico y del 14% en recuperación (Fig. 3.14C).

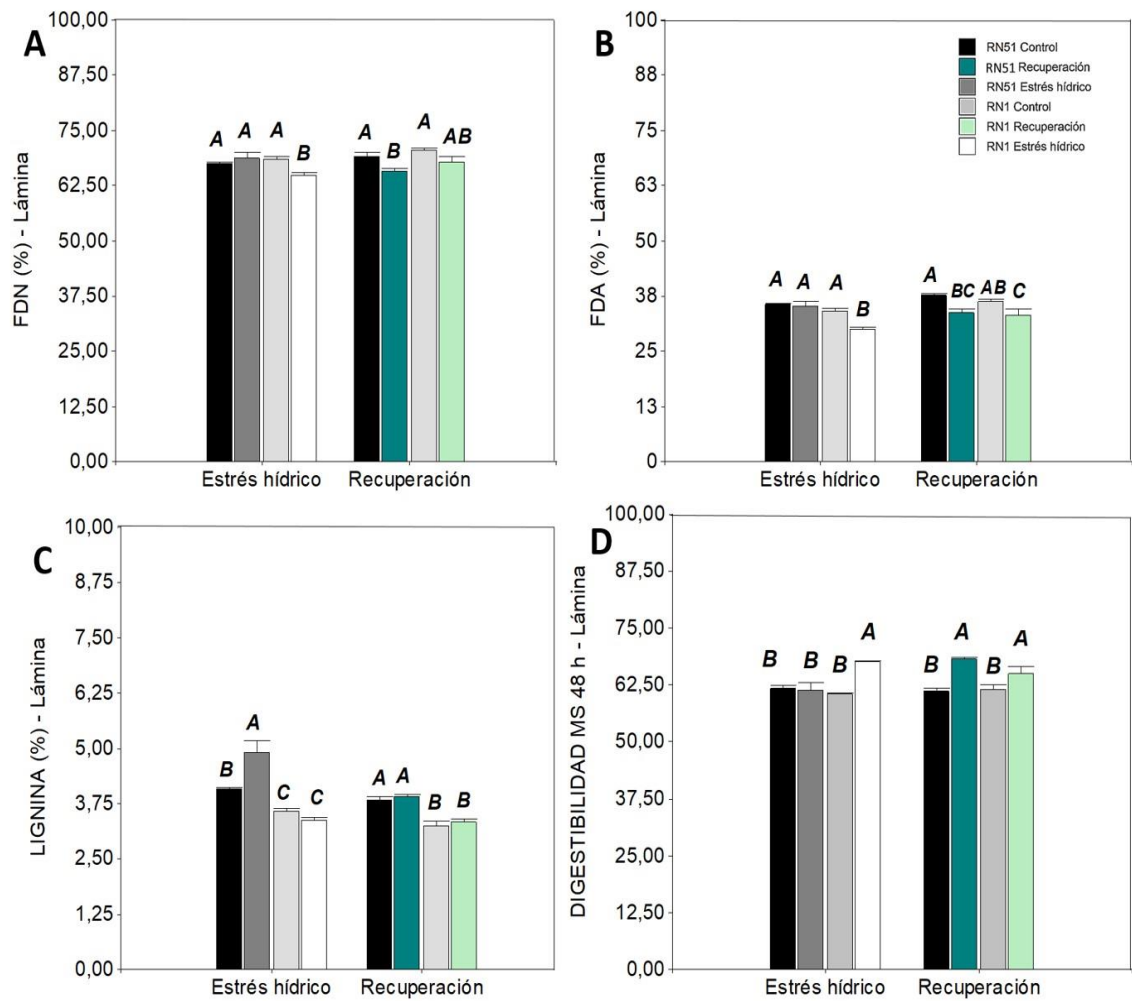
Finalmente, RN1 mostró el mayor valor de Digestibilidad de la materia seca (DMS), tanto en condiciones de estrés (51,6%) como en recuperación (53,8%), registrando un aumento significativo ( $P \leq 0,05$ ) respecto a su control de un 14,3% y 15,5%, respectivamente (Fig. 3.14D).



**Fig. 3.14.** Efecto del estrés hídrico en parámetros de calidad forrajera, FDN (A), FDA (B), Lignina (C) y Digestibilidad de la materia seca (D) en tallos de los genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris*, RN51 y RN1, en condiciones de estrés hídrico y recuperación. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para la interacción entre genotipo y tratamiento. Las barras de error indican el error estándar.

Las mismas variables de calidad forrajera evaluadas en lámina, también mostraron diferencias significativas en la doble interacción ( $P \leq 0,05$ ) genotipo x tratamiento. Con respecto al contenido de FDN, en estrés hídrico, RN1 disminuyó de manera significativa un 6% su valor respecto al control, mientras que RN51 no se diferenció significativamente ( $P > 0,05$ ). En el tratamiento de recuperación se observó disminución significativa respecto a sus correspondientes plantas control del 5 y 4%, en RN51 y RN1, respectivamente (Fig. 3.15A). En cuanto al contenido de FDA, en condiciones de estrés, RN51 (35,3%), no se diferenció significativamente ( $P > 0,05$ ) respecto a su control (35,6%), mientras que RN1 (30%) disminuyó significativamente ( $P \leq 0,05$ ) el valor respecto a su control (34,2%), registrando una reducción del 12,33%.

En el tratamiento de recuperación, el contenido de FDA se redujo en ambos genotipos con diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0,05$ ), exhibiendo RN51 un valor de 10,62% menor a su control, mientras que en RN1 esa diferencia fue del 8,51% (Fig. 3.15B). Por otro lado, el mayor valor porcentual de Lignina observado en condiciones de estrés hídrico fue en el genotipo RN51 (4,91%), diferenciándose significativamente ( $P \leq 0,05$ ) de su control (4%), mientras que, el menor valor fue registrado en RN1 (3,38%), sin mostrar diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) respecto a su control. En el tratamiento de recuperación, sólo hubo diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre genotipos, registrándose el mayor valor en RN51 (3,88%) y el menor valor en RN1 (3,3%) (Fig. 3.15C). Con relación a DMS, RN1 en condiciones de estrés hídrico mostró el mayor valor para esta variable (67,6%), diferenciándose significativamente ( $P \leq 0,05$ ) del resto. A diferencia de los resultados observados en condiciones de estrés hídrico, sólo se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre genotipos en condiciones de recuperación (53,8%), en el cual tanto RN51 como RN1, incrementaron la digestibilidad de manera significativa ( $P < 0,05$ ) respecto a sus correspondientes controles, de un 11,23% y 5,63%, respectivamente (Fig. 3.15D).



**Fig. 3.15.** Efecto del estrés hídrico en parámetros de calidad forrajera, FDN (A), FDA (B), LDA (C) y Digestibilidad de la materia seca (D) en láminas de los genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris*, RN51 y RN1, en condiciones de estrés hídrico y recuperación. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para la interacción entre genotipo y tratamiento. Las barras de error indican el error estándar.

## DISCUSIÓN

El comportamiento de los genotipos evaluados respecto a los mecanismos de adaptación fisiológicos frente al estrés hídrico fue similar a los descritos en el capítulo anterior, sin embargo, la diferencia observada entre tratamientos en términos absolutos fue mayor, lo que permitió reforzar el contraste entre ambos genotipos a campo.

El mantenimiento de las relaciones de agua de las hojas, la capacidad fotosintética y antioxidante, permitió a las plantas de *C. ciliaris* evadir el daño inducido por el estrés

hídrico. Sin embargo, en este caso y a diferencia de lo visto anteriormente, ambos genotipos recuperaron sus funciones fisiológicas después de la rehidratación, manifestado por un menor daño oxidativo y restauración de la funcionalidad del PSII. El contenido relativo de agua (CRA), tal como se mencionara previamente, es un buen indicador del mantenimiento hídrico adecuado en la planta (Rampino *et al.*, 2006, Siddiqui *et al.*, 2016). En este estudio, el estrés hídrico provocó una reducción del CRA de las láminas de *C. ciliaris*, la cual fue mayor en el genotipo susceptible (RN1). Durante la rehidratación, el genotipo tolerante recuperó completamente su estado hídrico, a diferencia del genotipo susceptible, el cual no alcanzó a restaurar totalmente el valor óptimo del CRA. Similar comportamiento en condiciones de estrés hídrico se observó en numerosas gramíneas forrajeras, incluida *C. ciliaris* (Ings *et al.*, 2013; Amari *et al.*, 2017). Por otro lado, y tal como se mencionara anteriormente, el daño al PSII es a menudo la primera manifestación de estrés (Maxwell y Johnson, 2000), más aún el proceso fotooxidativo conocido como fotoinhibición puede evaluarse mediante una reducción en  $F_v / F_m$ , que se utiliza como indicador de estrés (Macedo *et al.*, 2019). En este estudio, cuando las plantas estuvieron expuestas a estrés hídrico, se observaron alteraciones en la mayoría de las mediciones de fluorescencia de la clorofila (los parámetros de la prueba OJIP), siendo éstas más acentuadas en el genotipo susceptible, el cual mostró un considerable daño a la funcionalidad del PSII. Al respecto, el parámetro  $F_v / F_m$  resultó altamente afectado en condiciones de estrés hídrico, lo que sugirió que los centros de reacción del PSII estaban dañados (Kalaji *et al.*, 2017), reducción que fue significativamente más marcada en el genotipo susceptible. Además, el genotipo susceptible tuvo la mayor absorción de energía por centro de reacción ( $ABS / RC$ ) en condiciones de estrés hídrico, seguido de un marcado aumento de la disipación de este exceso de energía luminosa, como calor latente por centro de reacción ( $D_{Io} / RC$ ), sugiriéndose este comportamiento como un mecanismo fotoprotector (Luna *et al.*, 2018). Varios autores estudiando el efecto del estrés hídrico en gramíneas cultivadas como trigo (Huseynova *et al.*, 2012), maíz (Lepeduš *et al.*, 2012) y Kentucky bluegrass (Huang and Wang., 2005), encontraron un comportamiento similar en genotipos tolerantes vs. susceptibles a diferentes intensidades de estrés hídrico, lo que sugiere que el equilibrio entre la captura de luz y el uso de energía son de gran relevancia en los estudios sobre la capacidad de respuesta del aparato fotosintético en condiciones de estrés hídrico. En este trabajo en particular, después de la



rehidratación, los valores de la mayoría de los parámetros de fluorescencia de la clorofila se restauraron a valores similares a los del tratamiento control en ambos genotipos, tal como se observó en el ensayo a tiempo corto (Carrizo *et al.*, 2021). Este proceso de recuperación dinámica de la fotoinhibición posterior a un estrés (Ploschuk *et al.*, 2014), indicaría en este caso, la reversibilidad del impacto del estrés hídrico en la funcionalidad del PSII.

El efecto del estrés hídrico en *C. ciliaris* se relacionó con un mayor cierre de los centros de reacción, estimado por los cambios observados en la curva característica de la fluorescencia de la clorofila y un aumento del transporte de electrones a destinos alternativos a la vía fotosintética. Esta disfuncionalidad del aparato fotosintético condujo a un exceso en la producción de EROS tal como se menciona en otras especies (Ashraf, 2009, Huseynova *et al.*, 2012), lo cual incrementa el daño oxidativo. El daño celular por peroxidación de lípidos de membrana, medido a través del indicador de daño oxidativo (MDA) (Moller *et al.*, 2007, Bi *et al.*, 2016), fue mayor en el genotipo susceptible, tal como se observó en Tommasino *et al.*, (2018), situación que se revirtió durante el tratamiento de recuperación. Esto último difirió del comportamiento observado en Carrizo *et al.*, (2021), en donde el genotipo susceptible mantuvo altos valores de MDA durante las condiciones de recuperación. Esto podría deberse, como se discutirá más adelante, a una mayor acumulación de osmolitos (azúcares solubles) en el genotipo susceptible, protegiendo a la célula contra la deshidratación al estabilizar las estructuras de la membrana. Por otro lado, el genotipo tolerante, RN51, mostró mayor actividad del sistema de defensa antioxidante no enzimático, siguiendo la misma tendencia de ensayos anteriores.

Tal como se mencionara, el genotipo susceptible en condiciones de estrés hídrico registró el mayor contenido de azúcares en lámina. En condiciones de estrés, las plantas se ven privadas de energía debido al mal funcionamiento del aparato fotosintético (Fahad *et al.*, 2017). Al respecto, uno de los procesos que se afecta de manera importante por el estrés hídrico es el metabolismo primario como el de los carbohidratos. El almidón se degrada a azúcares solubles, lo que induce un aumento en el nivel de éstos en condiciones de estrés (Ghafar *et al.*, 2021). Según cita la bibliografía, las plantas expuestas a condiciones de estrés hídrico a menudo acumulan azúcar y sus derivados (Pattanagul,

2011). La acumulación de estos osmolitos puede ayudar a las plantas a tolerar la deshidratación al mejorar su capacidad para mantener el equilibrio osmótico dentro de la célula. Se han descrito beneficios adicionales de estos solutos, que incluyen el incremento del potencial redox celular, la protección de la célula contra la deshidratación al estabilizar las estructuras de la membrana y las proteínas y proporcionar una posible fuente de energía bajo estrés severo. Ghafar *et al.*, (2021), observaron en especies halófitas, que el nivel de azúcares solubles totales se incrementó significativamente en condiciones de estrés hídrico. Lo mismo fue observado en *Secale cereale* L. (Bao *et al.*, 2022). Además, la alteración en la partición de fotoasimilados entre los tejidos fuente y destino también podría haber contribuido a la acumulación de estos solutos (Pattanagul, 2011). Al respecto, el genotipo susceptible cuando fue expuesto a estrés hídrico mostró una disminución significativa de la relación Hoja:Tallo. Esta reducción, se explicó principalmente por la marcada caída del peso seco de las hojas más que por un aumento de peso de tallos; más aún, no sólo el peso de estos disminuyó, sino que el número de macollos también registró una fuerte disminución en condiciones de estrés. La marcada reducción del peso seco de las hojas del genotipo susceptible puede explicarse por una senescencia anticipada de las mismas. Es citado ampliamente en la bibliografía que el estrés abiótico induce la senescencia prematura de las hojas y altera las relaciones fuente-destino, lo cual resulta en una reducción del rendimiento de los cultivos (Merewitz *et al.*, 2011, Sade *et al.*, 2018). Las plantas utilizan una variedad de estrategias para hacer frente al estrés abiótico, dependiendo de la especie y del desarrollo de la planta (Volaire, 2018). La senescencia acelerada y la abscisión de las hojas son parte de una estrategia de "escape" por la cual las plantas disminuyen el tamaño de su canopia en respuesta al estrés (Tambussi *et al.*, 2005, Sade *et al.*, 2018).

La senescencia inducida por el estrés es una respuesta compleja que involucra muchos procesos, incluyendo entre otros la homeostasis hormonal de la planta, la asimilación de C y N de la "fuente" y relaciones fuente-destino (asignaciones de C y N). La senescencia de las hojas suele ser asociada con la disminución de los niveles endógenos de citoquininas, mientras que el ácido abscísico y el etileno aceleran el proceso (Sade *et al.*, 2018). Por otro lado, la disminución del consumo en los tejidos destino conduce a la acumulación de asimilados en las hojas fuente, produciendo inhibición de la retroalimentación de la fotosíntesis (Fahad *et al.*, 2017, Sade *et al.*, 2018). Uno de los

tejidos destino, es el sistema radicular. En este estudio se comparó el peso seco de las raíces, y se pudo observar una marcada reducción de este en el genotipo susceptible en condiciones de estrés hídrico, a diferencia del genotipo tolerante, el cual además exhibió gran desarrollo de rizomas. En plantas perennes el desarrollo del sistema radicular cobra gran importancia como almacenamiento de sustancias de reservas, asignando nutrientes para el crecimiento vegetativo durante el rebrote (Saedi *et al.*, 2013). Razón por la cual, las raíces son un órgano importante que contribuye a evitar el estrés abiótico, especialmente en condiciones de estrés hídrico, no sólo por el desarrollo de éstas en un sistema más denso y profundo que les permita una mayor exploración del suelo en búsqueda de humedad (Norton *et al.*, 2016), si no que permite una mayor recuperación de las plantas después del período de estrés (Sade *et al.*, 2018, Perlikowski *et al.*, 2019). Beneragama and Kumara, (2018), trabajando con pastos C4, observaron en condiciones de estrés hídrico un aumento en la partición de asimilados a las raíces, debido principalmente a la reducción absoluta en la biomasa aérea.

Por todo lo mencionado anteriormente, se puede afirmar que la tolerancia a condiciones de estrés hídrico en las plantas es un rasgo extremadamente complejo. Las plantas adoptan un conjunto de estrategias que abarcan aspectos moleculares, fisiológicos y morfológicos, para sobrevivir en condiciones de estrés hídrico (Amari *et al.*, 2017). Al respecto, en *C. ciliaris*, se pudo ver que las modificaciones en las relaciones hídricas de las hojas, la capacidad fotosintética y el sistema de defensa antioxidante observadas en estrés hídrico, estuvieron acompañadas de cambios en los tejidos foliares y su lignificación (Carrizo *et al.*, 2021). Esto último afecta a la composición química de los forrajes, modificando la calidad nutricional de los mismos (Hugues *et al.*, 2014; Habermann *et al.*, 2018).

Determinar el valor nutricional de los forrajes es importante en la alimentación animal, porque una producción ganadera eficiente está directamente relacionada con la cantidad de nutrientes aportados por los mismos. La calidad nutricional de los forrajes depende de la cantidad de proteínas y carbohidratos solubles altamente digeribles presentes en el alimento, mientras que es afectado por el contenido de hidratos de carbono estructurales que hacen a la fracción de fibra del forraje (Amiri *et al.*, 2012). Razón por la cual, a medida que aumenta el contenido de fibra del forraje, su valor nutricional, estimado a

través de la digestibilidad, disminuye (Ball *et al.*, 2001; El Hage *et al.*, 2018; Grabber *et al.*, 2004; Stabile *et al.*, 2012).

En este estudio, las variables de calidad forrajera evaluadas mostraron diferencias significativas en ambos genotipos en condiciones de estrés hídrico y recuperación. Si bien, la tendencia observada fue similar tanto en lámina como en tallo, el porcentaje de fibra fue mayor en este último. El genotipo susceptible, RN1, registró el menor contenido de FDN y FDA, mientras que el genotipo tolerante, RN51, mostró el mayor valor porcentual de lignina en condiciones de estrés hídrico y recuperación.

El mayor contenido en lignina en el genotipo tolerante condice con las modificaciones anatómicas observadas en *C. ciliaris* bajo estrés hídrico, como el mayor desarrollo de tejido esclerenquimático, y con el aumento de la expresión génica de enzimas de la biosíntesis de lignina (Carrizo *et al.*, 2021). A su vez, la menor fracción de fibra de la materia seca en el genotipo susceptible, RN1, se tradujo en los mayores valores de digestibilidad de este. Debido a que la lignina ha sido identificada como la principal responsable para limitar la digestibilidad de la fibra (Van Soest, 1994; 1991, Avilés-Nieto *et al.*, 2013), los genotipos que muestran alta concentración de lignina tienen baja digestibilidad (Thaikua *et al.*, 2015).

Los resultados aquí observados condicen con los descritos en numerosos estudios en diferentes especies forrajeras. Al respecto, Mansoor *et al.*, (2019), trabajando con *C. ciliaris*, observaron en ecotipos altamente tolerantes al estrés hídrico una mayor esclerificación en tallo y un aumento del número de haces vasculares. Similar comportamiento se observó en *Panicum maximum* bajo estrés hídrico y térmico (Habermann *et al.*, 2018). Por otro lado, Chen *et al.*, (2002), utilizaron festuca como sistema modelo, y observaron que los cambios a nivel anatómico, metabólico y molecular estuvieron estrechamente asociados y finalmente condujeron a los cambios en la digestibilidad. En *Brachiaria* spp., la digestibilidad de la materia seca, características morfológicas y contenido de agua se correlacionaron positivamente (Thaikua *et al.*, 2015).

Abundantes datos muestran correlaciones negativas entre la concentración de lignina en las plantas y la digestibilidad de la materia seca (Chávez *et al.*, 2002). Si bien la

lignina, y tal como se mencionara anteriormente, contribuye a la integridad estructural de los tejidos e hidrofobicidad de los elementos vasculares, la asociación de ésta con los carbohidratos de la pared celular dificulta el acceso de las enzimas microbianas y limitan fuertemente la hidrólisis enzimática de estos (Barrière *et al.*, 2009). Además de bloquear la liberación hidrolítica de azúcares de la celulosa, la lignina también puede liberar compuestos aromáticos que inhiben la fermentación (Byrt *et al.*, 2011).

Aunque es deseable un bajo contenido de lignina en los forrajes desde el punto de vista nutricional, el rendimiento de materia seca también es relevante en la producción forrajera. En general, una menor concentración de lignina favorece el vuelco de plantas y disminuiría la tolerancia al estrés hídrico, mientras que la concentración de lignina se ha correlacionado positivamente con rendimiento de materia seca (Daniel *et al.*, 2016). Esto condice con los resultados obtenidos en este trabajo. Los parámetros morfológicos evaluados relacionados con el crecimiento se vieron alterados notablemente en condiciones de estrés hídrico, siendo el genotipo susceptible el más afectado.

La comprensión del contenido de fibra, su composición, la degradación y los efectos sobre la disponibilidad de energía es esencial para mantener un suministro de nutrientes a los animales (Chávez *et al.*, 2002) y una mejor eficiencia de conversión energética de la biomasa lignocelulósica (Chen *et al.*, 2010).

## CONCLUSIÓN

En este capítulo se profundizaron aspectos relacionados con la calidad forrajera en materiales contrastantes de *Cenchrus ciliaris* en estrés hídrico y rehidratación, en condiciones semi-controladas de campo.

Teniendo en cuenta los parámetros bioquímicos y fisiológicos se puede concluir que las estrategias adaptativas que contribuyen a la tolerancia al estrés hídrico en *C. ciliaris*, estuvieron relacionadas con el mantenimiento del estado hídrico foliar y con la capacidad antioxidante. Esto reforzaría las conclusiones obtenidas en ensayos previos, detallados en el capítulo anterior.

En relación con a los parámetros morfológicos y parámetros relacionados con la calidad forrajera, si bien el estrés hídrico tuvo impacto sobre la producción de biomasa, el genotipo de mejor comportamiento frente a condiciones de estrés hídrico presentó menor daño en dicha producción como consecuencia de procesos de lignificación y consecuentemente una menor digestibilidad, afectando la calidad del forraje.

Conocer el balance entre producción de materia seca y digestibilidad de la misma es importante en términos de producción forrajera e impacto en la producción animal. En este trabajo, el balance parcial determinó que, bajo condiciones de estrés hídrico, la merma en producción de materia seca registrada en el genotipo susceptible fue mayor a las “pérdidas” registradas en calidad-digestibilidad en el genotipo tolerante.

## BIBLIOGRAFÍA

- Al-Maskri A., Hameed M., Ashraf M., Khan M.M., Fatima S., Nawaz T. 2014. Structural features of some wheat (*Triticum* spp.) landraces/cultivars under drought and salt stress. *Arid Land Research and Management* 28: 355–370.
- Amari T., Saidi I., Taamali M., Abdely C. 2017. Morphophysiological changes in *Cenchrus ciliaris* and *Digitaria commutata* subjected to water stress. *International Journal of Plant Research* 7: 12-20.
- Amiri F. 2012. Comparison of nutritive values of grasses and legume species using forage quality index. *Songklanakarinn Journal of Science & Technology* 34.
- Ashraf M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology advances* 27: 84-93.
- Avilés-Nieto J. N., Valle-Cerdán J. L., Castrejón-Pineda F., Angeles-Campos S., Vargas-Bello-Pérez E. 2013. Digestibility of Buffel grass (*Cenchrus ciliaris*)-based diets supplemented with four levels of *Gliricidia sepium* hay in hair sheep lambs. *Tropical Animal Health and Production* 45: 1357-1362.
- Ball D. M., Collins M., Lacefield G. D., Martin N. P., Mertens D. A., Olson K. E., Putnam D. H., Undersander D. J., Wolf M. W. 2001. Understanding forage quality. American Farm Bureau Federation Publication 1-01, Park Ridge, Illinois
- Bao G., Pan X., Yan B., Chang Y., Tang W., Qu Y., Zhao H. 2022. Resistance of Rye Seedlings to Drought and Freeze-Thaw Stress. *Polish Journal of Environmental Studies* 31: 1559-1568.
- Barrière Y., Mechin V., Lafarguette F., Manicacci D., Guillon F., Wang H., Tatout C. 2009. Toward the discovery of maize cell wall genes involved in silage quality and capacity to biofuel production. *Maydica* 54: 161-198.
- Batistoti C., Lempp B., Jank L., Morais M. D. G., Cubas A. C., Gomes R. A., Ferreira M. V. B. 2012. Correlations among anatomical, morphological, chemical and agronomic characteristics of leaf blades in *Panicum maximum* genotypes. *Animal feed science and technology* 171: 173-180.
- Baxter H. L., Stewart C. N. 2013. Effects of altered lignin biosynthesis on phenylpropanoid metabolism and plant stress. *Biofuels* 4: 635–650.
- Beneragama C. K., Kumara G. D. K. 2018. Evaluation of Bermuda grass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) and Bahia grass (*Paspalum notatum* Flugge) for short-term drought tolerance targeting low-maintenance landscaping. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology* 6:12-16.
- Benzie I. F., Strain J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76.
- Bi A., Fan J., Hu Z., Wang G., Amombo E., Fu J., Hu T. 2016. Differential acclimation of enzymatic antioxidant metabolism and photosystem II photochemistry in tall fescue under drought and heat and the combined Stresses. *Frontiers in Plant Science* 7: 453.
- Buxton D. R. 1996. Quality-related characteristics of forages as influenced by plant environment and agronomic factors. *Animal feed science and technology* 59: 37-49.

- Byrt C. S., Grof C. P., Furbank R. T. 2011. C4 Plants as biofuel feedstocks: optimising biomass production and feedstock quality from a lignocellulosic perspective free access. *Journal of integrative plant biology* 53: 120-135.
- Carrizo I. M., Lopez Colomba E., Tommasino E., Carloni E., Bollati G. and Grunberg K. 2021. Contrasting adaptive responses to cope with drought stress and recovery in *Cenchrus ciliaris* L. and their implications for tissue lignification. *Physiologia Plantarum*: 172: 762-779.
- Chaves A. V., Waghorn G. C., Tavendale M. H. 2002. A simplified method for lignin measurement in a range of forage species. In *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* (pp. 129-133).
- Chen L., Auh C., Chen F., Cheng X., Aljoe H., Dixon R. A., Wang Z. 2002. Lignin deposition and associated changes in anatomy, enzyme activity, gene expression, and ruminal degradability in stems of tall fescue at different developmental stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 5558-5565.
- Chen Y., Zein I., Brenner E. A., Andersen J. R., Landbeck M., Ouzunova M., Lübberstedt T. 2010. Polymorphisms in monolignol biosynthetic genes are associated with biomass yield and agronomic traits in European maize (*Zea mays* L.). *BMC plant biology* 10: 1-10.
- Daniel J. L. P., Jacovaci F. A., Junges D., Santos M. C., Lima J. R., Anjos I. A., Nussio L. G. 2017. Fibre digestibility and its relationships with chemical and morphological traits in thirty-two sugarcane varieties. *Grass and Forage Science* 72: 545-555.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo, C. W. 2020. InfoStat 2019 version. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dumont B., Andueza D., Niderkorn V., Lüscher A., Porqueddu C., Picon-Cochard C. 2015. A meta-analysis of climate change effects on forage quality in grasslands: specificities of mountain and Mediterranean areas. *Grass and Forage Science* 70: 239-254.
- El Hage F., Legland D., Borrega N., Jacquemot M. P., Griveau Y., Coursol S., Méchin V., Reymond M. 2018. Tissue lignification, cell wall p-coumaroylation and degradability of maize stems depend on water status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66: 4800-4808.
- Fahad S., Bajwa A. A., Nazir U., Anjum S. A., Farooq A., Zohaib, A., Huang J. 2017. Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Frontiers in plant science* 1147.
- Fales F.W. 1951. The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. *Journal of Biological Chemistry* 193: 113-124.
- Ghafar M. A., Akram N. A., Saleem M. H., Wang J., Wijaya L., Alyemeni M. N. 2021. Ecotypic Morphological and Physio-Biochemical Responses of Two Differentially Adapted Forage Grasses, *Cenchrus ciliaris* L. and *Cyperus arenarius* Retz. to Drought Stress. *Sustainability* 13: 8069.
- Giordano A., Liu Z., Panter S. N., Dimech A. M., Shang Y., Wijesinghe H. 2014. Reduced lignin content and altered lignin composition in the warm season forage grass *Paspalum dilatatum* by down-regulation of a Cinnamoyl CoA reductase gene. *Transgenic research* 23: 503-517.



- Grabber J. H., Ralph J., Lapierre C., Barrière Y. 2004. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin–cell wall matrix interactions. *Comptes Rendus: Biologies* 327: 455-465.
- Habermann E., Dias de Oliveira E. A., Contin D. R., Delvecchio G., Vicedo D. O., de Moraes M. A. 2019. Warming and water deficit impact leaf photosynthesis and decrease forage quality and digestibility of a C4 tropical grass. *Physiologia Plantarum* 165: 383–402.
- Hameed M., Batool S., Naz N., Nawaz T., Ashraf M. 2012. Leaf structural modifications for drought tolerance in some differentially adapted ecotypes of blue panic (*Panicum antidotale* Retz.). *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 1479–1491.
- Heath R. L., Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Huang B., Wang Z. 2005. Physiological recovery of Kentucky bluegrass from drought stress. *International Turfgrass Society Research Journal* 10: 867-873.
- Hughes M., Mlambo V., Jennings P. G. A., Lallo C. H. O. 2014. The accuracy of predicting in vitro ruminal organic matter digestibility from chemical components of tropical pastures varies with season and harvesting method. *Tropical Agriculture* 91: 135-146.
- Huseynova I. M. 2012. Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817: 1516-1523
- Ings J., Mur L. A., Robson P. R., Bosch M. 2013. Physiological and growth responses to water deficit in the bioenergy crop *Miscanthus x giganteus*. *Frontiers in Plant Science* 4: 468.
- IPCC 2018. Global warming of 1.5 °C. An IPCC special report on the impacts of global warming of 1.5 °C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change.
- Juan N. A., Bollati G. P., Ortiz D. A., Ribotta A., Griffa S., Lopez Colomba E. 2020. Determinación de la calidad nutritiva de las gramíneas megatérmicas Buffel Grass y Grama Rhodes con tecnología NIRS. *Revista Argentina de Producción Animal* 40: 39- 170.
- Kalaji H. M., Schansker G., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Ferroni L., Goltsev V., Guidi L., Jajoo A., Li P., Losciale P., Mishra V. K., Misra A. N., Nebauer S. G., Pancaldi S., Penella C., Pollastrini M., Suresh K., Tambussi E., Yannicari M., Zivcak M., Cetner M. D., Samborska I. A., Stirbet A., Olsovska K., Kunderlikova K., Shelonzek H., Rusinowski S., Bałba W. 2017. Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynthesis Research* 132: 13-66.
- Lanza Castelli S., Grunberg K., Muñoz N., Griffa S., Colomba 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.
- Lee M. A. 2018. A global comparison of the nutritive values of forage plants grown in contrasting environments. *Journal of plant research* 131. 641-654.
- Lepeduš H., Brkić I., Cesar V., Jurković V., Antunović J., Jambrović A., Brkić J., Šimić D. 2012. Chlorophyll fluorescence analysis of photosynthetic performance in seven maize inbred lines under water-limited conditions. *Periodicum Biologorum* 114: 73-76.

- Luna D. F., Pons A. B. S., Bustos D., Taleisnik E. 2018. Early responses to Fe-deficiency distinguish *Sorghum bicolor* genotypes with contrasting alkalinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 155: 165-176.
- Macedo D. C., Lima G. R., Barros R. L. N., Pimentel C. 2019. The intensity of and recovery from photoinhibition under drought in a thermotolerant common bean compared to drought tolerant genotypes. *Biologia plantarum* 63: 465-473.
- Mahyuddin P. 2008. Relationship between chemical component and in vitro digestibility of tropical grasses. *Hayati Journal of Biosciences* 15: 85-89.
- Mansoor U., Fatima S., Hameed M., Naseer M., Ahmad M. S. A., Ashraf M., Ahmad F., Waseem M. 2019. Structural modifications for drought tolerance in stem and leaves of *Cenchrus ciliaris* L. ecotypes from the Cholistan Desert. *Flora* 261: 151485.
- Maxwell K., Johnson G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
- Merewitz E. B., Gianfagna T., Huang B. 2011. Photosynthesis, water use, and root viability under water stress as affected by expression of SAG12-ipt controlling cytokinin synthesis in *Agrostis stolonifera*. *Journal of experimental botany* 62: 383-395.
- Møller I. M., Jensen P. E., Hansson A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 459-481.
- Moura J. C. M. S., Bonine C. A. V., Viana J. O. F., Dornelas M. C., Mazzafera P. 2010. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 360-376.
- Norton M. R., Malinowski D. P., Volaire F. 2016. Plant drought survival under climate change and strategies to improve perennial grasses. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 36: 1-15.
- Pattanagul W. 2011. Exogenous abscisic acid enhances sugar accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) under drought stress. *Asian Journal of Plant Sciences* 10: 212-219.
- Perlikowski D., Augustyniak A., Masajada K., Skirycz A., Soja A. M., Michaelis Ä., Kosmala A. 2019. Structural and metabolic alterations in root systems under limited water conditions in forage grasses of *Lolium-Festuca* complex. *Plant science* 283: 211-223.
- Ploschuk E. L., Bado L. A., Salinas M., Wassner D. F., Windauer L. B., Insausti P. 2014. Photosynthesis and fluorescence responses of *Jatropha curcas* to chilling and freezing stress during early vegetative stages. *Environmental and Experimental Botany* 102: 18-26.
- Rampino P., Pataleo S., Gerardi C., Mita G., Perrotta C. 2006. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant, cell & environment* 29: 2143-2152.
- Sade N., del Mar Rubio-Wilhelmi M., Umnajkitikorn K., Blumwald E. 2018. Stress-induced senescence and plant tolerance to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 69: 845-853.
- Saedi K., Sepehri A., Gharedaghi H., Pessarakli M. 2013. Impact of Two Stocking Systems and Phenology on Water-Soluble Carbohydrates Reserves of Rangeland Species in Western Iran. *World Applied Sciences Journal* 27: 1288-1296.
- Siddiqui Z. S., Shahid H., Cho J. I., Park S. H., Ryu T. H., Park S. C. 2016. Physiological responses of two halophytic grass species under drought stress environment. *Acta Botanica Croatica* 75: 31-38.

- Stabile S. D. S., Bodini A. P., Jank L., Rennó F. P., Santos M. V. D., Silva L. F. P. 2012. Expression of genes from the lignin synthesis pathway in guineagrass genotypes differing in cell-wall digestibility. *Grass and Forage Science* 67: 43–54
- Tambussi E. A. 2005. Fotosíntesis, fotoprotección, productividad y estrés abiótico: algunos casos de estudio. Universitat de Barcelona.
- Thaikua S., Ebina M., Kouki K., Inafuku M., Akamine H., Shimoda K., Kawamoto Y. 2015. Preliminary evaluation on digestibility and the relation to morphology and water content of *Brachiaria* spp. and their heritability. *Grassland Science* 61: 92-100.
- Tommasino E., Griffa S., Grunberg K., Ribotta A., Lopez Colomba E., Carloni E., Quiroga M., Luna C. 2012. Malondialdehyde content as a potential biochemical indicator of tolerant *Cenchrus ciliaris* L. genotypes under heat stress treatment. *Grass and Forage Science* 67: 456-459.
- Tommasino E., López Colomba E., Carrizo M., Grunberg K., Quiroga M., Carloni E., Griffa S., Ribotta A., Luna C. 2018. Individual and combined effects of drought and heat on antioxidant parameters and growth performance in Buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) genotypes. *South African Journal of Botany* 119: 104–111.
- Van Soest P. V., Robertson J. B., Lewi B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science* 74: 3583-3597.
- Van Soest P. J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Cornell university press.
- Volaire F. 2018. A unified framework of plant adaptive strategies to drought: crossing scales and disciplines. *Global Change Biology* 24: 2929-2938.

## CAPÍTULO IV

### ASOCIACIONES ENTRE VARIABLES MORFOLÓGICAS, ANATÓMICAS Y DE CALIDAD FORRAJERA Y TOLERANCIA A ESTRÉS HÍDRICO

#### INTRODUCCIÓN

El estrés hídrico tiene una amplia gama de efectos en los procesos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de las plantas, y puede afectar negativamente a la persistencia, producción y calidad en especies forrajeras. Al respecto, *Cenchrus ciliaris* es una especie considerada tolerante a estrés hídrico, siendo el comportamiento frente a dichas condiciones genotipo-dependiente (Mansoor *et al.*, 2019). Existen diversas prácticas tendientes a mitigar el efecto del estrés hídrico como el riego suplementario que no son de aplicabilidad para sistemas ganaderos de cría y recría. Una de las alternativas económicamente viables es la obtención de genotipos tolerantes (Beloni *et al.*, 2017), que en esta especie han sido escasos debido a diversos factores entre los que se pueden mencionar: 1) el carecer de la comprensión de los mecanismos implicados en la tolerancia, 2) la evaluación de la tolerancia focaliza como único criterio la producción de biomasa o materia seca, lo que implica que sólo refleja la tolerancia a nivel de planta entera, 3) la mayoría de los experimentos de estrés hídrico no contemplan evaluaciones de recuperación y son realizados en condiciones controladas, en los cuales no se refleja la complejidad de las interacciones planta-suelo existente en condiciones de campo y 4) la infrecuencia en el uso de características bioquímicas-fisiológicas como criterio de selección para tolerancia a estrés hídrico, que pueden reflejar la respuesta al mismo a nivel celular, de tejidos y órganos (Basu *et al.*, 2016; El-Hendawy *et al.*, 2017).

Un pre-requisito para mejorar tolerancia a estrés hídrico es la identificación de parámetros agro-fisiológicos que tengan potencial para ser usados como criterios para discriminar genotipos promisorios frente a estrés hídrico (El-Hendawy *et al.*, 2017). Sumado a esto, los parámetros deben ser evaluados en diferentes variaciones temporales y espaciales y estadios de crecimiento. Por el otro lado, las condiciones de evaluación a campo dificultan la identificación de parámetros fisiológicos (El-Hendawy *et al.*, 2017). Es así que en este trabajo se realizaron ensayos a diferentes escalas (condiciones controladas, semi-controladas y a campo con estructuras rain-out shelter) para hallar parámetros bioquímicos-fisiológicos que sean útiles en la diferenciación de genotipos de mejor comportamiento frente a estrés hídrico. Los estudios realizados por el grupo de trabajo de Genotecnia perteneciente al IFRGV, CIAP, INTA, permitieron identificar genotipos con respuesta diferencial a dicho estrés.

Por otra parte, las mediciones moleculares, bioquímicas, fisiológicas y anatómicas generadas en este estudio ofrecieron un enfoque sensible y confiable para diferenciar el comportamiento de genotipos tolerantes o susceptibles al estrés hídrico. Sin embargo, los análisis que abordan variable a variable (univariados) dificultan la interpretación de la variabilidad conjunta (Córdoba *et al.*, 2012). Por lo que, es necesario establecer asociaciones entre ellas que nos permitan realizar una mejor comprensión de toda la información generada, ya sea tanto para identificar aquellos parámetros que expliquen mejor el comportamiento de ciertos genotipos frente a estrés hídrico y que puedan ser utilizados luego como indicadores de tolerancia, o justamente para discriminar o caracterizar genotipos. En tal sentido, una técnica multivariada comúnmente utilizada para el análisis de varias variables simultáneamente es el análisis de componentes principales (ACP) (Abdi, 2010; Córdoba *et al.*, 2012). Esta técnica reduce la dimensión del análisis, ya que permite analizar el conjunto de datos completo teniendo en cuenta varios factores simultáneamente (es decir, los diferentes tratamientos, condiciones) (Di Rienzo *et al.*, 2020). De esta manera, se pueden identificar las variables que explican la mayor parte de la variabilidad total contenida en los datos y explorar las correlaciones entre ellas (Córdoba *et al.*, 2012).

Gran parte de los análisis multivariados se usan de manera exploratoria, para describir tendencias y principales fuentes de variación en los datos. Los estudios exploratorios, dentro de los cuales se encuentra el ACP, pueden realizarse sin la necesidad de vincular

los datos con hipótesis. Sin embargo, otras técnicas multivariadas son confirmatorias y se aplican para responder a hipótesis referidas a la variabilidad multidimensional de las unidades de estudio y sus causas de variación (Balzarini *et al.*, 2015). Al respecto, el análisis de correlaciones canónicas (ACC) permite identificar y cuantificar la asociación entre dos conjuntos de variables o dos conceptos. La correlación canónica mide la existencia y fuerza de relación entre grupos de variables (Batistoti *et al.*, 2012).

A continuación, se establecerán correlaciones entre variables morfo-fisiológicas, anatómicas y de calidad forrajera, medidas en condiciones de estrés hídrico y recuperación. Por otro lado, a través de la asociación de estas a cada genotipo (tolerante vs. susceptible), se intentará dilucidar los mecanismos adaptativos para hacer frente a dicho estrés y el impacto de los mismos en la calidad forrajera de esta especie.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para cumplimentar el objetivo general inicialmente propuesto, se evaluó un gran número de variables, bioquímicas, fisiológicas, morfológicas, anatómicas y moleculares en genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris*, bajo condiciones de estrés hídrico y recuperación a diferentes tiempos. A su vez, se exploraron variables relacionadas con calidad forrajera. Como resultado, se obtuvo una gran cantidad de datos, de los que se pudo extraer conclusiones parciales.

Con el fin de explorar las asociaciones entre los parámetros fisiológicos, bioquímicos, anatómicos y de crecimiento, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) a partir de los datos generados de la evaluación de todas las variables medidas.

Este análisis multivariado, encuentra los pesos o ponderaciones para cada variable con el fin de construir combinaciones lineales de variables capaces de maximizar la varianza (Córdoba *et al.*, 2012). Las combinaciones lineales obtenidas (CPs) son ortogonales (independientes) y en conjunto explican toda la variabilidad de los datos originales. La primera componente (CP1) explica la mayor parte de la variación total en el conjunto de datos y la segunda (CP2), la mayor parte de la variabilidad remanente o no explicada por la CP1 (Córdoba *et al.*, 2012). Los resultados de estos análisis se visualizaron a través de

gráficos biplot (Gabriel, 1971), construidos a partir del primer y segundo componente principal (CP1 y CP2) derivados del ACP.

Luego de realizar el análisis exploratorio multivariado de componentes principales (ACP), se seleccionaron algunas variables dentro de cada conjunto de parámetros medidos y se realizó un análisis de correlaciones canónicas (ACC). Muchas veces cada conjunto de variable es usado para representar un concepto el cual no puede ser medido directamente sino a través de varias variables. El ACC se basa en la correlación entre una combinación lineal de las variables en un conjunto con una combinación lineal de las variables en otro conjunto. Las combinaciones lineales de un par son llamadas variables canónicas y la correlación entre ellas, es llamada correlación canónica (Balzarini et al., 2015). Para dicho análisis se tuvieron en cuenta variables relacionadas al estado hídrico de la planta y estrés oxidativo (CRA, Fv/Fm y MDA), variables anatómicas y moleculares relacionadas a la composición de tejidos (área esclerenquimática, parénquima total, expresión de genes codificantes de las enzimas CCR y CCoAOMT) y variables relacionadas a la calidad forrajera (DEGMS48 Tallo y DEGMS48 Hoja).

Para estos análisis se utilizó el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2020).

## **RESULTADOS**

### **Asociaciones entre parámetros fisiológicos-bioquímicos, moleculares, anatómicos y de crecimiento**

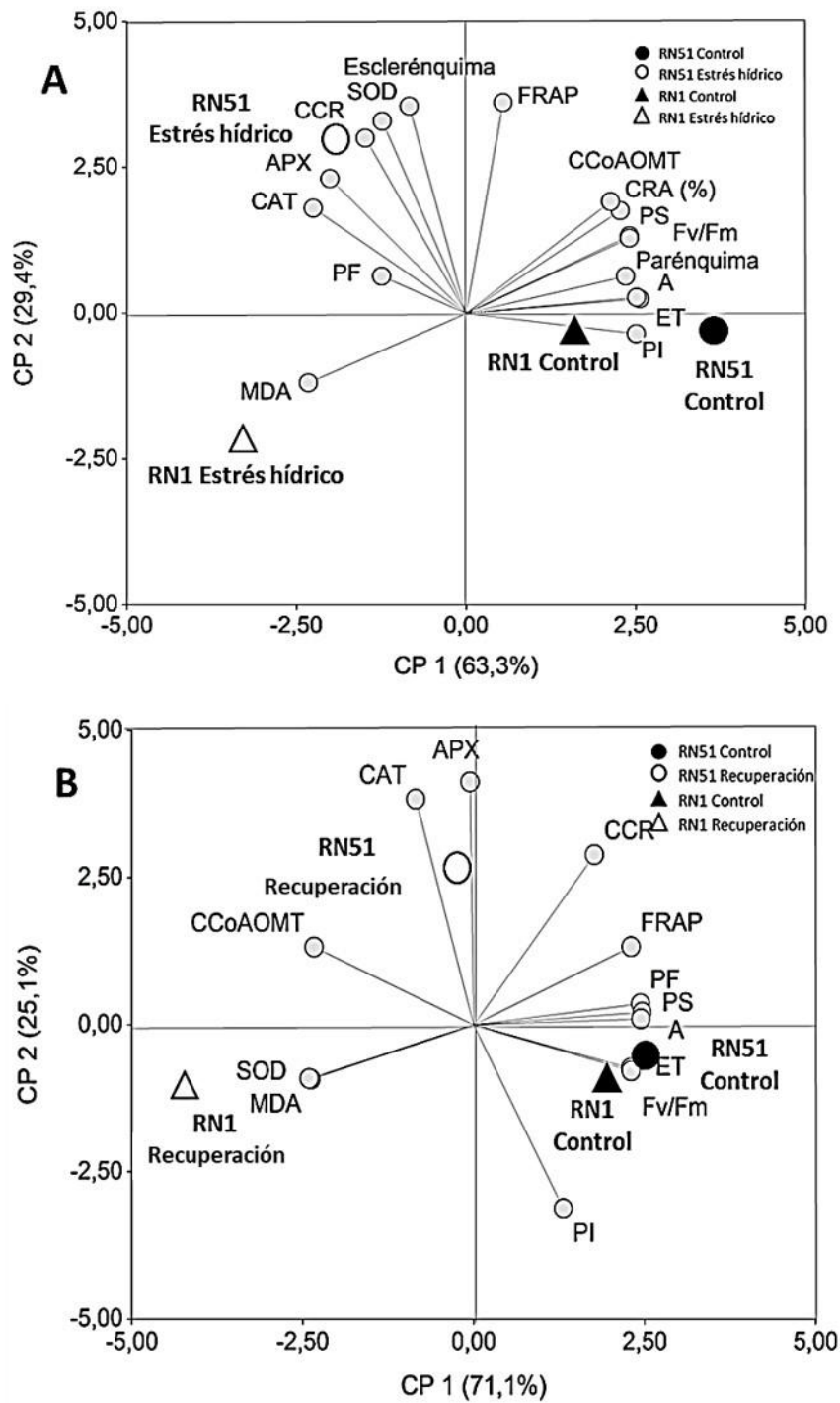
#### *Ensayo a tiempo corto*

En el tratamiento de estrés hídrico, los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2) del ACP explicaron el 92,7% de la variabilidad total en los datos (coeficiente de correlación cofenética = 0,992; Fig. 4.1A). Las correlaciones entre los diferentes parámetros fueron exploradas por los ángulos entre vectores. Los ángulos agudos y obtusos indican correlación positiva y negativa, respectivamente, mientras que los ángulos rectos no muestran correlación entre los parámetros evaluados. La CP1 del biplot (Fig. 4.1A) reveló que los parámetros ET (0.31), PI (0.31) y A (0.31), seguidos de Fv/Fm

(0.29), PS (0.29) y CRA (0.28) se agruparon juntos, se correlacionaron entre sí y se asociaron positivamente con ambos genotipos en el tratamiento control. Los parámetros CAT (-0,28) y APX (-0,25) se agruparon y se asociaron fuertemente al genotipo RN51 bajo estrés hídrico, mientras que el genotipo RN1 bajo dichas condiciones estuvo fuertemente asociado con el contenido de MDA (-0,28).

En condiciones de recuperación, los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2) explicaron el 96,2% de la variabilidad total en los datos (coeficiente de correlación cofenética = 0,993; Fig. 4.1B). El CP1 del biplot (Fig.4.1B) reveló que los parámetros PF (0.33), PS (0.32), A (0.32), ET (0.31) y Fv / Fm (0.31) permanecieron asociados positivamente entre ellos y con ambos genotipos en el tratamiento control. Los vectores MDA (-0,32) y SOD (-0,32) se agruparon y orientaron hacia el genotipo RN1 en condiciones de recuperación. Para la componente CP2, los parámetros CAT (0,55) y APX (0,51) se agruparon y correlacionaron entre sí, revelando al genotipo RN51 en condiciones de recuperación.





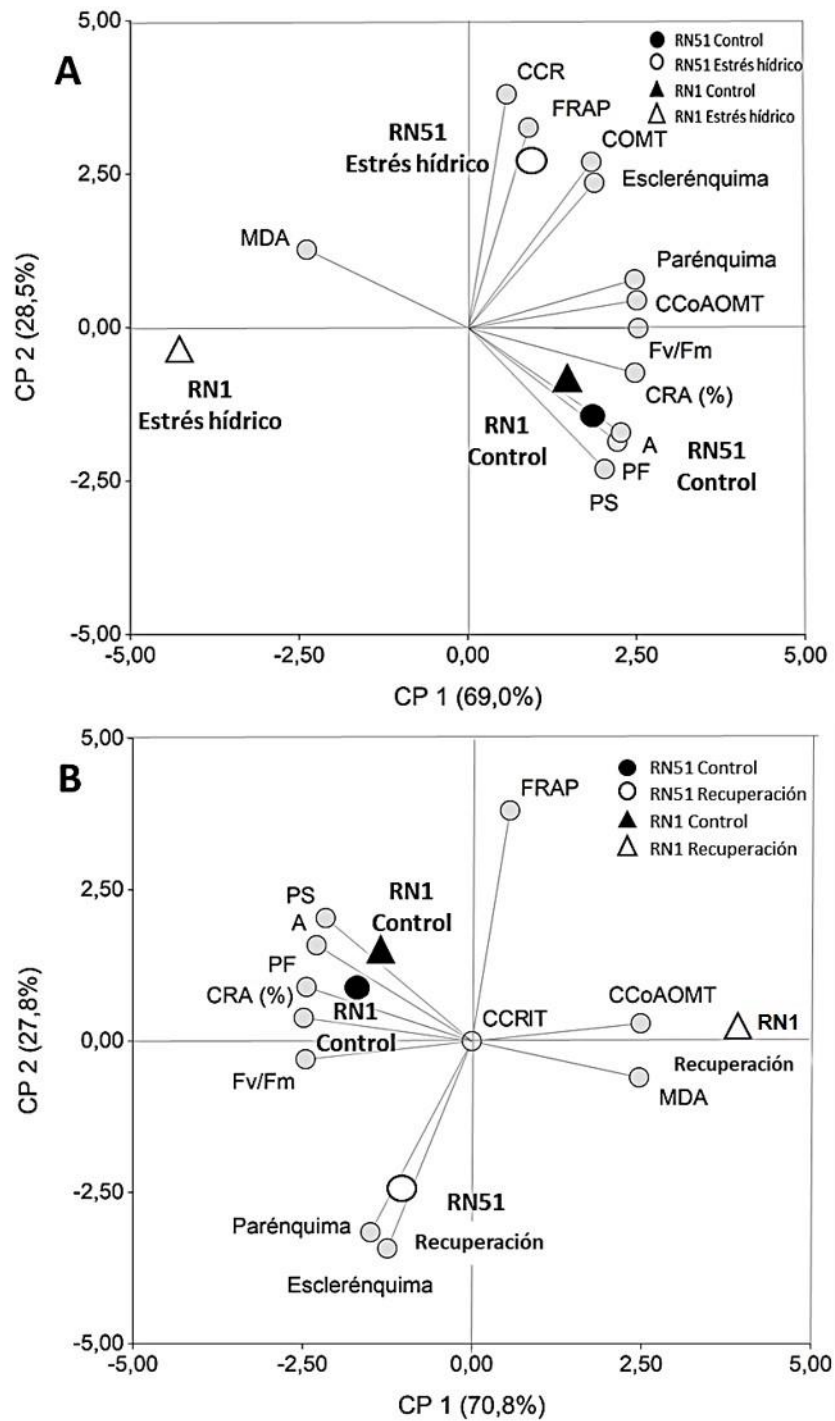
**Fig. 4.1.** Biplot que muestra el comportamiento diferencial entre los genotipos de *Cenchrus ciliaris* (RN51 y RN1) en condiciones de estrés hídrico (A) y recuperación (B) en el ensayo a tiempo corto.

### Ensayo a tiempo largo

En el tratamiento de estrés hídrico, los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2) del ACP explicaron el 97,5% de la variabilidad total en los datos (coeficiente de

correlación cofenética = 0,999; Fig. 4.2A). La CP1 del biplot (Fig. 4.2A) reveló que los parámetros CRA (0,34) y Fv/Fm (0,35), seguidos de A (0,31), PF (0,31) y PS (0,28) se agruparon juntos, se correlacionaron entre sí y se asociaron positivamente con ambos genotipos en los tratamientos de control. Los parámetros, CCoAOMT (0,35), Parénquima (0,34), COMT (0,25), Esclerénquima (0,26), CCoAOMT (0,35) FRAP (0,12) y CRR (0,08), se agruparon y se asociaron fuertemente al genotipo RN51 en condiciones de estrés hídrico. Contrariamente, el genotipo RN1 en dichas condiciones estuvo fuertemente asociado con el contenido de MDA (-0,33).

En condiciones de recuperación, los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2) explicaron el 98.6% de la variabilidad total en los datos (coeficiente de correlación cofenética = 0,999; Fig. 4.2B). El CP1 del biplot (Fig. 4.2B) reveló que los parámetros CRA (-0,37), Fv/Fm (-0,37) y PF (-0,37) seguidos de PS (0,34) y A (0,32), permanecieron asociados positivamente entre ellos y con ambos genotipos en los tratamientos de control. Los vectores Parénquima (-0,22) y Esclerénquima (-0,19) se agruparon y orientaron hacia el genotipo RN51 en condiciones de recuperación, mientras que los parámetros MDA (0,37) y CCoAOMT (0,37) se agruparon y correlacionaron entre sí, revelando al genotipo RN1 en condiciones de recuperación.



**Fig. 4.2.** Biplot que muestra el comportamiento diferencial entre los genotipos de *Cnchrus ciliaris* (RN51 y RN1) en condiciones de estrés hídrico (A) y recuperación (B) en ensayo a tiempo largo.

La Tabla 4.1 describe las correlaciones canónicas entre variables fisiológicas y bioquímicas (CRA, Fv/Fm y MDA) con las variables anatómicas y moleculares (Área

esclerenquimática, Parénquima total, expresión génica de las enzimas CCoAOMT y CCR) medidas en el ensayo a tiempo corto y largo de estrés hídrico.

En el ensayo a tiempo corto y en el ensayo a tiempo largo de estrés hídrico, el primer par canónico explicó el 95% y 94% de la variación de los datos ( $P < 0,001$ ), respectivamente. Las variables canónicas que más contribuyeron al primer par canónico en ambos ensayos, fueron: Fv/Fm, MDA y CRA, seguidas de CCoAOMT y CCR. Así, valores superiores de Fv/Fm y CRA, y menores de MDA, se relacionaron con mayores valores de CCoAOMT y parénquima, y con valores inferiores de CCR y esclerenquima.

**Tabla 4.1.** Correlaciones canónicas entre variables fisiológicas y bioquímicas con variables anatómicas y moleculares medidas en el ensayo a tiempo corto y largo de estrés hídrico.

Variables	<i>1er Par canónico</i>	
	<i>Tiempo Corto</i>	<i>Tiempo Largo</i>
<b>CRA (%)</b>	0,09	0,02
<b>Fv/Fm</b>	9,66	6,12
<b>MDA</b>	-0,14	-0,02
<b>Área escl. (um<sup>2</sup>)</b>	-3,30E-05	-3,80E-06
<b>Parénq. Total</b>	3,70E-06	9,30E-07
<b>CCoAOMT</b>	2,40E-01	4,90E-01
<b>CCR</b>	-8,00E-02	-3,00E-01
R	0,97	0,97
R <sup>2</sup>	0,95	0,94
p-valor	0	1,10E-09

La Tabla 4.2 describe las correlaciones canónicas entre variables fisiológicas y bioquímicas (CRA, Fv/Fm y MDA) con las variables morfológicas (PS y A).

En el ensayo a tiempo corto de estrés hídrico y en el ensayo a tiempo largo, el primer par canónico explicó el 84% y 74% de la variación de los datos ( $P < 0,001$ ),

respectivamente. Por otro lado, en el ensayo a tiempo largo el primer par canónico explicó el 74% de la variación de los datos ( $P < 0,001$ ). Las variables canónicas que más contribuyeron al primer par canónico en ambos ensayos fueron: Fv/Fm y PS, seguidas de MDA, CRA y A. Así, valores superiores de Fv/Fm y CRA, y menores de MDA, se relacionaron con mayores valores de PS y A.

**Tabla 4.2.** Correlaciones canónicas entre variables fisiológicas y bioquímicas con variables morfológicas medidas en el ensayo a tiempo corto y largo de estrés hídrico.

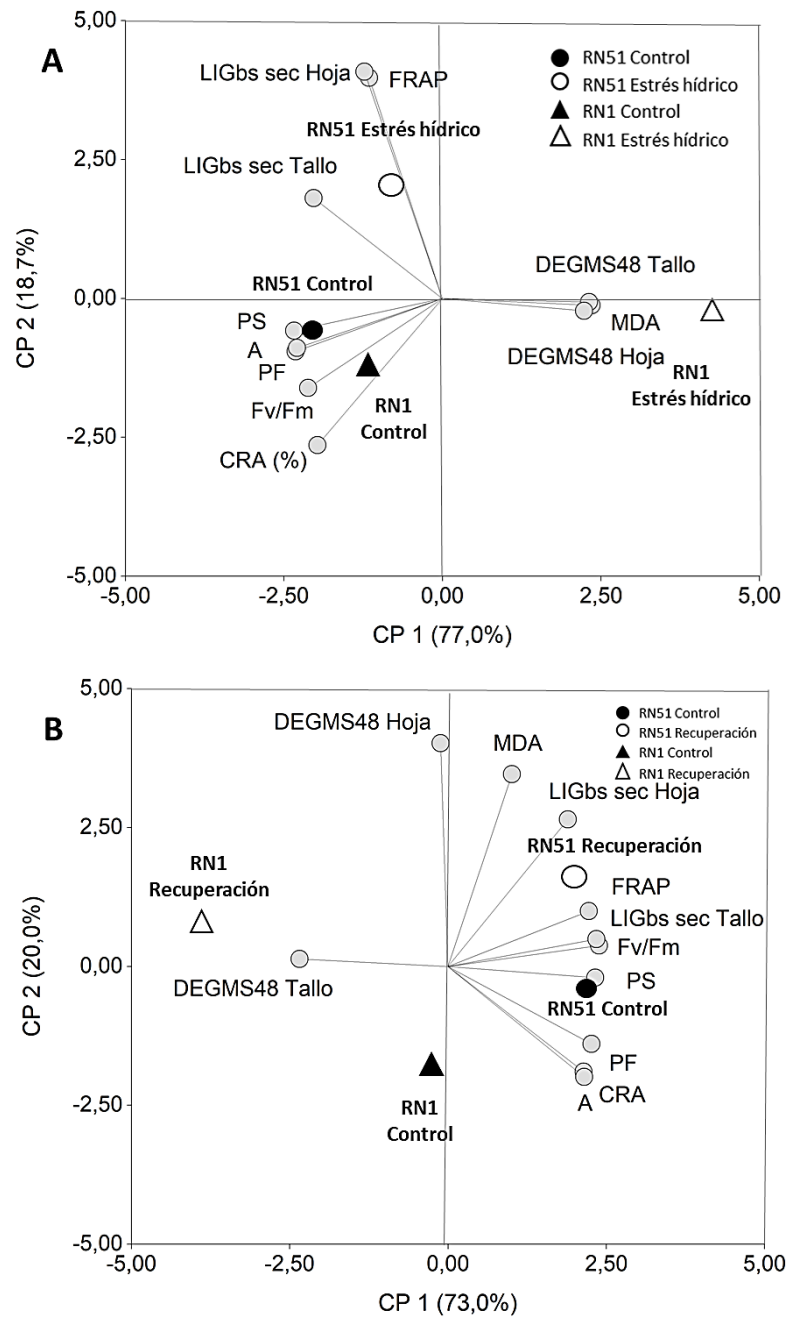
Variables	1er Par canónico	
	Tiempo Corto	Tiempo Largo
CRA (%)	0,07	0,02
Fv/Fm	4,4	-2,13
MDA	-0,18	-0,06
PS	4,95	0,21
A	0,06	0,01
R	0,92	0,86
R <sup>2</sup>	0,84	0,74
p-valor	2,60E-11	2,40E-05

#### **Asociaciones entre parámetros fisiológicos, bioquímicos, morfológicos y de calidad forrajera en condiciones de estrés hídrico y recuperación en *Cenchrus ciliaris*.**

En el tratamiento de estrés hídrico, los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2) del ACP explicaron el 95,7% de la variabilidad total en los datos (coeficiente de correlación cofenética = 0,992; Fig. 4.3A). La CP1 del biplot (Fig. 4.3A) reveló que los parámetros PF (-0,34), PS (-0,34) y A (-0,33) seguidos de CRA (-0,29) y Fv/Fm (-0,31), se agruparon juntos, se correlacionaron entre sí y se asociaron positivamente con ambos genotipos en el tratamiento control. Los parámetros LIGbs sec tallo (-0,30) y LIGbs sec

hoja (-0,18) se agruparon y se asociaron fuertemente al genotipo RN51 bajo estrés hídrico, mientras que el genotipo RN1 en dichas condiciones estuvo fuertemente asociado con el contenido de MDA (0,34), DEGMS48 tallo (0,34) y DEGMS48 hoja (0,32).

En condiciones de recuperación, los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2) explicaron el 93% de la variabilidad total en los datos (coeficiente de correlación cofenética = 0,994; Fig. 4.3B). El CP1 del biplot (Fig. 4.3B) reveló que los parámetros Fv/Fm (0,35), CRA (0,32), PF (0,33), PS (0,34) y A (0,32) permanecieron asociados positivamente entre ellos y con ambos genotipos en el tratamiento control. Los vectores LIGbs sec tallo (0,35), FRAP (0,33), y LIGbs sec hoja (0,28) se agruparon y orientaron hacia el genotipo RN51 en condiciones de recuperación. Contrariamente, el parámetro DEGMS48 tallo (-0,35) se asoció al genotipo RN1 en condiciones de recuperación.



**Fig. 4.3.** Biplot mostrando las diferencias en el performance de genotipos contrastantes de *C. ciliaris* (RN51 y RN1) en condiciones de estrés hídrico (A) y recuperación (B) en ensayo a campo.

La Tabla 4.3 describe las correlaciones canónicas entre variables fisiológicas y bioquímicas (CRA, Fv/Fm y MDA) con las variables de calidad (DEGMS48 Tallo y DEGMS48 Hoja). El primer par canónico explicó el 73% de la variación de los datos ( $P < 0,001$ ). Las variables canónicas que más contribuyeron al primer par canónico fueron:

Fv/Fm, MDA y CRA, seguidas de DEGMS48 Tallo y DEGMS48 Hoja. Así, valores superiores de Fv/Fm y CRA, y menores de MDA, se relacionaron con mayores valores de DEGMS48 Tallo y DEGMS48 Hoja.

**Tabla 4.3.** Correlaciones canónicas entre variables fisiológicas y bioquímicas con variables de calidad.

<b>Variab</b> les	<b>1er Par canónico</b>
<b>CRA (%)</b>	0,01
<b>Fv/Fm</b>	2,43
<b>MDA</b>	-0,2
<b>DEGMS48 Tallo</b>	6,00E-02
<b>DEGMS48 Hoja</b>	2,50E-01
R	0,85
R <sup>2</sup>	0,73
p-valor	0,000063

La Tabla 4.4 describe las correlaciones canónicas entre variables fisiológicas y bioquímicas (CRA, Fv/Fm y MDA) con las variables morfológicas (PS y A). El primer par canónico explicó el 70% de la variación de los datos ( $P < 0,001$ ). Las variables canónicas que más contribuyeron al primer par canónico fueron: Fv/Fm y MDA, seguidas de CRA y A. Así, valores superiores de Fv/Fm y CRA y menores de MDA, se relacionaron con mayores valores de PS y A.



**Tabla 4.4.** Correlaciones canónicas entre variables fisiológicas y bioquímicas con variables morfológicas.

<b>Variables</b>	<b>1er Par canónico</b>
<b>CRA (%)</b>	0,03
<b>Fv/Fm</b>	3,06
<b>MDA</b>	-0,11
<b>PS</b>	0,01
<b>A</b>	0,03
R	0,83
R <sup>2</sup>	0,7
p-valor	2,80E-04

## DISCUSIÓN

El análisis multivariado de CPs, permitió explicar más del 90% de la variabilidad total en los datos entre los dos primeros componentes principales.

En el ensayo a tiempo corto, los parámetros morfo-fisiológicos permitieron discriminar el comportamiento de los genotipos asociándose positivamente a los mismos en condiciones control. Por el contrario, en condiciones de estrés hídrico, los parámetros que contribuyeron a la mitigación del estrés, como la actividad de enzimas antioxidantes, se asociaron al genotipo tolerante, RN51. Por otro lado, el contenido de MDA, utilizado como indicador de daño oxidativo (Tommasino *et al.*, 2012), explicó fuertemente el comportamiento del genotipo susceptible, RN1. En condiciones de recuperación, ambos genotipos mantuvieron la misma tendencia en su comportamiento, con la diferencia que la actividad enzimática de SOD permitió discriminar a RN1 bajo el tratamiento de recuperación. Tal como se discutiera anteriormente, el comportamiento de esta enzima, la cual participa en procesos de señalización, sugiere que podría estar sensando aún el estrés, ya sea debido a que el proceso de recuperación después de la rehidratación no

necesariamente limitó la producción de EAO, o bien la rehidratación activó la defensa antioxidante con el fin de regular la sobreproducción de estas.

En el ensayo a tiempo largo, también los parámetros morfo-fisiológicos permitieron discriminar el comportamiento de los genotipos asociándose positivamente a los mismos en condiciones control. Sin embargo, en condiciones de estrés hídrico, los parámetros moleculares relacionados a la expresión génica de enzimas relacionadas a la lignificación, así como parámetros anatómicos, como el mayor desarrollo de tejido esclerenquimático, adquirieron mayor peso en el análisis y se asociaron fuertemente al genotipo tolerante RN51, diferenciándolo de RN1. Contrariamente, el genotipo RN1 en dichas condiciones continuó fuertemente asociado con el contenido de MDA. El contenido de este producto del metabolismo secundario ha sido asociado estrés oxidativo y comportamiento susceptible frente al estrés en *C. ciliaris* (Tommasino *et al.*, 2012).

Finalmente, en el ensayo realizado a campo, los parámetros relacionados con calidad forrajera adquirieron un gran peso en el análisis, pudiendo discriminar junto al resto de los parámetros morfo-fisiológicos a ambos genotipos en las distintas condiciones. Al respecto, el porcentaje de lignina, tanto en tallo como en lámina, estuvo fuertemente asociado al genotipo RN51 en condiciones estrés hídrico, mientras que el genotipo RN1 en dichas condiciones estuvo fuertemente asociado a una mayor digestibilidad, debido mayormente a la menor lignificación, tal como se explicara en el capítulo anterior.

Este primer análisis exploratorio, teniendo en cuenta todos los parámetros medidos, arrojó resultados que nos permitieron dilucidar las estrategias adaptativas para hacer frente al estrés hídrico en los genotipos evaluados y el impacto de estos en la calidad forrajera de esta especie. Sin embargo, a través de un análisis multivariado posterior de correlaciones canónicas (ACC), y teniendo en cuenta las variables más representativas de cada conjunto de parámetros analizados, pudimos confirmar la existencia de las correlaciones existentes entre los mismos. Tanto en el ensayo de estrés hídrico a tiempo corto como a tiempo largo, el primer par canónico permitió explicar más del 90% de la variación de los datos. El conjunto de variables fisiológicas y bioquímicas se correlacionó con el conjunto de variables anatómicas y moleculares y con el conjunto de variables morfológicas de crecimiento. Es decir, el estado hídrico de la planta tendría influencia sobre la composición de tejidos de la lámina y afectaría también a la producción de

materia seca. Por otro lado, en el ensayo de estrés hídrico a campo, el primer par canónico permitió explicar más del 90% de la variación de los datos. El conjunto de variables fisiológicas y bioquímicas se correlacionó con el conjunto de variables de calidad forrajera y con el conjunto de variables morfológicas de crecimiento. Por lo cual, el estado hídrico de la planta tendría influencia sobre la digestibilidad y la producción de materia seca en esta especie. Similares resultados fueron descritos en Batistoti *et al.*, (2012), quienes observaron en *Panicum maximum*, que la proporción de tejidos anatómicos de la lámina se correlacionaba con la composición química del tejido, y por lo tanto con la digestibilidad de la planta. A su vez, varios estudios señalan a los tejidos lignificados como los más relevantes en la reducción de la calidad del forraje (El Hage *et al.*, 2018; Grabber *et al.*, 2004; Stabile *et al.*, 2012). En las especies forrajeras existen relaciones inversas entre digestibilidad y fibra; a medida que aumenta el contenido de fibra del forraje, disminuye su digestibilidad (Lee, 2018).

Existen numerosos trabajos en especies forrajeras que se valieron de estos análisis, ya sea tanto para identificar aquellos parámetros que expliquen mejor el comportamiento de ciertos genotipos frente a estrés hídrico y que puedan ser utilizados luego como indicadores de tolerancia, o justamente para discriminar o caracterizar genotipos. Al respecto, Liu *et al.*, (2015) examinaron 49 diversos genotipos de *Panicum virgatum* por su tolerancia al estrés hídrico midiendo características fisiológicas, morfológicas y metabólicas. Los datos obtenidos mediante el análisis de ACP revelaron que los parámetros fisiológicos contribuyeron más que los rasgos morfológicos en la separación de los grupos control y tratamiento de estrés hídrico. Por otro lado, Gallo *et al.*, (2013), caracterizó un conjunto de 180 forrajes a través de parámetros de composición química y digestibilidad, y posteriormente, mediante un ACP discriminó las poblaciones de forraje y limitó el número de variables a aquellas útiles para obtener una rápida evaluación de la calidad. Por otro lado, Batistoti *et al.*, (2012), valiéndose de un ACC, estudió las correlaciones entre características químicas, anatómicas, morfológicas y agronómicas de la lámina de *Panicum maximum*, que pudieran afectar valor de la pastura. En Mansoor *et al.*, (2019) exploraron el efecto del estrés hídrico en modificaciones morfo-anatómicas en las partes aéreas de ecotipos de *C. ciliaris* recolectados del desierto de Pakistán, los cuales fueron agrupados mediante ACPs en cuatro categorías, altamente tolerantes, tolerantes, moderadamente tolerantes y sensibles.

Considerando estos resultados, la correlación existente entre los parámetros fisiológicos y bioquímicos indicadores de estrés con los parámetros anatómicos y de calidad forrajera, nos permitieron analizar el desempeño diferencial del genotipo tolerante en condiciones de estrés hídrico y recuperación, el cual podría estar relacionado con el aumento de la lignificación de los tejidos a través de un aumento de la expresión de genes relacionados a la biosíntesis de la lignina (Carrizo *et al.*, 2021). Esto último se vio reflejado en un mayor porcentaje de lignificación de tejidos, que consecuentemente tuvo impacto en la calidad forrajera de esta especie.

## CONCLUSIÓN

Los análisis multivariados permitieron la exploración de las asociaciones entre parámetros fisiológicos, bioquímicos, morfológicos, anatómicos y moleculares bajo estrés hídrico a tiempo corto y largo y recuperación. Además, se establecieron asociaciones entre los parámetros anteriormente mencionados con parámetros de calidad forrajera bajo estrés hídrico y recuperación. La vinculación de diferentes escalas y variables, permitió la identificación de grupos de parámetros discriminantes.

Se pudo concluir que, si bien los dos genotipos investigados aquí pudieron tolerar la sequía y se recuperaron de la condición de estrés impuesta, ambos genotipos difirieron significativamente en su respuesta. El genotipo tolerante se correlacionó positivamente a las variables relacionadas al mantenimiento del estado hídrico, a la mitigación del estrés y al metabolismo de la lignina y negativamente a la digestibilidad. Contrariamente, el genotipo susceptible se correlacionó positivamente a las variables relacionadas al daño oxidativo y digestibilidad y negativamente al metabolismo de la lignina.

Las correlaciones halladas entre los distintos parámetros, resultaron robustas y consistentes, las cuales se mantuvieron a lo largo de los diferentes ensayos de tiempo de exposición a estrés hídrico, condiciones controladas y semi-controladas.

Al analizar simultáneamente toda la información generada, se puede concluir que el estado hídrico de la planta ejerce influencia sobre la composición de tejidos de la lámina,

lo cual puede ser detectado en etapas tempranas de estrés, y que posteriormente impactarán tanto en la calidad como en la producción de materia seca en esta especie.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdi H. and Williams L. J. 2010. Principal component analysis. Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics 2: 433-459.
- Balzarini M., Bruno C., Córdoba M. y Teich I. 2015. Herramientas en el Análisis Estadístico Multivariado. Escuela Virtual Internacional (CAVILA). Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. ISBN 978-987-591-648-7
- Basu S., Ramegowda V., Kumar A., Pereira A. 2016. Plant adaptation to drought stress. F1000Research 5.
- Batistoti C., Lempp B., Jank L., Morais M. D. G., Cubas A. C., Gomes R. A. y Ferreira M. V. B. 2012. Correlations among anatomical, morphological, chemical and agronomic characteristics of leaf blades in *Panicum maximum* genotypes. Animal feed science and technology 171: 173-180.
- Beloni T., Pezzopane C. D. G., Rovadoscki G. A., Fávero A. P., Dias-Filho M. B., Santos P. M. 2017. Morphological and physiological responses and the recovery ability of *Paspalum* accessions to water deficit and waterlogging. Grass and Forage Science, 72: 840-850.
- Carrizo I. M., Lopez Colomba E., Tommasino E., Carloni E., Bollati G. and Grunberg K. 2021. Contrasting adaptive responses to cope with drought stress and recovery in *Cenchrus ciliaris* L. and their implications for tissue lignification. Physiologia Plantarum: 172: 762-779.
- Córdoba M., Bruno C., Balzarini M. and Costa J. L. 2012. Análisis de componentes principales con datos georreferenciados: Una aplicación en agricultura de precisión. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo 44: 27-39.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C. W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- El Hage F., Legland D., Borrega N., Jacquemot M. P., Griveau Y., Coursol S., Méchin V., Reymond M. 2018. Tissue lignification, cell wall p-coumaroylation and degradability of maize stems depend on water status. Journal of Agricultural and Food Chemistry 66: 4800-4808.
- El-Hendawy S. E., Hassan W. M., Al-Suhaibani N. A., Refay Y., Abdella K. A. 2017. Comparative performance of multivariable agro-physiological parameters for detecting salt tolerance of wheat cultivars under simulated saline field growing conditions. Frontiers in plant science 8: 435.
- Gabriel K. R. 1971. The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. Biometrika: 58: 453-467.
- Gallo A., Moschini M., Cerioli C. and Masoero F. 2013. Use of principal component analysis to classify forages and predict their calculated energy content. Animal 7: 930-939.
- Grabber J. H., Ralph J., Lapierre C. and Barrière Y. 2004. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions. Comptes rendus biologiques 327: 455-465.

- Habermann E., Dias de Oliveira E. A., Contin D. R., Delvecchio G., Vicedo D. O., de Moraes M. A. 2019. Warming and water deficit impact leaf photosynthesis and decrease forage quality and digestibility of a C4 tropical grass. *Physiologia Plantarum* 165: 383–402.
- Lee M. A. 2018. A global comparison of the nutritive values of forage plants grown in contrasting environments. *Journal of plant research* 131: 641-654.
- Liu Y., Zhang X., Tran H., Shan L., Kim J., Childs K. and Zhao B. 2015. Assessment of drought tolerance of 49 switchgrass (*Panicum virgatum*) genotypes using physiological and morphological parameters. *Biotechnology for Biofuels* 8: 1-18.
- Mansoor U., Fatima S., Hameed M., Naseer M., Ahmad M. S. A., Ashraf M., Ahmad F., Waseem M. 2019. Structural modifications for drought tolerance in stem and leaves of *Cenchrus ciliaris* L. ecotypes from the Cholistan Desert. *Flora* 261: 151485
- Stabile S. D. S., Bodini A. P., Jank L., Rennó F. P., Santos M. V. D. and Silva L. F. P. 2012. Expression of genes from the lignin synthesis pathway in guineagrass genotypes differing in cell-wall digestibility. *Grass and Forage Science* 67: 43–54.
- Tommasino E., Griffa S., Grunberg K., Ribotta A., Lopez Colomba E., Carloni E., Quiroga M. and Luna C. 2012. Malondialdehyde content as a potential biochemical indicator of tolerant *Cenchrus ciliaris* L. genotypes under heat stress treatment. *Grass and Forage Science* 67: 456-459.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES GENERALES

El incremento de la actividad ganadera en las provincias del Norte argentino, hizo que se incorpore genética y tecnología en la utilización de pasturas. En esta región, la escasez de lluvias es uno de los principales factores abióticos que provoca pérdidas de rendimiento, persistencia y valor nutricional de las pasturas. En este contexto, la incorporación de pasturas cultivadas como *Cenchrus ciliaris* L., resultó ser un recurso forrajero de gran importancia para incrementar la producción y calidad de la oferta de materia seca, altamente estacional, permitiendo aumentar la receptividad animal por superficie y mejorar los índices productivos y reproductivos. Al ser ésta una especie perenne, continuamente se ve expuesta a alternancias de periodos de lluvias esporádicas durante la estación de crecimiento y reducción de precipitaciones, por lo cual sucesivamente está sujeta a períodos de estrés hídrico y recuperación. Esto provoca una profunda reorganización en el metabolismo de la planta. La tolerancia a dicho estrés es un rasgo extremadamente complejo. Las plantas adoptan un conjunto de estrategias que abarcan aspectos morfológicos, cambios fisiológicos, celulares y moleculares para sobrevivir en condiciones de estrés hídrico.

En este trabajo y a diferencia de los que se pueden consultar actualmente en la bibliografía, se realizó un estudio integral sobre el efecto del estrés hídrico en la morfofisiología, en la anatomía foliar, en el proceso de lignificación y en la calidad forrajera de genotipos contrastantes de *Cenchrus ciliaris* L.

La vinculación de escalas de los diferentes ensayos realizados, permitieron concluir que los genotipos evaluados pudieron tolerar el estrés hídrico y se recuperaron de la condición de estrés a la que fueron expuestos. Sin embargo, ambos genotipos difirieron



significativamente en su respuesta, la cual se acentuó al incrementar la duración del estrés.

El estrés hídrico causó daño a los fotosistemas de las plantas, lo que provocó una reducción de la eficiencia de absorción de luz. Al inhibirse la tasa de transporte de electrones e incrementarse la producción de especies reactivas de oxígeno (EAO), se produjo daño oxidativo, ante lo cual las plantas respondieron a través de la actividad del complejo sistema antioxidante. Los resultados obtenidos, indicaron que la capacidad para regular la peroxidación de lípidos y mitigar el daño oxidativo en respuesta al estrés hídrico y la posterior rehidratación, así como el mantenimiento de un contenido relativo de agua en niveles altos, constituyen uno de los mecanismos de adaptación mediante los cuales los genotipos tolerantes hacen frente al estrés hídrico. Estos cambios en la actividad celular, se acompañaron de características adaptativas foliares, como el grosor de la epidermis adaxial, células buliformes bien desarrolladas, y una lignificación tisular pronunciada. Esto último, se correlacionó con la detección en etapas tempranas del aumento en la expresión de genes que codifican para algunas enzimas consideradas claves en la regulación del complejo proceso de biosíntesis de lignina.

Si bien el estrés hídrico tuvo impacto sobre la producción de biomasa, el genotipo de mejor comportamiento presentó menor daño en dicha producción a costa de procesos de lignificación y consecuentemente una menor digestibilidad, afectando la calidad del forraje. Sin embargo, en términos productivos, la “pérdida” en la digestibilidad de la materia seca en el genotipo tolerante fue menor a la disminución en la producción registrada en el genotipo susceptible.

La comprensión de algunos de los mecanismos de adaptación implicados en la tolerancia y/o susceptibilidad en condiciones de estrés hídrico y recuperación, y su relación con la calidad forrajera, proporciona nuevas herramientas que brindarán claridad en el desarrollo de nuevas creaciones fitogenéticas de mayor tolerancia y calidad forrajera que respondan a las demandas del sector pecuario.

Como perspectivas y consideraciones particulares, la detección temprana del proceso de lignificación, podría ser empleada en programas de mejoramiento como un indicador de tolerancia a estrés hídrico. Asimismo, posteriores estudios serían necesarios en los que

se involucre mayor número de genotipos, para dilucidar el impacto del estrés hídrico en los componentes del rendimiento de esta especie forrajera, para encontrar el equilibrio entre la tolerancia a estrés hídrico y los niveles de producción y calidad forrajera.

*Parte de los resultados derivados de esta tesis fueron publicados:*

Carrizo I. M., Lopez Colomba E., Tommasino E., Carloni E., Bollati G. and Grunberg K. 2021. Contrasting adaptive responses to cope with drought stress and recovery in *Cenchrus ciliaris* L. and their implications for tissue lignification. *Physiologia Plantarum*: 172: 762-779. <https://doi.org/10.1111/ppl.13274>