



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias



UTILIZACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA
DEFENSA ANTIOXIDANTE PARA LA
CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN
TEMPRANA DE GENOTIPOS DE *CENCHRUS*
CILIARIS L. TOLERANTES AL ESTRÉS ABIÓTICO

Exequiel Arturo Tommasino

Tesis

Para optar al Grado Académico de
Doctor en Ciencias Agropecuarias

Córdoba, 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.**

Exequiel Arturo Tommasino

Comisión Asesora de Tesis

Directora: Biól.(Dra.) Celina Luna

Asesores : Biól.(Dra.) Sabrina Griffa
Ing. Agr.(Dra.) Marta Ojeda

Tribunal Examinador de Tesis :

.....

.....

.....

Presentación Formal Académica:

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA PARA GRADUADOS

AGRADECIMIENTOS

A mis compañeros de trabajo: Karina Grunberg, Eliana López Colomba, Sabrina Griffa, Andrea Ribotta, Mariana Quiroga, Edgardo Carloni.

A mi familia: Vanina y Athos.

A mis padres y hermanos: Toty, Carlos, Juan, Anselmo y Agustina.

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

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: Dra. Celina Luna, Dra. Sabrina Griffa, Dra. Marta Ojeda.

¡A TODOS MUCHAS GRACIAS!

RESUMEN

La sequía y el estrés por calor son dos tipos de estrés abiótico importantes que afectan el crecimiento de los cultivos y la agricultura en todo el mundo. Muchos estudios se han enfocado en analizar la respuesta de los cultivos aplicando un solo estrés, sin embargo, estudiar la respuesta de las plantas a una combinación de estrés puede ser crítico para la comprensión de la tolerancia en las plantas y el desarrollo de genotipos tolerantes. El buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) es una pastura subtropical conocida en las regiones áridas y semiáridas del mundo por su productividad y calidad del forraje, y por su mayor tolerancia al estrés por calor y sequía en relación a otras especies forrajeras subtropicales. Sin embargo, varias accesiones han exhibido diferentes respuestas a distintos tipos de estrés abiótico. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la combinación de sequía y calor sobre los parámetros bioquímicos y morfológicos de las plantas y comparar los impactos de los factores limitantes al ser aplicados por separado y cuando se combinan, con la finalidad de obtener sistemas experimentales para evaluar la tolerancia de buffel grass en condiciones controladas y aportar herramientas para la identificación de genotipos tolerantes. Los resultados obtenidos, indican que la sequía y el calor causan alteraciones en el metabolismo oxidativo y generan cambios bioquímicos y de crecimiento en los genotipos de buffel grass, existiendo respuestas variables según los genotipos. Sequía y calor, aplicados de manera individual o en combinación causaron cambios en el metabolismo oxidativo, demostrado por la disminución de la actividad de enzimas antioxidantes y el incremento de la peroxidación lipídica. El genotipo susceptible exhibió mayor contenido de malondialdehído, menor poder reductor y baja actividad de las enzimas antioxidantes en comparación con el genotipo tolerante en los estreses por sequía y calor, aplicados en forma individual o en combinación. Esto puede resultar una herramienta importante en un programa de mejoramiento para la caracterización y diferenciación de genotipos de buffel grass tolerantes con mejor crecimiento bajo las condiciones de estrés evaluadas.

Palabras clave: *Cenchrus ciliaris* L., Sequía, Calor, Estrés combinado, Daño oxidativo, Defensa antioxidante.

ABSTRACT

Drought and heat stress are two critical threats to crop growth and sustainable agriculture worldwide. Many studies focused on the response of crops to a single stress, nevertheless studying the response of plants to a combination stress may be critical to our understanding of stress tolerance in plants and the development of tolerant genotypes. Buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) is a warm-season grass known in arid and semiarid regions for its tolerance to heat and drought stress, productivity, and forage quality. However, several accessions have exhibited different responses to abiotic stresses. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effects of the combination of drought and heat on the biochemical and morphological parameters in plants, and to compare the impacts of these limiting factors when applied separately and when combined, in order to develop experimental systems for tolerance evaluations of buffel grass in controlled conditions and provide tools for the identification of tolerant genotypes.. The results indicate that drought and heat greatly disrupt oxidative metabolism and generate biochemical and growth performance changes in buffel grass genotypes with variable responses. Individual drought or heat, and the combination, induce oxidative damage in buffel grass genotypes, as demonstrated in the present study, by the reduction in antioxidant enzyme activities and increase in lipid peroxidation. The sensitive genotype exhibited higher malondialdehyde content, lower reducing power, and reduced catalase and superoxide dismutase activities than tolerant under drought or heat stress or a combination of both stresses. This can be an important tool for the selection of genotypes in buffel grass breeding program, which allow us to develop strategies for selection of tolerant genotypes with better growth performance under drought and heat conditions.

Key Words: *Cenchrus ciliaris* L., Drought, Heat, Combined stress, Oxidative damage, Antioxidant defence.

TABLA DE CONTENIDOS

CONTENIDOS.....	PAG.
CAPÍTULO I – INTRODUCCIÓN GENERAL.....	13
Chaco árido y buffel grass.....	13
Caracterización de genotipos en estrés abiótico.....	17
El estrés oxidativo.....	18
Hipótesis.....	20
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos.....	21
Bibliografía.....	22
CAPÍTULO II – ESTRÉS POR SEQUÍA Y ESTRÉS POR CALOR	27
INTRODUCCIÓN.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Material vegetal.....	31
Condiciones generales de crecimiento.....	32
Determinación de la intensidad de sequía	32
Determinación del período de estrés por sequía	33
Evaluación de la tolerancia al estrés por sequía	32
Evaluación de la tolerancia al estrés por calor	36
Medición de parámetros bioquímicos.....	37
Determinación del contenido de Malondialdehído (MDA).....	37
Determinación del Poder reductor total (Valor FRAP).....	37
Determinación de Actividad Catalasa (CAT).....	38
Determinación de la Actividad Superóxido Dismutasa (SOD).....	38
Medición de caracteres morfológicos	39

Diseño experimental y análisis estadístico.....	40
RESULTADOS.....	41
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES PARCIALES.....	54
BIBLIOGRAFÍA	55
CAPÍTULO III – ESTRÉS COMBINADO POR SEQUÍA Y CALOR	65
INTRODUCCIÓN.....	65
MATERIALES Y MÉTODOS.....	68
Material vegetal.....	68
Condiciones generales de crecimiento.....	68
Ensayo de estrés combinado.....	69
Medición de parámetros bioquímicos.....	70
Medición de caracteres morfológicos de crecimiento.....	70
Diseño experimental y análisis estadístico	71
RESULTADOS.....	72
Comparación de parámetros bioquímicos y caracteres de crecimiento, en estrés por sequía y calor aplicados por separado y aplicados en combinación.....	75
DISCUSIÓN.....	80
CONCLUSIONES PARCIALES	83
BIBLIOGRAFÍA.....	85
CAPÍTULO IV – UTILIZACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS TOLERANTES	90
INTRODUCCIÓN.....	90
MATERIALES Y MÉTODOS.....	92.
Material vegetal.....	92.
Condiciones generales de crecimiento.....	93.

Evaluación de la tolerancia al estrés combinado en cinco genotipos de buffel grass	93
Medición de parámetros bioquímicos.....	94
Medición de caracteres morfológicos	94
Evaluación de producción total de biomasa en condiciones de campo	95
Diseño experimental y análisis estadístico.....	96
RESULTADOS.....	97
DISCUSIÓN.....	104
CONCLUSIÓN PARCIAL	105
BIBLIOGRAFÍA.....	106
CAPÍTULO V – CONCLUSIONES GENERALES	108
ANEXO – ENSAYOS ESTRÉS POR SEQUÍA.....	109

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 2.1.** Esquema del ensayo para determinación de la intensidad de sequía.....33
- Fig. 2.2.** Esquemas de los ensayos de estrés por sequía para determinar el tiempo en el cual se observan diferencias en el crecimiento.....34
- Fig. 2.3.** Esquema del ensayo de estrés para evaluar la tolerancia a la sequía utilizando parámetros bioquímicos y caracteres de crecimiento.....35
- Fig. 2.4.** Esquema del ensayo de estrés por calor con tratamiento de 45°C durante 72 horas y tratamiento control con 28°C.....36
- Fig. 2.5.** Parámetros bioquímicos medidos en diferentes Contenidos hídricos del sustrato.....42
- Fig. 2.6.** Caracteres morfológicos evaluados en los genotipos RN51 y RN1 a los 12 días (51 DDS) de tratamiento sequía con 30% de CHS.....44
- Fig. 2.7.** Parámetros bioquímicos medidos a las 24, 48 y 72 horas en los genotipos RN1 y RN5145
- Fig. 2.8.** Caracteres morfológicos evaluados en los genotipos RN51 y RN1 a los 15 días (54 DDS) de tratamiento sequía con 30% de CHS.....46
- Fig. 2.9.** Caracteres morfológicos evaluados en los genotipos RN51 y RN1, a los 21 días (60 DDS) de tratamiento sequía con 30% de CHS.....47
- Fig. 2.10.** Parámetros bioquímicos medidos a las 24, 48 y 72 h de tratamientos, con calor 45°C y control 28°C en los genotipos RN1 y RN51.....49
- Fig. 2.11.** Caracteres de crecimiento: Altura (A), Peso fresco (B) y Peso seco de la parte aérea de planta (C), medidos en los genotipos RN1 y RN51 a los 15 días de realizado el tratamiento de calor (54 días desde la siembra).....50
- Fig. 3.1.** Esquema del ensayo de estrés combinado por sequía y calor69
- Fig. 3.2.** Parámetros bioquímicos medidos a las 24, 48 y 72 h de tratamiento de estrés combinado por sequía y calor.....73
- Fig. 3.3.** Caracteres de crecimiento evaluados a los 15 días de aplicado el estrés combinado (54 DDS) en los genotipos RN51 y RN1.....75
- Fig. 3.4.** Comparación de resultados obtenidos al evaluar el contenido de MDA (A), (B), (C) y el valor de FRAP (D), (E), (F) aplicando el estrés por sequía y calor en forma separada y en combinación.....76
- Fig. 3.5.** Comparación de resultados obtenidos al evaluar las actividades enzimáticas CAT (A), (B), (C) y SOD (D), (E), (F) aplicando el estrés por sequía y calor en forma separada y en combinación.....78
- Fig. 3.6.** Comparación de resultados obtenidos al evaluar el crecimiento mediante el Peso Seco de Planta en Sequía (A), Calor (B) y la combinación de sequía más Calor (C).....79

Fig. 4.1. Esquema del ensayo de estrés combinado.....	95
Fig. 4.2. Contenido de malondialdehído (MDA) medido a las 24, 48 y 72 horas de estrés combinado por sequía y calor en los genotipos RN51, RN1, RN49, J20 y S6.....	98
Fig. 4.3. Poder reductor total, cuantificado mediante el valor de FRAP, medido a las 24, 48 y 72 horas de estrés combinado por sequía y calor en los genotipos RN51, RN1, RN49, J20 y S6.....	99
Fig. 4.4. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) a las 24, 48 y 72 horas de estrés combinado por sequía y calor en los genotipos RN51, RN1, RN49, J20 y S6.....	100
Fig. 4.5. Actividad de la enzima catalasa (CAT) a las 24, 48 y 72 horas de estrés combinado con sequía y calor, en los genotipos RN51, RN1, RN49, J20 y S6.....	101
Fig. 4.6. Peso Seco de la parte aérea de la Planta medido a los 15 días del tratamiento de estrés combinado con sequía y calor (54 días desde la siembra) en los genotipos RN51, RN1, RN49, J20 y S6.....	102
Fig. 4.7. Producción total de Biomasa en Kg de Peso seco / m ² obtenida de tres cosechas en el período de crecimiento del cultivo entre diciembre – marzo para los genotipos RN51, RN1, RN49, J20 y S6, evaluados en condiciones de campo en la localidad de Quilino (Noroeste de Córdoba, Argentina).....	102
Fig. 4.8. Comparación de producciones de Biomasa en Kg de Peso seco / m ² obtenidas en cada cosecha en el período de crecimiento del cultivo entre diciembre – marzo para los genotipos RN51, RN1, RN49, J20 y S6, evaluados en condiciones de campo en la localidad de Quilino	103
Fig. 4.9. Valores de precipitaciones y temperaturas durante el período de evaluación de los genotipos de buffel grass en la localidad de Quilino.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
AL	altura
ANAVA	Análisis de la Variancia
C°	grados centígrados
CAT	catalasa
CHS	contenido hídrico del sustrato
CIAP	centro de investigaciones agropecuarias
cm	centímetros
DDS	días desde la siembra
DGC	Di Rienzo Guzmán Casanoves
EDTA	ácido etileno di amino tetra acético
ERO	especie reactiva de oxígeno
Fig	figura
FRAP	ferric reduce ability of plasma
g	gramos
h	hora
ha	hectárea
IFRGV	Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
kg	kilogramos
LUV	luz ultravioleta
M	Molar
m ²	metro cuadrado
MDA	malondialdehído
mg	miligramos
min.	minutos
mL	mililitro
mM	mili molar
mm	milímetros

NBT	nitro blue tetrazolium
nm	nano moles
NOA	noroeste argentino
PF	peso fresco
PS	peso seco
PVPP	poli vinil poli pirrolidona
RN	register number
rpm	revoluciones por minuto
SOD	superóxido dismutasa
T°	temperatura
TBA	ácido thiobarbitúrico
TCA	ácido tri cloro acético
USOD	unidades de superóxido dismutasa
Xc	promedio tratamiento control
Xs	promedio tratamiento estrés

INTRODUCCIÓN GENERAL

Chaco árido y buffel Grass

La región fitogeográfica denominada Chaco Árido está situada en el Noroeste Argentino (NOA) y comprende los llanos de la provincia de La Rioja, el Noroeste de Córdoba, Suroeste de Santiago del Estero, Sureste de Catamarca, Noroeste de San Luís y Este de San Juan. Abarca una superficie aproximada de diez millones de hectáreas, donde las condiciones de clima y suelo imponen restricciones naturales a la producción agrícola extensiva (Karlin *et al.*, 2013). El suelo, las temperaturas y fundamentalmente las lluvias son las principales características ambientales que limitan las posibilidades productivas de la región (Avila *et al.*, 2014; Karlin, 2013). El clima es de tipo monzónico, con lluvias netamente estivales, y con precipitaciones anuales que varían de 450 mm al Este (Noroeste de Córdoba) a 200 mm al Oeste (Este de San Juan), concentradas entre los meses de diciembre a marzo. Los promedios anuales mencionados presentan alta variabilidad tanto entre años como dentro del año. Así es posible que, para una misma localidad se presenten años de 600-700 mm y otros donde las precipitaciones alcanzan solo 180 mm o menos (Rearte, 2007). Los suelos del Chaco Árido se caracterizan en general por ser poco desarrollados debido a que las escasas precipitaciones no influyen de forma importante en los procesos edafogénicos. La gran mayoría de los suelos del Chaco Árido corresponden a entisoles (Soil Survey Staff, 2010), con escasa participación de aridisoles en zonas bajas. Los suelos de piedemonte son suelos sueltos, permeables, franco arenoso de arenas gruesas. Las pendientes, la granulometría y el mal manejo de estos suelos los hacen susceptibles a erosión hídrica

(Karlin, 2013). El verano térmico comienza en octubre y finaliza en marzo. Las temperaturas en verano son elevadas, con una media mensual del mes más cálido (enero) de 26°C. Suelen presentarse 20 a 25 días con temperaturas superiores a los 40°C y máximas absolutas que sobrepasan los 45°C. Gran parte del Chaco Árido forma parte del polo de calor de Sudamérica (Karlin *et al.*, 2013). La producción agropecuaria sostenible debe contemplar primero las características ambientales y, sobre su base, fijar los objetivos productivos (De Leon, 2004; Karlin, 2013).

La principal actividad de la región es la ganadería de cría vacuna, y la cría de caprinos. Los campos presentan en general, baja infraestructura de alambrados y aguadas, falta de manejo del pastoreo y explotación irracional del bosque y de los pastizales naturales, mostrando un fuerte deterioro en el ecosistema (Karlin, 2013; Namur *et al.*, 2014; Rossi, 2005). El impacto más notable es la desaparición del pastizal y monte original, que fueron reemplazados por una vegetación arbustiva intrincada denominada "Fachinal". Las principales características del Fachinal son altamente negativas para el sistema productivo, por ejemplo: menor receptividad ganadera por la baja calidad y cantidad de forraje; mayor proporción de suelo desnudo (con riesgos de erosión hídrica y eólica); menor eficiencia hídrica (mayor evaporación y menor infiltración); menor accesibilidad al pastoreo (efecto de la barrera física del fachinal) (De León, 2004; Karlin, 2013; Rossi, 2005).

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 la ganancia de peso vivo animal y por consiguiente, la producción de carne. Además, permite reducir los riesgos de erosión y deterioro ambiental, mejora las condiciones del suelo, rehabilita áreas degradadas y complementa estratégicamente a la producción del

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

Buffel grass es una especie vegetal que pertenece a la familia Gramineae, subfamilia Panicoideae. Es perenne, con crecimiento primavero-estival y alcanza una altura entre 50 y 150 centímetros según el cultivar (Namur *et al.*, 2014). Esta especie, es originaria del sur y centro de África y de las regiones cálidas de la India e Indonesia (Humphreys, 1967). Es considerada como una de las mejores pasturas forrajeras para regiones semi áridas en zonas subtropicales debido a su fácil establecimiento, productividad y calidad (Jorge *et al.*, 2008). En la década del 80' varios cultivares se han introducido en diversos países del mundo, incluyendo Argentina (Ayerza, 1981; Griffa, 2010; Jorge *et al.*, 2008). En cuanto a tipo de suelo, no tolera inundaciones ni anegamientos prolongados, prefiere suelos profundos de textura liviana (Avila *et al.*, 2014). Es una especie que se reproduce por apomixis (clonación natural a través de semillas) y los genotipos sexuales son raros (Burson *et al.*, 2012). El Intituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) dispone 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 estudiado por Bashaw y colaboradores (Bashaw, 1962), la cual constituye la única alternativa hasta el momento, para ser utilizada como parental femenino en cruzamientos controlados. Buffel grass se desarrolla muy bien en regiones cálidas, subtropicales y tropicales, áridas y semiáridas. Presenta cultivares que se adaptan a precipitaciones desde 250 hasta 650 mm anuales, por lo que es mencionada como una especie muy tolerante a la sequía (Avila *et al.*, 2014; Chandra y Dubey, 2008) con variabilidad en dicha tolerancia entre diferentes genotipos (Mansoor *et al.*, 2002). Esta especie muestra en general, mayor capacidad de producción bajo condiciones de estrés hídrico que otras pasturas subtropicales como grama Rhodes (*Chloris gayana* Kunth.) y gatton panic (*Megathyrsus maximus* Jacq.).

Desde el punto de vista económico la importancia de buffel grass es creciente. En Argentina y en otras partes del mundo, como las regiones áridas de la India, estudios de valores nutricionales recomiendan su utilización (Avila *et al.*, 2014; Namur *et al.*, 2014; Saini *et al.*, 2007). El Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV) dependiente del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) del INTA, dispone de una colección activa de buffel grass, 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. Se ha logrado determinar un conjunto de caracteres descriptores morfológicos, no correlacionados entre sí, y suficientemente útiles para diferenciar los genotipos introducidos en nuestro país (Griffa, 2002; Griffa *et al.*, 2017). Asimismo, se han realizado ensayos en condiciones controladas de invernáculo donde, utilizando algunos de los caracteres descriptores (Altura, Peso seco y Peso fresco de plántula), los cultivares Biloela y Americana fueron más tolerantes al estrés por salinidad, comparado con Texas y la estirpe sexual introducida (Lanza Castelli *et al.*, 2010). Sin embargo, falta conocimiento acerca del comportamiento de dichos genotipos frente a otros tipos de estrés abiótico tales como sequía y calor. Ambos factores limitantes han sido declarados de importancia en la problemática del cambio climático y calentamiento global (Mittler y Blumwald, 2010) y particularmente influyen en la disminución de la productividad de los forrajes en la región del NOA (Karlin, 2013). Además, la planta puede sufrir un estrés por sequía y calor en forma simultánea (Mittler, 2006; Mittler y Blumwald, 2010) y se ha observado que los daños causados en la productividad son mayores (Mittler, 2006). Consecuentemente, resulta de creciente interés analizar el comportamiento de los cultivos en estrés combinado (Ahuja *et al.*, 2010; Mittler y Blumwald, 2010; Suzuki *et al.*, 2014; Zandalinas *et al.*, 2018).

Caracterización de genotipos en estrés abiótico

La identificación de genotipos más tolerantes al estrés ambiental, es una de las estrategias para superar el cambio climático global (Mittler y Blumwald, 2010; Zandalinas *et al.*, 2018). Asimismo, es uno de los objetivos primordiales en programas de mejoramiento genético (Ashraf, 2004; 2009). En tal sentido, en estos últimos, se plantea la necesidad de contar con criterios de selección. Los caracteres de interés agronómico se mencionan entre los más utilizados, como por ejemplo la variación en el rendimiento (Mitra, 2001; Tester y Bacic, 2005). Este, sin embargo, es un carácter complejo y poligénico. La selección de genotipos basada únicamente en el rendimiento total, podría ser poco eficiente. Por lo tanto, la identificación y uso de caracteres que contribuyan a explicar la productividad es importante para lograr una mayor eficiencia en el mejoramiento. En plántulas de buffel grass en ensayos hidropónicos, el peso fresco de parte aérea fue identificado como criterio de selección de genotipos tolerantes a salinidad (Griffa *et al.*, 2010); mientras que la altura de plantas a pesar de ser un carácter morfológico, presenta baja interacción genotipo ambiente y alta determinación genética (89%) (Griffa, 2002). Otra estrategia de interés para la selección de genotipos es la utilización de caracteres fisiológicos tales como, la capacidad para la exclusión de iones y el comportamiento del metabolismo fotosintético (Ashraf, 2004). En los últimos años se ha puesto mayor énfasis en la utilización de marcadores moleculares, sin embargo, tanto la aplicación de los marcadores moleculares, como los caracteres fisiológicos y bioquímicos, se benefician cuando van acompañados de estudios que muestren su relación con la tolerancia al estrés aplicado (Ashraf, 2004; Ashraf y Harris, 2004). En tal sentido, el fenómeno de estrés oxidativo por ser considerado un mecanismo común, relacionado a la tolerancia en la mayoría de los estreses abióticos (Ashraf, 2009; Mittler 2002), surge como una propuesta de interés para su análisis como herramienta para caracterización e identificación de genotipos tolerantes en estadíos fenológicos tempranos. Para tal fin, es necesario en buffel grass, el desarrollo de sistemas experimentales de estrés por sequía y calor. Además, debido a que es muy común que sequía y calor ocurran simultáneamente en condiciones de campo, se debe

hacer un mayor esfuerzo para imitar estas condiciones en estudios de estrés combinado en laboratorio (Atkinson y Urwin, 2012; Mittler, 2006; Mittler y Blumwald, 2010).

El estrés oxidativo

Las reacciones de óxido – reducción ocurren normalmente en la planta. En condiciones ambientales favorables, el metabolismo oxidativo se encuentra en equilibrio entre producción y degradación de especies reactivas del oxígeno (ERO), tales como el ión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), entre las más nombradas. Numerosas investigaciones han reportado incrementos y acumulación de ERO tanto en el estrés abiótico como en el biótico provocando en la planta estrés oxidativo. Por ejemplo, se ha medido su presencia en condiciones edáficas y climáticas como salinidad, metales pesados, sequía, altas y bajas temperaturas, alta intensidad lumínica (Arbona *et al.*, 2003; Foyer *et al.*, 1994; Luna *et al.*, 1994; Suzuki y Mittler, 2006;) y en las interacciones planta-patógeno (Ashraf, 2009; Lamb y Dixon, 1997).

Las ERO se generan tanto en el metabolismo fotosintético como en el respiratorio y cumplen una función dual: de señalización de la respuesta de defensa frente al estrés, y al aumentar en exceso, promueven daños oxidativos en la planta e incluso la muerte (Apel y Hirt, 2004; Jaleel *et al.*, 2009; Mittler, 2002; Vranová *et al.*, 2002). La planta se defiende mediante un complejo sistema antioxidante. Entre los antioxidantes no enzimáticos más estudiados se mencionan el ascórbico y el glutatión, mientras que dentro de los enzimáticos figuran enzimas claves como la superóxido dismutasa (SOD), que secuestra ión superóxido, catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) que secuestran peróxido de hidrógeno (Apel y Hirt, 2004; Jaleel *et al.*, 2009; Mittler, 2002).

Particularmente, tanto en el estrés por sequía como por altas temperaturas se ha observado un aumento de las ERO relacionadas con señales de defensa y/o con el daño oxidativo, dependiendo de la intensidad del estrés en estudio (Almeselmani *et al.*, 2006; Apel y Hirt, 2004; Gill y Tuteja, 2010). Asimismo, se ha señalado la inducción de enzimas de la defensa antioxidante, como también el incremento y participación de metabolitos antioxidantes no enzimáticos (Gill y Tuteja, 2010). Por otra parte, bajo condiciones de estrés combinado por sequía y calor, los mecanismos que se activan parecen ser diferentes (Rizhsky *et al.*, 2002; Mittler, 2006; Suzuki *et al.*, 2014). A nivel molecular, la respuesta en la expresión génica a una combinación de sequía y calor es única y no puede ser extrapolada directamente de la respuesta obtenida en la aplicación individual de ambos tipos de estrés (Rizhsky *et al.*, 2002; 2004). Desde entonces, muchos estudios han descubierto las respuestas de las plantas a diferentes combinaciones de estrés que involucran sequía, sal, temperatura extrema, metales pesados, alta luminosidad, compactación del suelo y estrés biótico (Alameda *et al.*, 2012; Atkinson y Urwin, 2012; Mittler, 2006; Mittler y Blumwald, 2010; Rivero *et al.*, 2014). Estos estudios demostraron que, a pesar de cierto grado de superposición, cada condición de estrés requería un mecanismo de respuesta único, adaptado a las necesidades específicas de la planta, y que cada combinación de dos o más factores de estrés también puede generar una respuesta específica (Suzuki *et al.*, 2014).

Numerosas investigaciones muestran que una mejor regulación del daño oxidativo se observa en los individuos tolerantes al ser comparados con los susceptibles (Gill y Tuteja, 2010; Lu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009;). Esto ha llevado a plantear la búsqueda de criterios fisiológicos/bioquímicos, algunos provenientes del estrés oxidativo, que muestren su relación con la mayor tolerancia al estrés abiótico en estudio (Ashraf, 2004). En tal sentido, para el estrés por sequía se han mencionado el nivel de prolina como osmolito, destacándose su capacidad antioxidante (Gill y Tuteja, 2010). En el estrés térmico se han reportado la regulación en el nivel de iones y el contenido de clorofilas (Almeselmani *et al.*, 2006). Además, se ha observado que el nivel de proteínas oxidadas, evaluadas como carbonilos, aumenta en los genotipos más sensibles al estrés (Gill y Tuteja, 2010). Particularmente, resultados del grupo que estudia

especies forrajeras subtropicales en el IFRGV, han mostrado al contenido de malondialdehído (MDA), un producto de la peroxidación de lípidos de membrana, como criterio para la selección de genotipos tolerantes al estrés salino, observándose tanto en grama Rhodes como en buffel grass, un menor contenido foliar de MDA en aquellos genotipos tolerantes (Luna *et al.*, 2000, 2002; Lanza Castelli *et al.*, 2010; Griffa *et al.*, 2010).

Por todo lo expuesto, esta tesis doctoral, se propone indagar acerca de la participación del estrés oxidativo y la defensa antioxidante como posibles mecanismos fisiológicos y bioquímicos relacionados con la tolerancia al estrés por sequía y calor en buffel grass. Para ello se desarrollarán sistemas experimentales modelo para ambos tipos de factores limitantes aplicados individualmente y en combinación. Asimismo, los genotipos de buffel grass serán caracterizados por su respuesta al estrés mediante caracteres morfológicos. Esta última información será comparada con evaluaciones del daño oxidativo y la actividad de la defensa antioxidante.

HIPÓTESIS

1- Los genotipos de *Cenchrus ciliaris* L. tolerantes al estrés por sequía, calor y la combinación de ambos factores, presentan una mayor defensa antioxidante y menor daño oxidativo.

2- Existe variabilidad genética en *Cenchrus ciliaris* L. en la tolerancia expresada en parámetros fisiológicos/bioquímicos relacionados con el fenómeno de estrés oxidativo para condiciones de sequía, calor y la combinación de ambos tipos de estrés.

OBJETIVO GENERAL

Aportar herramientas fisiológico/bioquímicas, útiles en un programa de mejoramiento genético, para la caracterización e identificación de genotipos tolerantes al estrés por sequía y calor en *Cenchrus ciliaris* L.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la participación del estrés oxidativo y la defensa antioxidante en la tolerancia al estrés por sequía, calor y la combinación de ambos en *Cenchrus ciliaris* L.
2. Aplicar los parámetros bioquímicos relacionados con el estrés oxidativo para la caracterización e identificación de genotipos tolerantes a sequía y calor en *Cenchrus ciliaris* L.
3. Desarrollar sistemas experimentales modelo de sequía, calor y la combinación de ambos, para evaluar la tolerancia de *Cenchrus ciliaris* L.

BIBLIOGRAFIA

- Ahuja, I., De-Vos R.C.H., Bones, A.M. and Hall, R.D. 2010. Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science* 15:664-674.
- Alameda D., Anten N.P.R. and Villar R. 2012. Soil compaction effects on growth and root traits of tobacco depend on light, water regime and mechanical stress. *Soil and Tillage Research*. 120:121-129.
- Almeselmani M., Deshmukh P.S., Sairam R.K., Kushwaha S.R. and Singh T.P. 2006. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant Science* 171:382-388.
- Apel K. and Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399.
- Arbona V., Flors V., Jacas J., García-Agustín P. and Gómez-Cadenas A. 2003. Enzymatic and Non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive Citrus Rootstock, to different levels of salinity. *Plant and Cellular Physiology* 44:388-394.
- Ashraf M. and Harris P.J.C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166:3-16.
- Ashraf M. 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora* 199:361-376.
- Ashraf M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances* 27:84-93.
- Atkinson N.J. and Urwin P.E. 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany* 63(10):3523–3543.
- Avila R., Barbera P., Blanco L., Burghi V., De Battista J., Frasinelli C., Frigerio F., Gandara L., Goldfarb M.C., Griffa S., Grunberg K., Leal K., Kunst C., Lacorte S., Martinez Calsina L., Mc Lean G., Nenning F., Otondo J., Petruzzi H., Pizzio R., Pueyo D., RE A., Ribotta A., Romero L., Stritzler N., Torres C., Carbonell C., Ugarte C., Veneciano J., Tomas M.A., Lauric M. 2014. Gramíneas forrajeras para el subtrópico y el semiárido central de la Argentina. Ediciones INTA, 72 pp. (Disponible: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-intagramineas_forrajeras_para_el_subtrpico_y_el_se.pdf Verificado: noviembre 2018).

- Ayerza R. 1981. El Buffel grass: Utilidad y manejo de una promisorio gramínea. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina, 139 pp.
- Bashaw E.C. 1962. Apomixis and sexuality in buffel grass. *Crop Science*. 2:412-415.
- Burson B.L., Actkinson J.M., Hussey M.A. and 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.
- Chandra A. and Dubey A. 2008. Evaluation of genus *Cenchrus* based on malondialdehyde, proline content, specific leaf area and carbon isotope discrimination for drought tolerance and divergence of species at DNA level. *Acta Physiologia Plantarum* 30:53-61.
- 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. SAGPyA. (Disponible: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_cultivadas_megatermicas/55-ampliando_frontera_ganadera.pdf verificado: mayo 2018).
- Ferrando C., Namur P., Berone G., Oriente E. y Blanco L. 2003. Del peladal a la producción de carne. *Revista Super Campo*. 1:56-59.
- Foyer C.H., Lelandais M. and Kunert K.J. 1994. Photooxidative stress in Plants. *Plant Physiology* 92:696-717.
- Gill S.S. and Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:909-930.
- Griffa S. 2002. Caracterización de una estirpe sexual y cultivares apomícticos de “Buffel grass” (*Cenchrus ciliaris* L.). Tesis para optar al título de magister en Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba – Argentina. 174 pp.
- Griffa S., Biderbost E., Grunberg K., Ribotta A., López Colomba E. y 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.
- Griffa S., Ribotta A., Lopez Colomba E., Tommasino E., Carloni E., Luna C. and Grunberg K. 2010. Evaluation seedling biomass and its components as selection criteria for improving salt tolerance in Buffel grass genotypes. *Grass and Forage Science* 65:358-361.
- Humphreys L.R. 1967. Buffel grass (*Cenchrus ciliaris*) in Australia. *Tropical Grasslands* 1:123–134.

- Jaleel C.A., Riadh K., Gopi R., Manivannan P., Ine`s J., Al-Juburi H.J., Chang-Xing Z., Hong-Bo S. and Panneerselvam R. 2009. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiologiae Plantarum* 31:427–436.
- Jorge M.A.B., Van de Wouw M., Hanson J. and Mohammed J. 2008. Characterisation of a collection of buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.). *Tropical Grasslands* 42:27–39.
- Karlin M.S. 2013. Cambio climático en zonas semiáridas: El caso Chaco Árido. Editorial Académica Española. 177 pp.
- Karlin M.S., Karlin U.O., Coirini R.O., Reati G.J. y Zapata R.M. 2013. El Chaco Árido. Encuentro Grupo Editor. Córdoba – Argentina. 420 pp.
- Lamb C. and Dixon R.A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:251-275.
- Lanza Castelli S., Grunberg K., Muñoz N., Griffa S., López Colomba E., Ribotta A., Biderbost E. and Luna C.M. 2010. Oxidative damage and antioxidant defenses as potential indicators of salt -tolerant *Cenchrus ciliaris* L. genotypes. *Flora* 205: 622–626.
- Lu S., Chen Ch. and Wang Z. 2009. Physiological responses of somaclonal variants of triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* X *Cynodon dactylon*) to drought stress. *Plant Cell Report* 28:517-526.
- Luna C.M., De Luca M. and Taleisnik E. 2002. Physiological causes for decreased productivity under high salinity in Boma, a tetraploid *Chloris gayana* cultivar: II. Oxidative stress. *Australian Journal of Agricultural Research* 53(6):663-669.
- Luna C.M., García Seffino L., Arias C. and Taleisnik E. 2000. Oxidative stress indicators as selection tools for salt tolerance in *Chloris gayana*. *Plant Breeding* 119:341-345.
- Luna C.M., Gonzalez C.A. and Trippi V. 1994. Oxidative damage by an excess of copper in Oat leaves. *Plant and Cell Physiology* 35(1):11-15.
- 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(3):392- 397.
- Mitra J. 2001. Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Current Science* 80(6):758-763.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 9:405-410.

- Mittler R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11(1):15-19.
- Mittler R. and Blumwald E. 2010. Genetic engineering for modern agriculture: Challenges and Perspectives. *Annual Review of Plant Biology* 61:443-462.
- Namur P., TessiJose M., Avila R.E., Rettore H.A. y Ferrando C.A. 2014. Buffel grass Generalidades, implantación y manejo para recuperación de áreas degradadas. Ediciones INTA. La Rioja, Argentina, 20 pp.
- Quiroga M., Grunberg K., Ribotta A., López Colomba E., Carloni E., Tommasino E., Luna C. and Griffa S. 2013. Obtaining sexual genotypes for breeding in buffel grass. *South African Journal of Botany* 88:118–123.
- Rearte D. 2007. La producción de carne en Argentina. Sitio Argentino de Producción Animal pp 10. (Disponible: http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/origenes_evolucion_y_estadisticas_de_la_ganaderia/48-ProdCarneArg_esp.pdf. Verificado: junio 2018).
- Rizhsky L., Liang H. and Mittler R. 2002. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology* 130:1-9.
- Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S. and Mittler R. 2004. When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. *Plant Physiology* 134:1683–1696.
- Rivero R.M., Mestre T.C., Mittler R., Rubio F., Garcia-Sanchez F. and Martinez V. 2014. The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. *Plant, Cell and Environment* 37:1059–1073.
- Rossi C.A. 2005. Utilización del "Buffel grass" (*Cenchrus ciliaris*) para la recuperación de pastizales degradados en la región árida subtropical. p.5. Recuperado el 15 de mayo de 2018 de http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_cultivadas_megatermicas/34-buffel_grass_en_chaco_arido_argentino.pdf
- Saini M.L., Jain P. and Joshi U.N. 2007. Morphological characteristics and nutritive value of some grass species in an arid ecosystem. *Grass and Forage Science* 62:104-108.
- Soil Survey Staff. 2010. Keys to soil taxonomy. USDA-NRCS. Eleventh Edition.
- Suzuki N. and Mittler R. 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* 126: 45-51.
- Suzuki N., Rivero R.M., Shulaev V., Blumwald E. and Mittler R. 2014. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist* 203:32–43.

- Tester M. and Bacic A. 2005. Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. *Plant Physiology* 137:791-793.
- Vranová E., Inzé D. and Van Breusegem F. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53(372):1227-1236.
- Wang J.Z., Cui L.J., Wang Y. and Li J.L. 2009. Growth, lipid peroxidation and photosynthesis in two tall fescue cultivars differing in heat tolerance. *Biologia Plantarum* 53(2):237-242.
- Zandalinas S.I., Mittler R., Balfagóna D., Arbonaa V. and Gómez-Cadenasa A. 2018. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum* 162: 2–12.

CAPÍTULO II

ESTRÉS POR SEQUÍA Y ESTRÉS POR CALOR

INTRODUCCIÓN

El estrés por sequía es uno de los factores más adversos para el crecimiento y la productividad de las plantas y es considerado una grave amenaza para la producción sustentable de cultivos en las actuales condiciones de cambio climático (Siddiqui *et al.*, 2015). La sequía desencadena una amplia variedad de respuestas en las plantas, que abarcan desde cambios en el metabolismo celular hasta aquellos que ocurren en las tasas de crecimiento y rendimiento (Farooq *et al.*, 2012). Comprender las respuestas bioquímicas a la sequía es esencial para una percepción holística de los mecanismos de tolerancia de las plantas en condiciones limitantes de agua (Anjum *et al.*, 2011). Para entender dicha tolerancia, la acumulación de osmolitos ha sido muy investigada. Se han observado incrementos en el contenido de prolina en plantas debido al déficit hídrico y diferencias en la cantidad de prolina acumulada entre diferentes especies (Hare y Cress, 1997; Maggio *et al.*, 2002); sin embargo, no se ha identificado una relación clara entre mayor capacidad de acumular prolina y tolerancia a la sequía (Maggio *et al.*, 2002). En diferentes especies de plantas, uno de los efectos primarios de la falta de agua es el cierre estomático y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) lo cual produce estrés oxidativo (Sharma y Dubey, 2005). Las ERO son subproductos inevitables del metabolismo aeróbico y tienen doble función, regulan procesos como el crecimiento, ciclo celular, muerte celular programada, respuestas celulares ante factores bióticos y abióticos y el desarrollo (Foyer y Noctor, 2005; Miller *et al.*, 2010). Por otra parte, una producción excesiva de ERO puede iniciar reacciones oxidativas no

controladas provocando daño de membranas, proteínas, clorofila y ácidos nucleicos resultando en un fuerte deterioro del normal funcionamiento celular (Blokchina *et al.*, 2002; Halliwell y Gutteridge, 2007; Noctor, 2006). El estrés oxidativo es el resultado del desbalance entre la producción de ERO y la degradación de éstas por medio de antioxidantes. Asimismo, es una característica general en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico, como por ejemplo temperaturas extremas (Sung *et al.*, 2003) y sequía (Zandalinas *et al.*, 2016).

El calor es otro estrés ambiental importante que limita el crecimiento, el metabolismo y la productividad de las plantas en todo el mundo. La temperatura media del aire a nivel global se ha incrementado 0,5 °C en el siglo XX, y es posible que aumente entre 1,5 a 4,5 °C durante el siglo XXI (IPCC, 2014; Karl *et al.* 1991; Kumar *et al.*, 2012). Debido al calentamiento global, se espera que los fenómenos de temperaturas extremas ocurran con mayor frecuencia y con mayor duración, afectando el crecimiento y desarrollo de los cultivos. Por lo tanto, resulta de suma importancia desarrollar programas de mejoramiento genético de especies vegetales con la finalidad de incrementar la tolerancia al estrés por calor (IPCC, 2007; Sanchez *et al.*, 2014; IPCC, 2014). En las plantas numerosas reacciones bioquímicas son sensibles a la temperatura (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). El calor puede afectar a las plantas en varios niveles organizacionales provocando alteraciones morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e incluso la expresión génica (Kumar *et al.*, 2012; Wahid *et al.*, 2007). Asimismo, las respuestas de las plantas al calor, varían dependiendo de la especie vegetal, la intensidad y la duración del estrés (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). Se ha observado que el calor provoca la pérdida del contenido de agua de las células, debido a esto se reduce el tamaño de las mismas y como consecuencia se reduce el crecimiento (Ashraf y Hafeez, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005). Como ejemplo, en respuesta al calor, la altura de planta, el número de tallos y la biomasa total se redujo en cultivares de arroz (Mitra *et al.*, 2008). Las altas temperaturas pueden acortar el estadio fenológico y reducir el ciclo de vida de la planta (Nahar *et al.*, 2010). La fotosíntesis es uno de los procesos fisiológicos más sensibles al calor, y en las plantas C3 la alta temperatura tiene mayor influencia sobre la capacidad fotosintética que en las C4 (Yang *et al.*, 2006). En estrés térmico se

producen alteraciones importantes en los cloroplastos, como la alteración de la organización estructural de los tilacoides y la pérdida de apilamiento de grana (Ashraf y Hafeez, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005). La actividad del fotosistema II (PSII) se reduce considerablemente en condiciones de elevada temperatura (Morales *et al.*, 2003). En un estudio realizado en *Vitis vinifera* L. la temperatura de 40 °C redujo notablemente la conductancia estomática, el crecimiento de tallos y la biomasa total (Greer y Weedon, 2012). Una de las principales consecuencias del calor es el exceso de generación de ERO, produciendo estrés oxidativo en la planta (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). Pudiendo causar peroxidación de lípidos y, por consiguiente, daños de membrana, degradación de proteínas e inactivación de enzimas (Meriga *et al.*, 2004). Una planta es capaz, en cierta medida, de tolerar el estrés térmico generando señales para cambiar el metabolismo. Las plantas alteran su metabolismo de diversas maneras en respuesta al calor, por ejemplo, modificando el sistema antioxidante para restablecer el equilibrio de óxido-reducción celular y la homeostasis (Valliyodan *et al.*, 2006; Janska *et al.*, 2010; Hasanuzzaman *et al.*, 2013; Choudhury *et al.*, 2017). En plantas tolerantes al calor, se ha observado una mayor protección contra los daños producidos por ERO debido a la síntesis de compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Apel y Hirt, 2004). Se ha observado que la actividad de diferentes enzimas antioxidantes es sensible a la temperatura, que la activación se produce en diferentes rangos de temperatura, y que la actividad de estas enzimas varía aumentando o disminuyendo a medida que el calor se incrementa (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). Chakraborty y Pradhan (2011), observaron que la catalasa (CAT), la ascorbato peroxidasa (APX) y la superóxido dismutasa (SOD) mostraron un aumento inicial antes de disminuir (a 50 °C), mientras que las actividades de la peroxidasa (POX) y la glutatión reductasa (GR) disminuyeron sus actividades completamente en temperaturas de entre 20 y 50 °C. Por otra parte, la actividad antioxidante total fue máxima en 35 - 40 °C en las variedades tolerantes y en 30 °C en las susceptibles. Además, se han reportado diferencias en actividades enzimáticas dependiendo de la especie vegetal, y el estado fenológico del cultivo (Almelselmani *et al.*, 2006; Dat *et al.*, 1998).

Es bien conocido que el estrés por sequía y el estrés por calor inducen la generación de especies reactivas de oxígeno y que la generación de ERO está estrechamente controlada tanto a nivel de producción como de degradación a través del incremento de la actividad del sistema antioxidante (Gil y Tuteja, 2010; Anjum *et al.*, 2011). Esto último, resulta promisorio en *Cenchrus ciliaris* L. para caracterizar y evaluar la respuesta bioquímica con la finalidad de identificar parámetros asociados a la tolerancia en esta especie.

Buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) es una gramínea utilizada como forraje para la alimentación de ganado bovino y caprino en las regiones áridas y semiáridas del mundo (Saini *et al.*, 2007; Chandra y Dubey, 2008; Kharrat-Souissi, *et al.*, 2012). Su temperatura óptima para el crecimiento se encuentra entre los 25 y 35 °C (Namur *et al.*, 2014). Ivory y Whiteman (1978) estudiaron el efecto de las combinaciones de temperaturas diurnas y nocturnas sobre el crecimiento de buffel grass cv. Biloela, entre otras especies forrajeras subtropicales y determinaron que el crecimiento óptimo se obtuvo aplicando temperatura diurna de 35°C y nocturna de 29°C. Sin embargo, falta conocimiento acerca de la tolerancia de buffel grass al estrés por calor, y la forma en que éste afecta a su crecimiento. Por otra parte, esta especie es conocida por su tolerancia a la sequía; sin embargo, se ha reportado variabilidad en la tolerancia y diferentes respuestas a los estreses ambientales han sido observadas en diversos genotipos (Mansoor *et al.*, 2002; Kharrat-Souissi *et al.*, 2012; Al-Dakheel *et al.*, 2015; Al-Dakheel y Iftikhar Hussain, 2016). En Argentina, buffel grass se cultiva en el noroeste (De León, 2004; Griffa, 2010; Namur *et al.*, 2014), en áreas con escasas precipitaciones durante la mayor parte del año y con alta temperatura e insolación en el verano (Guevara *et al.*, 2009; Karlin, 2013). El IFRGV lleva adelante un programa de mejoramiento genético en buffel grass y dispone de una colección activa de germoplasma caracterizada molecular y morfológicamente. Uno de los objetivos del programa de mejoramiento es obtener cultivares tolerantes a diferentes tipos de estrés abiótico. Para tal fin resulta necesario desarrollar sistemas experimentales en condiciones controladas que permitan evaluar genotipos en su respuesta al estrés

generando al mismo tiempo, herramientas para realizar caracterizaciones en estadíos fenológicos tempranos mediante parámetros asociados a la tolerancia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar la participación del estrés oxidativo y la defensa antioxidante en la tolerancia al estrés por sequía y calor en *Cenchrus ciliaris* L.

Desarrollar sistemas experimentales modelo de sequía y calor para evaluar la tolerancia de *Cenchrus ciliaris* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron los genotipos de buffel grass cultivar Biloela y una estirpe sexual introducida, de ahora en adelante denominados RN51 y RN1, respectivamente, según sus números de registro de la colección del IFRGV. RN51 es uno de los cultivares más difundidos en el país (Avila *et al.*, 2014; Namur *et al.*, 2014) y RN1 es el único parental sexual utilizado en programas de mejoramiento (Burson *et al.*, 2012) y ambos se encuentran disponibles en la colección activa de *C. ciliaris* del IFRGV. Además, en dichos genotipos, han sido observadas respuestas contrastantes (tolerancia y susceptibilidad, respectivamente) en salinidad (Lanza Castelli *et al.*, 2010).

Condiciones generales de crecimiento

Los genotipos fueron sembrados en macetas de plástico de 3 L de capacidad volumétrica, utilizando 0,2 gr de semillas por maceta. Cada maceta fue llenada con 2,76 kg de sustrato compuesto por una mezcla de arena y tierra en proporción 1:1 que previamente fue secado en estufa durante 72 horas a 105°C. Luego de la siembra las macetas fueron regadas utilizando un aspersor hasta lograr la saturación del sustrato y 2 horas más tarde, una vez finalizado el drenaje, las macetas fueron pesadas determinándose el 100 % de contenido hídrico del sustrato (CHS) por método gravimétrico. El CHS de las macetas se mantuvo al 80 % con riegos diarios durante 30 días en cámara de crecimiento con fotoperíodo de 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad, 28°C (+/-2) de temperatura, 40% (+/-10) de humedad relativa y 250 $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ de intensidad lumínica. En estas condiciones se cultivaron las plantas desde la siembra hasta cumplirse 30 días, obteniéndose 35 plantas por cada maceta con promedio de 4 hojas. A los 30 días desde la fecha de siembra (DDS) se realizaron los distintos ensayos aplicando los tratamientos detallados a continuación.

Determinación de la intensidad de sequía

Para establecer la intensidad de sequía capaz de provocar respuestas bioquímicas diferenciales entre los genotipos RN51 y RN1, las macetas con el material vegetal cultivado en las condiciones generales de crecimiento fueron regadas hasta saturación y luego de 2 horas de finalizado el drenaje se determinó el 100 % de CHS mediante método gravimétrico. Luego se suspendió el riego y se recolectaron todas las hojas de tres plantas de cada genotipo por seis repeticiones al lograrse 100, 70, 50, 30, 15 y 5 % de CHS (Fig. 2.1). De las muestras recolectadas se obtuvieron extractos para la medición de parámetros bioquímicos.

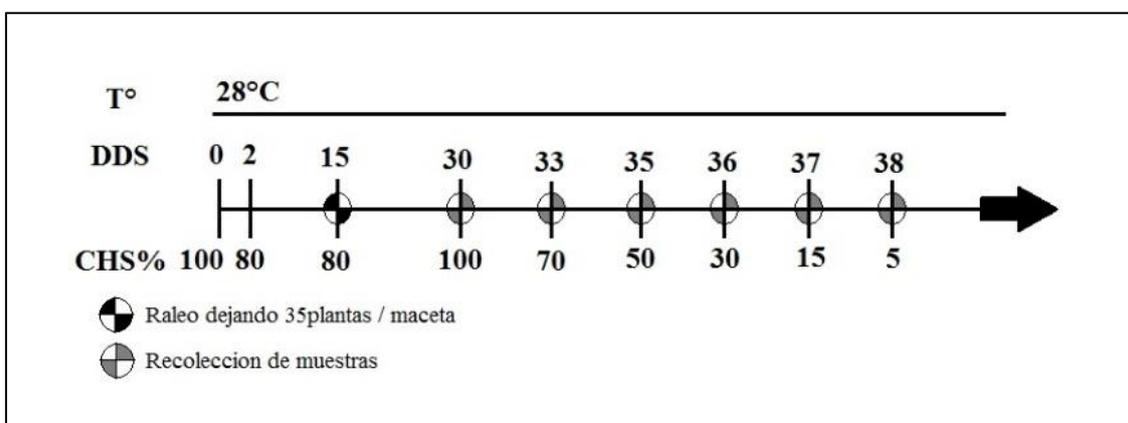


Fig. 2.1. Esquema del ensayo para determinación de la intensidad de sequía. Días desde la siembra (DDS). Contenido hídrico del sustrato (CHS).

Determinación del período de estrés por sequía para la obtención de respuestas diferenciales entre genotipos

Para establecer el período de estrés necesario para obtener respuestas de crecimiento diferentes entre los genotipos, observadas mediante los caracteres morfológicos, se ensayaron como materiales vegetales RN1 y RN51, que fueron cultivados en macetas en las condiciones generales de crecimiento y se realizaron tres ensayos donde se aplicaron tratamientos de sequía con 50% de CHS (Fig. 2.2 A), 30% de CHS (Fig. 2.2 B) y 15% de CHS (Fig. 2.2 C) que fueron contrastados aplicando un tratamiento con 80% de CHS considerado como control con buena provisión de agua y ausencia de estrés. El crecimiento de las plantas fue evaluado fenotípicamente cada tres días mediante Altura (AL), Peso Fresco (PF) y Peso Seco (PS) de la parte aérea de la planta. En cada momento de evaluación se recolectaron tres plantas de cada genotipo por tratamiento y por seis repeticiones.

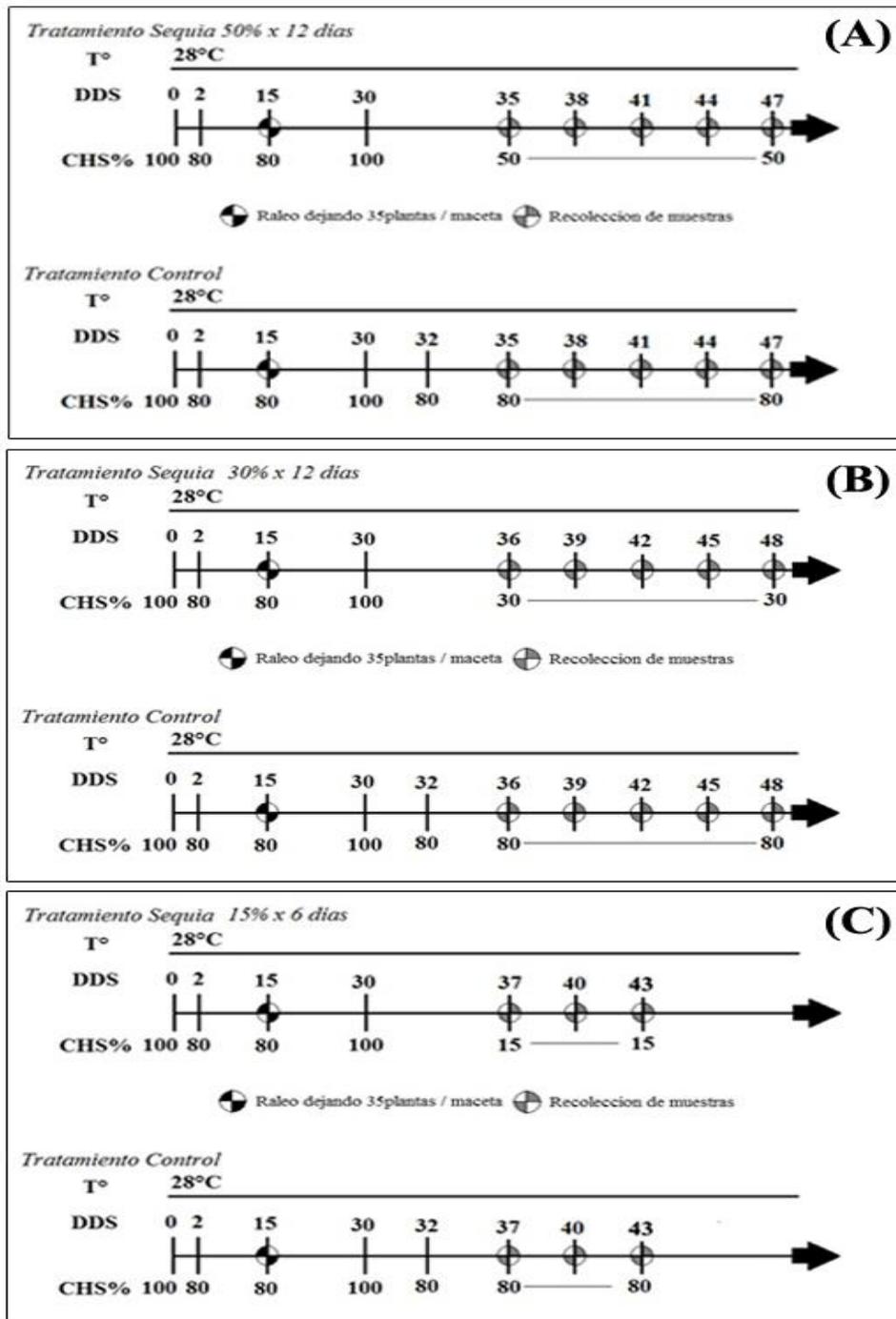


Fig. 2.2. Esquemas de los ensayos de estrés por sequía para determinar el tiempo en el cual se observan diferencias en el crecimiento. Días desde la siembra (DDS). Contenido hídrico del sustrato (CHS). (A) Tratamiento de 50% CHS durante 12 días y Control 80% CHS; (B) Tratamiento de 30% CHS durante 12 días y Control 80% CHS. (C) Tratamiento 15% de CHS durante 6 días y Control 80% CHS.

Evaluación de la tolerancia al estrés por sequía

Una vez identificada la intensidad y el período de estrés con los ensayos anteriores, en el cual los genotipos se diferenciaron entre sí, se realizó un nuevo ensayo. Para ello, los genotipos RN1 y RN51 se cultivaron en macetas bajo las condiciones generales de crecimiento antes descritas y a los 30 DDS se aplicaron los tratamientos sequía (30% de CHS) y control (80% de CHS). En el presente ensayo se decidió extender el período de sequía y realizar observaciones hasta cumplirse 24 días de tratamiento. Para la medición de caracteres bioquímicos se recolectaron muestras foliares a las 24, 48 y 72 horas y a los 6, 9, 12 y 21 días de tratamiento. El crecimiento fue evaluado a los 18 y 24 días, correspondiendo a 54 y 60 DDS mediante los caracteres de AL, PF y PS de planta (Fig. 2.3). Se realizaron seis repeticiones por cada genotipo y tratamiento.

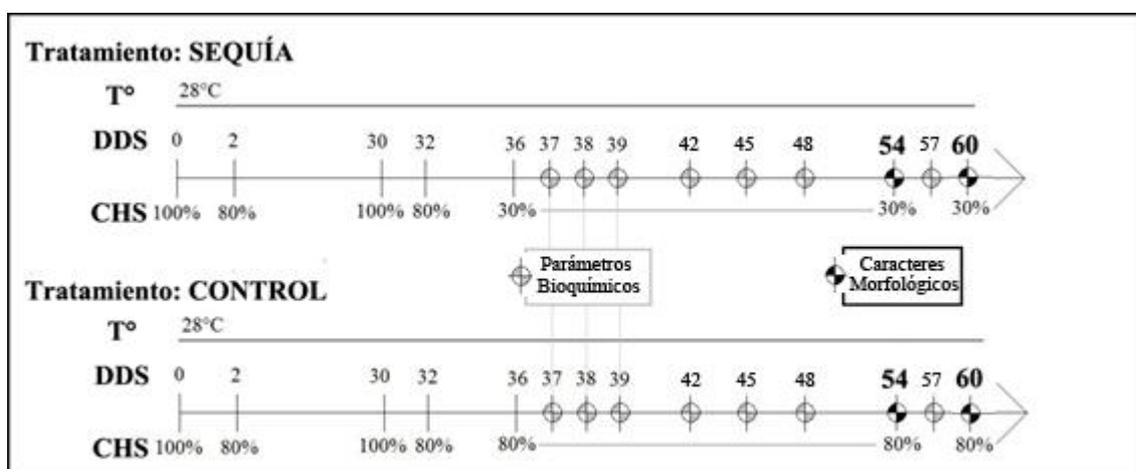


Fig. 2.3. Esquema del ensayo de estrés para evaluar la tolerancia a la sequía utilizando parámetros bioquímicos y caracteres de crecimiento. Días desde la siembra (DDS). Contenido hídrico del sustrato (CHS). Ambos tratamientos fueron aplicados a los genotipos RN51 y RN1.

Evaluación de la tolerancia al estrés por calor

A los 30 días DDS se realizó un riego a saturación y se determinó el 100 % de CHS en todas las macetas, luego un grupo de macetas fue llevado a una cámara de crecimiento donde se aplicó el tratamiento de shock térmico, elevando la temperatura a 45 °C (+ / - 2) durante 72 horas. El CHS fue mantenido en 80 % con fotoperíodo de 16 h luz / 8 h oscuridad, humedad relativa del ambiente (HR) 40 % (+ / - 10) y 250 $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ de intensidad lumínica. Otro grupo de macetas permaneció en cámara de cría bajo las condiciones generales de crecimiento y fueron utilizadas como tratamiento control. Se recolectaron muestras foliares para la medición de parámetros bioquímicos a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento. En cada momento de muestreo se recolectaron todas las hojas de tres plantas por genotipo y por tratamiento (control /calor) con seis repeticiones. Luego de aplicarse el tratamiento de calor, las macetas fueron llevadas a la cámara con condiciones normales de crecimiento y posteriormente, a los 5, 10 y 15 días (44, 49 y 54 DDS) se recolectaron muestras para la medición de los caracteres morfológicos (Fig. 2.4).

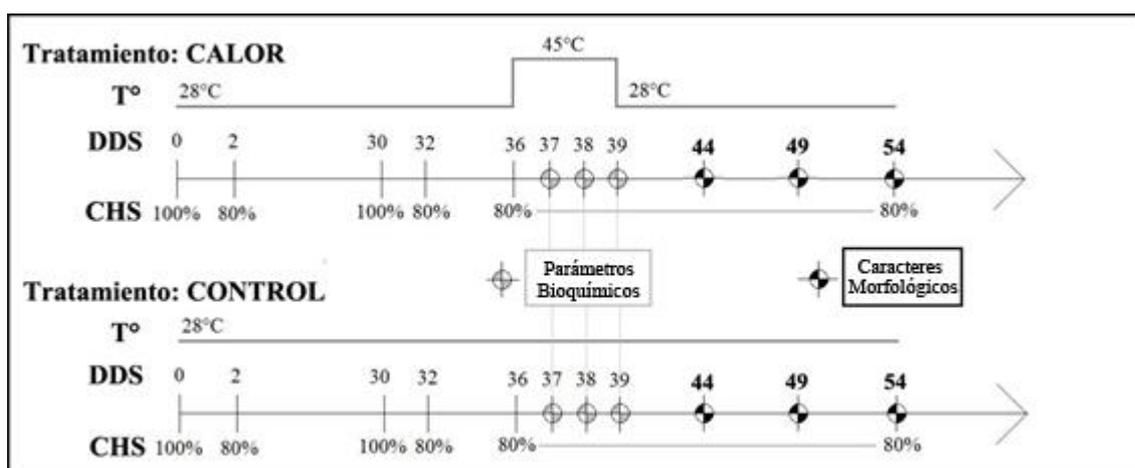


Fig 2.4. Esquema del ensayo de estrés por calor con tratamiento de 45°C durante 72 horas y tratamiento control con 28°C. Días desde la siembra (DDS). Contenido hídrico del sustrato (CHS).

Medición de parámetros bioquímicos

Determinación del contenido de Malondialdehído (MDA)

La peroxidación de lípidos en hojas fue evaluada mediante el contenido de MDA, de acuerdo con la técnica descrita por Heath y Packer (1968). Se utilizaron 100 mg de muestra vegetal congelada que fueron molidos con nitrógeno líquido con 1,5 mL de ácido tricloroacético 0,1% (TCA) y posteriormente se realizó un centrifugado a 12000 rpm durante 10 minutos. Luego se mezclaron 0,5 mL del extracto obtenido con 0,5 mL de una solución de 20 % de TCA con 0,5 % de ácido tiobarbitúrico (TBA) y se incubó durante 20 minutos a 90 °C en baño térmico. Posteriormente se realizó un centrifugado a 12000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue medido a 532 nm. Las mediciones se corrigieron para la turbidez inespecífica restando la absorbancia a 600 nm. Para cada muestra se realizó un control sin TBA (Hodges *et al.*, 1999). La concentración de MDA fue calculada utilizando un coeficiente de extinción molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados fueron expresados en nanomoles de MDA por miligramo de peso fresco (nmol / mg PF).

Determinación del poder reductor total (Valor FRAP)

La técnica de FRAP se utilizó para determinar la actividad antioxidante total mediante la reducción del ión férrico a la forma ferrosa en presencia de compuestos antioxidantes (Benzie and Strain, 1996). La solución reactiva de FRAP consistió en 525 mL de buffer acetato de potasio (300 mmol / L pH 3,6), 50 mL de 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazin (10 mmol / L), y 25 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ (200 mmol / L). Del extracto obtenido utilizando 100 mg de hojas molidas con 1 mL de alcohol al 80%, se utilizaron

30 μl que fueron mezclados con 270 μl de solución reactiva de FRAP. Luego se incubaron las muestras durante 40 minutos y se midió la densidad óptica a 600 nm. Los resultados fueron expresados en micromoles de hierro reducido por gramo de peso fresco ($\mu\text{mol} / \text{g PF}$).

Determinación de actividad catalasa (CAT)

La actividad de la enzima CAT fue medida mediante la cinética de consumo de peróxido de hidrógeno a 240 nm (Aebi, 1984). Se utilizaron 100 mg de muestra de hojas molidas con nitrógeno líquido y homogeneizadas en 1,5 mL con 50 mM de buffer fosfato de potasio (pH 7,4) conteniendo 1 mM de EDTA (ácido etileno di amino tetraacético) y 1% (25 mg) de PVPP (poli vinil poli pirrolidona). Luego se centrifugó a 12000 rpm durante 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante fue utilizado para determinar la concentración de proteína y la actividad enzimática. La unidad de actividad enzimática CAT se definió como la cantidad de enzima requerida para catalizar la conversión de 1 μmol de peróxido en agua por minuto. El contenido de proteína del extracto enzimático fue determinado de acuerdo al método descrito por Bradford (1976). El contenido de proteína soluble se calculó mediante la fórmula obtenida de la curva patrón de albúmina de suero bovino. Los resultados de la actividad CAT fueron expresados en micro moles de peróxido consumido por minuto por miligramo de proteína ($\mu\text{mol} / \text{min} \cdot \text{mg Proteína}$).

Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la enzima SOD se estimó de acuerdo al método de Beauchamp and Fridovich (1973), basado en la capacidad de esta enzima para inhibir la reducción de NBT (nitro blue tetrazolium). La luz ultravioleta (LUV) influye sobre la riboflavina, la cual se oxida reduciendo el oxígeno a ión súperóxido. Éste a su vez, en presencia de metionina como catalizadora, se oxida reduciendo el NBT a blue formazan, responsable

de la coloración azul. Así la concentración del ión súperóxido está directamente relacionada con el color. La mezcla de reacción (1 mL) contenía 30 μ l del extracto enzimático y una solución de buffer fosfato (50 mM pH 7,4) conteniendo 13 mM de Metionina, 75 μ M de NBT y 1 μ M de EDTA. La reacción se inició agregando 4 μ M de riboflavina y se incubó 9 minutos bajo LUV. Como muestra Control, se realizó una mezcla completa, pero sin extracto vegetal, la cual presentó la máxima reducción de NBT (máxima coloración de la reacción). La reacción se detuvo colocando los tubos en oscuridad y la densidad óptica fue medida a 560 nm. La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que redujo la densidad óptica al 50% del control (mezcla de reacción carente de enzima). El contenido de proteína del extracto enzimático fue determinado de acuerdo al método descrito por Bradford (1976). El contenido de proteína total se calculó mediante la fórmula obtenida de la curva patrón de albúmina de suero bovino. Los resultados de la actividad SOD fueron expresados en unidades SOD por miligramo de proteína (USOD / mg Proteína).

Medición de caracteres morfológicos

Se realizaron mediciones de AL, PF y PS de la parte aérea de la planta, recolectándose en cada momento de medición tres plantas al azar por cada repetición para cada genotipo y tratamiento.

Diseño experimental y Análisis estadístico

En todos los ensayos se utilizaron diseños completamente aleatorizados con seis repeticiones, siendo la unidad experimental la maceta. Para las comparaciones entre las medias de los parámetros bioquímicos, se utilizaron modelos lineales generales mixtos y se aplicó ANAVA para un modelo trifactorial con interacción entre los factores genotipo x tratamiento x tiempo de medición. Los caracteres morfológicos de crecimiento, se analizaron con modelos lineales generales mixtos y ANAVA para un modelo bifactorial con interacción genotipo x tratamiento. Las medias se compararon mediante la prueba DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002) al nivel de significación del 5% ($p \leq 0,05$) usando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017). En todas las figuras se representa el error estándar.

Complementariamente, en las figuras se presentan valores en porcentaje que indican la reducción o el incremento del valor promedio del tratamiento de estrés en relación al valor promedio del tratamiento control y fue calculado utilizando la siguiente fórmula: **Valor %** = $[(\bar{x}_s * 100 / \bar{x}_c) - 100]$. Donde \bar{x}_s y \bar{x}_c representan los valores promedio de los tratamientos de estrés y control para cada genotipo.

RESULTADOS

Determinación de la intensidad de sequía

En el ensayo para la determinación de la intensidad de sequía, se observó que el daño oxidativo cuantificado mediante el contenido de MDA se incrementó a partir del 30% de CHS en el genotipo RN1 mientras que, en el genotipo RN51 el aumento ocurrió al 5% de CHS. Asimismo, a medida que se incrementó la severidad de la sequía (disminuyendo el CHS), el daño oxidativo en RN1 fue mayor que el observado en RN51 (Fig. 2.5 A).

En relación a la actividad enzimática SOD, ambos genotipos en las intensidades de sequía de 15 y 5% de CHS, presentaron baja actividad SOD, sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Por otra parte, se pudo observar que en el genotipo RN1 la máxima actividad se registró al 70% de CHS, mientras que en el genotipo RN51 la actividad máxima de SOD fue más tardía, al 50% de CHS. Por último, al 30% de CHS el genotipo RN51 presentó mayor actividad que RN1 (Fig. 2.5 B). En cuanto a la actividad de la enzima CAT, se observaron diferencias significativas, a partir del 30% de CHS en adelante (Fig. 2.5 C), siendo el genotipo RN51 el que mostró la mayor actividad CAT en comparación al RN1.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el 30% de CHS indicó una intensidad de sequía a partir de la cual se produjo estrés oxidativo y respuestas bioquímicas diferenciales en los genotipos evaluados.

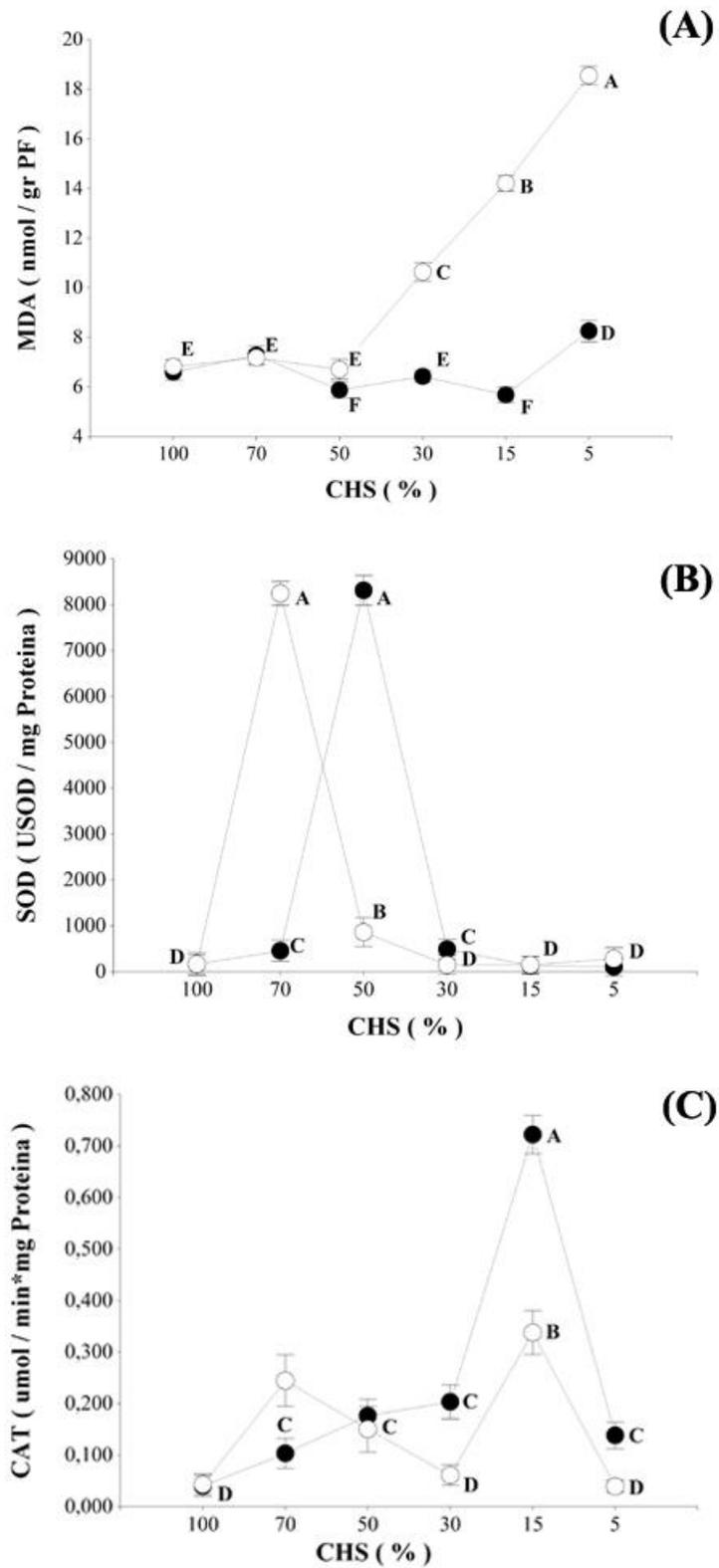


Fig 2.5. Parámetros bioquímicos medidos en diferentes contenidos hídricos del sustrato (CHS) en los genotipos RN1 (círculos blancos) y RN51 (círculos negros). Contenido de MDA (A). Actividad enzimática SOD (B) y actividad enzimática CAT (C). Cada punto representa el promedio de seis repeticiones. Las barras de error indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Determinación del período de estrés por sequía para la obtención de una respuesta diferencial entre genotipos

En relación a la evaluación del crecimiento, el ensayo en el cual durante 12 días se aplicaron los tratamientos de sequía con 50% de CHS y 80% de CHS (condición control), no se observaron cambios en las variables AL, PF y PS de planta para los genotipos evaluados. (Anexo). Al comparar ambos genotipos, no se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos. Por otra parte, al aplicar los tratamientos de sequía con 15% de CHS y control (80% CHS), se observó interacción entre genotipo y tratamiento; sin embargo, las diferencias solo se pudieron apreciar hasta el tercer día al 15% de CHS, posteriormente el material vegetal mostró signos de elevada deshidratación, dificultando las mediciones por lo cual las observaciones fueron suspendidas al sexto día de tratamiento (Anexo).

Por último, se observó interacción entre genotipo y tratamiento ($p < 0,02$) a los 12 días en el ensayo donde fueron aplicados los tratamientos de sequía con 30% de CHS y control (80% CHS). Ambos genotipos, en sequía, presentaron disminuciones en los valores de AL, PF y PS respecto de los valores observados en la condición control. El crecimiento fue más afectado por la sequía en el genotipo RN1 que en el genotipo RN51. Las reducciones de Al (Fig 2.6 A), PF (Fig. 2.6 B) y PS (Fig. 2.6 C) en el genotipo RN1 fueron de -22,8%, -36,3% y -37,6% respectivamente, mientras que en el genotipo RN51 los valores observados fueron de -9,8%, -18,7% y -17%.

De acuerdo a los resultados obtenidos, un período de 12 días aplicando los tratamientos de sequía con 30% de CHS y control con 80% de CHS, permitió expresar diferencias contrastantes en los caracteres morfológicos y observar diferencias en la reducción del crecimiento para los genotipos evaluados.

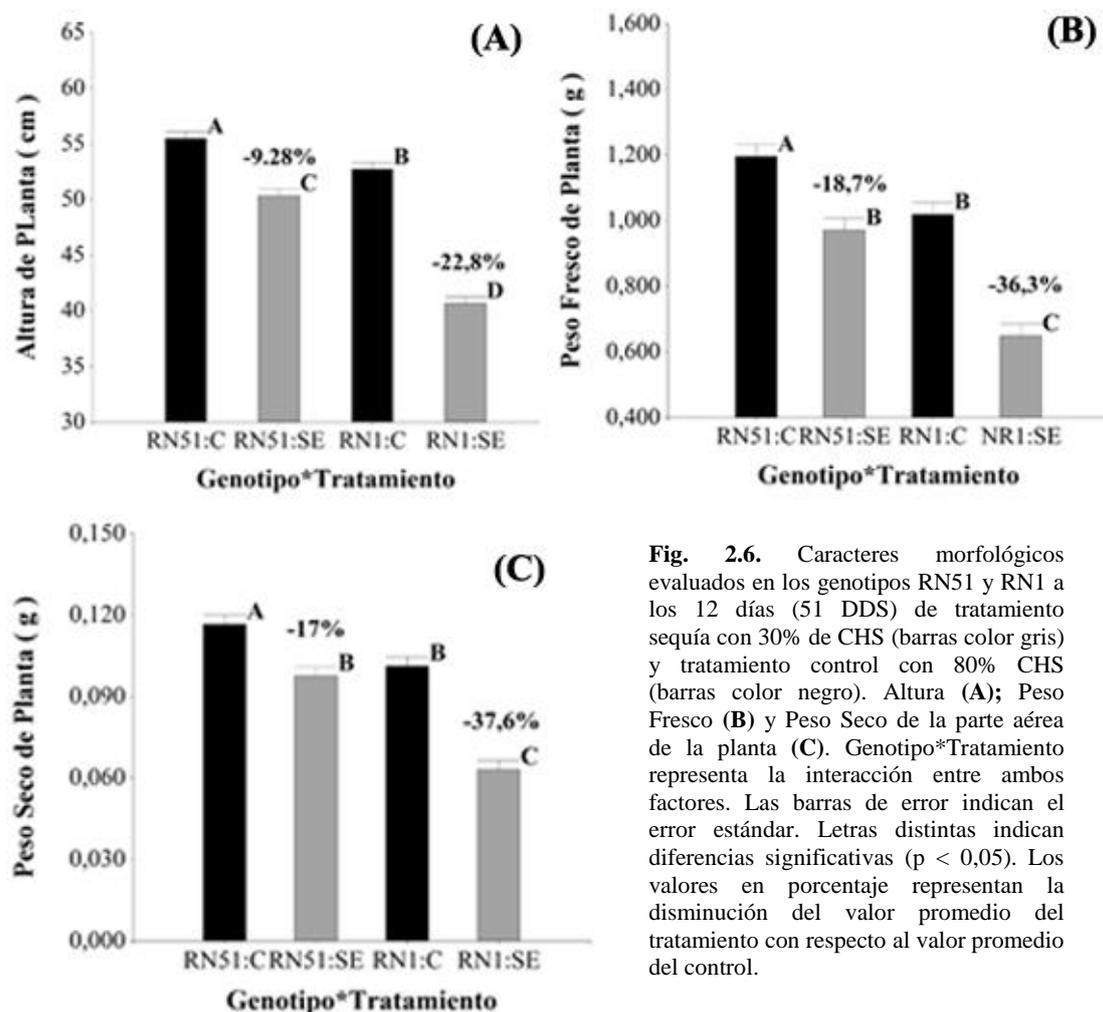


Fig. 2.6. Caracteres morfológicos evaluados en los genotipos RN51 y RN1 a los 12 días (51 DDS) de tratamiento sequía con 30% de CHS (barras color gris) y tratamiento control con 80% CHS (barras color negro). Altura (A); Peso Fresco (B) y Peso Seco de la parte aérea de la planta (C). Genotipo*Tratamiento representa la interacción entre ambos factores. Las barras de error indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores en porcentaje representan la disminución del valor promedio del tratamiento con respecto al valor promedio del control.

Evaluación de la tolerancia al estrés por sequía

Para evaluar la tolerancia a la sequía a través de parámetros bioquímicos y caracteres morfológicos, se aplicaron los tratamientos de sequía con 30 % de CHS y control con 80 % de CHS durante 24 días. A nivel bioquímico, las mayores diferencias se observaron a las 72 horas de tratamiento. El genotipo RN51 presentó un incremento del 30% en el contenido de MDA mientras que el genotipo RN1 mostró un 60% de aumento (Fig. 2.7 A). En cuanto al poder reductor, RN51 presentó mayores valores de

FRAP que RN1 y se observó un incremento de 162% a las 72 horas de tratamiento (Fig. 2.6 B). En las mediciones de las actividades enzimáticas SOD y CAT, el genotipo RN51 presentó la mayor actividad, con aumentos de 62 y 200% respectivamente, mientras que el genotipo RN1 no mostró incrementos de actividad enzimática respecto de su tratamiento control (Fig. 2.7 C y 2.7 D).

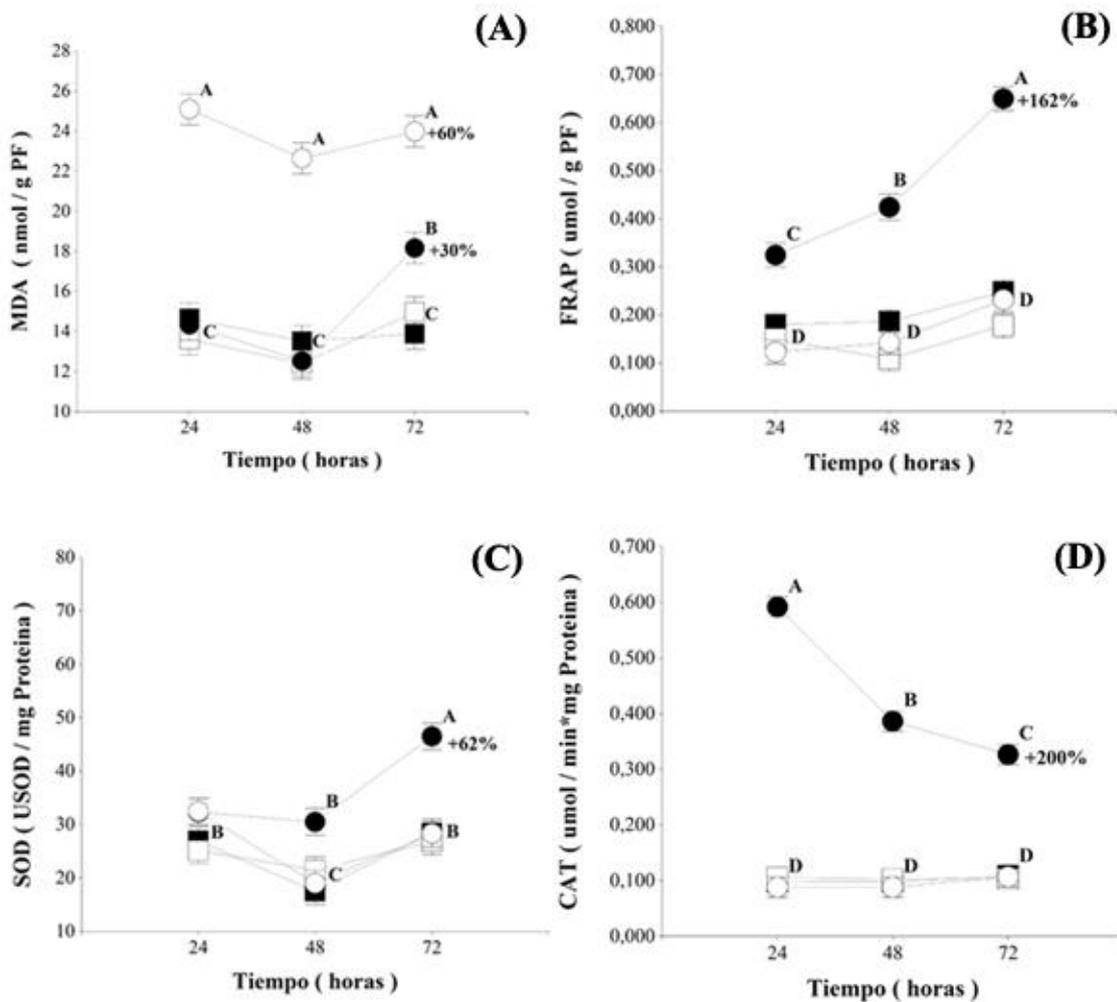


Fig 2.7. Parámetros bioquímicos medidos a las 24, 48 y 72 horas en los genotipos RN1 (cuadrado blanco: control, círculo blanco: sequía 30% de CHS) y RN51 (cuadrado negro: control, círculo negro: sequía 30% de CHS). Contenido de MDA (A), Valor de FRAP (B), Actividad enzimática SOD (C) y actividad enzimática CAT (D). Cada punto representa el promedio de seis repeticiones. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores expresados en porcentaje indican el incremento en el valor promedio del tratamiento de sequía respecto del valor promedio del tratamiento control.

En relación a los caracteres morfológicos evaluados: AL, PF y PS, se observó interacción entre genotipo y tratamiento a los 18 y a los 24 días. Los 18 días de tratamiento, correspondieron a 54 DDS y se observaron pérdidas de -21,7%, -57,9% y -44% en AL (Fig 2.8 A), PF (Fig. 2.8 B) y PS (Fig. 2.8 C) en el genotipo RN1 y pérdidas de -6,4%, -24,2% y -18% en el genotipo RN51. Por lo tanto, el crecimiento se vió más afectado en el genotipo RN1 en relación al genotipo RN51. Similares respuestas fueron observadas en los genotipos a los 24 días de tratamiento (60 DDS). El efecto del estrés por sequía sobre la disminución del crecimiento se acentuó, pero las diferencias entre los genotipos se mantuvieron, resultando el crecimiento del genotipo RN1 más afectado en relación al genotipo RN51. En el genotipo RN1 las pérdidas de AL (Fig. 2.9 A), PF (Fig. 2.9 B) y PS (Fig 2.9 C) fueron de -23%, -65% y -52,4% mientras que en RN51 se observaron pérdidas de -10.3 %, -26.3 % y -31 %, respectivamente.

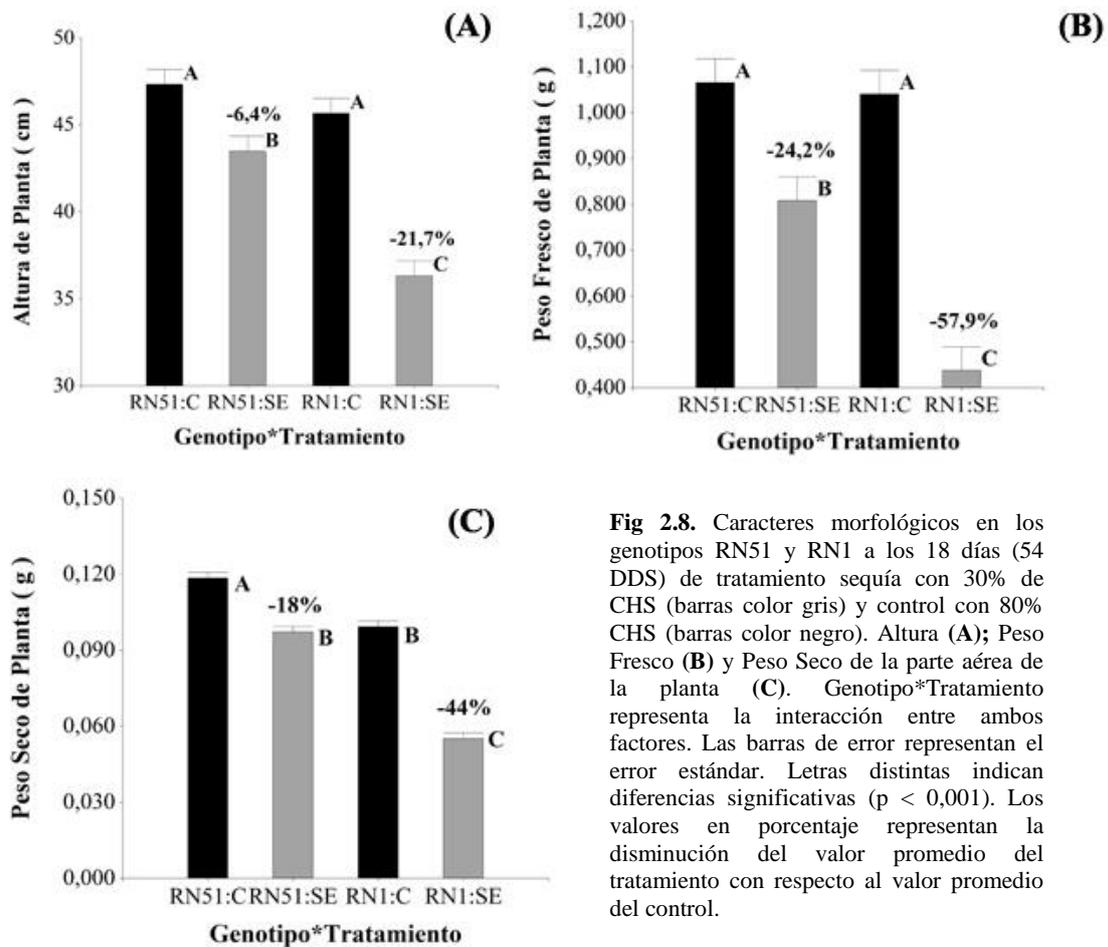


Fig 2.8. Caracteres morfológicos en los genotipos RN51 y RN1 a los 18 días (54 DDS) de tratamiento sequía con 30% de CHS (barras color gris) y control con 80% CHS (barras color negro). Altura (A); Peso Fresco (B) y Peso Seco de la parte aérea de la planta (C). Genotipo*Tratamiento representa la interacción entre ambos factores. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,001$). Los valores en porcentaje representan la disminución del valor promedio del tratamiento con respecto al valor promedio del control.

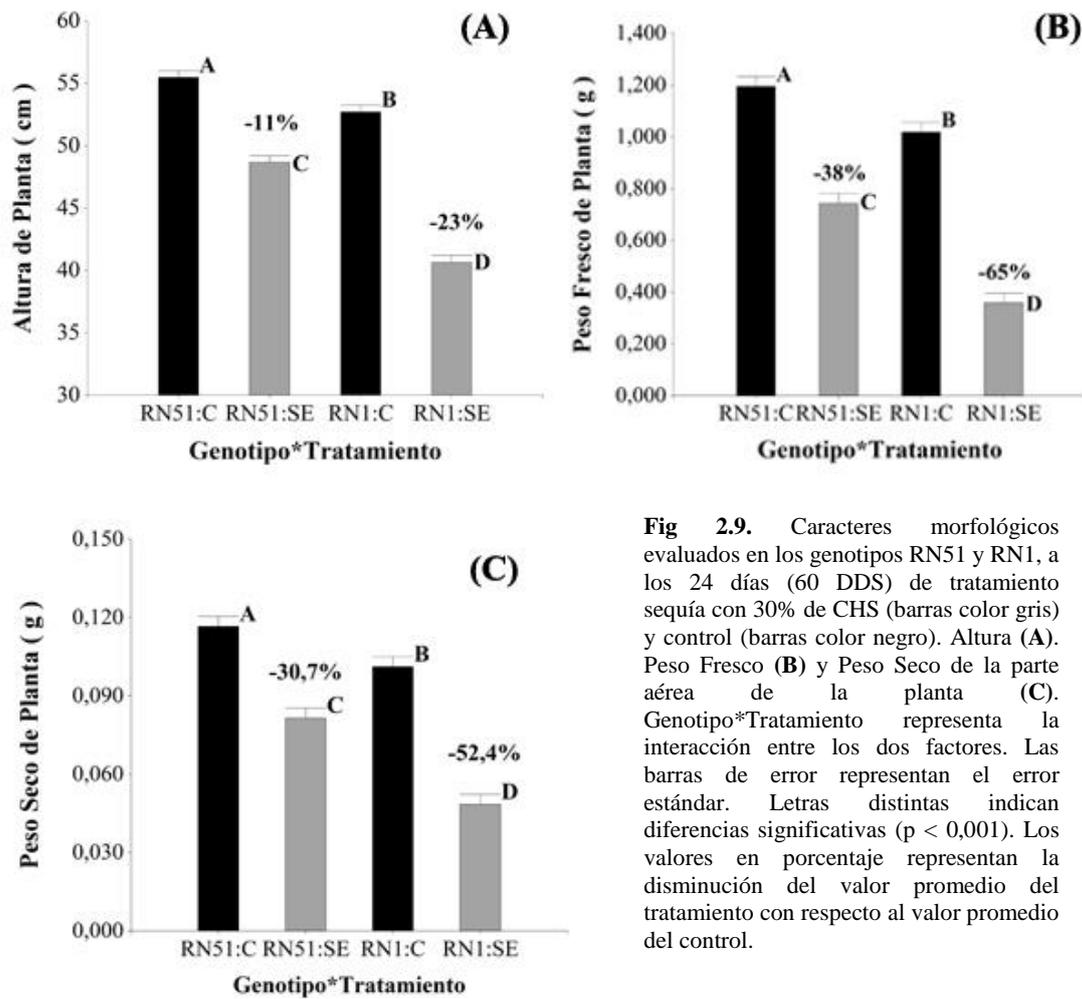


Fig 2.9. Caracteres morfológicos evaluados en los genotipos RN51 y RN1, a los 24 días (60 DDS) de tratamiento sequía con 30% de CHS (barras color gris) y control (barras color negro). Altura (A). Peso Fresco (B) y Peso Seco de la parte aérea de la planta (C). Genotipo*Tratamiento representa la interacción entre los dos factores. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,001$). Los valores en porcentaje representan la disminución del valor promedio del tratamiento con respecto al valor promedio del control.

Evaluación de la tolerancia al estrés por calor

El daño oxidativo se incrementó en ambos genotipos a las 72 horas con tratamiento de 45 °C observándose diferencias en el contenido de MDA entre los genotipos evaluados. El genotipo RN1 presentó el mayor incremento en el contenido de MDA respecto del control (73 %); mientras que, el genotipo RN51 presentó un aumento del 33 %. Además, se observó que el daño oxidativo se incrementó de forma temprana en el genotipo RN1 a partir de las 24 horas de tratamiento de calor; mientras que, en RN51 recién fue observado a las 72 horas (Fig. 2.10 A).

En relación al poder reductor total, el genotipo RN1 en estrés por calor, no mostró cambios respecto del tratamiento control; mientras que, el genotipo RN51 presentó incrementos en los valores de FRAP a las 24, 48 y 72 horas del orden del 88 % y superiores (Fig. 2.10 B). Al evaluar las actividades enzimáticas SOD y CAT, el genotipo RN51 mostró los mayores incrementos en la actividad antioxidante, incluso a las 72 horas de tratamiento pudo observarse actividades enzimáticas incrementadas respecto del control, con valores de 66 % en SOD (Fig. 2.10 C) y 105 % en CAT (Figura 2.10 D). Por otra parte, el genotipo RN1 solamente presentó incrementos en las actividades enzimáticas a las 24 horas de tratamiento y luego no se observaron diferencias respecto del control (Fig. 2.10 C y 2.10 D).

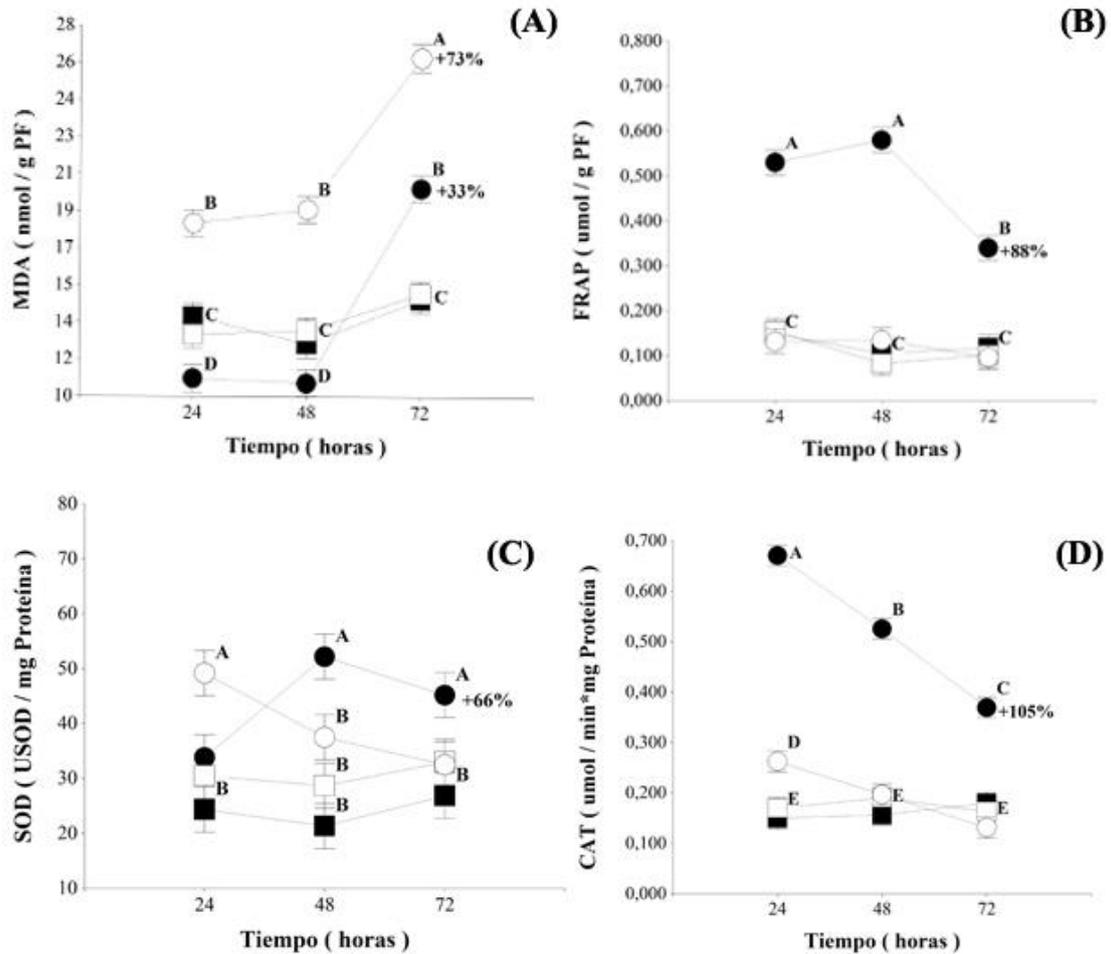


Fig 2.10. Parámetros bioquímicos medidos a las 24, 48 y 72 h de tratamientos, con calor 45°C (círculos) y control 28°C (cuadrados) en los genotipos RN1 (color blanco) y RN51 (color negro). Contenido de MDA (A). Valor de FRAP (B). Actividad enzimática SOD (C). Actividad enzimática CAT (D). Los valores expresados en porcentaje, señalados a las 72 h, indican el incremento del valor promedio del tratamiento de calor con respecto al valor promedio del tratamiento control. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a los caracteres morfológicos, se observó que el genotipo RN51 resultó menos afectado por el calor que RN1 y las diferencias fueron significativas a los 15 días luego de aplicado el tratamiento de calor (54 DDS). En AL (Figura 2.11 A), PF (Figura 2.11 B) y PS (Figura 2.11 C) de parte aérea de la planta, el genotipo RN51 disminuyó -7%, -16% y -37%, respectivamente en relación al tratamiento control, mientras en el genotipo RN1 los valores fueron de mayor magnitud -50%, -44% y -68%, respectivamente.

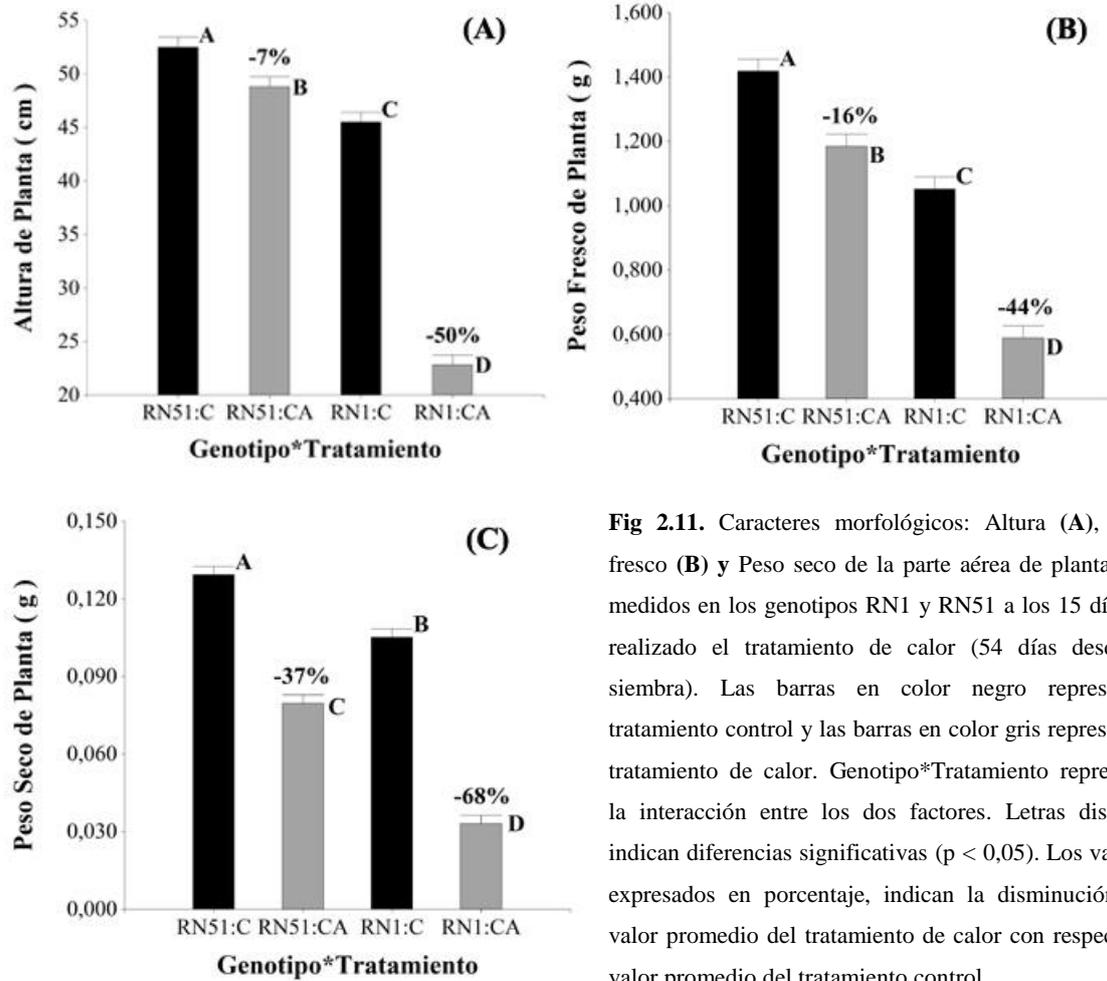


Fig 2.11. Caracteres morfológicos: Altura (A), Peso fresco (B) y Peso seco de la parte aérea de planta (C), medidos en los genotipos RN1 y RN51 a los 15 días de realizado el tratamiento de calor (54 días desde la siembra). Las barras en color negro representan tratamiento control y las barras en color gris representan tratamiento de calor. Genotipo*Tratamiento representa la interacción entre los dos factores. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores expresados en porcentaje, indican la disminución del valor promedio del tratamiento de calor con respecto al valor promedio del tratamiento control.

DISCUSIÓN

La sequía y el calor reducen el crecimiento de la planta afectando varios procesos fisiológicos y bioquímicos como la fotosíntesis, respiración, transporte de nutrientes y el balance hormonal, provocando la reducción del peso fresco, seco y la biomasa (Farooq *et al.*, 2012; Hasanuzzaman *et al.*, 2012). La disminución del crecimiento es uno de los potenciales criterios o índices de tolerancia a estrés abiótico (Fazeli *et al.*, 2007; Munns, 2002). La tolerancia generalmente se evalúa como el porcentaje de producción de biomasa en condiciones de estrés en comparación con las condiciones de control durante un período de tiempo (Munns, 2002). En esta tesis se registraron disminuciones en el crecimiento debido a la sequía y el calor, resultando más afectado el genotipo RN1. Por esta razón, se sugiere a este último como susceptible y, a RN51 como tolerante. Además, esta diferenciación en la respuesta a la sequía y calor, sugiere la existencia de variabilidad intraespecífica en buffel grass, coincidiendo con lo reportado por Mansoor y colaboradores (2002) quienes evaluaron una colección de genotipos de la misma especie, en India.

El estrés ambiental (salinidad, sequía, calor, alta intensidad de luz, entre otros) puede provocar un rápido incremento oxidativo debido a la proliferación de ERO generando cambios bioquímicos y fisiológicos que pueden provocar una baja producción de biomasa en las plantas (Abbasi *et al.*, 2007; Abideen *et al.*, 2015; Giraud *et al.*, 2008; Miao *et al.*, 2006; Serrato *et al.*, 2004). La depuración de especies reactivas de oxígeno por sistemas enzimáticos y no enzimáticos y la estabilidad de la membrana celular, son mecanismos vitales de tolerancia a la sequía (Anjum *et al.*, 2011). El contenido de MDA, producto de la peroxidación de lípidos de membrana, es considerado indicador de daño oxidativo (Moller *et al.*, 2007). En el presente estudio, el daño oxidativo se incrementó en ambos genotipos en sequía y calor; sin embargo, RN51 fue menos afectado en relación a RN1. Nuestras observaciones concuerdan con varios estudios realizados en otras especies vegetales (Bi *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2008; Sekmen *et al.*, 2014; Wang y Huang, 2004;) donde aquellos genotipos con

menor daño oxidativo, lograron un mejor desempeño en el crecimiento en condiciones de estrés. En cuanto al poder reductor total (valor FRAP), ha sido utilizado como una medida del contenido total de antioxidantes en plantas medicinales y especies arbóreas (Cervilla *et al.*, 2007; Dudonné *et al.*, 2009; Nur Alam *et al.*, 2013; Popović *et al.*, 2016; Rabeta y Nur Faraniza, 2013). Adicionalmente, se ha reportado un aumento del poder reductor bajo condiciones de estrés en una gramínea halófito *Phragmites karka* Rets. (Abideen *et al.*, 2015). Observación que concuerda con nuestros resultados. Además, en los resultados obtenidos en la presente tesis, se encontraron valores más elevados en RN51 bajo condiciones de estrés que en RN1. Incluso, se observó una asociación negativa entre el contenido de MDA y el valor de FRAP, mostrando un contenido reducido de MDA y un valor incrementado de FRAP en el genotipo tolerante (RN51). Esta relación inversa puede deberse a que el valor de FRAP es una medida del poder reductor total y proporciona una estimación de la capacidad antioxidante total del extracto obtenido de las muestras foliares de las plantas, por lo tanto, a mayor valor de FRAP se infiere mayor reacción antioxidante y por lo tanto mayor capacidad para evitar o controlar la peroxidación de lípidos de membrana cuantificado mediante el contenido de MDA.

En condiciones de estrés por déficit hídrico se ha descrito que el nivel de los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos puede incrementarse, decrecer o permanecer sin cambios, dependiendo de la especie vegetal, la duración del estrés y el antioxidante en estudio (Sircelj *et al.*, 2005; Jubany-Marí *et al.*, 2010). Las enzimas antioxidantes SOD y CAT son consideradas claves en la defensa antioxidante (Bi *et al.*, 2016). La SOD celular constituye la primera línea de defensa contra las ERO y cataliza la dismutación del radical superóxido ($O\cdot 2$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Apel y Hirt, 2004; Bi *et al.*, 2016; Das y Roychoudhury, 2014; Gill y Tuteja, 2010). En este estudio, mayor actividad SOD bajo sequía, se observó en el genotipo tolerante. Los resultados aquí presentados concuerdan con lo reportado por Huseynova (2012), quien informó que la actividad SOD disminuyó significativamente en cultivares de trigo sensibles y se mantuvo a nivel basal o aumentó en los tolerantes. Además, se reportaron resultados similares en *Festuca arundinacea* S. bajo sequía (Bi *et al.*, 2016). La CAT es una de las principales enzimas que capturan H_2O_2 , que se produce a través de la dismutación de $O\cdot 2$ en los peroxisomas y cloroplastos. La actividad de la enzima CAT se incrementó en

el genotipo tolerante bajo sequía, mientras que no se observó aumento de actividad en el susceptible. Resultados similares en la actividad CAT han sido reportados en otras especies vegetales (Jiang y Huang, 2001, Gill y Tuteja, 2010, Anwar Hossain *et al.*, 2013; Boaretto *et al.*, 2014; Bi *et al.* 2016; Jin *et al.*, 2016).

En cuanto al desarrollo del sistema experimental, el modelo con tratamientos de sequía (30% CHS) y control (80% CHS) durante 24 días resultó útil para provocar respuestas diferenciales entre los genotipos tanto a nivel bioquímico como fenotípico.

Bajo condiciones óptimas de temperatura, las plantas mantienen un balance entre la producción y la degradación de las EAO (Suzuki y Mittler, 2006). El estrés por calor induce la producción de EAO y deprime la actividad antioxidante provocando peroxidación lipídica (He y Huang, 2010; Jiang y Huang, 2001). El mantenimiento de bajos niveles de acumulación de MDA ha sido asociado con una mejor tolerancia al calor (Du *et al.*, 2009; Larkindale y Huang, 2004). En el presente estudio, el genotipo RN51 presentó menor contenido de MDA, mayor poder reductor, mayor actividad enzimática y su crecimiento fue menos afectado. Estas observaciones concuerdan con otros estudios donde en general se ha reportado que los genotipos tolerantes al estrés, poseen una expresión superior de antioxidantes, siendo ese comportamiento observado en otras especies vegetales en condiciones de salinidad (Walia *et al.*, 2005), sequía (Türkan *et al.*, 2005), frío (Kumar *et al.* 2008) y calor (Cui *et al.*, 2006; Almeselmani *et al.*, 2009; Snider *et al.*, 2010). Por último, cabe destacar que la capacidad de las plantas para minimizar el estrés oxidativo depende de la eficacia de los antioxidantes, existiendo variaciones entre y dentro de las especies vegetales (Blokhina *et al.*, 2002). En la presente tesis también se observaron variaciones en la capacidad para minimizar el daño oxidativo en los genotipos evaluados de buffel grass, y dicha capacidad, estuvo relacionada con el incremento en la actividad antioxidante. En relación al modelo de estrés aplicado, con temperatura de 45 °C constante durante 72 horas, resultó efectivo para generar estrés por calor en los genotipos evaluados, permitiendo observar cambios bioquímicos y morfológicos. Se diferenciaron respuestas al calor en los genotipos de buffel grass evaluados, identificándose al genotipo RN1 como sensible al estrés por calor y, al genotipo RN51, como tolerante.

CONCLUSIONES PARCIALES

El presente estudio aporta conocimiento acerca de la participación del estrés oxidativo en el estrés por sequía y calor en buffel grass. Se presentan respuestas bioquímicas y morfológicas contrastantes que sugieren la existencia de variabilidad genética intraespecífica para la tolerancia a sequía y calor en *Cenchrus ciliaris* L. Se evidencia que el genotipo tolerante presenta mayor defensa antioxidante, menor daño oxidativo y menor reducción de crecimiento en comparación con el susceptible.

Se obtuvo un sistema experimental modelo de estrés por sequía para buffel grass. En dicho sistema, la utilización de parámetros bioquímicos (MDA, FRAP, SOD y CAT) medidos a las 72 horas de estrés y caracteres morfológicos (AL, PF y PS) medidos a los 12, 18 y/o 24 días aplicando tratamiento sequía (30% CHS) y control (80% CHS), identifican al genotipo RN1 como susceptible y a RN51 como tolerante a dicho estrés.

En el estrés por calor, los parámetros bioquímicos medidos a las 72 horas de tratamiento permiten obtener respuestas diferenciales entre los genotipos evaluados y concuerda con la respuesta observada en caracteres morfológicos medidos a 15 días luego de aplicados los tratamientos control (28 °C) y calor (45 °C). El sistema experimental modelo de estrés por calor desarrollado permite identificar a RN1 como susceptible y a RN51 como tolerante.

BIBLIOGRAFIA

- Abbasi A.R., Hajirezaei M., Hofius D., Sonnewald D. and Voll L.M. 2007. Specific roles of alpha and gamma tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiology* 143:1720-1738.
- Abideen Z., Qasim M., Rasheed A., Yousuf Adnan M., Gul B. and Ajmal Khan M. 2015. Antioxidant activity and polyphenolic content of *Phragmites karka* under saline conditions. *Pakistan Journal of Botany* 47: 813-818.
- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- Al-Dakheel A.J. and Iftikhar Hussain M. 2016. Genotypic variation for salinity tolerance in *Cenchrus ciliaris* L. *Frontiers in Plant Science* 7:1090.
- Al-Dakheel A.J., Hussain M.I. and Abdul Rahman A.Q.M. 2015. Impact of irrigation water salinity on agronomical and quality attributes of *Cenchrus ciliaris* L. accessions. *Agricultural Water Management* 159:148-154.
- Almeselmani M., Deshmukh P.S. and Sairam R.K. 2009. High temperature stress tolerance in wheat genotypes: role of antioxidant defence enzymes. *Acta Agronomica Hungarica* 57(1):1–14.
- Almeselmani M., Deshmukh P.S., Sairam R.K., Kushwaha S.R. and Singh T.P. 2006. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress.
- Anjum S.A., Xie X., Wang L., Saleem M.F., Man C. and Lei W. 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research* 6(9):2026-2032.
- Anwar Hossain M., Golam Mostofa M. and Fujita M. 2013. Heat-shock positively modulates oxidative protection of salt and drought-stressed mustard (*Brassica campestris* L.) seedlings. *Journal of Plant Science and Molecular Breeding* 2:2.
- Apel K. and Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399.
- Ashraf M. and Hafeez M. 2004. Thermotolerance of pearl millet and maize at early growth stages: Growth and nutrient relations. *Biologia Plantarum* 48:81–86.

- Avila R., Barbera P., Blanco L., Burghi V., De Battista J., Frasinelli C., Frigerio F., Gandara L., Goldfarb M.C., Griffa S., Grunberg K., Leal K., Kunst C., Lacorte S., Martinez Calsina L., Mc Lean G., Nenning F., Otondo J., Petruzzi H., Pizzio R., Pueyo D., RE A., Ribotta A., Romero L., Stritzler N., Torres C., Carbonell C., Ugarte C., Veneciano J., Tomas M.A., Lauric M. 2014. Gramíneas forrajeras para el subtrópico y el semiárido central de la Argentina. Ediciones INTA, 72 pp. (Disponible: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-intagramineas_forrajeras_para_el_subtrpico_y_el_se.pdf Verificado: junio 2018).
- Beauchamp C.O. and Fridovich I. 1973. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochimica et Biophysica Acta* 317:50-64.
- Benzie I.F. and 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. and 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.
- Blokhina O., Virolainen E. and Fagerstedt K.V. 2002. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Annals of Botany* 91:179–194.
- Boaretto L., Carvalho G., Borgo L., Creste S., Landell M.G.A., Mazzafera P. and 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.
- Burson B.L., Actkinson J.M., Hussey M.A. and 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.

- Cervilla L.M., Blasco B., Ríos J.J., Romero L. and Ruiz J.M. 2007. Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*). Plants subjected to boron toxicity. *Annals of Botany* 100:747-756.
- Chakraborty U. and Pradhan D. 2011. High temperature-induced oxidative stress in *Lens culinaris*, role of antioxidants and amelioration of stress by chemical pre-treatments. *Journal of Plant Interactions* 6:43–52
- Chandra A. and Dubey A. 2008. Evaluation of genus *Cenchrus* based on malondialdehyde, proline content, specific leaf area and carbon isotope discrimination for drought tolerance and divergence of species at DNA level. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30:53–61.
- Choudhury F.K., Rivero R.M., Blumwald E. and Mittler R. 2017. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal* 90:856–867.
- Cui L., Li J., Fan Y., Xu S. and Zhang Z. 2006. High temperature effects on photosynthesis, PSII functionality and antioxidant activity of two *Festuca arundinacea* cultivars with different heat susceptibility. *Botanical Studies* 47: 61-69.
- Das K. and Roychoudhury A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* 2(53):1-13.
- Dat J.F., Foyer C.H. and Scott I.M. 1998. Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiology* 118(4):1455-61.
- De León M. 2004. Ampliando la frontera ganadera. Informe técnico INTA N°1, 19 pp. Córdoba, Argentina. (Disponible en: http://www.produccionbovina.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_cultivadas_megatermicas/17-ampliando_frontera_ganadera.pdf verificado: mayo 2018).
- Di Rienzo J. A., Guzman A. W. and Casanoves F. 2002. A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological and Environment Statistics* 7:129-142. (Disponible: <http://www.jstor.org/stable/1400690> verificado: mayo 2018).

- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. and Robledo C.W. 2017. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (Disponible: <http://www.infostat.com.ar> verificado: mayo 2018)
- Du H., Wang Z. and Huang B. 2009. Differential responses of warm-season and coolseason turfgrass species to heat stress associated with antioxidant enzyme activity. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134:417–422.
- Dudonné S., Vitrac X., Coutiere P., Woillez M. and Merillon J.M. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:1768-1774.
- Farooq M., Hussain M., Wahid A., Siddique K.H.M. 2012. Drought Stress in Plants: An Overview. In: Aroca R. (eds) *Plant Responses to Drought Stress*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Fazeli F., Ghorbanli M. and Niknam V. 2007. Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biologia Plantarum* 51(1): 98-103.
- Foyer C.H. and Noctor G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* 28:1056-1071.
- Gill S.S. and Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Giraud E., Ho L.H.M., Clifton R. and Carroll A. 2008. The absence of alternative oxidase 1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiology* 147: 595-610.
- Greer D.H. and Weedon M.M. 2012. Modelling photosynthetic responses to temperature of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Semillon) leaves on vines grown in a hot climate. *Plant Cell & Environment* 35(6):1050-64.
- Griffa S., Ribotta A., Lopez Colomba E., Tommasino E., Carloni E., Luna C. and Grunberg K. 2010. Evaluation seedling biomass and its components as selection criteria for improving salt tolerance in Buffel grass genotypes. *Grass Forage Science* 65:358-361.

- 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 B., Allegretti L.I. and Passera C.B. 2009. Range and livestock production in the Monte Desert, Argentina. *Journal of Arid Environments* 73:228–237.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. 2007. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., eds., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4rd Edition, Oxford University Press, New York, pp.187-267.
- Hare P.D. and Cress W.A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21:79–102.
- Hasanuzzaman M., Hossain M.A., da Silva J.A.T. and Fujita M. 2012. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: Antioxidant defense is a key factor. In: *Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies*. Venkateswarlu B., Shanker A., Shanker C., Maheswari M. (eds) Springer, Dordrecht, pp. 261–316.
- Hasanuzzaman M., Nahar K. and Fujita M. 2013. Extreme Temperatures, Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Plants. In: *Abiotic Stress Plant Responses and Applications in Agriculture*. Vahdati K., Leslie C., Eds., InTech: Rijeka, Croatia, pp. 169–205.
- He Y. and Huang B. 2010. Differential responses to heat stress in activities and isozymes of four antioxidant enzymes for two genotypes of Kentucky bluegrass contrasting in heat tolerance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 135:116–124.
- Heath R.L. and Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125:189-198.
- Hodges D.M., De Long J.M., Forney C.F. and 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.

- Huseynova, I.M. 2012. Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817:1516–1523.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) 2014. Climate Change 2014: Synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Climate change 2007–The physical science basis. In: Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2007. 989 pp.
- Ivory D.A. and Whiteman P.C. 1978. Effect of temperature on growth of five subtropical grasses. 1. Effect of day and night temperature on growth and morphological development. *Australian Journal of Plant Physiology* 5:131-148.
- Janska A., Marsik P., Zelenkova S. and Ovesna J. 2010. Cold stress and acclimation: What is important for metabolic adjustment?. *Plant Biology*. 12, (3) 95–405.
- Jiang Y. and Huang B. 2001. Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Science* 41:436–442.
- Jin R., Wang Y., Liu R., Gou J. and 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. doi:10.3389/fpls.2015.01123
- Jubany-Marí T., Munné-Bosch S. and Alegre L. 2010. Redox regulation of water stress responses in field-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(5):351-8.
- Karl T.R., Kukla G., Razuvayev V.N., Changery M.J., Quayle R.G., Heim R.R., Easterling D.R. and Fu C.B. 1991. Global warming: evidence for asymmetric diurnal temperature change. *Geophys Res Lett* 18:2253–2256.
- Karlin M.S. 2013. Cambio climático en zonas semiáridas: El caso Chaco Árido. Editorial Académica Española. 177 pp.

- Kharrat-Souissi A., Baumel A., Torre F. and Chaieb M. 2012. Genetic differentiation of the dominant perennial grass *Cenchrus ciliaris* L. contributes to response to water deficit in arid lands. *The Rangeland Journal* 34:55-62.
- Kumar A., Bali Y., Sharma K.D., Thakral S.K. 2008. Evaluation of wheat genotypes for terminal heat tolerance by simple physiological traits. *Indian Journal of Plant Physiology* 13:21–27
- Kumar S., Gupta D. and Nayyar H. 2012. Comparative response of maize and rice genotypes to heat stress: status of oxidative stress and antioxidants. *Acta Physiologiae Plantarum* 34:75–86.
- Lanza Castelli S., Grunberg K., Muñoz N., Griffa S., Lopez Colomba E., Ribotta A., Biderbost E. and Luna C.M. 2010. Oxidative damage and antioxidant defenses as potential indicators of salt-tolerant *Cenchrus ciliaris* L. genotypes. *Flora* 205: 622–626.
- Larkindale J. and Huang B.R. 2004. Changes of lipid composition and saturation level in leaves and roots for heat-stressed and heat-acclimated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Environmental and Experimental Botany* 51: 57–67.
- Liu J., Xie X, Du J., Sun J. and Bai X. 2008. Effects of simultaneous drought and heat stress on Kentucky bluegrass. *Scientia Horticulturae* 115: 190-195.
- Maggio A., Miyazaki S., Veronese P., Fujita T., Ibeas J.I., Damsz B., Narasimhan M.L., Hasegawa P.M., Joly R.J. and Bressan R.A. 2002. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *The Plant Journal* 31(6):699-712.
- 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(3):392-397.
- Meriga B., Krishna Reddy B., Rajender Rao K., Ananda Reddy L., and Kavi Kishor P.B. 2004. Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *Journal of Plant Physiology* 161: 63-68.
- Miao Y., Lv D., Wang P., Wang X.C., Chen J., Miao C. and Song C.P. 2006. An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a

- scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *The Plant Cell* 18:2749-2766.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S. and Mittler R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment* 33:453–467.
- Mitra R. and Bhatia C.R. 2008. Bioenergetic cost of heat tolerance in wheat crop. *Current Science* 94:1049–1053
- Moller I.M., Jensen P.E. and Hansson A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58:459-481.
- Morales D., Rodriguez P., Dellamico J., Nicolas E., Torrecillas A., Sanchez-Blanco M.J. 2003. High-temperature preconditioning and thermal shock imposition affects water relations, gas exchange and root hydraulic conductivity in tomato. *Biologia Plantarum* 47:203–208.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25:239–250.
- Nahar K., Ahamed K.U., Fujita M. 2010. Phenological variation and its relation with yield in several wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars under normal and late sowing mediated heat stress condition. *Notulae Scientia Biologicae* 2:51–56.
- Namur P., TessiJose M., Avila R.E., Rettore H.A. y Ferrando C.A. 2014. BUFFEL GRASS Generalidades, implantación y manejo para recuperación de áreas degradadas. Ediciones INTA. La Rioja, Argentina, 20 pp.
- Noctor G. 2006. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell and Environment* 29(3): 409-425.
- Nur Alam M.D., Bristi N.J. and Rafiquzzaman M.D. 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21:143-152.
- Plant Science. 171(3):382-8.
- Popovic B.M., Stajner D., Zdero-Pavlovi R., Tumbas-Saponjac V., Canadanovic-Brunet J. and Orlovic S. 2016. Water stress induces changes in polyphenol profile and antioxidant capacity in poplar plants (*Populus* spp.). *Plant Physiology and Biochemistry* 105:242-250.

- Rabeta M.S. and Nur Faraniza R. 2013. Total phenolic content and ferric reducing antioxidant power of the leaves and fruits of *Garcinia atrovirdis* and *Cynometra cauliflora*. *International Food Research Journal* 20:1691-1696.
- Rodríguez M., Canales E. and Borrás-Hidalgo O. 2005. Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biotechnology* 22:1–10.
- Saini M.L., Jain P. and Joshi Oshi U.N. 2007. Morphological characteristics and nutritive value of some grass species in an arid ecosystem. *Grass and Forage Science* 62: 104–108.
- Sanchez B., Mussen A. and Porter J. 2014. Temperatures and the growth and development of maize and rice: a review. *Global Change Biology* 20: 408–417.
- Sekmen A.H., Ozgur R., Uzilday B. and Turkan I. 2014. Reactive oxygen species scavenging capacities of cotton (*Gossypium hirsutum*) cultivars under combined drought and heat induced oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany* 99:141-149.
- Serrato A.J., Perez-Ruiz J.M., Spinola M.C. and Cejudo F.J. 2004. A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 279: 43821-43827.
- Siddiqui M.H., Al-Khaishany M.Y., Al-Qutami M.A., Al-Whaibi M.H., Grover A., Ali H.M., Al-Wahibi M.S. and Bukhari N.A. 2015. Response of different genotypes of faba bean plant to drought stress. *International Journal of Molecular Science* 16:10214-10227.
- Sircelj H., Tausz M., Grill D. and Batic F. 2005. Biochemical responses in leaves of two apple tree cultivars subjected to progressing drought. *Journal of Plant Physiology* 162(12):1308-18.
- Snider J.L., Oosterhuis D.M. and Kawakami E.M. 2010. Genotypic differences in thermotolerance are dependent upon pre-stress capacity for antioxidant protection of the photosynthetic apparatus in *Gossypium hirsutum*. *Physiologiae Plantarum* 138: 268–277.
- Sung D., Kaplan F., Lee K. and Guy C.L. 2003. Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in Plant Science* 8(4):179-187.

- Suzuki N., Rivero R.M, Shulaev V., Blumwald E. and Mittler R. 2014. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist* 203:32–43.
- Türkan I., Bor M., Özdemir F. and Koca H. 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of droughttolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science* 168:223–231.
- Valliyodan B. and Nguyen H.T. 2006. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 9:189–195.
- Wahid A., Gelani S., Ashraf M. and Foolad M.R. 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* 61:199–223.
- Walia H., Wilson C., Condamine P.I., Liu X., Ismail A.M., Zeng L., Wanamaker S.I., Mandal J., Jin X., Cui X. and Close T.J. 2005. Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. *Plant Physiology* 139:822–835.
- Wang Z. and Huang B. 2004. Physiological recovery of Kentucky bluegrass from simultaneous drought and heat stress. *Crop Science* 44:1729-1736.
- Yang X., Chen X., Ge Q., Li B., Tong Y., Zhang A., Li Z., Kuang T. and Lu C. 2006. Tolerance of photosynthesis to photoinhibition, high temperature and drought stress in flag leaves of wheat: A comparison between a hybridization line and its parents grown under field conditions. *Plant Science* 171:389–397.
- Zandalinas S.I., Rivero R.M., Martínez V., Gómez-Cadenas A. and Arbona V. 2016. Tolerance of citrus plants to the combination of high temperatures and drought is associated to the increase in transpiration modulated by a reduction in abscisic acid levels. *BMC Plant Biology* 16:105.

CAPÍTULO III

ESTRÉS COMBINADO POR SEQUÍA Y CALOR

INTRODUCCIÓN

La sequía y el calor son conocidos como dos de los principales factores abióticos que amenazan al crecimiento y desarrollo de los cultivos agrícolas. Se prevé que la frecuencia, duración e intensidad de ambos tipos de estrés aumente en el futuro, lo que podría causar efectos adversos en la productividad de cultivos, forrajes y consecuentemente en la producción ganadera (Zhou *et al.*, 2017). En la última década, se han realizado investigaciones para determinar la respuesta de diferentes especies de plantas a distintos tipos de estrés abiótico aplicando un único estrés a la vez, mientras en los ecosistemas, las plantas suelen estar expuestas simultáneamente a distintos factores estresantes (Mittler, 2006; Pandey *et al.*, 2015).

Las plantas han desarrollado diversas adaptaciones morfológicas, celulares, fisiológicas, bioquímicas y moleculares para protegerse en situaciones de estrés abiótico (Choudhury *et al.*, 2017; Pandey *et al.*, 2015). El estrés oxidativo por ser considerado un mecanismo común asociado a la tolerancia en la mayoría de los estreses abióticos (Ashraf, 2009; Mittler 2002), surge como una propuesta de interés para su análisis como herramienta para la identificación de genotipos tolerantes. Las condiciones de sequía y calor aumentan drásticamente los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) provocando daño oxidativo de proteínas, ADN y lípidos (Apel y Hirt, 2004; Farooq *et*

al., 2009; Gill y Tuteja, 2010; Mittler, 2002). Particularmente, cuando las ERO atacan directamente a los lípidos de la membrana celular, el malondialdehído (MDA), un producto de la peroxidación de ácidos grasos insaturados, aumenta su contenido (Gill y Tuteja, 2010). Las ERO también actúan como moléculas de señalización en muchos procesos biológicos, como el cierre de estomas, el crecimiento, el desarrollo y la señalización del estrés (Suzuki *et al.*, 2012). Debido a la doble función de las ERO, las plantas tienen capacidad de regular, en cierta medida, las concentraciones de ERO por medio de mecanismos de control y eliminación (Sekmen *et al.*, 2014). Las plantas han desarrollado un sistema de defensa, que involucra enzimas antioxidantes y compuestos no enzimáticos para proteger a las plantas de las ERO. Cuando la homeostasis de ERO se interrumpe bajo condiciones ambientales desfavorables, la inducción de la defensa antioxidante enzimática es considerada un factor importante de la tolerancia al estrés en las plantas (Mittler *et al.*, 2011; Sekmen *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2012; You y Chan, 2015). Las principales enzimas antioxidantes incluyen a la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR) entre otras (Ashraf, 2009; Gill y Tuteja, 2010; Sharma *et al.*, 2012; You y Chan, 2015).

Existe poco conocimiento acerca de la respuesta de las plantas a la combinación de distintos tipos de estrés abiótico y actualmente es necesario realizar estudios aplicando tratamientos de estrés en forma combinada, para obtener una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la tolerancia (Choudhury *et al.*, 2017; Mittler y Blumwald, 2010; Pandey *et al.*, 2015; Rizhsky *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2014). Cuando las plantas se enfrentan a múltiples factores abióticos al mismo tiempo, la estrategia de adaptación se rige por la interacción, entre los factores de estrés involucrados, lo cual es interpretado por la planta como un nuevo estado de estrés (Mittler, 2006). En general, las respuestas de las plantas a múltiples tipos de estrés están mayormente determinadas por el estrés más severo (estrés dominante) (Pandey *et al.*, 2015). Sin embargo, los resultados dependen en gran medida del estado fenológico de la planta, el genotipo, la susceptibilidad o tolerancia y la intensidad de los tipos de estrés abiótico involucrados en la combinación (Silva *et al.*, 2010). Varios autores resaltan la

necesidad de desarrollar cultivos con mejor rendimiento y tolerancia a la combinación de estrés abiótico, destacando la compleja interacción entre sequía y calor (Feller y Vaseva, 2014; Mittler, 2006; Pandey *et al.*, 2015).

Buffel grass es una especie subtropical apomíctica (Ozias-Akins, 2006), utilizada para producción de forraje en regiones áridas y semiáridas en todo el mundo (Saini *et al.*, 2007). Se sabe que buffel grass presenta tolerancia al estrés por sequía con buena producción de biomasa y calidad de forraje (Hacker y Waite, 2001; Kharrat-Souissi *et al.*, 2010; Marshall *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha observado variabilidad genética en varios genotipos cuando fueron expuestos a estrés abiótico (Al-Dakheel y Iftikhar Hussain, 2016; Kharrat-Souissi *et al.*, 2012; Mansoor *et al.*, 2002).

En el capítulo previo de esta tesis, se desarrollaron sistemas experimentales de estrés por sequía y calor aplicados de forma separada. En el desarrollo de dichos sistemas experimentales se caracterizó la participación del estrés oxidativo y se evaluó la tolerancia, relacionada con el crecimiento, en los genotipos contrastantes RN51 y RN1 de buffel grass. En el presente capítulo, se aplicó un modelo experimental de estrés combinado por sequía y calor, generado en base a los resultados obtenidos en los modelos descritos en los capítulos anteriores y se realizó la comparación de las respuestas de los parámetros bioquímicos y de crecimiento observadas en el estrés por sequía y calor, aplicados de forma separada y en combinación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar la participación del estrés oxidativo y la defensa antioxidante en la tolerancia al estrés combinado por sequía y calor en *Cenchrus ciliaris* L.

Desarrollar un sistema experimental modelo de estrés combinado por sequía y calor para evaluar la tolerancia de *Cenchrus ciliaris* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se utilizaron los genotipos RN1 y RN51 descritos en el Capítulo II.

Condiciones Generales de Crecimiento

Se utilizaron las mismas condiciones descritas en el Capítulo II.

Ensayo de estrés combinado por sequía y calor

A los 30 DDS las macetas con el material vegetal crecido en las condiciones generales de crecimiento fueron regadas hasta saturación y luego de 2 h de finalizado el drenaje, se determinó el 100 % de CHS mediante método gravimétrico. Luego se suspendió el riego y se recolectaron todas las hojas de 3 plantas de cada genotipo por cada repetición a las 24, 48 y 72 horas de lograrse las condiciones de 30 % de CHS y temperatura de 45 °C constante. Paralelamente, un grupo de macetas fue utilizado como tratamiento control, permaneciendo en cámara de cría, bajo condiciones generales de crecimiento y, se recolectaron muestras en los mismos momentos que el grupo de macetas bajo estrés combinado (Fig. 3.1).

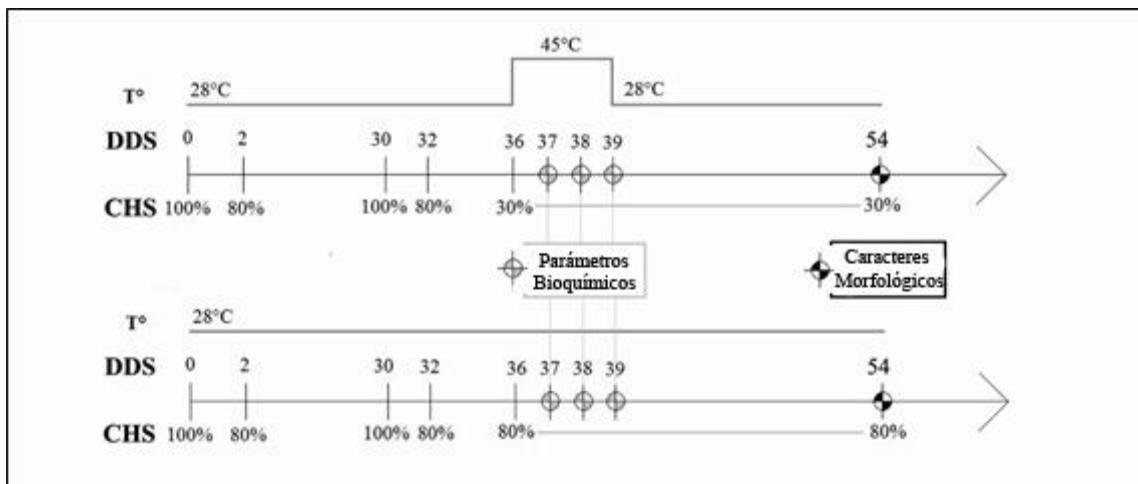


Fig 3.1. Esquema del ensayo de estrés combinado por sequía y calor. DDS: días después de la siembra. CHS: contenido hídrico del sustrato.

Medición de parámetros bioquímicos

Se realizaron mediciones de daño oxidativo (contenido de MDA), poder reductor total (valor de FRAP) y actividades enzimáticas SOD y CAT utilizando las técnicas descritas en el Capítulo II. Establecida la condición de estrés combinado por sequía y calor, las mediciones fueron realizadas en muestras foliares a las 24, 48 y 72 h. Recolectándose todas las hojas de tres plantas al azar, de seis repeticiones, para cada genotipo y tratamiento.

Medición de caracteres morfológicos

Se realizaron mediciones de AL, PF y PS de la parte aérea de planta, a los 15 días luego de aplicado el tratamiento de estrés combinado por sequía y calor (correspondiendo a 54 DDS). Se recolectaron cinco plantas al azar, de seis repeticiones, para cada genotipo y tratamiento.

Diseño experimental y Análisis estadístico

En el ensayo se utilizó un diseño completamente aleatorizado con seis repeticiones, siendo la unidad experimental la maceta. Para las comparaciones entre las medias de los parámetros bioquímicos, se utilizaron modelos lineales generales mixtos y se aplicó ANAVA para un modelo de tres factores con interacción entre los factores genotipo x tratamiento x tiempo de medición. Para las comparaciones entre las medias en caracteres de crecimiento, se utilizaron modelos lineales generales mixtos y se aplicó ANAVA para un modelo bifactorial con interacción entre los factores genotipo x tratamiento. Las medias se compararon mediante la prueba DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002) al nivel de significación del 5% ($p \leq 0,05$) usando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017).

Complementariamente, en las figuras se presentan valores en porcentaje indicando la reducción o el incremento del valor promedio del tratamiento de estrés en relación al valor promedio del tratamiento control. Para el cálculo de dicho valor se utilizó la siguiente fórmula: $\text{Valor \%} = [(\bar{x}_s * 100 / \bar{x}_c)] - 100$. Donde \bar{x}_s y \bar{x}_c representan los valores promedio de los tratamientos de estrés y control para cada genotipo.

RESULTADOS

Parámetros bioquímicos

El contenido de MDA fue mayor en el genotipo RN1 en comparación con el genotipo RN51 en todos los momentos de medición (24, 48 y 72 horas de tratamiento), alcanzando un incremento del 86 % respecto de su tratamiento control. Por el contrario, RN 51 solamente incrementó un 21 % el contenido de MDA, a las 72 horas de tratamiento (Fig. 3.2 A).

En relación al poder reductor total, cuantificado mediante el valor de FRAP, el genotipo RN51 presentó incrementos mayores que el genotipo RN1. Asimismo, la mayor diferencia entre los genotipos fue observada a las 72 h de tratamiento, con un incremento de 140% en el genotipo RN51 respecto de su control y el valor de FRAP en el genotipo RN1 no varió (Fig 3.2 B).

En cuanto a la actividad enzimática SOD, ambos genotipos presentaron incrementos a las 24 horas, aunque sin diferenciarse entre sí. Luego, el genotipo RN1 mostró el máximo de actividad a las 48 horas de tratamiento y finalmente a las 72 horas no se diferenció con el control. Por el contrario, el genotipo RN51 mostró un incremento de 37 % en la actividad SOD a las 72 horas (Fig. 3.2 C).

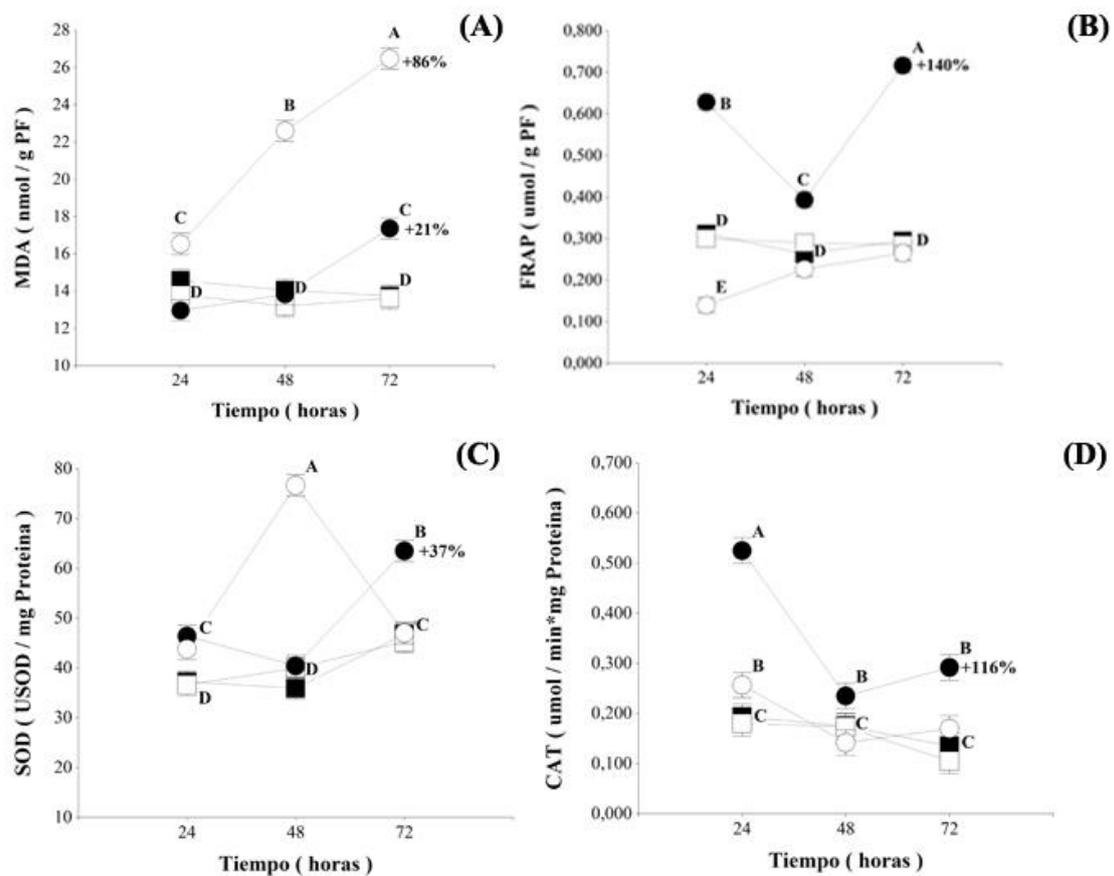


Fig. 3.2. Parámetros bioquímicos medidos a las 24, 48 y 72 h de tratamiento de estrés combinado por sequía y calor. Contenido de MDA (A), Valor de FRAP (B), Actividad enzimática SOD (C) y Actividad enzimática CAT (D). Genotipo RN51 Control (cuadrado negro), RN51 estrés combinado (círculo negro), RN1 Control (cuadrado blanco), RN1 estrés combinado (círculo blanco). Cada punto representa el valor promedio de seis repeticiones. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores en porcentaje representan el incremento en el valor promedio del tratamiento de estrés respecto del valor promedio del tratamiento control.

En relación a la actividad de la enzima CAT, se observó mayor actividad en el genotipo RN51 en cada momento de medición. Inclusive, a las 72 h de exposición al estrés combinado, se observó un incremento de 116 % en RN51 con respecto a su control; mientras que, RN1, sólo mostró diferencias en la actividad de la enzima CAT, a las 24 h bajo estrés combinado, en relación a la condición sin estrés (Figura 3.2 D).

Caracteres morfológicos

Se observó interacción entre Genotipo y Tratamiento para los caracteres de AL, PF y PS a los 15 días de aplicado el estrés combinado. Ambos genotipos presentaron reducciones en los valores de los caracteres evaluados respecto del control. Sin embargo, las pérdidas de Altura (Fig 3.3 A), Peso fresco (Fig. 3.3 B) y Peso seco de la parte aérea de la planta (Fig. 3.3 C) observadas en el genotipo RN51 fueron de -23%, -24% y -42% respectivamente, mientras que en el genotipo RN1 los valores fueron de -43 %, -70 % y -70% repectivamente. Por lo tanto, el crecimiento en el genotipo RN51 resultó menos afectado en comparación con en el genotipo RN1.

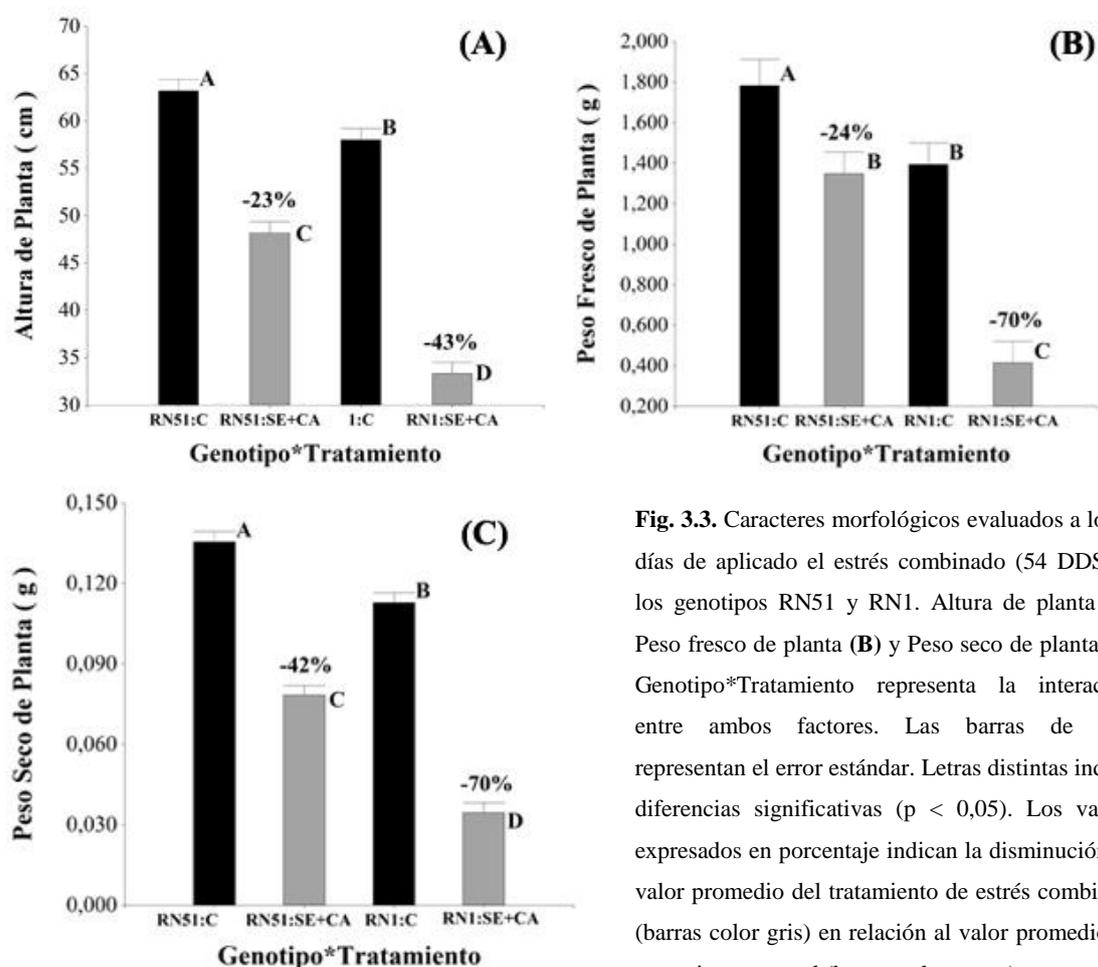


Fig. 3.3. Caracteres morfológicos evaluados a los 15 días de aplicado el estrés combinado (54 DDS) en los genotipos RN51 y RN1. Altura de planta (A), Peso fresco de planta (B) y Peso seco de planta (C). Genotipo*Tratamiento representa la interacción entre ambos factores. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores expresados en porcentaje indican la disminución del valor promedio del tratamiento de estrés combinado (barras color gris) en relación al valor promedio del tratamiento control (barras color negro).

Comparación de las respuestas obtenidas en parámetros bioquímicos y caracteres morfológicos, en estrés por sequía y calor aplicados por separado y aplicados en combinación

Al comparar los resultados obtenidos aplicando los estreses por sequía y calor de manera separada y en combinación, se pudo observar incrementos en el contenido de MDA en ambos genotipos. Sin embargo, el contenido de MDA siempre fue mayor en el genotipo susceptible RN1 y los incrementos de MDA se observaron a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento, mientras que en el genotipo tolerante RN51 el incremento de MDA solamente fue observado a las 72 h para todas las condiciones de estrés. En ese momento de muestreo, los incrementos de MDA para el genotipo RN1 respecto de su condición control fueron de 60%, 73% y 86% para estrés por sequía (Fig 3.4 A), calor (Fig. 3.4 B) y la combinación de ambos (Fig. 3.4 C) respectivamente, mientras que en el genotipo tolerante RN51, se observaron incrementos del 30%, 33% y 21%.

En relación al valor de FRAP, siempre se observaron incrementos en el genotipo tolerante RN51 mientras que en el genotipo susceptible RN1, en general, no se observaron cambios respecto del tratamiento control. Únicamente a las 24 horas de tratamiento de estrés combinado se observó un cambio, para el genotipo RN1 encontrándose el valor de FRAP por debajo del valor control. De acuerdo a estos resultados, el genotipo susceptible no mostró capacidad para incrementar el poder reductor total. Por otra parte, los incrementos en los valores de FRAP observados a las 72 horas para el genotipo RN51 fueron de 162%, 88% y 140% para las condiciones de estrés por sequía (Fig. 3.4 A), calor (Fig 3.4 B) y la combinación de ambos (Fig. 3.4 C) respectivamente.

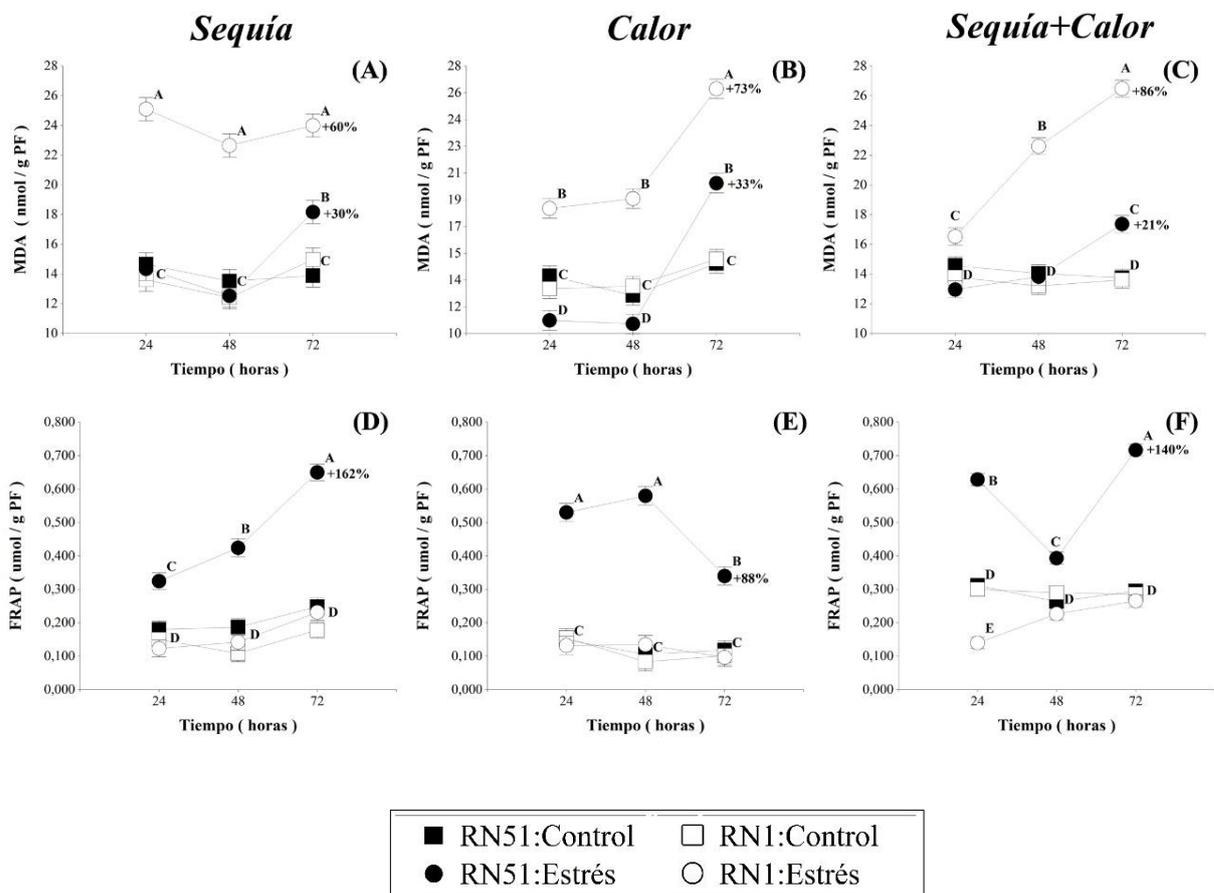


Fig. 3.4. Comparación de resultados obtenidos al evaluar el contenido de MDA (A), (B), (C) y el valor de FRAP (D), (E), (F) aplicando el estrés por sequía y calor en forma separada y en combinación. Cada punto representa el promedio de seis repeticiones. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores expresados en porcentaje, a las 72 horas, indican el incremento en el valor promedio del tratamiento de estrés respecto del valor promedio del tratamiento control.

Al comparar la actividad de la enzima CAT, el genotipo tolerante RN51 presentó mayores incrementos de actividad en relación al genotipo susceptible RN1. Este último, solamente presentó incrementos en la actividad CAT a las 24 horas de tratamiento de estrés combinado y de tratamiento estrés por calor y no fueron observados incrementos en el tratamiento de estrés por sequía (Fig. 3.5 A, B, C). Por otra parte, se observó que la actividad CAT decreció en el genotipo tolerante a medida que aumentó el tiempo de exposición de las plantas al tratamiento de estrés por sequía y calor aplicados de forma separada o en combinación. Sin embargo, e incluso a las 72 horas de tratamiento, el genotipo RN51 mostró incrementos en la actividad CAT, respecto de su condición control, de 200%, 105% y 116% en los tratamientos de estrés por sequía (Fig 3.5 A), calor (Fig. 3.5 B) y la combinación de ambos (Fig. 3.5 C) respectivamente.

En relación a la actividad SOD, se observaron incrementos variables en ambos genotipos. Por un lado, el genotipo susceptible, no mostró cambios de actividad respecto del tratamiento control en la mayoría de los momentos de medición. Pero se observó un incremento de actividad a las 24 horas de tratamiento en estrés por calor y otro incremento de actividad fue observado a las 48 horas de tratamiento en el estrés combinado. Además, en el genotipo RN1, no se observaron incrementos de actividad SOD a las 72 horas de tratamiento. Por otra parte, en el genotipo tolerante RN51 se observaron incrementos en la actividad SOD en la mayoría de los momentos de medición. Incluso a las 72 horas de tratamiento de estrés el genotipo RN51 presentó valores de actividad SOD incrementados, respecto del control, de 62%, 66% y 37% cuando se aplicó estrés por sequía (Fig. 3.5 A), estrés por calor (Fig. 3.5 B) y la combinación de ambos (Fig. 3.5 C) respectivamente.

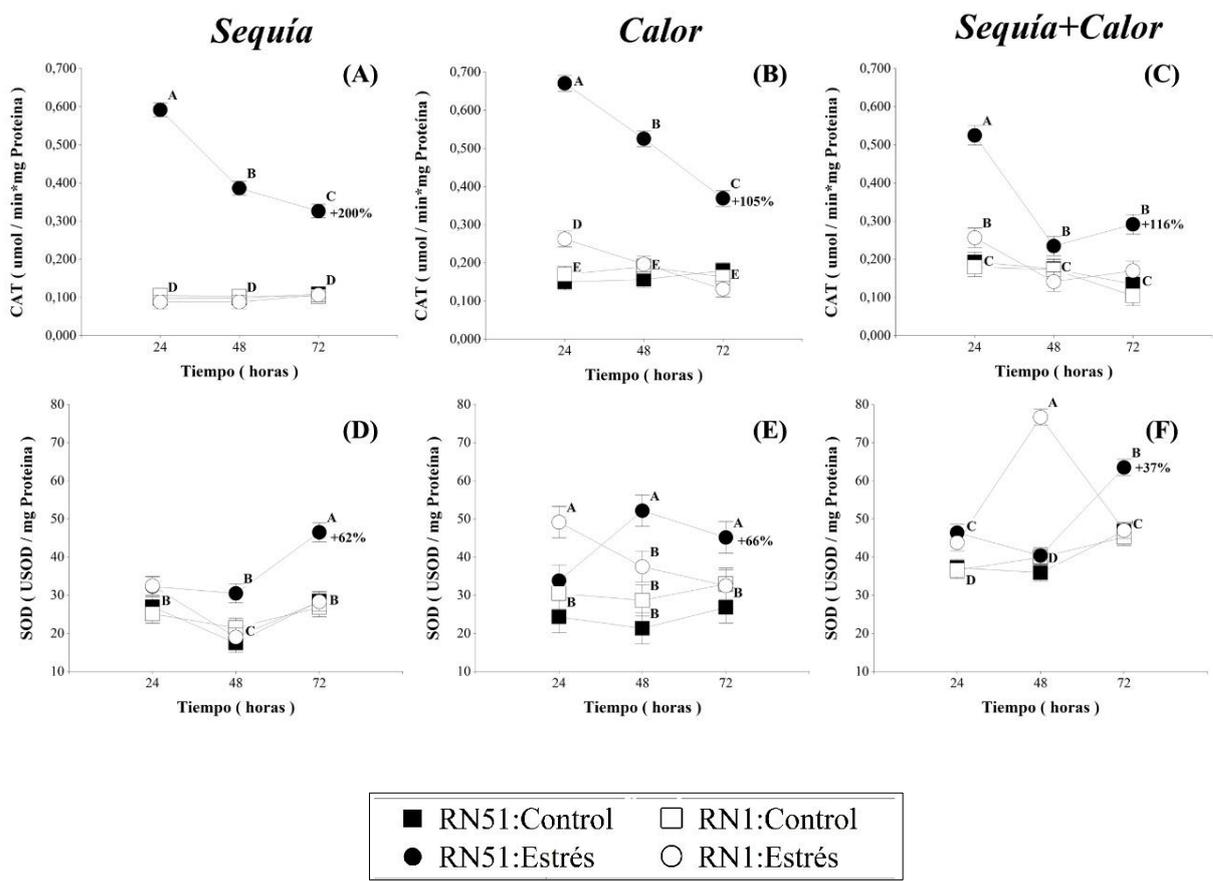


Fig. 3.5. Comparación de resultados obtenidos al evaluar las actividades enzimáticas CAT (A), (B), (C) y SOD (D), (E), (F) aplicando el estrés por sequía y calor en forma separada y en combinación. Cada punto representa el promedio de seis repeticiones. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores expresados en porcentaje, a las 72 horas, indican el incremento en el valor promedio del tratamiento de estrés respecto del valor promedio del tratamiento control.

A los 54 DDS, los caracteres de AL, PF y PS de la parte aérea de la planta mostraron interacción ente genotipo y tratamiento, distinguiéndose respuestas contrastantes entre los genotipos. La reducción en el PS de la parte aérea de la planta en el genotipo RN51 fue de -18%, -37% y -42% para el estrés por sequía (Fig. 3.6 A), estrés por calor (Fig. 3.6 B) y estrés combinado (Fig. 3.6 C) respectivamente. Mientras que, en el genotipo RN1 la reducción fue de -44%, -68% y -70%. Los caracteres de AL y PF mostraron resultados similares. En general, se observó reducción del crecimiento en ambos genotipos cuando se aplicó estrés por sequía y por calor de manera separada o en combinación. Sin embargo, el genotipo RN51 resultó menos afectado demostrando mejor capacidad para mantener el crecimiento bajo condiciones desfavorables y por lo tanto tolerancia a los estreses aplicados, mientras que el genotipo RN1 resultó más afectado y por lo tanto susceptible.

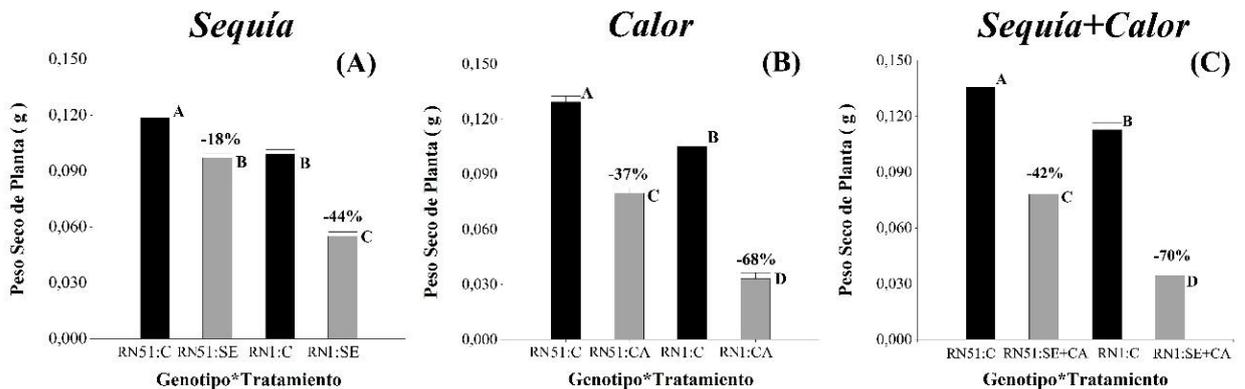


Fig. 3.6. Comparación de resultados obtenidos al evaluar el Peso Seco de Planta en Sequía (A), Calor (B) y la combinación de sequía más Calor (C). Genotipo RN51 Control (51:C), RN51 Sequía (51:SE), RN51 Calor (51:CA), RN51 Sequía más Calor (51:SE+CA). Genotipo RN1 Control (1:C), RN1 Sequía (1:SE), RN1 Calor (1:CA), RN1 Sequía más Calor (1:SE+CA). Genotipo*Tratamiento representa la interacción entre ambos factores. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas con ($p < 0,05$). Los valores en porcentaje representan la disminución del valor promedio del tratamiento de estrés (barras color gris) con respecto al valor promedio del tratamiento control (barras color negro).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se utilizó un modelo de estrés combinado, aplicando sequía y calor en forma simultánea. Se evaluó la tolerancia en dos genotipos contrastantes de buffel grass y se compararon los resultados obtenidos en parámetros bioquímicos y de crecimiento entre los tratamientos individuales de estrés por sequía, calor, y la combinación de ambos.

El daño oxidativo evaluado mediante el contenido de MDA, producto de la peroxidación de lípidos de membranas, se incrementó en las plantas cuando se impusieron los estreses. Pero, menores contenidos de MDA fueron observados en el genotipo tolerante en todas las condiciones de estrés, sugiriendo que el genotipo tolerante tuvo menor daño generado por las especies reactivas de oxígeno (EAO). Nuestros resultados concuerdan con varios estudios realizados en otras especies de plantas (Bi *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2008; Sekmen *et al.*, 2014; Wang y Huang, 2004). Además, el presente estudio sugiere que el genotipo tolerante tendría más capacidad para mantener controlado el daño oxidativo durante un período más prolongado de exposición al estrés en comparación al genotipo susceptible.

Por otra parte, el valor de FRAP, ha sido estudiado en especies de plantas medicinales y se ha utilizado como herramienta para la determinación del poder reductor en estrecha relación con el contenido total de antioxidantes (Cervilla *et al.*, 2007; Dudonné *et al.*, 2009; Nur Alam *et al.*, 2013; Popović *et al.*, 2016; Rabeta y Nur Faraniza, 2013). Más aún, Abideen *et al.*, (2015) ha reportado aumento del poder reductor en una pastura halófito en condiciones de estrés. De acuerdo con los resultados, mayores valores de FRAP fueron observados en el genotipo tolerante (RN51), bajo las distintas condiciones de estrés, en comparación con el genotipo susceptible (RN1). Además, se observó una relación inversa entre el contenido de MDA y el valor de FRAP, en la cual valores bajos de MDA correspondieron con valores altos de FRAP

para el genotipo tolerante y valores altos de MDA fueron observados en ausencia de incrementos en valor de FRAP para el genotipo susceptible.

Para analizar el comportamiento de la defensa antioxidante, se realizaron mediciones de la actividad de las enzimas SOD y CAT, que cumplen funciones importantes en el control de las EAO (Bi *et al.*, 2016). La enzima SOD ha sido considerada como la primera defensa contra las EAO catalizando la dismutación del anión superóxido ($O^{\cdot-2}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Apel y Hirt, 2004; Bi *et al.*, 2016; Choudhury *et al.*, 2017; Das y Roychoudhary, 2014; Gill y Tuteja, 2010). En el presente trabajo de tesis, se observó mayor actividad SOD en el genotipo tolerante bajo condiciones de estrés por sequía, calor y la combinación (sequía + calor). Por otra parte, fue observado un aumento de actividad SOD en el genotipo susceptible, pero solamente a las 48 h bajo estrés combinado. Huseynova (2012) ha reportado que la actividad SOD fue significativamente afectada en cultivares de trigo susceptibles y se mantuvo sin diferencias respecto del control o se incrementó en los cultivares tolerantes. Además, estudios en festuca alta, especie forrajera templada, han mostrado similares resultados cuando se realizaron evaluaciones en plantas en condiciones de estrés por sequía, calor y la combinación de ambos estreses (Bi *et al.*, 2016). Basados en trabajos previos y en el estudio actual, el genotipo tolerante podría tener una mayor capacidad para incrementar la actividad SOD e incluso mantener ese incremento durante más tiempo bajo condiciones de estrés que el genotipo susceptible.

La CAT es una de las principales enzimas que eliminan el H_2O_2 producto de la dismutación del $O^{\cdot-2}$ en los cloroplastos y peroxisomas (Apel y Hirt, 2004; Gill y Tuteja, 2010). Hasta el momento, los estudios que han aplicado estrés por calor, sequía y combinación, han reportado diferentes efectos sobre la actividad CAT, observándose incrementos, reducciones o valores iguales al control (Anwar Hossain *et al.*, 2013; Bi *et al.*, 2016; Boaretto *et al.*, 2014; Gill y Tuteja, 2010; Jiang y Huang, 2001; Jin *et al.*, 2016). En el presente estudio se ha observado que la actividad enzimática CAT se incrementó en el genotipo tolerante en todas las condiciones de estrés, mientras que, en el genotipo susceptible se registró ausencia de aumento en la actividad CAT en la mayoría de las mediciones. En este estudio, se observó también que la actividad CAT

decreció en ambos genotipos a medida que aumentó el tiempo de exposición de las plantas al estrés; sin embargo, a las 72 horas de tratamiento, el genotipo tolerante siempre mostró actividad CAT incrementada en todas las condiciones de estrés. Estos resultados concuerdan con otros reportes que indicaron que la tolerancia al estrés abiótico estuvo asociada con incrementos en la actividad CAT (Anwar Hossain *et al.*, 2013; Choudhury *et al.*, 2017; Gill y Tuteja, 2010; Suzuki *et al.*, 2014; You y Chang, 2015).

La evaluación del crecimiento reveló menores reducciones en el genotipo tolerante cuando fue evaluado en estrés por sequía, calor y la combinación de ambos. En base a estos resultados, se pudo observar una relación significativa entre un mejor desempeño del crecimiento, menor daño oxidativo, inducción de enzimas antioxidantes y mayor poder reductor, indicando que, la regulación del estrés oxidativo estaría asociado a una mayor tolerancia al estrés abiótico en buffel grass, como ha sido informado en otros estudios para otras especies de plantas (Almeselmani *et al.*, 2006; Gill y Tuteja, 2010; Sundaram y Rathinasabapathi, 2010; Wang *et al.*, 2010).

En general, cuando diferentes estreses abióticos ocurren simultáneamente, pueden causar efectos sinérgicos o antagónicos sobre la productividad y el crecimiento del cultivo (Pandey *et al.*, 2015). En un estudio realizado por Pandey *et al.*, (2015) en la especie *Hordeum spontaneum* se reportó que la combinación de estrés por sequía y salinidad causó efecto sinérgico, provocando aumento del daño en las plantas. Por otra parte, se han observado efectos antagónicos para el estudio del estrés combinado por calor y salinidad, donde la exposición simultánea a salinidad y calor mejoró la tolerancia a la sal en *Solanum lycopersicum* (Rivero *et al.*, 2014). Varios estudios han observado que el estrés por sequía en combinación con estrés por calor, causa daños más severos que los provocados por los mismos aplicados de forma individual, en cultivos templados anuales y bianuales (Suzuki *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2017), en *Portulaca* (Jin *et al.*, 2016) y en pasturas (Jian y Huang, 2000). En el presente trabajo de tesis, cuando calor y sequía se aplicaron por separado, la reducción en el crecimiento fue más severa en estrés térmico que en sequía, mientras que cuando se aplicaron ambos tipos de estrés en combinación, los efectos perjudiciales fueron similares a los obtenidos

en estrés por calor. Por lo tanto, no se observó efecto sinérgico ni antagónico al aplicar el tratamiento combinado de estrés por sequía y calor. Los resultados sugieren que el calor tuvo un efecto predominante sobre la sequía en los genotipos de buffel grass evaluados. Esto podría indicar que la respuesta al estrés combinado no es única y se podría inferir una relación entre la respuesta bioquímica de buffel grass al calor y el estrés combinado. Aunque la evidencia reciente muestra que las respuestas de las plantas a la sequía y calor simultáneos dieron como resultado un nuevo perfil de expresión de la transcripción que no podría predecirse por el efecto del estrés individual (Zandalinas *et al.*, 2018). Además, otro factor a considerar es que el efecto que provoca el estrés combinado depende del genotipo, el estadio fenológico de la planta, la intensidad y duración de la combinación y los tipos de estrés involucrados (Silva *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES PARCIALES

El estrés individual por sequía y calor, como también la ocurrencia en simultáneo de ambos estreses, provoca daño oxidativo en los genotipos de buffel grass, quedando esto demostrado por la reducción de las actividades enzimáticas y el incremento de la peroxidación lipídica.

El genotipo susceptible (RN1) exhibe mayor contenido de MDA, menor valor de FRAP y menores actividades SOD y CAT, en comparación con el genotipo tolerante en todas las condiciones de estrés evaluadas.

Los resultados aquí presentados, indican que la sequía y el calor perjudican notablemente el balance del metabolismo oxidativo y provocan cambios bioquímicos y de crecimiento en los genotipos de buffel grass.

Los modelos de estrés por sequía y calor aplicados de manera aislada o en combinación, permiten observar respuestas contrastantes en buffel grass.

La medición de los parámetros bioquímicos, realizada a las 72 horas de aplicados los modelos de estrés desarrollados, puede resultar una herramienta importante para la caracterización de genotipos de buffel grass en un programa de mejoramiento genético, permitiendo identificar genotipos tolerantes con capacidad de lograr menor pérdida de crecimiento en condiciones ambientales desfavorables de sequía y calor.

Por último, en relación a la utilización de los modelos de estrés aplicados en forma individual o en combinación y debido a que las respuestas bioquímicas y de crecimiento mantuvieron los contrastes, entre los genotipos, cuando estos fueron evaluados en sequía y calor aplicados en forma separada o en combinación, podría resultar más completo y eficiente realizar futuras evaluaciones de la tolerancia de buffel grass a dichos tipos de estrés aplicando el modelo combinado.

BIBLIOGRAFÍA

- Abideen Z., Qasim M., Rasheed A., Yousuf Adnan M., Gul B. & Ajmal Khan M. 2015. Antioxidant activity and polyphenolic content of *Phragmites karka* under saline conditions. *Pakistan Journal of Botany* 47:813-818.
- Al-Dakheel A.J. and Hussain M.I. 2016. Genotypic variation for salinity tolerance in *Cenchrus ciliaris* L. *Frontiers in Plant Science* 7:1090.
- Almeselmani M., Deshmukh P.S., Sairam R.K., Kushwaha S.R. and Singh T.P. 2006. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant Science* 171:382-388.
- Anwar Hossain M., Golam Mostofa M. and Fujita M. 2013. Heat-shock positively modulates oxidative protection of salt and drought-stressed mustard (*Brassica campestris* L.) seedlings. *Journal of Plant Science and Molecular Breeding* 2:2.
- Apel K. and Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373–399
- Ashraf M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances* 27:84-93.
- Bi A., Fan J., Hu Z., Wang G., Amombo E., Fu J. and 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.
- Boaretto L., Carvalho G., Borgo L., Creste S., Landell M.G.A., Mazzafera P. and Azevedo R.A. 2014. Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry* 74:165-175.
- Cervilla L.M., Blasco B., Ríos J.J., Romero L. and Ruiz J.M. 2007. Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*). Plants subjected to boron toxicity. *Annals of Botany* 100:747-756.
- Choudhury F., Rivero R., Blumwald E. and Mittler R. 2017. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal* 90:856-867.
- Das K. and Roychoudhury A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* 2:53.

- Di Rienzo J. A., Guzman A. W. and Casanoves F. 2002. A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological and Environment Statistics* 7:129-142. (Disponible: <http://www.jstor.org/stable/1400690> verificado: mayo 2018).
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. and Robledo C.W. 2017. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (Disponible: <http://www.infostat.com.ar> verificado: mayo 2018)
- Dudonné S., Vitrac X., Coutiere P., Woillez M. and Merillon J.M. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:1768-1774.
- Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D. and Basra S.M.A. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron Sustain Dev* 29:185–212.
- Feller U. and Vaseva I.I. 2014. Extreme climatic events: Impacts of drought and high temperature on physiological processes in agronomically important plants. *Frontiers in Environmental Science* 2:39.
- Gill S.S. and Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Hacker J.B. and Waite R.B. 2001. Selecting buffel grass (*Cenchrus ciliaris*) with improved spring yield in subtropical Australia. *Tropical Grasslands* 35:205–210.
- Huseynova I.M. 2012. Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817:1516–1523.
- Jiang Y. and Huang B. 2000. Effects of Drought or Heat Stress Alone and in Combination on Kentucky bluegrass. *Crop Science* 40:1358–1362. doi: 10.2135/cropsci2000.4051358x.
- Jin R., Wang Y., Liu R., Gou J. and 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.

- Kharrat-Souissi A., Baumel A., Mseddi K., Torre F. and Chaieb M. 2010. Polymorphism of *Cenchrus ciliaris* L. a perennial grass of arid zones. African Journal of Ecology 49:209–220.
- Kharrat-Souissi A., Baumel A., Torre F. and Chaieb M. 2012. Genetic differentiation of the dominant perennial grass *Cenchrus ciliaris* L. contributes to response to water deficit in arid lands. The Rangeland Journal 34:55–62.
- Liu J., Xie X, Du J., Sun J. and Bai X. 2008. Effects of simultaneous drought and heat stress on Kentucky bluegrass. Scientia Horticulturae 115:190-195.
- 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 and Biology 4(3):392–397.
- Marshall V.M., Lewis M.M. and Ostendorf B. 2012. Buffel grass (*Cenchrus ciliaris*) as an invader and threat to biodiversity in arid environments: a review. Journal of Arid Environments 78:1–12.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 9:405-410.
- Mittler R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. Trends in Plant Science 11:15-19.
- Mittler R. and Blumwald E. 2010. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. Annual Review of Plant Biology 61:443–462.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V. and Van Breusegem F. 2011. ROS signalling: The new wave?. Trends in Plant Science 16:300–309.
- Nur Alam M.D., Bristi N.J. and Rafiquzzaman M.D. 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal 21:143-152.
- Ozias-Akins P. 2006. Apomixis: developmental characteristics and genetics. Critical Reviews in Plant Science 25:199–214.
- Pandey P., Ramegowda V. and Senthil-Kumar M. 2015. Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. Frontiers in Plant Science 6:723.
- Popovic B.M., Stajner D., Zdero-Pavlovi R., Tumbas-Saponjac V., Canadanovic-Brunet J. & Orlovic S. 2016. Water stress induces changes in polyphenol profile and

- antioxidant capacity in poplar plants (*Populus* spp.). *Plant Physiology and Biochemistry* 105:242-250.
- Rabeta M.S. and Nur Faraniza R. 2013. Total phenolic content and ferric reducing antioxidant power of the leaves and fruits of *Garcinia atrovirdis* and *Cynometra cauliflora*. *International Food Research Journal* 20:1691-1696.
- Rivero R.M., Mestre T.C., Mittler R., Rubio F., Garcia-Sanchez F. and Martinez V. 2014. The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. *Plant, Cell and Environment* 37:1059-1073.
- Rizhsky L., Liang H. and Mittler R. 2002. The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiology* 130:1143–1151.
- Saini M.L., Jain P. and Joshi U.N. 2007. Morphological characteristics and nutritive value of some grass species in an arid ecosystem. *Grass Forage Science* 62:104–108.
- Sekmen A.H., Ozgur R., Uzilday B. and Turkan I. 2014. Reactive oxygen species scavenging capacities of cotton (*Gossypium hirsutum*) cultivars under combined drought and heat induced oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany* 99:141-149.
- Sharma P., Bhushan Jha A., Dubey R.S. and Pessarakli M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 217037:1-26.
- Silva E.N., Ferreira-Silva S.L., de Vasconcelos Fontenelea A., Vasconcelos Ribeiro R., Viégas R.A. and Gomes Silveira J.A. 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.
- Sundaram S. and Rathinasabapathi B. 2010. Transgenic expression of fern *Pteris vittata* glutaredoxin PvGrx5 in *Arabidopsis thaliana* increases plant tolerance to high temperature stress and reduces oxidative damage to proteins. *Planta* 231:361–369.
- Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R. and Miller G. 2012. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell and Environment* 35:259–270.

- Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M.A. and Mittler R. 2011. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 14:691–699.
- Suzuki N., Rivero R.M, Shulaev V., Blumwald E. and Mittler R. 2014. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist* 203:32–43.
- Wang G.P, Zhang X.Y., Li F., Luo Y. and Wang W. 2010. Over accumulation of glycine betaine enhances tolerance to drought and heat stress in wheat leaves in the protection of photosynthesis. *Photosynthetica* 48:117-126.
- Wang Z. and Huang B. 2004. Physiological Recovery of Kentucky bluegrass from Simultaneous Drought and Heat Stress. *Crop Science* 44:1729-1736.
- You J. and Chan Z. 2015. ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Frontiers in Plant Science* 6:1092.
- Zandalinas S.I., Mittler R., Balfagón D., Arbona V., Gómez-Cadenas A. 2018. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum* 162:2–12.
- Zhou R., Yu X., Ottosen C., Rosenqvist E., Zhao L., Wang Y., Yu W., Zhao T. and Wu Z. 2017. Drought stress had a predominant effect over heat stress on three tomato cultivars subjected to combined stress. *BMC Plant Biology* 17:24.

UTILIZACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS TOLERANTES

INTRODUCCIÓN

Las condiciones de estrés abiótico como sequía y calor causan grandes pérdidas a la producción agrícola en todo el mundo. El progreso en la generación de cultivares con mayor tolerancia al estrés abiótico ha sido lento debido a la complejidad ambiental de las zonas de cultivo, con sus condiciones heterogéneas, las combinaciones de estrés abiótico y el cambio climático global (Mittler y Blumwald, 2010), entre otros. En los programas de mejoramiento vegetal, la identificación y selección de genotipos como parentales promisorios, así como en la progenie, es el paso básico para la obtención de nuevos recursos genéticos. Los fitomejoradores utilizan diversas variables y métodos de selección para identificar aquellos genotipos tolerantes a estrés ambiental; sin embargo, las condiciones no controladas, la heterogeneidad del suelo, la gran cantidad de material vegetal, el tiempo de realización de los experimentos y la cantidad de mano de obra necesaria para evaluar materiales en condiciones de campo, hacen que los ensayos en condiciones naturales, sean costosos y complejos de realizar. Los experimentos bajo condiciones controladas en laboratorio y en cámaras de cría, estandarizados correctamente, son más confiables y fáciles de conducir, en comparación a los ensayos de campo (Razzaq *et al.*, 2017).

Asimismo, existe fuerte evidencia de que los ensayos bajo condiciones controladas pueden ser realizados para identificar adecuada y rápidamente aquellos genotipos tolerantes (Minner *et al.*, 1983); sin embargo, el éxito de estas predicciones requiere evidencia de que los genotipos identificados como tolerantes en condiciones controladas, también reflejen este rasgo bajo condiciones de campo (Ashraf *et al.*, 2009). Existen varios autores que han reportado asociaciones entre datos de laboratorio y campo y otros que no. Asimismo el carácter final en el que se centra la selección de germoplasma en condiciones naturales, es la producción de materia seca o rendimiento, sin embargo, previamente bajo condiciones controladas, se puede reducir el número de material a validar su producción a campo. Estos son algunos de los desafíos que enfrenta la agricultura moderna, siendo necesario combinar enfoques para mejorar significativamente la tolerancia al estrés abiótico de los cultivos en diversos ambientes de producción. Se deben lograr enfoques innovadores que tengan en cuenta los antecedentes genéticos y la fisiología de los cultivos, integrando evaluaciones realizadas en condiciones controladas y a campo (Mittler y Blumwald, 2010).

Con la finalidad de utilizar los parámetros bioquímicos del estrés oxidativo para caracterizar e identificar genotipos tolerantes al estrés por sequía y calor, en el presente capítulo se realizó la evaluación de cinco genotipos de *Cenchrus ciliaris* L., empleando el sistema experimental modelo de estrés combinado, desarrollado en el Capítulo previo. Asimismo, para convalidar los resultados obtenidos en el crecimiento bajo condiciones controladas, se efectuó un ensayo comparativo de producción de biomasa en condiciones de campo en la localidad de Quilino ubicada en el noroeste de la provincia de Córdoba.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Aplicar los parámetros bioquímicos relacionados con el estrés oxidativo para la identificación de genotipos tolerantes a sequía y calor en *Cenchrus ciliaris* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se utilizaron tres genotipos de *Cenchrus ciliaris* L. RN1, RN51, RN49, que forman parte de la colección activa, sita en el IFRGV. Los genotipos RN1 y RN51 fueron elegidos debido a sus respuestas contrastantes (susceptible y tolerante, respectivamente) observadas en los estudios realizados por Lanza Castelli, *et al.*, (2010), Tommasino *et al.*, (2012) y en los capítulos previos de esta tesis. El genotipo RN49 es el cultivar comercial Texas 4464, muy utilizado en Argentina (Namur *et al.*, 2014) y a nivel mundial, además es conocido por su tolerancia a la sequía (Al-Dakheel y Iftikhar Hussain, 2016; Ayers, 1981; Fernando *et al.*, 1995). De igual forma, se evaluaron dos mutantes somaclonales S6 y J20, obtenidos a partir del genotipo RN51 mediante técnicas de mejoramiento genético no convencionales que fueron desarrollados por el grupo de Genotecnia del IFRGV – CIAP – INTA. Con respecto a S6, éste fue obtenido mediante cultivo *in vitro* de embriones maduros de *Cenchrus ciliaris* L., y un proceso de selección *in vitro* con NaCl como agente simulador de estrés salino (López Colomba *et al.*, 2013). En relación a J20, se obtuvo por mutagénesis de semillas maduras y posterior selección *in vitro* con manitol, como agente simulador de estrés por sequía (López Colomba *et al.*, 2011).

Condiciones Generales de Crecimiento

Los genotipos fueron sembrados en macetas de plástico de 3 L de capacidad volumétrica, utilizando 0,2 gr de semillas por maceta. Cada maceta fue llenada con 2,76 Kg de sustrato compuesto por una mezcla de arena y tierra en proporción 1:1 que previamente fue secado en estufa durante 72 horas a 105°C. Luego de la siembra las macetas fueron regadas utilizando un aspersor hasta lograr la saturación del sustrato y 2 horas más tarde, una vez finalizado el drenaje, las macetas fueron pesadas y se determinó el 100 % de contenido hídrico del sustrato (CHS) por método gravimétrico. El CHS de las macetas se mantuvo al 80 % con riegos diarios durante 30 días en cámara de crecimiento con fotoperíodo de 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad, con 28°C (+/- 2) de temperatura, 40% (+/-10) de humedad relativa y 250 $\mu\text{mol} / \text{s} \cdot \text{m}^2$ de intensidad lumínica. Al cumplirse 30 días desde la fecha de siembra (DDS) se aplicaron los tratamientos descritos a continuación.

Evaluación de la tolerancia al estrés combinado por sequía y calor en cinco genotipos de buffel grass

Se utilizó el sistema experimental modelo de estrés combinado de sequía y calor descrito en el Capítulo III de la presente tesis. (Fig.4.1). Se realizaron seis repeticiones por cada genotipo para cada tratamiento.

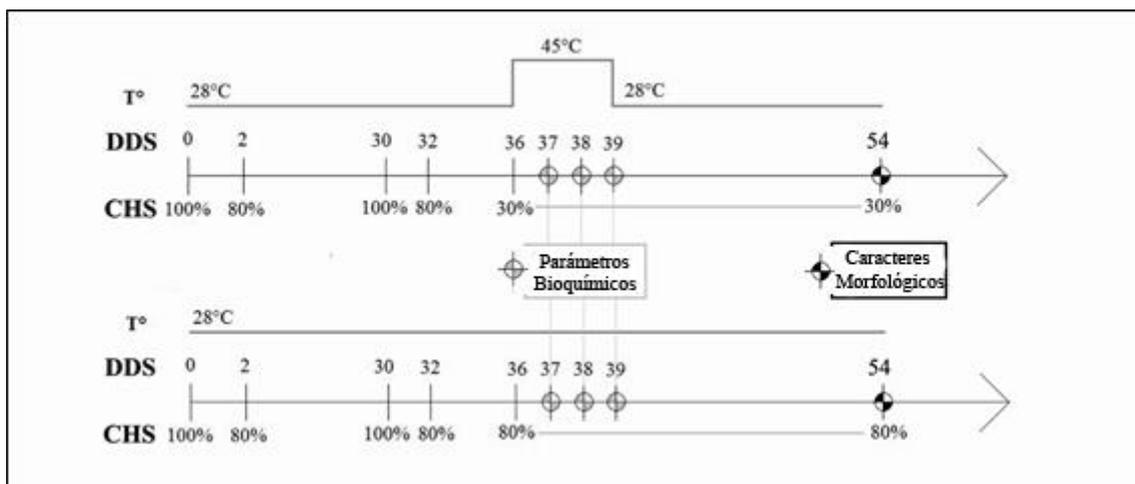


Fig. 4.1. Esquema del ensayo de estrés combinado. DDS: días después de la siembra. CHS: contenido hídrico del sustrato.

Medición de parámetros bioquímicos

Determinaciones del Contenido de Malondialdehído (MDA), valor de FRAP y actividades enzimáticas SOD y CAT, fueron realizadas del mismo modo y utilizando las mismas técnicas que fueron descritas en materiales y métodos en el Capítulo II de esta tesis doctoral.

Medición de Caracteres morfológicos

Se realizaron mediciones de AL, PF y PS de la parte aérea de la planta a los quince días, luego de aplicado el tratamiento de estrés combinado (54 DDS). Para la medición se utilizaron cinco plantas al azar, por seis repeticiones para cada genotipo y tratamiento.

Evaluación de producción total de biomasa en condiciones de campo

Con el fin de evaluar el rendimiento, en términos de producción de biomasa, de los cinco genotipos (RN51, RN1, J20, S6 y RN49), se diseñó un experimento en condiciones de campo. Las semillas de cada genotipo se sembraron en macetas, las plantas se mantuvieron en el invernadero para su crecimiento durante 30 días y luego se implantaron en la localidad de Quilino, Córdoba (230 m.s.n.m. 30°10'25,86'' S 64°40'02,52'' O). Las condiciones edáficas del lote donde se realizó el ensayo fueron: 1,79 % de contenido de materia orgánica, 1,04 % de carbono orgánico, 0,105 % de nitrógeno total, 9,9 de relación C: N, $N-NO_3^- > 100$, contenido de fósforo 96,5 ppm, pH 6,5 y C.E. 3,9 dS / m. Quilino es una región típica de cría de ganado bovino para producción de carne y se realiza el cultivo de buffel grass como un importante recurso forrajero. Quilino está influenciado por el clima de estepa local con un régimen de precipitaciones escaso (entre 200 y 450mm anuales). Este clima se considera BSh según la clasificación climática de Köppen-Geiger (Köppen, 1936; Peel et al., 2007), que tiene inviernos suaves (con valores mínimos absolutos de -2 °C) y veranos calurosos o muy calurosos (con valores máximos absolutos de 45 °C o incluso superiores). Las condiciones climáticas durante el período evaluado variaron dentro de los valores promedio (Anuario Meteorológico BCCBA, 2015; 2016) (Fig. 4.9). Veinticinco plantas de cada genotipo se colocaron en cada parcela (1 m²) siguiendo un diseño en bloques completos aleatorizados con cinco repeticiones. La distancia entre parcelas fue de 1 m. La implantación se llevó a cabo en diciembre de 2014. Las plantas de todas las parcelas se cortaron a una altura uniforme de 25 cm el 14 de septiembre de 2015. Se realizaron tres cortes para evaluar la producción total de biomasa. Los cortes se realizaron mecánicamente durante la temporada de crecimiento de la especie en las fechas: 17/12/15, 14/ 01/16 y el 12/03/16. El PS se determinó después de secar las muestras en un horno de aire forzado a 60 °C hasta que se obtuvo un peso en seco constante (72 horas).

Diseño experimental y Análisis estadístico

En el ensayo de estrés combinado por sequía y calor, se utilizó un diseño completamente aleatorizado con seis repeticiones, siendo la unidad experimental la maceta. Para las comparaciones entre las medias de los parámetros bioquímicos, se utilizaron modelos lineales generales mixtos y se aplicó ANAVA para un modelo trifactorial con interacción entre los factores genotipo x tratamiento x tiempo de medición. Para las comparaciones entre los valores promedios de los caracteres de crecimiento, se utilizaron modelos lineales generales mixtos y se aplicó ANAVA para un modelo bifactorial con interacción entre los factores genotipo x tratamiento.

En el ensayo realizado a campo, se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cinco repeticiones, siendo la unidad experimental la parcela. La comparación entre las medias de la producción total de biomasa se utilizó modelos lineales generales mixtos y se aplicó ANAVA para un modelo unifactorial (Genotipo) y para un modelo bifactorial (Genotipo*Fecha de cosecha). Las medias se compararon mediante la prueba DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002) al nivel de significación del 5% ($p \leq 0,05$) usando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017). El error estándar se representa en todas las figuras.

Complementariamente, en las figuras se presentan valores en porcentaje que indican la reducción o el incremento del valor promedio del tratamiento de estrés en relación al valor promedio del tratamiento control y fue calculado utilizando la siguiente fórmula: Valor % = $[(\bar{x}_s * 100 / \bar{x}_c) - 100]$. Donde \bar{x}_s y \bar{x}_c representan los valores promedio de los tratamientos de estrés y control para cada genotipo.

RESULTADOS

Parámetros bioquímicos

El contenido de MDA se incrementó en todos los genotipos cuando se aplicó el tratamiento de estrés por sequía y calor. A las 72 horas de tratamiento se observaron 5 grupos con diferencias significativas. El primer grupo estuvo constituido por el genotipo RN1 y presentó el mayor incremento en el contenido de MDA con un valor de 83% respecto del tratamiento control. El segundo y tercer grupo mostraron incrementos intermedios e incluyeron a los genotipos S6 y RN49 respectivamente, con valores de 54% y 38%. El cuarto grupo presentó los menores incrementos de MDA, e incluyó a los genotipos RN51 y J20, con valores de 15% y 33% respectivamente. El quinto grupo estuvo conformado por el tratamiento control de cada uno de los genotipos evaluados (Figura. 4.2).

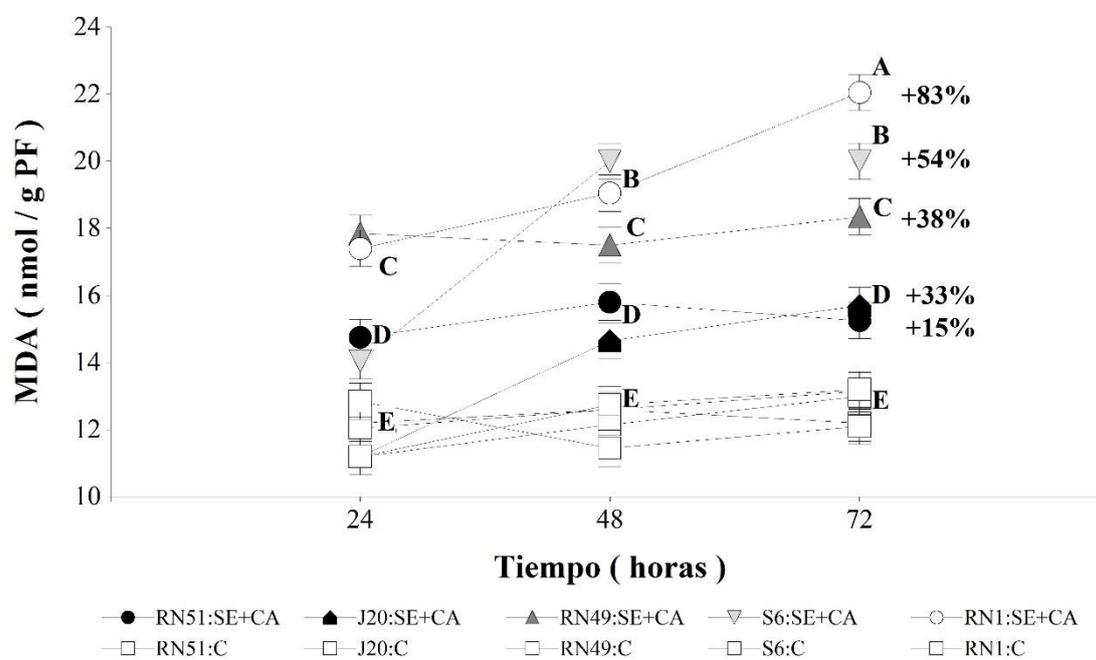


Fig. 4.2. Contenido de malondialdehído (MDA) medido a las 24, 48 y 72 horas de estrés combinado por sequía y calor en los genotipos RN51, RN1, RN49, J20 y S6. Cada punto representa el promedio de seis repeticiones. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores en porcentaje representan el incremento en el valor promedio del tratamiento de estrés combinado respecto del valor promedio del tratamiento control.

En relación al poder reductor total, cuantificado mediante el valor de FRAP, se distinguieron 4 grupos con diferencias significativas a las 72 horas de tratamiento de estrés por sequía y calor. El primer grupo, conformado por los genotipos RN51 y J20, presentó el mayor incremento del poder reductor, con valores de 166% y 143% respectivamente. El segundo grupo estuvo constituido por el genotipo RN49 que presentó un incremento inferior al primer grupo, pero superior al tercer y cuarto grupo, con un valor de 103%. Por otra parte, en el tercer grupo se encontró el genotipo S6 que presentó un incremento de 67%. Finalmente, el cuarto grupo incluyó los tratamientos control y el genotipo RN1 en estrés que no presentó incremento del poder reductor total (Figura. 4.3).

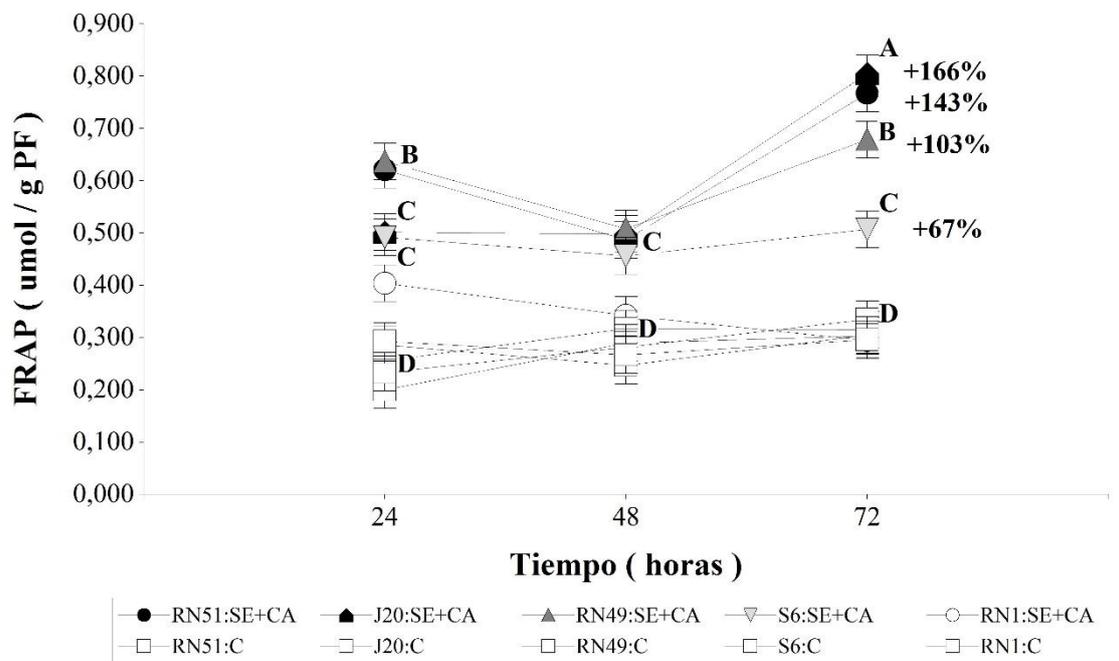


Fig. 4.3. Poder reductor total, cuantificado mediante el valor de FRAP, medido a las 24, 48 y 72 horas de estrés combinado por sequía y calor en los genotipos RN51, RN1, RN49, J20 y S6. Cada punto representa el promedio de seis repeticiones. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores expresados en porcentaje, a las 72 horas, representan el incremento en el valor promedio del tratamiento de estrés combinado respecto del valor promedio del tratamiento control.

Al analizar la actividad de la enzima SOD, se encontraron 4 grupos significativamente diferentes a las 72 horas de aplicado el tratamiento de estrés. El primer grupo presentó los mayores incrementos de actividad, encontrándose los genotipos J20 y RN51 con valores de 180% y 169% respectivamente. El segundo grupo incluyó a los genotipos RN49 y S6 con incrementos intermedios en la actividad SOD, presentando valores de 146% y 78% respectivamente. El tercer grupo mostró menor incremento de actividad SOD y estuvo conformado por el genotipo RN1 con un valor de 69%. El cuarto grupo incluyó al tratamiento control de todos los genotipos evaluados (Figura 4.4).

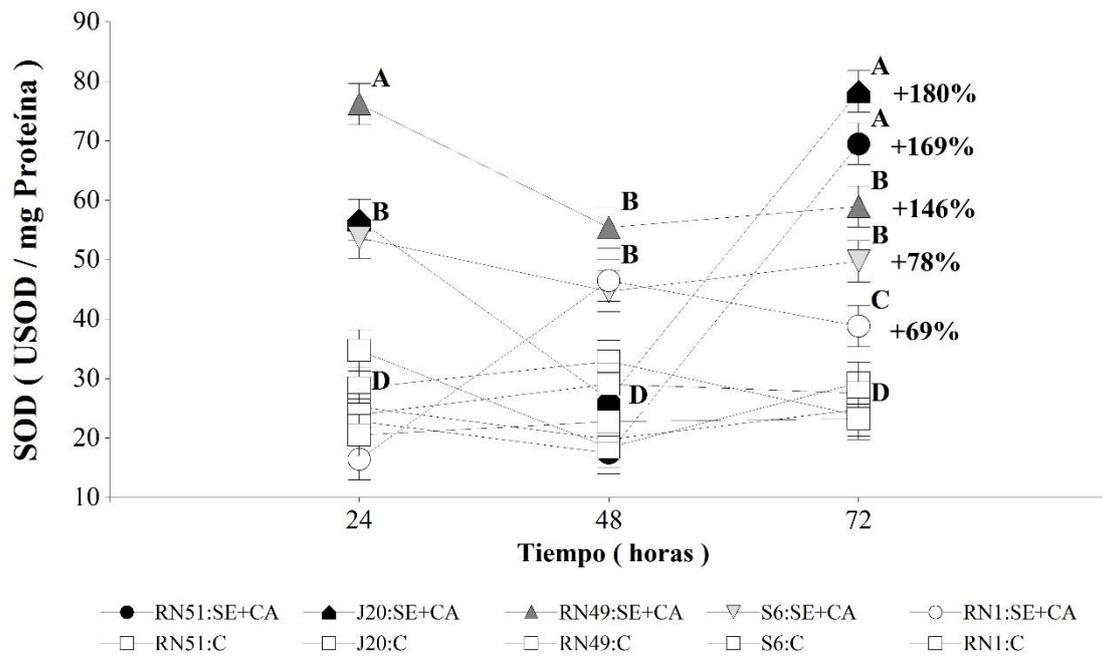


Fig. 4.4. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) a las 24, 48 y 72 horas de estrés combinado por sequía y calor en los genotipos RN51, RN1, RN49, J20 y S6. Cada punto representa el promedio de seis repeticiones. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores expresados en porcentaje, a las 72 horas, representan el incremento en el valor promedio del tratamiento de estrés combinado respecto del valor promedio del tratamiento control.

En relación a la actividad enzimática CAT, se diferenciaron dos grupos a las 72 horas de tratamiento de estrés combinado por sequía y calor. El primer grupo mostró incremento de actividad enzimática con valores de 137%, 128% y 93% para los genotipos RN51, J20 y RN49 respectivamente. Por otra parte, el segundo grupo incluyó a los tratamientos control de todos los genotipos y a los tratamientos de estrés de los genotipos RN1 y S6 sin incrementos de actividad CAT (Fig. 4.5).

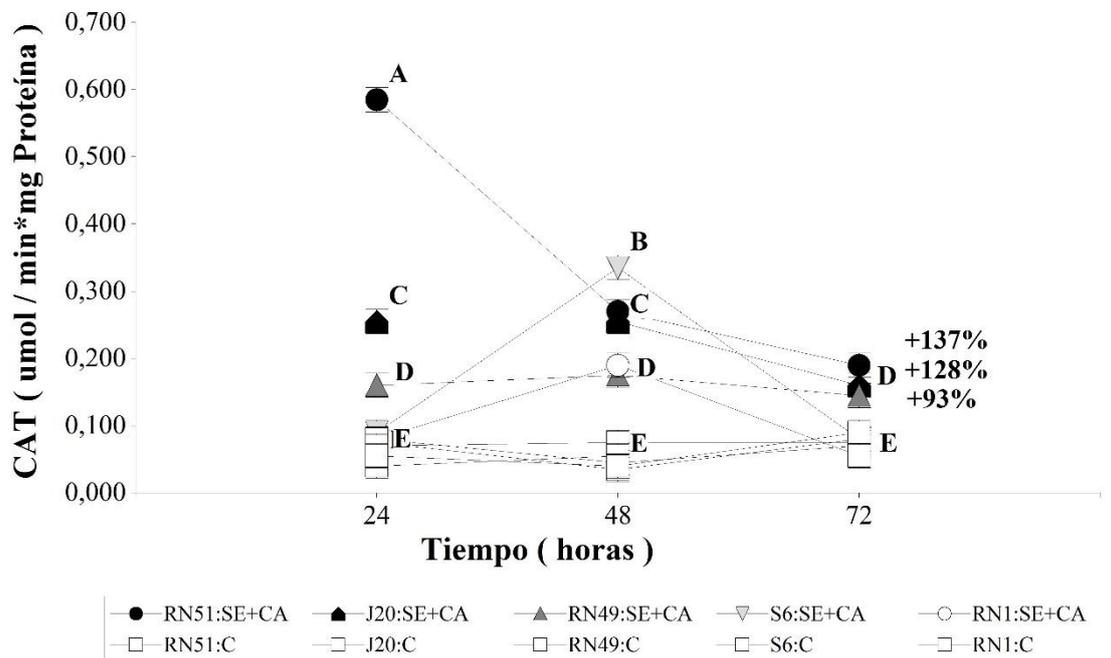


Fig. 4.5. Actividad de la enzima catalasa (CAT) a las 24, 48 y 72 horas de estrés combinado con sequía y calor, en los genotipos RN51, RN1, RN49, J20 y S6. Cada punto representa el promedio de seis repeticiones. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores expresados en porcentaje, a las 72 horas, representan el incremento en el valor promedio del tratamiento de estrés combinado respecto del valor promedio del tratamiento control.

Caracteres de crecimiento

A los 15 días de aplicado el tratamiento de estrés combinado se observó reducción del crecimiento en todos los genotipos bajo tratamiento de estrés combinado. En el peso seco de la parte aérea de la planta se distinguieron 4 grupos con diferencias significativas. El primer grupo incluyó al tratamiento control del genotipo RN51. El segundo grupo estuvo conformado por los tratamientos control de los genotipos J20, RN49, S6 y RN1. El tercer grupo incluyó a los tratamientos de estrés combinado de los genotipos RN51, J20 y RN49 con reducciones de -46%, -40% y -41% respectivamente. El cuarto grupo se formó con los tratamientos de estrés combinado de los genotipos S6 y RN1, con reducciones de -64% y -71% (Fig. 4.6).

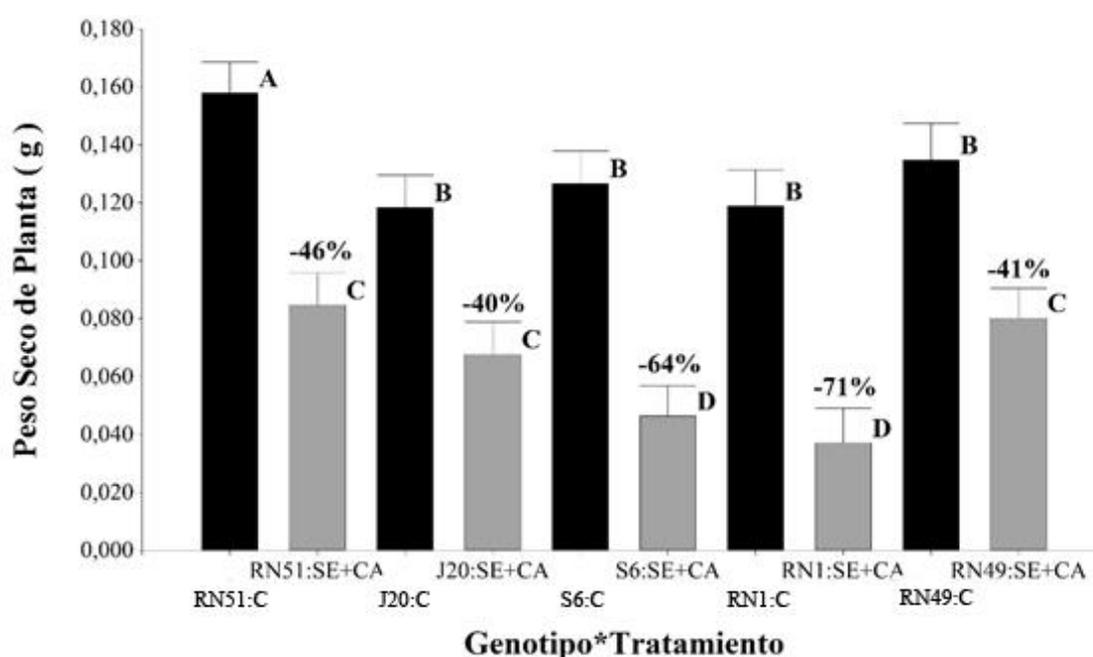


Fig. 4.6. Peso seco de la parte aérea de la planta medido a los 15 días del tratamiento de estrés combinado con sequía y calor (54 días desde la siembra) en los genotipos RN51, RN1, RN49, J20 y S6. Genotipo*Tratamiento representa la interacción entre ambos factores. Las barras color negro (tratamiento control) y color blanco (tratamiento estrés combinado) representan los promedios de seis repeticiones. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores expresados en porcentaje representan la reducción en el valor promedio del tratamiento de estrés combinado respecto del valor promedio del tratamiento control.

Evaluación de producción total de biomasa en condiciones de campo

Se observaron 3 grupos con diferencias significativas. El primer grupo mostró la mayor producción de biomasa e incluyó a los genotipos J20, RN51 y RN49, con valores promedios iguales o superiores a 0,800 Kg de Materia seca total por metro cuadrado. El segundo grupo, incluyó al genotipo S6 con un valor promedio cercano a 0,600 Kg MS/m². El tercer grupo presentó la menor producción e incluyó al genotipo RN1 con un valor promedio cercano a 0,300 Kg MS/m² (Fig. 4.7).

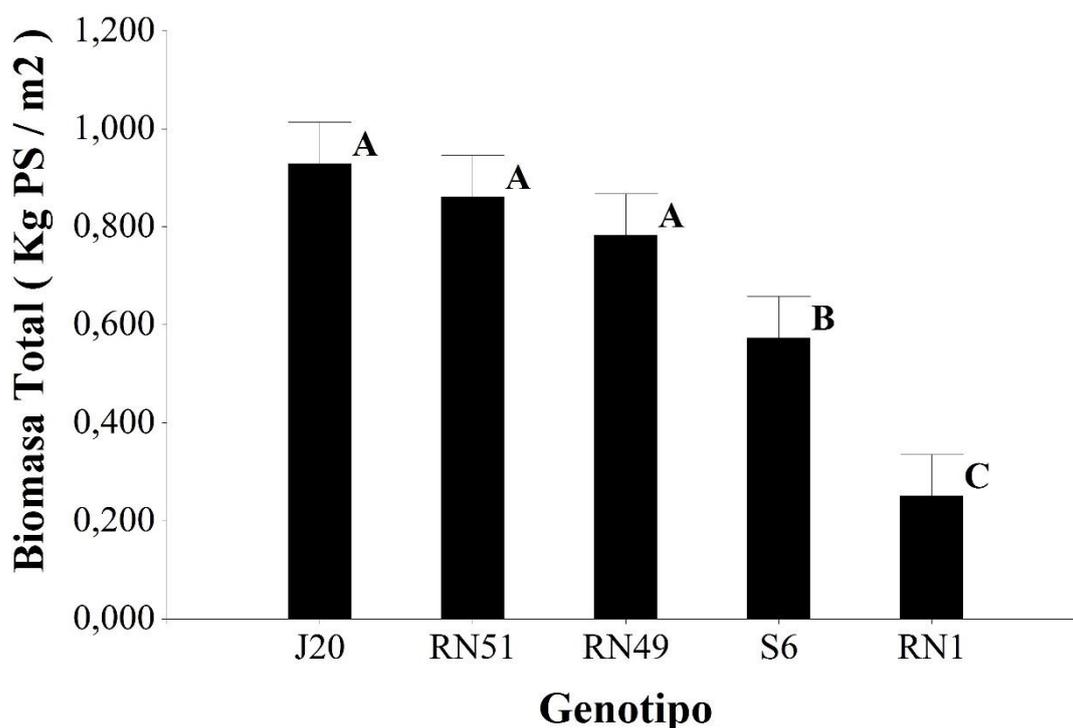


Fig. 4.7. Producción total de Biomasa en Kg de Peso seco / m² obtenida de tres cosechas en el período de crecimiento del cultivo entre diciembre – marzo para los genotipos RN51, RN1, RN49, J20 y S6, evaluados en condiciones de campo en la localidad de Quilino (Noroeste de Córdoba, Argentina). Las barras representan el valor promedio de cinco repeticiones. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los genotipos (RN1 y S6) que en el sistema experimental de estrés combinado por sequía y calor mostraron mayores reducciones en el crecimiento (71% y 64%) también presentaron menor producción de biomasa en condiciones de campo en todos los momentos de cosecha de biomasa (Fig. 4.8).

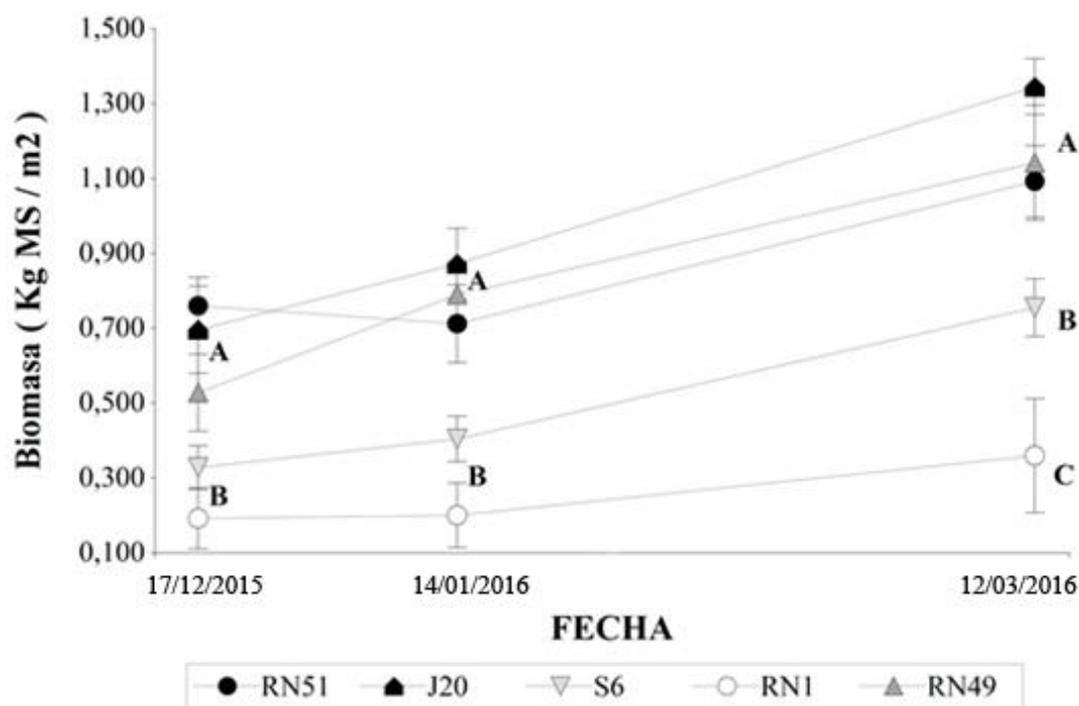


Fig. 4.8. Comparación de producciones de Biomasa en Kg de Peso seco / m² obtenidas en cada cosecha en el período de crecimiento del cultivo entre diciembre – marzo para los genotipos RN51, RN1, RN49, J20 y S6, evaluados en condiciones de campo en la localidad de Quilino (Noroeste de Córdoba, Argentina). Cada punto representa el valor promedio de cinco repeticiones. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

QUILINO	pp (mm) acum	T media (°C)	Tmed max (°C)	Tmed min (°C)
Sept-15	2	14	22	7
Oct-15	3	18	24	13
Nov-15	65	23	28	15
Dic-15	78	24	34	18
Ene-16	103	26	33	20
Feb-16	95	25	31	20
Mar-16	48	22	27	15
Total	394 mm			
		21,7 °C	28,4 °C	15,4 °C

Fig. 4.9. Valores de precipitaciones y temperaturas durante el período de evaluación de los genotipos de buffel grass en la localidad de Quilino. Los datos de precipitaciones fueron obtenidos del pluviómetro instalado en el lugar de ensayo. Los datos de temperatura fueron suministrados por la red de estaciones meteorológicas de la Bolsa de Cereales de Córdoba (Anuario Meteorológico BCCBA, 2015; 2016).

DISCUSIÓN

Cuando los cinco genotipos fueron evaluados en estrés combinado, el genotipo J20 mostró una respuesta similar a la observada en el genotipo tolerante RN51. Mientras que el genotipo S6 presentó una respuesta semejante a la observada en el genotipo susceptible RN1. Las diferentes respuestas pueden deberse al proceso de obtención y selección de éstos genotipos (J20 y S6) inducidos por mutación y variación somaclonal como ha sido explicado en trabajos previos, para tolerancia a sequía (López Colomba *et al.* 2011) y tolerancia a salinidad (López Colomba *et al.* 2013). Por otra parte, el genotipo RN49 es el genotipo de buffel grass de mayor difusión y utilización en los sistemas productivos de cría bovina del noroeste de la República Argentina (Namur *et al.*, 2014) y también presentó respuestas bioquímicas y de crecimiento similares a las observadas en el genotipo tolerante (RN51).

El efecto del estrés, aplicado de manera individual o en combinación, sobre los genotipos evaluados en condiciones controladas puede no tener correlación con el efecto observado en condiciones naturales (Mittler 2006). Sin embargo, en nuestro estudio, el resultado en el crecimiento obtenido en respuesta al estrés por sequía y calor en condiciones controladas fue similar a la respuesta obtenida en el ensayo de producción de biomasa en condiciones de campo realizado en la localidad de Quilino. Los genotipos tolerantes mostraron mayor crecimiento y producción total de biomasa, en ambas condiciones en comparación con los genotipos susceptibles. Similares resultados fueron reportados por Saeidi *et al.* (2015) quienes observaron que el estrés por sequía durante etapas vegetativas tempranas provocó reducción de algunos parámetros agronómicos como por ejemplo la producción total de biomasa. Asimismo, la clasificación obtenida de los genotipos de buffel grass en respuesta a estrés por sequía y calor, bajo condiciones controladas y mediante los parámetros bioquímicos y morfológicos analizados se convalidó a campo.

CONCLUSIÓN PARCIAL

Las respuestas bioquímicas y las disminuciones del crecimiento observadas en el presente estudio sentaron las bases para diferenciar los genotipos de buffel grass basándonos en la susceptibilidad y tolerancia al estrés combinado por sequía y calor. De los parámetros bioquímicos medidos, el contenido de MDA y el valor de FRAP, podrían resultar los más convenientes de utilizar para futuras caracterizaciones de nuevos genotipos obtenidos en el programa de mejoramiento que lleva adelante el IFRGV, lo cual permitiría la identificación temprana de genotipos tolerantes a ambos estreses, en el mejoramiento de buffel grass.

BILIOGRAFÍA

- Al-Dakheel A.J. and Iftikhar Hussain M. 2016. Genotypic Variation for Salinity Tolerance in *Cenchrus ciliaris* L. *Frontiers in Plant Science* 7(1090):1-12.
- Anuario Meteorológico BCCBA. Red de estaciones meteorológicas. Departamento de información Agroeconómica. 2015. (Disponible: <http://www.bccba.com.ar/anuario-meteorologico-2015red-estaciones-meteorologicas-7501.html#>. Verificado: noviembre 2018.)
- Anuario Meteorológico BCCBA. Red de estaciones meteorológicas. Departamento de información Agroeconómica. 2016. (Disponible: <http://www.bccba.com.ar/anuario-meteorologico-2016red-estaciones-meteorologicas-7501.html#>. Verificado: noviembre 2018.)
- Ashraf M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances* 27:84-93.
- Ayersa R. 1981. El Buffel grass : utilidad y manejo de una promisorio gramínea. Buenos Aires. Hemisferio Sur (eds). 139 p.
- Di Rienzo J. A., Guzman A. W. and Casanoves F. 2002. A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological and Environment Statistics* 7:129-142. (Disponible: <http://www.jstor.org/stable/1400690> verificado: mayo 2018).
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. and Robledo C.W. 2017. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (Disponible: <http://www.infostat.com.ar> verificado: mayo 2018).
- Fernando A., Ibarra F., Cox J.R., Martha H., Martin R., Crowl T.A. and A. Call C.A. 1995. Predicting Buffelgrass Survival across a Geographical and Environmental Gradient. *Journal of Range Management* 48(1):53-59.
- Köppen W. 1936. Das geographische System der Klimate. In: Köppen W, Geiger R (eds), *Handbuch der Klimatologie, I, Teil C*, Gebrüder Borntraeger, Berlin, 44 pp.
- Lanza Castelli S., Grunberg K., Muñoz N., Griffa S., López Colomba E., Ribotta A., Biderbost E. and Luna C.M. 2010. Oxidative damage and antioxidant defenses as

- potential indicators of salt -tolerant *Cenchrus ciliaris* L. genotypes. *Flora* 205: 622–626.
- López Colomba E., Prina A., Griffa S., Ribotta A., Carloni E., Tommasino E., Luna C., Biderbost E. and Grunberg K. 2011. Obtaining new germplasm in *Cenchrus ciliaris* L. through induced-mutation and *in vitro* selection. *Phyton International Journal of Experimental Botany* 80:59–64.
- López Colomba E., Tommasino E., Luna C., Griffa S., Carloni E., Ribotta A., Quiroga M. and 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.
- Minner D.D., Dernoeden P.H., Wehner D.J. and McIntosh M.S. 1983. Heat tolerance screening of field-grown cultivars of Kentucky bluegrass and perennial ryegrass. *Agronomy Journal* 75:772-775.
- Mittler R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11:15–19
- Mittler R. and Blumwald E. 2010. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annual Review of Plant Biology* 61:443–62.
- Namur P., TessiJose M., Avila R.E., Rettore H.A. y Ferrando C.A. 2014. BUFFEL GRASS Generalidades, implantación y manejo para recuperación de áreas degradadas. Ediciones INTA. La Rioja, Argentina, 20 pp.
- Peel M.C., Finlayson B.L. and McMahon T.A. 2007. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology Earth System Science* 11:1633–1644.
- Razzaq H., Tahir M.H.N. Sadaqat H.A. and Sadia B. 2017. Screening of sunflower (*Helianthus annus* L.) accessions under drought stress conditions, an experimental assay. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 17(3):662-671.
- Saeidi M., Ardalani S., Jalali-Honarmand S., Ghobadi M. and Abdoli M. 2015. Evaluation of drought stress at vegetative growth stage on the grain yield formation and some physiological traits as well as fluorescence parameters of different bread wheat cultivars. *Acta Biologica Szegediensis* 59:35–44.
- Tommasino E., Griffa S., Grunberg K., Ribotta A., López Colomba E., Carloni E., Quiroga M. and Luna C.M. 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.

CONCLUSIONES GENERALES

El estrés por sequía y calor, aplicado de forma separada o en combinación, provoca cambios en el metabolismo oxidativo en buffel grass observándose respuestas contrastantes y variabilidad en los genotipos evaluados. Lo cual resulta útil en un programa de mejoramiento para caracterizar e identificar genotipos de buffel grass tolerantes.

El daño oxidativo (contenido de MDA) y el poder reductor total (valor de FRAP) presentan una relación inversa, en la cual, menores contenidos de MDA se corresponden con mayores valores de FRAP en los genotipos tolerantes. Estos parámetros bioquímicos medidos a las 72 horas de tratamiento de estrés pueden ser una herramienta útil para identificar respuestas de tolerancia al estrés por sequía y calor en genotipos de buffel grass.

Los sistemas experimentales desarrollados, de estrés por sequía, calor y la combinación de ambos, logran diferenciar genotipos de buffel grass y resultan útiles para evaluar la tolerancia de dicha especie a esos factores limitantes.

La respuesta en el crecimiento de los genotipos obtenida en el modelo de estrés combinado utilizado en condiciones experimentales controladas concuerda con la producción de biomasa evaluada a campo.

Los resultados mostrados aquí sugieren que el metabolismo antioxidante cumple una función importante en la tolerancia de buffel grass a sequía, calor y la combinación de ambos tipos de estrés. Los mecanismos moleculares específicos que subyacen a estos parámetros en buffel grass podrían ser objeto de futuros estudios.

ANEXO

ENSAYOS DE ESTRÉS POR SEQUÍA

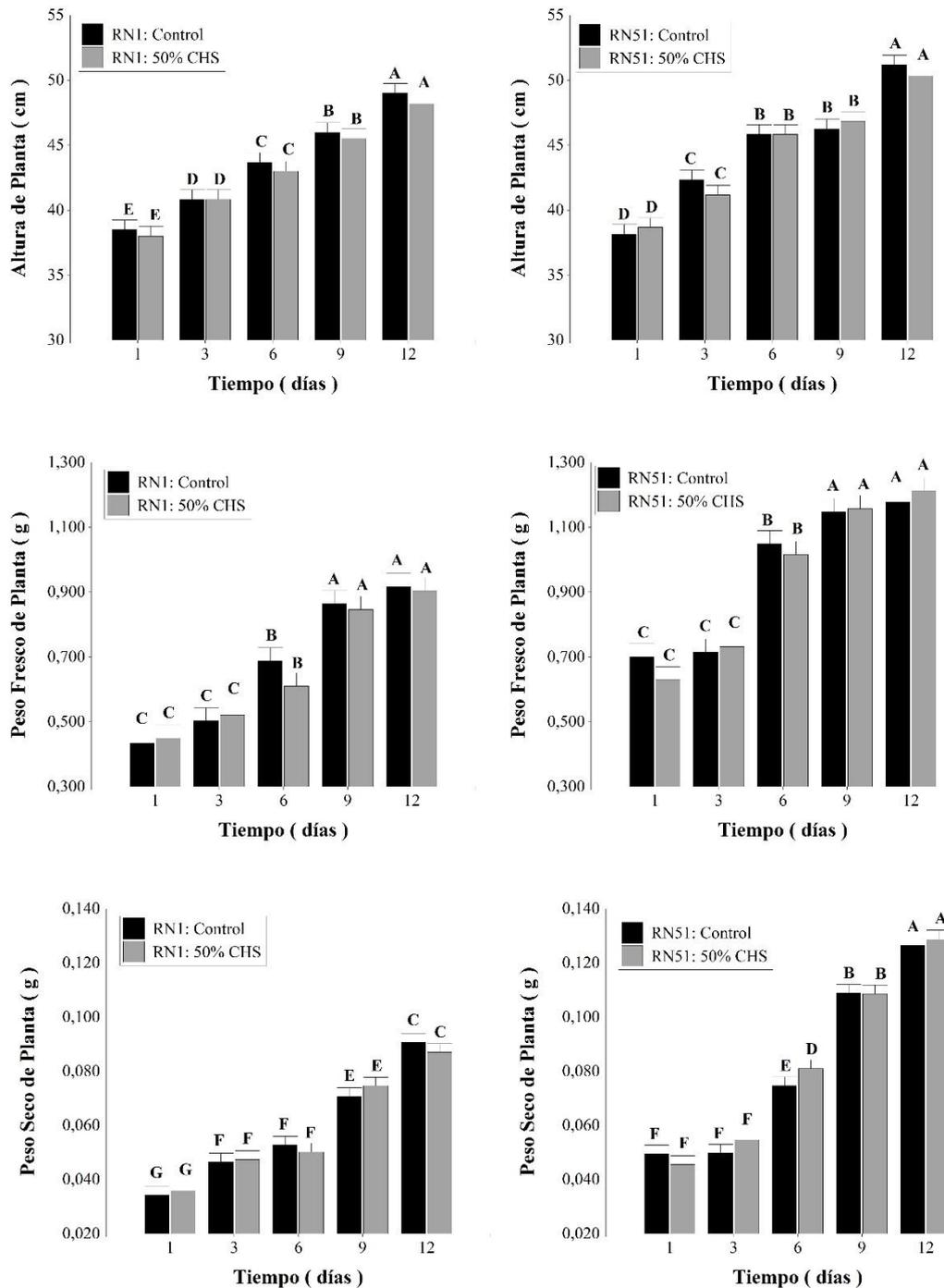


Fig A.1. Evaluación del crecimiento, mediante los caracteres de Altura, Peso Fresco y Peso Seco de la parte aérea de la planta en los genotipos RN1 (A, C, E) y RN51 (B, D, F) durante 12 días con tratamiento sequía 50% de CHS (barras color gris) y tratamiento control 80% de CHS (barras color negro). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). No se observó efecto del tratamiento sobre el crecimiento. Se observaron diferencias debido al genotipo y al tiempo de tratamiento.

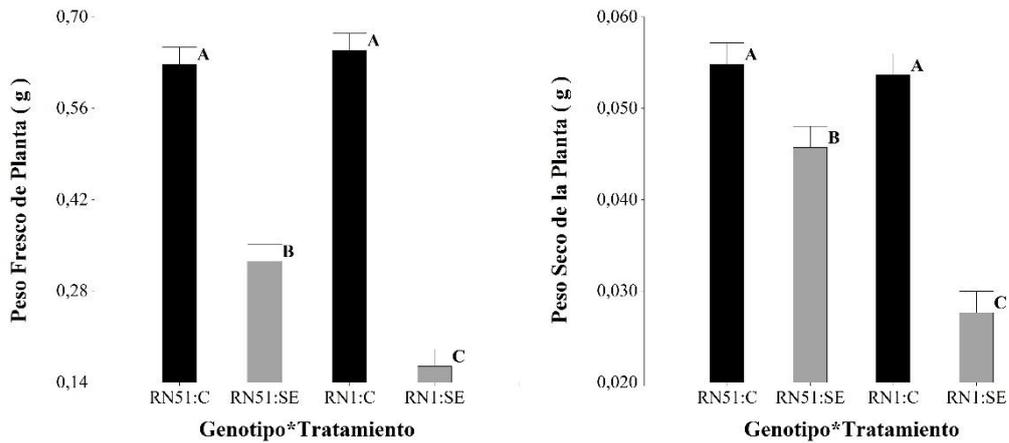


Fig A.2. Caracteres morfológicos PF y PS evaluados en los genotipos RN1 y RN51, al tercer día de aplicados los tratamientos: sequía 15% de CHS (barras color gris) y control 80% de CHS (barras color negro). Genotipo*Tratamiento representa la interacción entre ambos factores. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

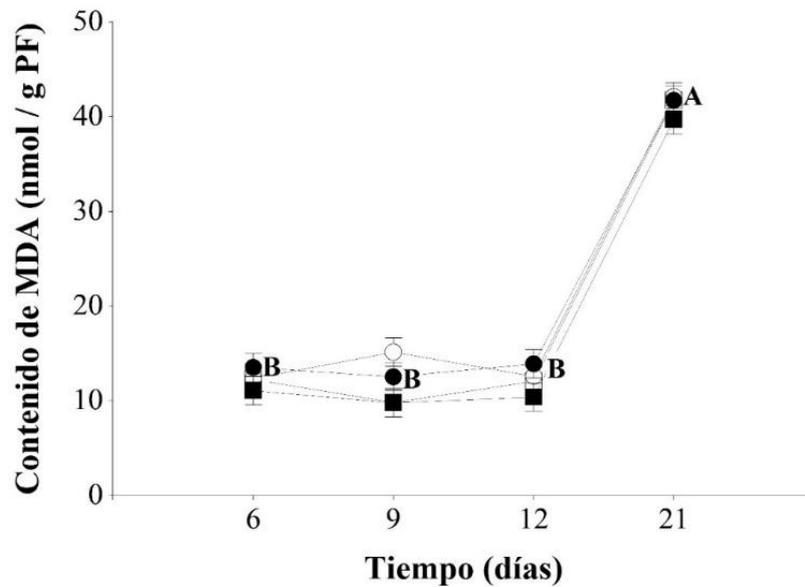


Fig. A.3. Medición del contenido de MDA en los genotipos RN51 y RN1 a los 6, 9, 12 y 21 días de tratamiento. RN51: Control (■); RN51: sequía 30% CHS (●); RN1: Control (□); RN1: sequía 30% CHS (○). No se observó interacción entre genotipo y tratamiento. Se observó diferencias debido al tiempo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

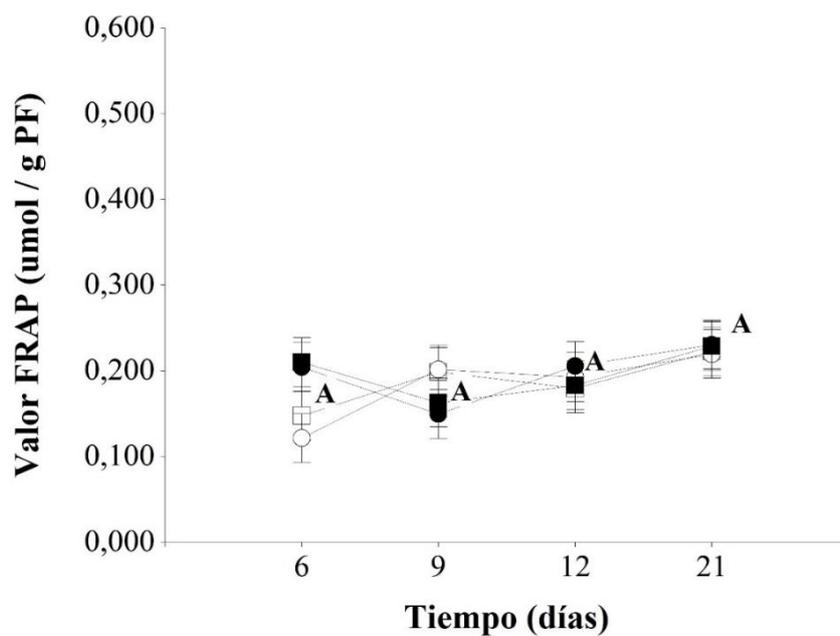


Fig. A.4. Poder reductor cuantificado mediante el Valor de FRAP en los genotipos RN51 y RN1 a los 6, 9, 12 y 21 días. RN51: Control (■); RN51: sequía 30% CHS (●); RN1: Control (□); RN1: sequía 30% CHS (○). No se observó interacción entre genotipo y tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).