

69526

Tesis Doctoral



ESTRÉS POR FRÍO EN *Digitaria eriantha*:  
FORRAJERA PROMISORIA PARA ZONAS

**SEMIÁRIDAS**

GARBERO, M.M  
Estrés por Frío en D

2011 69526

Doctorando:

Ing. Agr. *Marisa Mariela Garbero*

Director:

Dra. *Guillermina Abdala*

Co-Director:

Dra. *Hilda Pedranzani*



**Universidad Nacional de Río Cuarto**  
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Año 2011

60526

<b>MFA:</b>
<b>Clasf:</b> T-712

El presente trabajo para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas fue realizado en la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Directora:

Dra. *Guillermina Abdala*



.....

Co-Directora:

Dra. *Hilda Pedranzani*



.....

Comisión Asesora y Tribunal de Tesis:

Ing. Agr. *José Beltrano*



.....

Dra. *Teresa Kraus*



.....

Dra. *Celina Luna*



.....

*Dedicada a mis padres:*

*Edith y Ricardo*

## *Agradecimientos*

Quiero expresar mi gratitud a todas las personas que me han ayudado en la realización de este trabajo.

En primer lugar mi agradecimiento a la directora de esta tesis doctoral, Dra. Guillermina Abdala, por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección que ha facilitado a las mismas. Gracias por la confianza ofrecida.

A la Dra. Hilda Pedranzani, co-directora de esta tesis y directora de becas doctorales, por acompañarme en mis primeros pasos en la investigación científica, por su compañía y apoyo.

A los jurados: Ing. José Beltrano, Dra. Teresa Kraus y Dra. Celina Luna, por sus buenos comentarios y sus críticas siempre constructivas en favor del mejoramiento de este trabajo.

A la EEA-INTA de Villa Mercedes, San Luis y en particular al MSc. Oscar Terenti por proporcionar las semillas utilizadas en esta tesis.

Quiero expresar mi gratitud a la *Secretaría de Ciencia y Técnica* (FICES-UNSL) por concederme las becas de posgrado que ayudaron económicamente a la realización de esta tesis.

A la Dra. Fanny Zirulnik, Dra. Alicia Molina y Lic. Verónica Pérez-Chaca por enseñarme las técnicas de laboratorio relacionadas a estrés oxidativo en plantas, por su apoyo y cariño.

Por su orientación y atención a mis consultas sobre la anatomía de plantas y por sus palabras de aliento, que siempre me hicieron sentir bien, mi agradecimiento a la Dra. Herminda Reinoso. Gracias a la MSc. Claudia Escudero por su ayuda en la realización de los cortes para microscopía óptica.

Le agradezco a la Dra. Belén Fernández Muñiz por haberme recibido en su laboratorio, a la Dra. Candela Cuesta Moliner y al Lic. Victor Granda por su compañía y paciencia al enseñarme las técnicas y a la *Agencia Española para la Cooperación Internacional y el Desarrollo* por la beca que me permitió realizar la estancia en la Universidad de Oviedo, España.

A la Dra. Ana Vigliocco y a la Dra. Andrea Andrade por su paciencia y dedicación al enseñarme las técnicas de determinación de hormonas, mi agradecimiento por su compañía durante mis estancias en la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la UNRC.

Mi agradecimiento a la Dra. Susana Jurado y al grupo de trabajo del Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP) por poner a mi disposición su experiencia en la interpretación de imágenes ultraestructurales.

A los integrantes del Proyecto 50107 de la cátedra de Fisiología Vegetal (FICES-UNSL) por su ayuda durante la realización de esta tesis. A todos ellos gracias por sus palabras de ánimo.

Le agradezco a la MSc. María M. Hellmers responsable de la asignatura Hidrología Agrícola, por comprender mis ausencias y apoyar la realización de esta Tesis.

También quiero agradecer de forma muy especial a mis padres: Edith y Ricardo, y a mis hermanos: Vanessa y Javier, que han estado siempre a mi lado y han contribuido para que este trabajo concluyera favorablemente. Mi agradecimiento a Ezequiel, por su paciencia y comprensión.

Por último, mi gratitud a mis amigos y a todas aquellas personas que, aunque no he nombrado, han contribuido de algún modo a facilitarme el trabajo y a los que se han interesado por su desarrollo y feliz terminación.

## RESUMEN

*Digitaria eriantha*, importante forrajera introducida a la región semiárida argentina, posibilita esquemas de producción de carne bovina de alta rentabilidad. Sin embargo, el frío afecta la biomasa y desarrollo de las plantas de esta especie. En este trabajo se evaluó el efecto del frío sobre parámetros fisiológicos, anatómicos, ultraestructurales, hormonales y bioquímicos en dos cultivares de *D. eriantha* con diferente sensibilidad al frío. Las plantas de los cvs. Sudafricana (sensible) y Mejorada INTA (tolerante) fueron expuestas a  $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por cortos periodos de tiempo: 0 (control), 6, 24 y 72 h. En el cv. Sudafricana el frío causó detención del crecimiento, descenso en el contenido de clorofilas, citocininas (isopentenil adenina, iP) y ácido indol-3-acético (AIA), y la recuperación fue lenta luego de la interrupción del tratamiento con bajas temperaturas. Por el contrario, el cv. Mejorada INTA continuó creciendo a pesar de las bajas temperaturas, sin modificar el contenido de clorofilas y citocininas, aunque aumentando notablemente el nivel de AIA. Estas características posibilitaron la rápida recuperación de las plantas luego del tratamiento con frío. En el cv. Sudafricana se observaron daños anatómicos en hojas y brotes, y en la ultraestructura de cloroplastos; sin embargo, estos parámetros fueron levemente afectados en el cv. Mejorada INTA. En el cv. sensible Sudafricana el nivel de ácido abscísico (ABA) incrementó, disminuyendo sus catabolitos; también se observó incremento de ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA). En ambos cultivares ácido jasmónico (JA) y su hidroxilado (12-OH-JA) disminuyeron. No obstante, en el cv. tolerante Mejorada INTA ABA incrementó significativamente junto con su catabolito éster glucosa (ABA-GE). En el cv. Sudafricana, aumentaron los tioles no proteicos (TNP) y ascorbato peroxidasa (APX), disminuyendo sin embargo, superóxido dismutasa (SOD) lo cual conduce al incremento de malondialdehído (MDA). En el cv. Mejorada INTA los niveles de MDA, glutatión reducido (GSH) y enzimas antioxidantes no se modificaron. Así, la tolerancia al frío del cv. Mejorada INTA se vería reflejada en la ausencia de alteraciones anatómicas y se relacionaría con la estabilidad en los niveles de clorofilas y citocininas e incremento de AIA. Por lo tanto, los altos niveles endógenos de JA, 12-OH-JA y GSH, así como los incrementos de ABA, la estabilidad de MDA y las defensas antioxidantes, sugieren una interconexión entre estos actores que determinaría la tolerancia al frío.

## ABSTRACT

*Digitaria eriantha* is an important forage specie introduced in the semi-arid region of Argentina contributing to established beef production schemes of high productivity. However, cold stress affects the plant biomass and development of this specie. In this study, we evaluated the cold effect on physiological, anatomical, ultrastructure, hormonal and biochemical parameters in two cultivars of *D. eriantha* with different cold sensitivity. Plants of the cv. Sudafricana (a cold-sensitive cultivar) and cv. Mejorada INTA (a cold-tolerant cultivar) were exposed to  $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  during short-term: 0 (control), 6, 24 and 72 h. In cultivar Sudafricana, cold temperature suppressed plant growth, decreased chlorophylls, cytokinins (*iso*-pentenyladenine, iP) and indole-3-acetic acid (IAA) contents, and the recovery after cold treatment interruption was slow. On the contrary, in cultivar Mejorada INTA cold stress did not affect growth, chlorophylls and cytokinins contents, although IAA level increased considerably. These characteristics facilitated the rapid plant recovery after cold treatment. Anatomical damages on leaves and buds as well as on the chloroplast ultrastructure were observed in cv. Sudafricana. These parameters were slightly affected in cv. Mejorada INTA. In the sensitive cv. Sudafricana, abscisic acid (ABA) level increased but its catabolites decreased. Increase in 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA) content was also observed in this cultivar. Cold treatment decreased JA and 12-hydroxyjasmonate (12-OH-JA) in leaves of both cultivars. Nevertheless, in the tolerant cv. Mejorada INTA ABA and its glucose ester catabolite (ABA-GE) increased considerably. Both, non-protein thiols (NPT) and ascorbate peroxidase (APX) increased in cv. Sudafricana but superoxide dismutase (SOD) activity decreased leading to an increase in malondialdehyde (MDA). The levels of MDA, reduced glutathione (GSH) and antioxidant enzymes were not modified in Mejorada INTA. Thus, the cold tolerance of cv. Mejorada INTA would be reflected in the absence of anatomical alterations and it could be related to chlorophyll stability, cytokinins levels and IAA increase. Thereby, JA, 12-OH-JA and GSH high basal levels as well as ABA increases, MDA and antioxidant defenses stability suggest an interconnection among all these partners that would determine cold temperature tolerance.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b> .....	VI
<b>ABSTRACT</b> .....	VII
<b>ÍNDICE</b> .....	VIII
<b>ABREVIATURAS</b> .....	XVI
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. Caracterización de la región y de la especie .....	2
2. Las plantas y el estrés .....	9
3. Variación del crecimiento, citocininas y pigmentos en plantas bajo estrés por frío .....	11
Citocininas y el crecimiento de las plantas .....	12
Auxinas y su relación con el crecimiento .....	14
El estrés por frío y los pigmentos fotosintéticos .....	15
4. Anatomía de hojas y estrés por frío .....	16
5. Fitohormonas relacionadas al estrés .....	17
6. Estrés por frío y defensas antioxidantes .....	21
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	24
Hipótesis .....	25
Objetivo general .....	25
Objetivos específicos .....	26
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	27

1. Material vegetal y tratamiento de bajas temperaturas.....	28
2. Peso fresco, peso seco y longitud de parte aérea y radicular .....	29
2.1. Evaluación de la recuperación .....	29
3. Determinación de pigmentos fotosintéticos: clorofilas y carotenoides.....	29
4. Estudios por microscopia óptica y electrónica.....	30
4.1. Estructura anatómica del brote y láminas foliares .....	30
4.2. Ultraestructura de láminas foliares.....	30
5. Determinación de las hormonas de crecimiento .....	31
5.1. Citocininas.....	31
5.2. Auxinas.....	33
6. Fitohormonas relacionadas al estrés.....	34
6.1. Cuantificación de jasmonatos .....	34
6.2. Cuantificación de ácido abscísico y metabolitos .....	35
7. Determinación de parámetros de estrés oxidativo .....	35
7.1. Contenido de malondialdehído .....	35
7.2. Determinación de enzimas antioxidantes.....	36
7.3. Determinación de compuestos antioxidantes no enzimáticos.....	36
8. Análisis estadístico.....	37
<b>RESULTADOS</b> .....	38
1. Peso fresco, peso seco y longitud de hojas y raíces .....	39
1.1. Evaluación de la recuperación .....	42

2. Pigmentos fotosintéticos .....	44
3. Anatomía por microscopia .....	46
3.1. Anatomía del tallo .....	46
3.2. Anatomía de la hoja .....	49
4. Ultraestructura .....	51
5. Hormonas de crecimiento .....	57
5.1. Citocininas endógenas en hojas de <i>Digitaria eriantha</i> .....	57
5.2. Auxinas endógenas en hojas de <i>Digitaria eriantha</i> .....	60
6. Contenido endógeno de jasmonatos en plantas tratadas con frío.....	61
7. Contenido de ácido abscísico y sus metabolitos .....	63
8. Defensas antioxidantes en plantas bajo estrés.....	66
8.1. Enzimas antioxidantes.....	66
8.2. Antioxidantes no enzimáticos .....	67
<b>DISCUSIÓN</b> .....	70
<b>CONCLUSIONES</b> .....	82
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Plantas de <i>Digitaria eriantha</i> Steudel subespecie <i>eriantha</i> , en la Estación Experimental de INTA, Villa Mercedes, San Luis .....	3
Fig. 2. Detalle de la inflorescencia de <i>Digitaria eriantha</i> Steudel subespecie <i>eriantha</i> .....	4
Fig. 3. <i>Digitaria eriantha</i> Steudel subespecie <i>eriantha</i> . A: Hábito. B: Región ligular. C: Porción de un racimo. D: Detalle del indumento de la espiguilla. E y F: Espiguilla. G y H: Antecio superior.....	5
Fig. 4. Estructura de citocininas activas.....	12
Fig. 5. Miembros de la familia de los jasmonatos: OPDA, JA y sus hidroxilados 12-OH-JA y 11-OH-JA .....	19
Fig. 6. Catabolitos de ABA, ácido 4-dihidrofaseico (DPA), ácido faseico (PA) y éster ABA-Glucosa (ABA-GE) .....	21
Fig. 7. Plantas de <i>D. eriantha</i> cvs. Sudafricana (Izquierda) y Mejorada INTA (Derecha) con 30 días de crecimiento .....	28
Fig. 8. Bomba de vacío con las columnas C18 montadas sobre las columnas OASIS .....	32
Fig. 9. Peso fresco y peso seco foliar en <i>Digitaria eriantha</i> . A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA .....	39
Fig. 10. Peso fresco y peso seco radicular en <i>Digitaria eriantha</i> . A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA .....	40
Fig. 11. Longitud de hojas y raíces de <i>Digitaria eriantha</i> . A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA .....	41
Fig. 12. Porcentaje de recuperación del peso seco de hojas de <i>Digitaria eriantha</i> cvs. Sudafricana y Mejorada INTA.....	42

Fig. 13. Porcentaje de recuperación del peso fresco de hojas de <i>Digitaria eriantha</i> cvs. Sudafricana y Mejorada INTA .....	43
Fig. 14. Porcentaje de recuperación de la longitud de hojas de <i>Digitaria eriantha</i> cvs. Sudafricana y Mejorada INTA .....	44
Fig. 15. Contenido de clorofilas <i>a</i> , <i>b</i> y carotenoides en hojas de <i>Digitaria eriantha</i> . A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA .....	45
Fig. 16. Sección longitudinal de la región apical del brote de <i>D. eriantha</i> . Control, A: cv. Sudafricana, B: cv. Mejorada INTA. 24 h de frío, C: cv. Sudafricana, D: cv. Mejorada INTA. 72 h de frío, E: cv. Sudafricana, F: cv. Mejorada INTA.....	47
Fig. 17. Sección longitudinal de la región apical del tallo principal de <i>Digitaria eriantha</i> a 5 días de estrés por frío. A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA .....	48
Fig. 18. Sección transversal de hojas de <i>Digitaria eriantha</i> cvs. Sudafricana y Mejorada INTA.....	50
Fig. 19. Cloroplastos amiláceos de <i>Digitaria eriantha</i> cv. Sudafricana. A: Plantas control. B: 72 h de frío.....	52
Fig. 20. Cloroplastos amiláceos de <i>Digitaria eriantha</i> cv. Mejorada INTA. A: Plantas control. B: 72 h de frío .....	53
Fig. 21. Cloroplastos del parénquima de <i>Digitaria eriantha</i> cv. Sudafricana. A: Plantas control. B: 72 h de frío .....	54
Fig. 22. Cloroplastos del parénquima de <i>Digitaria eriantha</i> cv. Mejorada INTA. A: Plantas control. B: 72 h de frío.....	55
Fig. 23. Mitocondrias de <i>Digitaria eriantha</i> . Cv. Sudafricana, A: Control, C: 72 h de frío. Cv. Mejorada INTA, B: Control, D: 72 h de frío .....	56

Fig. 24. Pared celular de <i>Digitaria eriantha</i> . Cv. Sudafricana, A: Control, C: 72 h de frío. Cv. Mejorada INTA, B: Control, D: 72 h de frío .....	57
Fig. 25. Contenido de iP en hojas de <i>Digitaria eriantha</i> . A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA .....	58
Fig. 26. Contenido de iPA en hojas de <i>Digitaria eriantha</i> . A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA .....	59
Fig. 27. Contenido de AIA en hojas de <i>Digitaria eriantha</i> . A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA .....	61
Fig. 28. Niveles endógenos de JAs en <i>Digitaria eriantha</i> cvs. Sudafricana y Mejorada INTA a 6, 24 y 72 h de frío. A y B: JA. C y D: OPDA. E y F: 12-OH-JA .....	62
Fig. 29. Niveles endógenos de ABA en <i>Digitaria eriantha</i> a 6, 24 y 72 h de frío. A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA .....	64
Fig. 30. Niveles endógenos de PA en <i>Digitaria eriantha</i> a 6, 24 y 72 h de frío. A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA .....	64
Fig. 31. Niveles endógenos de DPA en <i>Digitaria eriantha</i> a 6, 24 y 72 h de frío. A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA .....	65
Fig. 32. Niveles endógenos de ABA-GE en <i>Digitaria eriantha</i> a 6, 24 y 72 h de frío. A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA .....	65
Fig. 33. Niveles de malondialdehído (MDA) en hojas de <i>Digitaria eriantha</i> a 6, 24 y 72 h de estrés por frío. A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA .....	66
Fig. 34. Defensa antioxidante enzimática en hojas de <i>Digitaria eriantha</i> cvs. Sudafricana y Mejorada INTA a 6, 24 y 72 h de estrés por frío. A: Superóxido dismutasa. B: Ascorbato peroxidasa .....	67
Fig. 35. Cultivar Sudafricana .....	69

Fig. 36. Cultivar Mejorada INTA .....	69
Fig. 37. Respuestas de <i>Digitaria eriantha</i> cvs. Sudafricana (sensible) y Mejorada INTA (tolerante) al estrés por frío .....	81
Fig. 38. Modelo de las respuestas observadas en <i>Digitaria eriantha</i> cv. Sudafricana frente a estrés con bajas temperaturas sobre parámetros hormonales, bioquímicos, anatómicos y la interrelación entre ellos .....	83
Fig. 39. Modelo de las respuestas observadas en <i>Digitaria eriantha</i> cv. Mejorada INTA frente a estrés con bajas temperaturas sobre parámetros hormonales, bioquímicos, anatómicos y la interrelación entre ellos .....	85



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de dihidrozeatina (DHZ) y ribósido de dihidrozeatina (RDHZ) en <i>Digitaria eriantha</i> cvs. Sudafricana y Mejorada INTA.....	60
Tabla 2. Contenido de GSH y TNP en hojas de <i>Digitaria eriantha</i> cvs. Sudafricana y Mejorada INTA.....	68

## ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ABA-GE	ABA éster glucosa
AIA	Ácido indol-3-acético
AOC	Óxido de aleno ciclasa
AOS	Óxido de aleno sintetasa
APX	Ascorbato peroxidasa
c	Citoplasma
cl	Cloroplasto del parénquima
cla	Cloroplasto amiláceo
clo	Cloroplasto
Cl a	Clorofila a
Cl b	Clorofila b
CQs	Citocininas
cv.	Cultivar
DHZ	Dihidrozeatina
DPA	Ácido dihidrofaseico
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
e	Espacio intercelular
eb	Epidermis abaxial
ed	Epidermis adaxial
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EROs	Especies reactivas del oxígeno
F	Floema
ga	Gránulos de almidón
GSH	Glutación reducido
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
iP	Isopentenil adenina
iPA	Isopentenil adenosina
JA	Ácido jasmónico
JAME	Metil jasmonato
LF	Longitud foliar
LR	Longitud radicular
m	Mitocondria
MDA	Malondialdehido
n	Núcleo
OPDA	Ácido 12-oxo-fitodienoico
PA	Ácido faseico
p	Pared celular
pc	Trazas de procambium

PF	Peso fresco
PS	Peso seco
PVP	Polivinilpirrolidona
ra	Raíz adventicia
RDHZ	Ribósido de dihidrozeatina
RZ	Ribósido de zeatina
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBS	Tampón tris-hidroximetil
TCA	Ácido tricloroacético
TNP	Tioles no proteicos
tv	Tejido vacular
v	Vacuola
V	Vaina del haz
vf	Vaina foliar
X	Xilema
yab	Yema axilar basal
yt	Yema apical terminal
11-OH-JA	11-hidroxi-jasmónico
12-OH-JA	12-hidroxi-jasmónico

# **INTRODUCCIÓN**

*ESTRÉS POR FRÍO EN Digitaria eriantha: FORRAJERA PROMISORIA PARA ZONAS SEMIÁRIDAS*

## INTRODUCCIÓN

### 1. Caracterización de la región y de la especie

La región semiárida central argentina comprende las provincias de San Juan, Mendoza, San Luis y oeste de La Pampa. Esta región se caracteriza por su clima continental seco con inviernos fríos y veranos calurosos. Las precipitaciones son primavera-estivales con otoños e inviernos secos (Giulietti y col., 2003).

La principal actividad productiva en las áreas de secano es la cría y recría de bovinos sobre recursos forrajeros naturales y una escasa proporción de pasturas cultivadas tanto perennes como anuales (Veneciano y col., 2003). Entre las forrajeras introducidas perennes de mayor relevancia se puede citar al pasto llorón (*Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees) y entre los verdes anuales prevalecen el centeno, el maíz para pasto y el sorgo forrajero, los cuales aumentan la fragilidad edáfica y sus rendimientos son moderados a consecuencia de las limitaciones ambientales existentes.

Por otro lado, los campos con pasturas naturales presentan un estado de deterioro importante y generalizado (Veneciano, 1999a) y la calidad nutricional de las especies forrajeras nativas es considerada la limitante más importante para la explotación ganadera de esta región (Silva Colomer y col., 1991).

La incorporación de pasturas subtropicales permite incrementar en forma considerable el potencial forrajero y posibilita el planteo de esquemas de producción de carne bovina de alta rentabilidad. Uno de los caminos posibles para revertir la situación de la región es la incorporación de especies perennes aptas para mejorar los niveles de productividad y/o calidad de forraje las cuales poseen probada adaptación al ambiente y permiten la conformación de cadenas alimentarias junto al planteo de sistemas de producción mejorados y estables. Dichos sistemas de producción preservan la estabilidad del suelo, son rentables y de implementación sencilla por parte del productor.

En la estación experimental del INTA (EEA-INTA) Villa Mercedes, San Luis, con la finalidad de lograr una mejor utilización del pastizal natural evitando la sobrecarga del sistema, se intensificó la evaluación de gramíneas subtropicales estivales, que pudieran suplementar nutricionalmente al ganado bovino, evitando

la disminución de la carga animal. En ese contexto en 1991 se introdujo *Digitaria eriantha* Steudel subespecie eriantha (Fig. 1) la cual se ha revelado como una especie idónea para integrarse a los sistemas pastoriles de la zona (Veneciano, 1999b; Veneciano y col., 2003).

Frasinelli (Diario La Nación, 1997) describe a *Digitaria eriantha* como una de las especies más promisorias de las últimas décadas para revertir la baja producción de carne por unidad de superficie de los sistemas de cría e invernada de la provincia de San Luis.



Fig. 1. Plantas de *Digitaria eriantha* Steudel subespecie eriantha, en la Estación Experimental de INTA, Villa Mercedes, San Luis.

Las plantas de esta especie son en general perennes, algunas veces estolonífera, o cespitosa y rizomatosa, con rizomas vigorosos y no ramificados (Cook y col., 2005), presentan porte robusto y alto, con hojas densas de color verde intenso, de 0,5-1,2 cm de ancho y 25-40 cm de longitud planas, lineares, ápice acuminado, con pelos en ambas caras de la porción basal (Veneciano, 1999b). Las cañas son simples o ramificadas, erectas a decumbentes en las

porciones basales, originando raíces en los nudos inferiores; entrenudos numerosos, pajizos a castaño claros, hasta de 15 cm de longitud; los nudos son glabros, castaño oscuros. Presenta vainas hasta de 12 cm de longitud finamente pubescentes con lígula triangular membranácea con borde fimbriado (Giraldo-Cañas, 2005).



Fig. 2. Detalle de la inflorescencia de *Digitaria eriantha* Steudel subespecie *eriantha* (Giraldo-Cañas, 2005)

Las inflorescencias en panojas digitadas, son erectas con pedúnculos hasta de 45 cm de longitud; un eje principal de 0 a 4,5 cm de longitud; panojas constituidas por 3-12 racimos erectos de hasta de 17 cm de longitud; las espiguillas son binadas, con pedicelos de diferente longitud y la articulación pedicelo-espiguilla truncada. Las espiguillas poseen dos flores, la inferior rudimentaria la superior fértil, lanceoladas. La gluma inferior es membranácea y glabra; la gluma superior es cortamente pilosa; ambas glumas son triangulares. La lema inferior es lanceolada, glabrescente a cortamente pilosa; pálea inferior membranácea a escariosa; antecio superior lanceolado, estriado, cartilagíneo,

glabro. La lema superior presenta las márgenes membranáceas y plegadas sobre la pálea superior (Giraldo-Cañas, 2005) (Fig. 2 y 3).

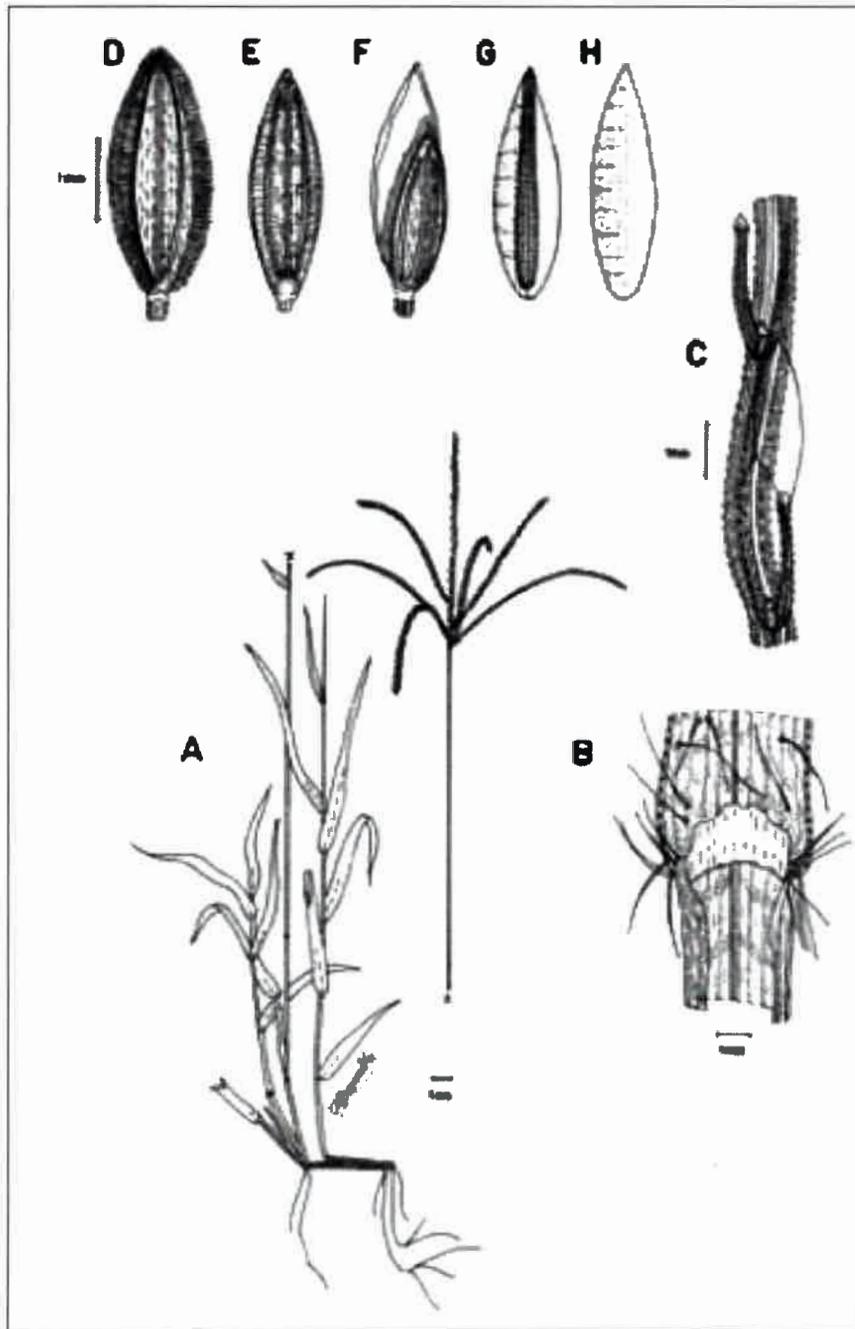


Fig. 3. *Digitaria eriantha* Steudel subespecie *eriantha*: A: Hábito; B: Región ligular; C: Porción de un racimo; D: Detalle del indumento de la espiguilla; E y F: Espiguilla; G y H: Antecio superior (Giraldo-Cañas, 2005)

Esta especie, adaptada a regiones tropicales y subtropicales, se desarrolla

adecuadamente con lluvias estivales no inferiores a 500 mm (Veneciano, 2006). Para su establecimiento requiere una cama de siembra firme y limpia, se recomienda la mezcla de la semilla con superfosfato o su peleteado, debido a la pubescencia de la misma que dificulta su distribución en los dispositivos de siembra (Cook y col., 2005).

*Digitaria* inicia su rebrote a fines de agosto o comienzo de septiembre, pero sin que las plantas experimenten un crecimiento significativo debido a la falta de humedad y las bajas temperaturas características de esa época del año. Por otra parte, el rebrote es sistemáticamente afectado por las heladas de mediana intensidad que suelen extenderse hasta promediar la estación primaveral (Veneciano, 1999b). La máxima producción de forraje ocurre en enero-febrero alcanzando valores superiores a 3000 Kg MS/ha. La producción total, considerando todo el año, se distribuye un 80% en primavera y un 20% en verano, donde los valores de proteína bruta son del 9% entre emergencia y floración, y del 4% en el momento de la fructificación. La senescencia se inicia después de las primeras heladas a mediados de abril (Privitello y col., 2004).

La fertilización nitrogenada incrementa entre un 60 a 100% los rendimientos de esta especie, dependiendo de la condición del cultivo y el nivel de lluvias de la estación de crecimiento (Veneciano y Terenti, 1997). Además mejora el contenido de proteína bruta durante toda la estación de crecimiento. En tanto que en los meses de enero y febrero el contenido proteico de plantas sin fertilizar disminuye, lo que coincide con el período que muestra la foliosidad más baja y mayor velocidad de crecimiento del cultivo. Este comportamiento es característico de las gramíneas megatérmicas, que ante condiciones altamente favorables de luminosidad, temperatura y humedad, maximizan su intensidad de crecimiento en detrimento de la calidad.

La digestibilidad de la planta no varía en el tiempo y tampoco es alterada por la fertilización nitrogenada, hallándose siempre a un nivel considerablemente alto para plantas del tipo C4 (Veneciano, 1999b). La calidad del diferido supera a la del pasto llorón por tener menor contenido de lignina y pared celular (Rabotnikof y col., 1986a) y mayor digestibilidad *in vitro* de la materia seca (Rabotnikof y col., 1986b).

En la zona del centro oeste, *Digitaria* se caracteriza por su sanidad, rusticidad y buen comportamiento ante el pastoreo, ocupando un lugar destacado

como forrajera perenne de verano en San Luis y en menor medida en La Pampa. Cumple un importante papel en los sistemas de cría durante los meses de verano, mejora el peso de los terneros de destete y el estado de la vaca de rechazo. En los meses de invierno cubre los requerimientos de los vientres preñados hasta el último mes de gestación, sin suplementos, considerándola como el único recurso forrajero durante todo el año (Frasinelli y col., 1998; Frasinelli y Martínez, 1999). En el establecimiento “El Centenario” ubicado en el centro sur de la provincia de San Luis, con suelos arenosos y fuertes variaciones de temperatura, se han incorporado pasturas megatérmicas, implantándose 33.000 hectáreas de *Digitaria eriantha* durante los años 1997 y 2002. Debido al alto aporte de proteína de esta especie en el primer rebrote de primavera (11-12%) y su aceptable nivel en pleno invierno (4,5-5%), determina que pueda ser consumida durante el verano y también en invierno como diferida a partir de mayo y hasta octubre, significando una mejora en la calidad forrajera y permitiendo la recuperación del pastizal natural durante estos meses (Diario La Nación, 2009).

Si bien su implantación es buena, se ha observado como una debilidad de esta especie, su sensibilidad a las bajas temperaturas y estrés hídrico, respondiendo también diferencialmente frente a distintos tipos de suelo y defoliación (Toribio y col., 1998).

En el mercado de Argentina, el cultivar más difundido es Irene (cv. Sudafricana) de origen sudafricano, público, el cual presenta dificultades para el establecimiento y la producción de semilla. En otros países como Australia, se han desarrollado otros cultivares con el objetivo de mejorar la calidad de la semilla, la homogeneidad de la forma de crecimiento, la floración temprana y una mejor relación hoja : tallo. En San Luis, mediante un convenio entre Forrajeras Avanzadas y la EEA-INTA Villa Mercedes, se obtuvo el cv. Avanzada INTA, a través del mejoramiento interpoblacional del cv. Irene, que se caracteriza por su mejor adaptación a las condiciones edafo-climáticas de la región semiárida, aunque aún no se encuentra disponible comercialmente (Rimieri y col., 1997). Por otro lado, en la EEA-INTA Villa Mercedes, el Ing. Oscar Terenti realizó el mejoramiento de esta especie, a partir de plantas del cv. Irene que sobrevivieron a heladas de septiembre-octubre, seleccionadas por sus características fenológicas de tolerancia al frío. A partir de esa subpoblación se produjeron semillas sintéticas, denominadas Mejorada INTA, que aún no están inscriptas ni

se comercializan y actualmente se investigan en esta tesis.

En la EEA-INTA Villa Mercedes se correlacionaron factores climáticos con el crecimiento de pasturas megatérmicas perennes nativas y cultivadas, entre ellas *Digitaria eriantha*. En este estudio se consideró las temperaturas medias, mínimas y máximas, como así también la fecha de heladas tardías y tempranas históricas de más de 30 años. Del análisis surgió que en el mes de septiembre la temperatura alcanzó o superó los valores que promueven el crecimiento de estas especies; sin embargo, las temperaturas mínimas de septiembre y la cantidad de días con heladas imposibilitaron tal crecimiento. Por otra parte, el crecimiento de los recursos perennes estivales también fue afectado por las últimas heladas que ocurrieron durante el mes de noviembre (Veneciano y col., 2002). Consistente con estos resultados Frasinelli y Martínez (1999) evaluaron el comportamiento de una pastura establecida de *Digitaria eriantha* y encontraron que las bajas temperaturas de febrero y parte de marzo influían negativamente sobre la producción foliar.

En el Departamento de Ciencias Agropecuarias de la UNSL, se estudió la respuesta de *Digitaria eriantha* a bajas temperaturas a solicitud de la EEA-INTA Villa Mercedes. Se realizaron experiencias de germinación con el cv. Mejorada INTA, en cámara de cultivo a 10°C, con un fotoperiodo de 8:16 h luz:oscuridad, durante 30 días y se evaluó el porcentaje y la velocidad de germinación a los 7, 15 y 30 días. Se observó que las bajas temperaturas no afectaron dichos parámetros a los 7 y 15 días de exposición, pero los disminuyeron significativamente a los 30 días (Quiroga, 2003). Además, se evaluó la germinación a diferentes temperaturas en el cv. Sudafricana y se encontró que temperaturas inferiores a 25°C afectaron este parámetro; la germinación se estimuló cuando se colocaron las semillas a temperaturas óptimas para la especie y a bajos potenciales osmóticos (Di Giambatista, 2006).

Otros estudios realizados, investigando la sensibilidad de la especie al frío, fueron los de metilación de residuos de citosina en el ADN genómico, para lo cual plantas de los cvs. Mejorada INTA y Sudafricana fueron sometidas a temperaturas de 10°C durante 24, 48 y 72 h. Se observaron variaciones en el % de metilación de ADN en el cv. Mejorada INTA, con diferencias significativas a las 24 y 48 h respecto al control; el cv. Sudafricana no mostró diferencias significativas en ningún tratamiento. Estos resultados sugieren un mecanismo de

control que permite desreprimir genes que probablemente expresan proteínas de defensa asociadas al frío o a la desecación (Quiroga y col., 2004). Paralelamente Fraga y col., (2000) afirman que los cambios en la metilación de residuos de citosina de ADN, promueven el control de la expresión génica modificando la síntesis proteica y este mecanismo ha sido asociado a procesos de crecimiento, maduración, envejecimiento y estrés biótico y abiótico.

## **2. Las plantas y el estrés**

Las plantas están sometidas a numerosas y muy diversas señales externas e internas que las obligan a mantener una gran plasticidad metabólica para poder sobrevivir. Entre las señales externas se pueden mencionar la temperatura, luz, gases, disponibilidad de agua, minerales, efectos mecánicos, heridas, influencias físicas y eléctricas; entre las internas, se mencionan a las hormonas, péptidos y azúcares.

Respecto al factor térmico, las plantas pueden crecer solamente en intervalos específicos de temperatura, por debajo de una temperatura mínima las respuestas de las plantas se ven reducidas, siendo este uno de los estreses abióticos que las plantas enfrentan durante su ciclo de vida. El estrés por frío limita la distribución geográfica de las especies silvestres y la necesidad humana para obtener algunas cosechas fuera de los límites impuestos por su distribución natural. Reduce el crecimiento de las plantas con negativos e imprevistos efectos en la biomasa, causando una gran diferencia entre la producción potencial y la real. Por último, el frío reduce la síntesis, acumulación y almacenaje de proteínas y polisacáridos. También la maduración del fruto es afectado por las bajas temperaturas disminuyendo la calidad del producto (Bracale y Coraggio, 2003).

El estudio de la tolerancia al frío es complejo, debido a que dentro de las especies, diferentes cultivares exhiben distintos grados de sensibilidad al frío; además, depende no sólo de la severidad y duración del estrés, sino también de la estación y las actividades diurnas de las plantas. Finalmente, la tolerancia es relativa al estado de desarrollo y al órgano de la planta afectado. Los efectos de las bajas temperaturas en las plantas incluyen alteraciones en la ultraestructura de mitocondrias y cloroplastos (Kratsch y Wise, 2000) y cambios en el metabolismo fotosintético y respiratorio (Nilsen y Orcutt, 1996). Además, las bajas

temperaturas provocan disminución en el crecimiento y alteraciones en el desarrollo (Allen y Ort, 2001).

Por otra parte, el frío produce cambios en la fluidez de los ácidos grasos que provocan deshidratación e incrementan la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) que dañan principalmente a las membranas de las organelas (Bracale y Coraggio, 2003). El grado de insaturación de lípidos de membrana puede ser considerado un factor crítico entre los mecanismos de tolerancia al estrés por frío (Nishida y Murata, 1996).

La tolerancia a bajas temperaturas se ha analizado particularmente en cuanto a acumulación de solutos compatibles (crioprotectores) o alteraciones de los diversos sistemas de membranas de la célula, conjuntamente con el orden de proteínas que se asocian con éstas membranas (Gilmour y col., 1988; Guy y Haskell, 1987). Además, este factor produce cambios en los elementos del citoesqueleto (Quader y col., 1989) y en los reguladores del crecimiento (Lalk y Dorffling, 1985).

En la mayoría de las especies, la fotosíntesis se inhibe después del descongelamiento debido a que los tilacoides son temporalmente perjudicados, en particular inhibiendo el fotosistema II. Krause y col. (1988) informaron que las enzimas que reducen el CO<sub>2</sub>, reguladas por la luz, son las primeras en ser afectadas. Cuando la cadena de transporte de electrones es deteriorada por el frío, los cloroplastos son expuestos a un exceso de energía, ocurriendo fotooxidación del oxígeno con producción de especies reactivas intermedias, como ser superóxido y peróxido.

### **3. Variación del crecimiento, hormonas y pigmentos en plantas bajo estrés por frío**

A medida que crecen los organismos multicelulares aumentan su volumen, peso, número de células y cantidad de protoplasma. La mayor parte del crecimiento de una planta se efectúa en los meristemas dando origen a todas las nuevas células que maduran y se diferencian en tejidos (Starr y Taggart, 2008).

El estrés por frío limita la producción agronómica con negativos e indeseables efectos sobre la biomasa (Bracale y Coraggio, 2003). La exposición a bajas temperaturas afecta el crecimiento y produce marcadas pérdidas en el peso

seco y en el área foliar en plantas de sorgo (Ercoli y col., 2004); en cultivares de trigo se han encontrado reducciones en la tasa de crecimiento relativo de raíces (Equiza y col., 2001); además, en caña de azúcar se ha observado disminución en el peso fresco y peso seco foliar a partir de las 32 h de estrés por frío (Rasheed y col., 2010).

En especies forrajeras del semiárido puntano, se evaluó el efecto del frío sobre parámetros de crecimiento, exponiendo las plantas a 4°C por períodos acumulativos de tiempo. *Trichloris crinita*, especie forrajera nativa, disminuyó su crecimiento por exposición a bajas temperaturas y sequía, mientras que *D. eriantha* cv. Sudafricana solo reaccionó a la exposición a bajas temperaturas cuando se acumulaban más de 30 h de frío, disminuyendo la longitud total de la planta, el peso fresco y seco de hojas y raíces (Di Giambatista, 2006).

Luego de un estrés abiótico, evaluar la respuesta de la planta al ser devuelta a condiciones favorables, puede ayudarnos a comprender su desempeño frente a situaciones que se presentan habitualmente en la naturaleza. Una mejor recuperación puede estar relacionada al grado de tolerancia de la planta frente a un determinado factor adverso. En estudios realizados en plantas de *Digitaria eriantha* cv. Mejorada INTA expuestas a 4°C durante 48 h, se observó una disminución en el crecimiento del follaje y de la biomasa aérea luego de una semana posterior al tratamiento con frío (Pedranzani y col., 2005).

Es importante determinar la recuperación de ambos cultivares de *Digitaria eriantha* para establecer posibles diferencias que podrían estar relacionadas a su diferente sensibilidad al frío.

### **Citocininas y el crecimiento de las plantas**

Las citocininas (CQs) son hormonas vegetales que promueven la división y diferenciación celular; además, controlan varios procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas, como por ejemplo el retraso de la senescencia (Gan y Amasino, 1995; Mok, 1994), el control del balance tallos/raíces (Werner y col., 2001; 2003), la transducción de señales nutricionales (Samuelson y Larsson, 1993; Takei y col., 2001; Sakakibara, 2005) y el incremento de la productividad del cultivo (Ashikari y col., 2005). Todas las CQs naturales identificadas son derivados de adenina con un sustituyente de naturaleza isoprenoide o aromático.

Las CQs isoprenoicas comprenden a isopentenil adenina (iP), zeatina (Z) y dihidrozeatina (DHZ) (Fig. 4), las cuales predominan en las plantas superiores.

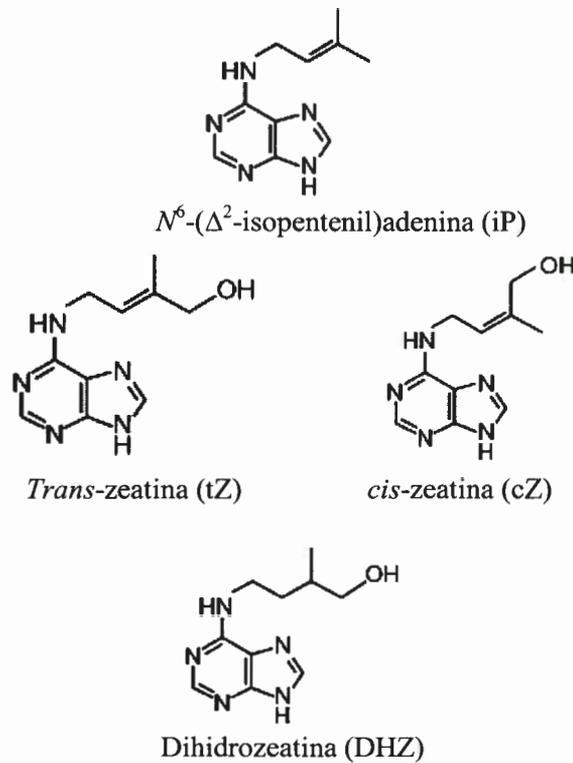


Fig. 4. Estructura de citocininas activas. Entre paréntesis se consignan sus abreviaturas (Fuente: Sakakibara, 2006)

Se cree que las bases libres y los ribósidos (iPA, RZ, RDHZ) son los compuestos biológicamente activos, mientras que los glucósidos de CQs participan en el transporte, en la protección frente a la degradación y en la inactivación reversible de dichos compuestos (Letham, 1994).

La biosíntesis tiene lugar principalmente en el citosol de las células de meristemas apicales de raíz, embriones y hojas jóvenes en desarrollo (Taiz y Zeiger, 1991).

Estudios realizados en plantas transgénicas de tabaco con niveles reducidos de CQs de tipo iP y Z, mostraron tallos achaparrados y meristemas apicales más pequeños que las plantas control (Werner y col., 2001). Sin embargo, el meristema de la raíz aumentaba de tamaño dando lugar a raíces más ramificadas y de crecimiento más rápido. Estos resultados sugieren que las CQs

son un factor importante en la regulación de la actividad de los meristemas y de la morfogénesis, con acción opuesta en tallos y raíces (Werner y col., 2001; 2003).

En hojas cortadas senescentes de avena, colocadas en una solución diluida de sales minerales, las CQs mantuvieron la integridad de los tonoplastos y evitaron la pérdida de clorofila. Leshem (1988) sugiere una fuerte acción protectora de las CQs debida tal vez, a que inhiben la formación y descomposición acelerada de radicales libres como el superóxido y el hidroxilo. Recientes microarrays revelan que los genes que codifican proteínas en la vía de señalización de CQs se ven afectados por estrés abiótico, incluyendo estrés por frío. Además, se ha sugerido un importante papel de las citocininas en el crecimiento de plantas sometidas al frío, sin embargo no hay reportes que relacionen la respuesta de las CQs a períodos cortos de estrés por frío (Argueso y col., 2009).

### **Auxinas y su relación con el crecimiento**

Las auxinas, al ser las hormonas vegetales responsables del crecimiento, modulan procesos tan diversos como las respuestas trópicas a la luz y la gravedad, la arquitectura de las raíces y tallos, el patrón de órganos, la diferenciación vascular y el crecimiento en cultivo de tejidos (Davies, 1995). Entre las hormonas con actividad auxínica, se encuentra el ácido indol-3-acético (AIA), siendo la más abundante y fisiológicamente más relevante.

AIA induce la elongación celular, inhibe la elongación de raíces e induce la formación de raíces laterales (Zolman y col., 2000) y adventicias (King y Stimart, 1998), regula la dominancia apical y retrasa la abscisión de hojas, entre otros efectos fisiológicos.

Estudios anteriores han demostrado que las plántulas pueden sintetizar AIA en hojas, cotiledones y raíces; conjuntamente, en *Arabidopsis* se ha encontrado que las hojas jóvenes tienen la mayor capacidad de biosíntesis de esta hormona (Ljung y col., 2001).

La síntesis de AIA puede realizarse por vías dependiente e independiente del aminoácido triptófano (Trp). Asimismo, se han sugerido varias vías de síntesis dependientes de triptófano, llamadas por el nombre del intermediario:

ruta del ácido indol-3-piruvico, ruta de la indol-3-acetamida, ruta de la triptamina y ruta de la indol-3-acetaldoxima. Es por ello que múltiples vías de biosíntesis pueden contribuir a la regulación de la producción de AIA (Woodward y Bartel, 2005), aunque se desconoce la importancia de cada vía de síntesis. Estudios realizados en la monocotiledónea acuática *Lemna gibba* indican que la vía de síntesis dependiente de Trp sería la responsable de la producción de AIA a bajas temperaturas mientras que a temperaturas elevadas la vía independiente de Trp determinaría el nivel de AIA (Rapparini y col., 2002).

Por otra parte, se ha encontrado que existe una relación cuantitativa entre los niveles endógenos de AIA y la tasa de crecimiento en diferentes líneas genéticas de *Pisum sativum* y *Lupinus albus* (Law y Davies, 1990; Ortuño y col., 1990). Sin embargo, el nivel de AIA resulta del balance entre la biosíntesis y el catabolismo y sólo cuando la temperatura afecta este balance pueden observarse cambios en los niveles de AIA.

La respuesta de esta hormona en relación a diferentes estreses ambientales también ha sido objeto de estudio durante los últimos años. Así se ha observado que en respuesta a altas temperaturas los niveles endógenos de auxina se reducen en plantas de cebada durante el desarrollo de las anteras (Sakata y col., 2010). Además, en *Arabidopsis* se ha encontrado que las bajas temperaturas afectarían el transporte y la señalización de auxinas (Shibasaki y col., 2009).

La determinación de parámetros de crecimiento en *D. eriantha* frente a bajas temperaturas es de suma importancia para determinar si existen cambios en el patrón de crecimiento que puedan estar asociados a los niveles de las hormonas que lo determinan.

### **El estrés por frío y los pigmentos fotosintéticos**

Los pigmentos de las membranas tilacoidales del cloroplasto consisten sobre todo en dos tipos de clorofilas: clorofila *a* y clorofila *b* que muestran coloración verde. También se presentan pigmentos amarillo-naranja que se clasifican como carotenoides, existen dos tipos: los carotenoides que son hidrocarburos puros y las xantofilas que contienen oxígeno (Salisbury y Ross, 1992). La energía absorbida por los carotenoides es rápidamente transferida a las clorofilas y por ello los carotenoides son denominados pigmentos accesorios. La

eficiencia de transferencia de energía de carotenoides a clorofilas es menor que la eficiencia de transferencia de clorofila a clorofila. Además, los carotenoides tienen un papel protector contra la fotodestrucción de las clorofilas (Taiz y Zeiger, 1991).

Los estreses abióticos producen alteraciones en el aparato fotosintético; el exceso de luz disminuye el contenido de clorofilas y la relación clorofila *a/b* (Anderson y col., 1995), asimismo se ha demostrado que la presencia de metales pesados en plantas de soja, produce el descenso del contenido de clorofilas totales con la consecuente reducción en la actividad fotosintética (Molina y col., 2008). Además, en relación al estrés por frío se ha encontrado que las hojas de plantas crecidas a baja temperatura se caracterizan por presentar muy bajo rendimiento fotosintético, cambios en la composición (Haldimann y col., 1996) y en el contenido de pigmentos (Oliveira y col., 2009). Por ejemplo, el contenido de clorofilas *a + b* y los carotenoides totales en *Zea mays*, fueron mayores en genotipos tolerantes al frío respecto a otros genotipos (Haldimann, 1999).

La capacidad fotosintética declina en las plantas sensibles al frío expuestas a bajas temperaturas y ese descenso es relativo a una menor eficiencia del fotosistema II y fotosistema I (Sonoike, 1998; Allen y Ort, 2001).

Algunos de los efectos dañinos del frío pueden ser debidos al incremento en la producción de EROs (Wise, 1995). La formación de EROs en las membranas de los tilacoides puede ser iniciada a través de la reducción univalente de O<sub>2</sub> para formar superóxido al sitio donante del PSI, o a través de la transferencia de energía de moléculas excitadas de clorofila a O<sub>2</sub> para producir oxígeno singulete (Foyer y col., 1994). Las EROs pueden causar una cascada de reacciones oxidativas en los componentes celulares, y ellos están implicados en la fotoinhibición (Hull y col., 1997) y el daño celular (Wise, 1995) en plantas sensibles al frío expuestas a bajas temperaturas.

Una forma de cuantificar el grado de daño de estrés por frío que sufre una planta es midiendo la pérdida de clorofila (Janowiak y Dörffling, 1996). En el presente trabajo se medirá el contenido de clorofilas y carotenoides en ambos cultivares de *Digitaria eriantha* para evaluar si el frío produce daños sobre el aparato fotosintético.

#### **4. Anatomía de hojas y estrés por frío**

El estudio de la anatomía de los tejidos proporciona información para determinar probables alteraciones inducidas por la exposición de los vegetales a estreses ambientales. De este modo se ha observado que en condiciones de estrés hídrico las hojas de roble incrementaron sus tejidos parenquimáticos, conduciendo a un aumento en el espesor y densidad del tejido foliar, además del incremento en el grosor de las capas superiores de la cutícula (Bussotti y col., 2002); también se observó que en las hojas de *Prosopis strumbulifera* frente a estrés salino las células del clorénquima se presentaban más densas y se producía una disminución en el espesor del mesófilo (Reinoso y col., 2005).

Frente al estrés por frío, se han observado múltiples cambios anatómicos y morfológicos en diferentes especies. En plantas de trigo, las bajas temperaturas incrementaron el espesor de las hojas (Equiza y col., 2001); asimismo, se ha observado disminución en el área foliar y alteraciones en la frecuencia estomática en especies como *Secale cereale* L. cv. Puma y *Spinacia oleracea* (Huner y col., 1981; Körner y Larcher, 1988; Boese y Huner, 1990).

El conocimiento detallado de la anatomía de los distintos órganos de las gramíneas, es imprescindible para estudiar los cambios producidos a este nivel por bajas temperaturas. Por microscopía óptica, en *Digitaria eriantha*, se observaron depósitos de pigmentos, engrosamiento de paredes y destrucción de organelas conspicuas (Escudero, 2006), mientras que en estudios ultraestructurales en *Cucumis sativus* se visualizaron daños en membranas y organelas (Xu y col., 2008).

Dado el importante papel de la fotosíntesis en la fisiología de las plantas y su sensibilidad al estrés por frío (Taylor y Rowley, 1971), no es sorprendente que los cloroplastos sean el primer sitio visible de daño por bajas temperaturas a nivel ultraestructural (Kimball y Salisbury, 1973). La primera manifestación de daño por bajas temperaturas es la turgencia de los cloroplastos, distorsión y prominencia de tilacoides, reducción en el tamaño y número de gránulos de almidón y formación de vesículas pequeñas en el retículo periférico del cloroplasto (Wise y col., 1983). Si el estrés es prolongado conduce a la acumulación de gotas de lípidos y oscurecimiento del estroma, desintegración de la envoltura del cloroplasto, lo que provoca que el contenido del estroma se mezcle con el citoplasma. En plantas extremadamente sensibles a bajas temperaturas se puede observar turgencia y desorganización de cloroplastos, aún

con pocas horas de estrés (Murphy y Wilson, 1981).

Las mitocondrias son más resistentes a las bajas temperaturas que los cloroplastos. Estudios realizados en tabaco, maíz y zapallo, coinciden en que la ultraestructura de mitocondrias no es notablemente afectada aún durante estados avanzados en la degeneración de cloroplastos (Nessler y Wernsman, 1980; Wise y Naylor, 1987a).

En el núcleo los cambios raramente ocurren o no son muy pronunciados; sin embargo, se ha observado en *Saintpaulia ionantha* cv. Ritali la condensación de la cromatina y en *Triticum aestivum* L. cv. Ducat cambios en los nucléolos por efecto del frío (Gazeau, 1985; Yun y col., 1996).

En las células en empalizada se observaron cambios ultraestructurales con tiempos breves de exposición a bajas temperaturas en especies muy sensibles al frío como *Saintpaulia*. Estas células mostraron un desorden en la disposición de la laminilla intergranal tilacoidal de los cloroplastos y condensación de cromatina en sus núcleos, y si bien fisiológicamente permanecieron activas se observó reducción en la fluorescencia de la clorofila y descenso de la actividad fotosintética (Yun y col., 1996). Se ha sugerido que la generación de EROs en los cloroplastos, provoca un incremento de iones calcio libres, los cuales inducen cambios en la fosforilación de proteínas y actúan como segundos mensajeros para estimular una variedad de procesos (Snedden y Fromm, 1998), incluida la cascada de enzimas proteolíticas que selectivamente clivan moléculas de proteínas.

## 5. Fitohormonas relacionadas al estrés

Entre las hormonas asociadas a los factores de estrés se mencionan a los jasmonatos, ácido abscísico y etileno.

Los jasmonatos (JAs) comprenden numerosos compuestos relacionados al ácido jasmónico (JA). Este grupo de compuestos se sintetizan a partir del ácido linolénico a través de la vía del ácido 12-oxofitodienoico (OPDA). Las etapas iniciales de la biosíntesis de JA están catalizadas por las enzimas 13-lipoxigenasa, óxido de aleno sintetasa (AOS) y óxido de aleno ciclasa (AOC); estos pasos se llevan a cabo en el cloroplasto. Las etapas finales que incluyen la

reducción del OPDA y la  $\beta$ -oxidación del ácido carboxílico se realizan en el peroxisoma (Strassner y col., 2002; Feussner y Wasternack, 2002).

Es bien conocido que los niveles de JA aumentan rápidamente en respuesta a estrés mecánico (Weiler y col., 1993), herbivoría (Halitschke y col., 2004, Schmelz y col., 2003), tratamiento con elicitores (Parchmann y col., 1997), estrés salino (Dombrowski, 2003; Pedranzani y col., 2003), radiación UV (Conconi y col., 1996), exposición a ozono (Rao y col., 2000) y bajas temperaturas (Wasternack y Parthier, 1997; Pedranzani y col., 2007).

No sólo JA estaría involucrado en los procesos normales del desarrollo y en las respuestas relacionadas a estrés, sino que también los derivados hidroxilados de JA, están siendo estudiados y relacionados a dichos procesos. El derivado 12-hidroxi-jasmónico (12-OH-JA), comúnmente conocido como ácido tuberónico, y el 11-hidroxi-jasmónico (11-OH-JA) han sido propuestos como catabolitos de JA en hongos (Miersch y col., 1993; 1999) (Fig. 5). Además, éstos compuestos estarían asociados con la sensibilidad a estrés osmótico y salino en semillas de tomate y desempeñarían alguna función en el proceso de germinación (Andrade y col., 2005).

También se ha relacionado a los JAs con el estrés por frío en gimnospermas; variaciones en los niveles endógenos de OPDA, JA y compuestos hidroxilados (11-OH-JA y 12-OH-JA) en follaje de plantas jóvenes de *Pinus pinaster* Ait en condiciones de estrés por frío fueron observadas (Pedranzani y col., 2007). Esta evidencia nos llevó a plantear la posibilidad de que en plantas monocotiledóneas, los JAs también estuvieran involucrados en las respuestas metabólicas al frío.

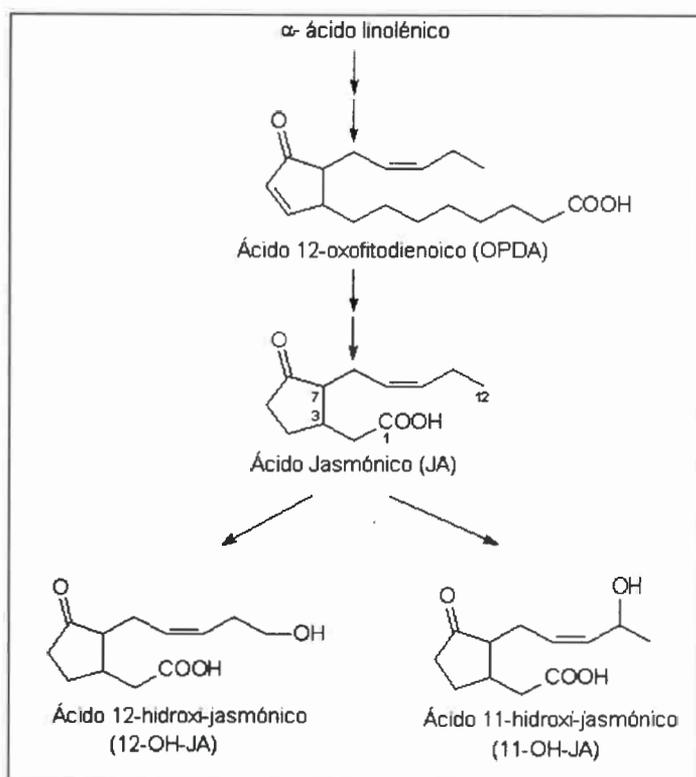


Fig. 5. Miembros de la familia de los jasmonatos: OPDA, JA y sus hidroxilados 12-OH-JA y 11-OH-JA.

El ácido abscísico (ABA) es otra de las fitohormonas estudiadas en relación al estrés en plantas y su mediación en variados mecanismos de adaptación a condiciones adversas.

Se ha informado que los niveles endógenos de ABA aumentan frente al déficit hídrico durante el crecimiento vegetativo (Davies y Zhang, 1991; Sauter y col., 2001), además de regular el cierre estomático permitiendo a la planta limitar la pérdida de agua por transpiración (Zhang y col., 1987; Zhang y Davies, 1989, 1990). ABA también está implicado en la respuesta al frío y congelación (Thomashow, 1999), salinidad (Hagemeyer, 1997), anegamiento y anoxia (Arteca, 1997) entre otros factores de estrés ambiental. Por otra parte, modula la respuesta morfogénica de las raíces a la sequía y la reacción general de la planta al daño mecánico (Leung y Giraudat, 1998).

La biosíntesis de ABA tiene lugar principalmente en los plástidos (cloroplastos) y citosol. Dado que es un terpenoide deriva de la vía del acetato - mevalonato, mediante una ruta indirecta a partir del  $\beta$ -caroteno, generado desde

el fitoeno. En el cloroplasto (u otro plástido), el  $\beta$ -caroteno se degrada pasando por 9-cis violaxantina y 9-cis neoxantina, que generan xantoxina, la cual en el citosol se oxida hasta formar ABA. En algunos mutantes de tomate y *Arabidopsis* se demostró que existe formación de ABA a partir del ABA alcohol.

El nivel de ABA en plantas es controlado no solamente por la síntesis, sino también por el catabolismo. Existen dos caminos principales para la inactivación de ABA, uno mediante oxidación y otro por conjugación (Fig. 6). Uno de los catabolitos primarios es el ácido faseico (PA) que se forma por oxidación con  $O_2$ , este compuesto es rápidamente convertido a ácido dihidrofaseico (DPA). El ABA también puede ser inactivado por la unión de glucosa al grupo carboxilo para formar un éster glucosa (ABA-GE) (Steven y Zeevaart, 2004). Los caminos de inactivación varían de acuerdo a las especies y además, están en relación con los diferentes estados de desarrollo dentro de una misma especie. De esta manera, ABA-GE es uno de los principales metabolitos en plantas de *Xanthium* (Zeevaart, 1999) y en la savia del xilema de girasol (Hansen y Dörffling, 1999) entre otros. Sin embargo, en cultivos de células en suspensión (Cutler y col., 1997) y en embriones estomáticos (Dunstan y col., 1992), ABA fue mayoritariamente convertido a PA. Además, contenidos pequeños de otros metabolitos ((+)-7'-hidroxi-ABA, trans-ABA, cis y trans 1',4'-diol de ABA) han sido detectados en algunas especies de plantas (Balsevich y col., 1994; Walton y Li, 1995; Zeevaart, 1999).

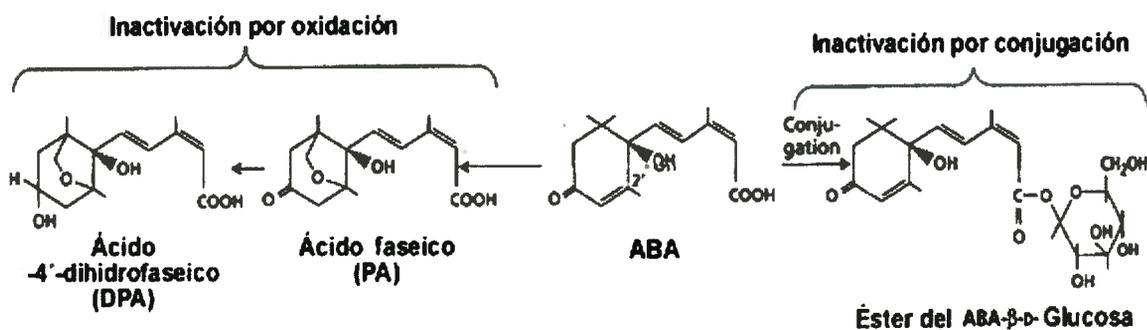


Fig. 6. Catabolitos de ABA, ácido 4-dihidrofaseico (DPA), ácido faseico (PA) y éster ABA-Glucosa (ABA-GE)

En los últimos años numerosos estudios documentan el papel de las fitohormonas (JAs y ABA) en diversos eventos relacionados con el estrés oxidativo. Aplicaciones exógenas de JA revelaron su influencia sobre compuestos de la lipoperoxidación, alteraciones en el sistema de defensa antioxidante enzimático y no enzimático (Babar Alí y col., 2006; Kumari y col., 2006; Maksymiec y col., 2007). Asimismo, ABA puede incrementar la generación de especies reactivas del oxígeno (Jiang y Zhang, 2001; Murata y col., 2001), inducir la expresión de genes antioxidantes (Anderson y col., 1994; Guan y Scandalios, 1998a, b) e incrementar la actividad de enzimas antioxidantes y el contenido de antioxidantes no enzimáticos (Bueno y col., 1998; Jiang y Zhang, 2001). Por ello, en este trabajo se investiga la posible relación entre JAs y ABA y la respuesta oxidativa en hojas de dos cultivares de *Digitaria eriantha* sometidas a estrés por bajas temperaturas.

## 6. Estrés por frío y defensas antioxidantes

El estrés oxidativo es un estado de la célula en el cual se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción intracelular; es decir, existe un desbalance entre prooxidantes y antioxidantes celulares. El estrés oxidativo acompaña a otros tipos de estrés en plantas actuando como un disparador de las defensas, generando radicales libres.

En las plantas, durante la respiración celular, la reducción completa de  $O_2$  a  $H_2O$  requiere la transferencia de 4 electrones. Sin embargo se pueden producir reducciones incompletas del  $O_2$ , originándose las especies reactivas del oxígeno. Estas comprenden al radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) (Wise y Naylor, 1987b). Incrementos en las EROs asociados a bajas temperaturas han sido reportados en diversas especies como *Zea mays* L., *Cucumis sativus* L., *Panicum miliaceum* L., *Solanum tuberosum* L. (Lukatkin, 2002a), *Fragaria* × *ananassa* D. (Zhang y col., 2008) y *Medicago sativa* L. (Wang y col., 2009) entre otras.

El  $H_2O_2$  es la forma más estable de los intermediarios de reducción del oxígeno, es la menos reactiva y la más fácil de detectar. Además, el peróxido de hidrógeno puede producirse directamente por la reducción divalente del  $O_2$  o indirectamente por reducción univalente del  $O_2$  seguidas por la dismutación del

$O_2^{\cdot-}$ . El  $H_2O_2$  es dañino porque puede causar la oxidación de sulfidrilos, residuos de metionilo en proteínas, peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados, ruptura de ADN e inactivación de enzimas del grupo tiol (Foyer y col., 1997). El  $H_2O_2$  puede dar origen al radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), que es extremadamente reactivo (Prasad, 1996).

Para prevenir el daño de EROs, las plantas han desarrollado sistemas de defensa antioxidante enzimático y no enzimático. El sistema de defensa antioxidante enzimático incluye, entre otras, las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y la ascorbato peroxidasa (APX) (Zhang y col., 1995; Lee y Lee, 2000).

Superóxido dismutasa pertenece a la familia de la metaloproteínas y cataliza la reacción del radical  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$  y  $O_2$ , jugando un importante rol en la protección de las células contra los efectos tóxicos del radical superóxido producido en diferentes compartimentos celulares (Fridovich, 1986; Elstner, 1991; Halliwell y Gutteridge, 2007). Ascorbato peroxidasa es generada en el citosol, cloroplastos y mitocondrias y es la principal enzima encargada de secuestrar el  $H_2O_2$  (Mittler y Zilinskas, 1991; Jiménez y col., 1997). La actividad de las enzimas antioxidantes ha sido estudiada en plantas de alfalfa en relación a las bajas temperaturas. En esta especie se determinó que la sensibilidad a frío puede ser linealmente correlacionada con los bajos niveles de actividad de SOD, APX y catalasa (Wang y col., 2009). Por otra parte, Lukatkin (2002b) sostiene que las plantas que presentan menos inactivación de las enzimas antioxidantes durante el periodo de bajas temperaturas son más resistentes al frío.

El sistema de defensa antioxidante no enzimático está constituido por compuestos de bajo PM, entre los que se encuentran el glutatión reducido (GSH) y los tioles no proteicos (TNP) que se encargan de detoxificar a las células de las EROs (Kocsy y col., 1996; Noctor y col., 1998). GSH participa directamente en la reducción de las EROs más activas generadas por diversos factores de estrés en las plantas (Shao y col., 2008).

El ácido linoleico es el predominante en los galactolípidos de las membranas de los tilacoides, mientras que el ácido linolénico es mayoritario en los fosfolípidos del resto de las células vegetales. Estos ácidos grasos son particularmente sensibles al ataque de  $O_2^{\cdot-}$  y  $OH^{\cdot}$  (Mueller, 2004; Halliwell y Gutteridge, 2007), dando lugar tras su oxidación a hidroperóxidos de lípidos y aldehídos complejos como el 4 hidroxil-2-nonenal y el malondialdehído (MDA).

La peroxidación de ácidos grasos insaturados disminuye la fluidez de la membrana, interfiere con la interacción de receptores celulares y provoca la pérdida de electrolitos (Halliwell, 2006). El MDA generado puede dañar el ADN al conjugarse con una guanina, creando un anillo extra en su estructura (Jeong y col., 2005). Por otro lado, las lesiones oxidativas en el ADN pueden producir cambios en el patrón de metilación de la citosina, lo cual es importante en la regulación de la expresión génica (Halliwell, 2006).

En relación a las bajas temperaturas, se han observado incrementos en el contenido de MDA en plantas tales como *Cucumis sativus* L. (Xu y col., 2008), *Fragaria×ananassa* D. (Zhang y col., 2008) y vid (Ma y col., 2010).

Castelli y col. (2010) proponen que el daño oxidativo, particularmente MDA foliar es potencial indicador de la tolerancia a estrés salino. La determinación de MDA en tejidos foliares de *Digitaria eriantha*, frente al frío, podría informar sobre el daño oxidativo y el grado tolerancia de ambos cultivares a este factor de estrés.

# ***HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

*ESTRÉS POR FRÍO EN Digitaria eriantha: FORRAJERA PROMISORIA PARA ZONAS SEMIÁRIDAS*

*Digitaria eriantha* es una especie forrajera megatérmica introducida a la región semiárida argentina que permite incrementar el potencial forrajero y posibilita el planteo de esquemas de producción de carne bovina de alta rentabilidad. Sin embargo las heladas tardías afectan la biomasa y desarrollo de las plantas; al no existir estudios sobre los efectos del estrés por frío en esta especie, se plantea la necesidad de investigar los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y hormonales, como así también, su base anatómica en la respuesta a baja temperatura.

### **Hipótesis**

Plantas de dos cultivares de *D. eriantha* uno originario de Sudáfrica y sensible al frío (cv. Sudafricana) y otro tolerante, procedente de Argentina (cv. Mejorada INTA), difieren en sus mecanismos de respuesta al estrés por frío. De este modo, las bajas temperaturas afectarán el crecimiento, estructuras anatómicas y pigmentos fotosintéticos. Además, se modificarán los niveles de fitohormonas asociadas a crecimiento y a estrés, activando mecanismos de defensa antioxidante los cuales varían en los cultivares según su origen.

### **Objetivo general**

Estudiar los efectos de breves períodos de bajas temperaturas sobre los tejidos de órganos vegetativos, parámetros fisiológicos, hormonales y bioquímicos de *Digitaria eriantha* Steudel subespecie eriantha, y establecer comparaciones en dos cultivares: Sudafricana y Mejorada INTA.

### Objetivos específicos

1. Determinar las variaciones en el crecimiento y pigmentos en plantas de *D. eriantha* frente al frío.
2. Evaluar si el crecimiento se reanuda al restablecer las condiciones favorables, posterior a la aplicación del frío en *D. eriantha*.
3. Medir el contenido endógeno de citocininas y auxinas y establecer su posible relación con las variaciones de crecimiento vegetativo frente al frío en *D. eriantha*.
4. Analizar los cambios anatómicos estructurales de hojas y base del tallo frente a bajas temperaturas en ambos cvs. de *D. eriantha*.
5. Examinar las alteraciones ultraestructurales frente al frío en las láminas foliares en *D. eriantha*.
6. Determinar el contenido endógeno de ácido jasmónico (JA), su precursor 12-oxofitodienoico (OPDA) y derivados hidroxilados (11 y 12-OH-JA), en plantas de ambos cvs. de *D. eriantha* controles y sometidas al estrés por bajas temperaturas.
7. Determinar el contenido endógeno de ácido abscísico (ABA) y sus metabolitos: ácido faseico (PA), ácido dihidrofaseico (DPA) y ABA éster glucosa (ABA-GE) en plantas de ambos cvs. de *D. eriantha* controles y sometidas al estrés por bajas temperaturas.
8. Evaluar el daño oxidativo a nivel de membranas por determinación de malondialdehído (MDA) y las variaciones en las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas ante el estrés por frío.
9. Establecer posibles diferencias entre ambos cultivares de *D. eriantha* en los parámetros analizados con el fin de aportar conocimientos útiles para el mejoramiento de esta especie forrajera.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**

*ESTRÉS POR FRÍO EN *Digitaria eriantha*: FORRAJERA PROMISORIA PARA ZONAS SEMIÁRIDAS*

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material vegetal y tratamiento de baja temperatura

Semillas de *Digitaria eriantha* cvs. Sudafricana (Irene) y Mejorada INTA crecieron en terrinas conteniendo turba-perlita en proporción 4:1; en cámara de crecimiento Conviron E15 (Conviron, Winnipeg, Manitoba, Canadá) con fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad, a 25°C de temperatura y 60% de humedad relativa. La densidad de flujo fotosintético fue de  $175 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (tubos fluorescentes F96T12/CW/1500, General Electric, USA, enriquecida con luz de lámparas incandescentes (OSRAM)). Luego de 30 días de crecimiento se aplicó el tratamiento de frío (Fig. 7); para ello se colocaron las terrinas en cámara a  $5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  de temperatura, por períodos de 6, 24 y 72 h. Se trabajó con  $5^\circ\text{C}$  ya que es la temperatura mínima media que ocurre durante la estación de crecimiento de los recursos forrajeros estivales, en la provincia de San Luis (datos del Servicio Meteorológico Nacional). Las plantas del tiempo 0 fueron consideradas como control. Efectuados los tratamientos se procedió a la cosecha y conservación de las plantas para estudios bioquímicos, hormonales y anatómicos. Un lote fue expuesto a condiciones normales para medir recuperación. Se usó diseño experimental simple al azar con tres repeticiones. Cada muestra fue representada por 10 plantas.



Fig. 7. Plantas de *D. eriantha* cvs. Sudafricana (izquierda) y Mejorada INTA (derecha) con 30 días de crecimiento.

## **2. Peso fresco, peso seco y longitud de parte aérea y radicular**

Se tomaron al azar 4 plántulas de *Digitaria eriantha* de ambos cultivares y se midió la longitud de hojas y raíces, por triplicado. Luego se pesaron las raíces y las hojas por separado para obtener el valor de peso fresco (PF) y se colocaron en estufa a 60°C durante 72 h. Se pesó nuevamente el material para obtener el valor de peso seco (PS).

### **2.1. Evaluación de la recuperación**

Plantas control y del tratamiento de 72 h de exposición a  $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  de temperatura, fueron colocadas en condiciones óptimas de crecimiento para evaluar la recuperación después del estrés. Se tomaron datos de LF, PF y PS de hojas en el tiempo cero (inmediatamente después de retiradas del frío) y a los 7, 14 y 21 días posteriores.

Los resultados en cada tiempo, se expresaron en porcentaje respecto al control sin frío (100%) y fueron analizados comparativamente entre cultivares.

## **3. Determinación de pigmentos fotosintéticos: clorofilas y carotenoides**

La determinación de clorofilas *a*, *b* y carotenoides se realizó según Porra (2002). 100 mg de material fresco se trituró en mortero con 10 ml de acetona 80% (v/v) y se filtró. El extracto obtenido se mantuvo a 4°C hasta la lectura en espectrofotómetro. Para la cuantificación de clorofilas se midió la absorbancia a 646,6 y 663,6 nm y para carotenoides a 470 nm. Como blanco se usó acetona 80% (v/v). Para calcular el contenido de las diferentes clorofilas se usaron las fórmulas de Porra (2002). Para calcular el contenido de carotenoides se usó la fórmula de Lichtenthaler y Wellburn (1983). Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g/g}$  PF.

## 4. Estudios por microscopia óptica y electrónica

### 4.1. Estructura anatómica del brote y láminas foliares

En este estudio se realizó un tratamiento adicional de 120 h (5 días) a baja temperatura. Los cortes de la base de tallo se realizaron en plantas control y tratadas a 6, 24, 72 y 120 h, mientras que los cortes de lámina foliar se realizaron en plantas control y en los tiempos de mayor exposición: 72 y 120 h. Las muestras de tallos y hojas se fijaron en FAA (etanol 95%, ácido acético, formaldehído 37-40%, agua destilada 50:5:10:35 v/v) por un período mínimo de 72 h. Posteriormente el material se deshidrató mediante una serie de mezclas de alcohol etílico-xilol y luego se incluyó en Histowax (parafina de alta pureza con agregado de cera y polímeros). De cada muestra se realizaron cortes longitudinales y transversales de 10-13  $\mu$  de espesor en micrótopo rotativo. Los cortes se tiñeron usando la triple coloración de Hematoxilina, Safranina y Fast-Green descrita por Johansen (1940). Para el montaje definitivo se utilizó DPX. Los preparados histológicos se observaron en microscopio Zeiss Standard 16 y se fotografiaron en un microscopio Zeiss Axiophot, con equipo de captura y digitalización de imagen AxioVisión 4.3, con cámara AxioCam HRc.

### 4.2. Ultraestructura de láminas foliares

Las muestras de hojas de plantas control y con 72 h de frío de ambos cultivares de *Digitaria eriantha* se cortaron en trozos de 0,5-1 mm y se fijaron al vacío en glutaraldehído al 2% en buffer de fosfato (pH 7,2-7,4) durante 4 h a 4°C. Luego las muestras fueron lavadas 3 veces con buffer fosfato en intervalos de 30 min y se realizó la fijación secundaria con tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1% (m/v) durante 1 h a 4°C. Se lavaron nuevamente 3 veces con buffer fosfato y se deshidrataron en una serie creciente de etanol-agua (50, 70, 80, 95 y 3 veces en etanol 100%), dejando el material 10 min en cada solución. Luego el etanol se reemplazó con acetona 3 veces, se dejaron las muestras 10 min cada vez. A continuación, se incluyeron en EPON (Shell, London, UK) mediante una mezcla resina-acetona (1:1) seguida de una mezcla resina-acetona (1:2). Finalmente las muestras se embebieron en EPON 100% durante 1 h a temperatura ambiente. La

resina se polimerizó a 35°C, 45°C y 60°C por 12 h cada vez. Los cortes ultrafinos (60-90 nm) se realizaron con ultramicrotomo Reichert-Jung SuperNova. Las secciones se cortaron en sentido transversal a fin de que ambas capas se pudieran ver en la misma sección. Los cortes se tiñeron con acetato de uranilo al 4% en etanol al 50% por 10 min y luego con citrato de plomo durante 5 min a temperatura ambiente. La microscopía electrónica de transmisión se realizó en un JEM 1200 EX II (Tokio, Japón) que opera a 80 kV.

## 5. Determinación de las hormonas de crecimiento

### 5.1. Citocininas

Para la extracción se utilizó el método descrito por Dobrev y Kamínek (2002) modificado. 100 mg de PS se colocaron en una solución de 5 ml de Bielecki modificado (MeOH/H<sub>2</sub>O/Fórmico - 75/20/5), e incubó a -20°C durante una noche. Se centrifugó a 4000 rpm a 4°C durante 20 min y se recolectó el sobrenadante. Una segunda extracción se realizó en 1 ml de solución durante 1 h y se redujo hasta eliminar el metanol.

La prepurificación de las citocininas se llevó a cabo en columnas de fase reversa C18 y mixta (OASIS MCX: fase reversa e intercambio catiónico) equilibradas con metanol y ácido fórmico. Se agregó 0,6 ml de ácido fórmico 1 M al extracto inicial, se aplicó a las columnas, eluyendo secuencialmente las distintas hormonas: ABA y AIA, los nucleótidos de citocininas y finalmente las bases y ribósidos de citocininas. Para ello se empleó ácido fórmico 1 M/metanol 80% (v/v), NH<sub>4</sub>OH 0,35 M y NH<sub>4</sub>OH 0,35 M/metanol 60% (v/v), respectivamente. Las fracciones recolectadas se evaporaron a sequedad y se almacenaron a -20°C.

La separación de las distintas bases y ribósidos de citocininas (zeatina (Z), ribósido de zeatina (RZ), dihidrozetina (DHZ), ribósido de dihidrozetina (RDHZ), isopentenil adenina (iP) e isopentenil adenosina (iPA)) se realizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), siguiendo el método descrito por Moncaleán y col. (2005). Las fracciones fueron colectadas y llevadas a sequedad.

Para la cuantificación de las CQs, se utilizaron anticuerpos policlonales desarrollados en el área de Fisiología Vegetal de la Universidad de Oviedo (España) (Fernández y col., 1995). En cada pocillo de la placa de ELISA se colocó 200  $\mu$ l del anticuerpo contra iPA, RZ o RDHZ y se incubó a 4°C toda la noche. Se vació y se lavó la placa tres veces con tampón tris-hidroximetil (TBS) y se añadió 250  $\mu$ l de seroalbúmina bovina (BSA) para saturar los posibles sitios de uniones inespecíficas. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. La placa se lavó con tampón TBS y se añadió 100  $\mu$ l de la muestra y de la curva estándar, se incubó a 4°C durante 30 min. Posteriormente, se añadió a cada pocillo 100  $\mu$ l del marcador y se incubó durante 2 h 30 min a 4°C. Se retiró la solución de la placa y se lavó con tampón TBS. Se agregaron 200  $\mu$ l de paranitrofenilfosfato (preparado en el momento) y se incubó a 37°C de 30 min a 1 h. Se midió la absorbancia a 405 nm en el lector de ELISAs.



Fig. 8. Bomba de vacío con las columnas montadas, en esta etapa las columnas C18 se colocan sobre las columnas OASIS para recolectar las distintas fracciones.

## 5.2. Auxinas

Se tomaron 200 mg de PS y se homogeneizaron con agua deionizada acidificada (H<sub>2</sub>O:AcH; 99:1). Para determinar la recuperación durante la extracción y purificación se adicionaron 100 ng del estándar interno de AIA [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>] y se dejó reposar 15 min en heladera; se homogeneizó con ultraturrax y se centrifugó 15 min a 5000 rpm. Se recolectó el sobrenadante en tubos de 50 ml y se ajustó el pH a 2,8-3 con ácido acético al 15% (v/v) al que se agregó 5 ml de éter etílico, se agitó 30 seg y centrifugó durante 1 min. De las dos fases formadas, se tomó la superior en balón de 10 ml, se repitió el procedimiento desde el agregado del éter etílico, se descartó la fase acuosa y se secaron en evaporador rotativo a 33-34°C. Los extractos secos se resuspendieron con 750 µl de metanol 100% y se filtraron en cámara de vacío. El filtrado, se recolectó en Eppendorf de 2 ml y se secó en SpeedVac SC110 (Savant Instruments, Inc., New York, USA) a 35°C en vacío. Las muestras se resuspendieron con 50 µl metanol 100%. Se inyectaron 15 µl en LC-ESI-MS-MS (HPLC), Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, USA), equipado con una columna C18 RESTEK (100 mm x 2,1 mm, columnas 3-µm de partícula). Las fracciones se separaron usando un gradiente de solvente A, metanol (MeOH); solvente B, ácido acético en agua 0,2% (AcH:H<sub>2</sub>O) y con flujo 0,2 ml min<sup>-1</sup>. El gradiente se incrementó linealmente de 40% MeOH (v/v) - 60% AcH:H<sub>2</sub>O (v/v) durante 25 min, a 80% MeOH (v/v) - 20% AcH:H<sub>2</sub>O (v/v). Luego de 1 min, las condiciones iniciales se restauraron y el sistema se equilibró por 7 min. Para la identificación y cuantificación de AIA se realizaron análisis de espectrofotometría de masa en un espectrofotómetro de masas en tándem cuadrupolo (MS-MS, Quattro Ultima; Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado con una fuente de iones por electrospray (ESI), en el modo de ionización negativa. La mezcla que contiene AIA endógeno y el estándar interno se analizó por espectrometría de masas en tándem con el monitoreo de reacción múltiple (MRM). Las siguientes reacciones seleccionadas se utilizaron para la determinación de AIA: m/z 174 → m/z 130 (endógeno) y m/z 180 → m/z 135 para (estándar interno, <sup>2</sup>H<sub>5</sub>-AIA), con un tiempo de retención de 4,53 min. Se utilizó el software del espectrómetro MassLynx™ v. 4.1 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

## 6. Fitohormonas relacionadas al estrés

### 6.1. Cuantificación de jasmonatos

Un gramo de MF de hojas se homogeneizó en mortero con nitrógeno líquido y 10 ml de MeOH. A cada muestra se adicionaron: 100 ng de ( $^2\text{H}_6$ )JA; 100 ng de ( $^2\text{H}_5$ )OPDA; 100 ng de 12-( $^2\text{H}_3$ )O Ac-JA y 100 ng de 11-( $^2\text{H}_3$ )O Ac-JA, como estándares, se filtró para obtener el sobrenadante, el cual se evaporó a sequedad y redisolvió con 10 ml de metanol. Se adicionó a las columnas de DEAE-Sephadex A-25 (3 ml en 100% MeOH), previamente lavada con 5 ml de 1N AcOH en 100% MeOH, 10 ml de MeOH 100%; estas fracciones se descartaron. Luego se agregó la muestra a la columna, diluida en un volumen máximo de 10 ml de MeOH, y se eluyó con 3 ml de MeOH, 3 ml de 0,1 N AcOH en 100% MeOH; estas fracciones se descartaron. Se agregó 5 ml de 1N AcOH en 100% MeOH; esta última fracción, donde eluyen los compuestos ácidos como el JA, se recolectó y se llevó a sequedad en evaporador rotativo al vacío.

Los extractos secos se disolvieron en MeOH y se analizaron por HPLC, utilizando una columna Eurospher 100,5  $\mu\text{m}$ . La elución se realizó con una mezcla isocrática de MeOH:  $\text{H}_2\text{O}$  en 0,1%  $\text{H}_3\text{PO}_2$  (60:40) a una velocidad de flujo de 1 ml  $\text{min}^{-1}$ . UV: 200 nm. Se recolectaron las fracciones correspondientes a los respectivos tiempos de retención: 14 min, Rt de JA; 22.5 min, Rt de OPDA; 9.30 min, Rt de 11-OH-JA; 11 min, Rt de 12-OH-JA y se evaporaron a sequedad.

Los extractos se resuspendieron en 200  $\mu\text{l}$  de  $\text{CHCl}_3$ /*N,N*-di-isopropil-etilamina (1:1 v/v) y se derivatizaron con 10  $\mu\text{l}$  de pentafluorbencilbromuro a 20  $^\circ\text{C}$  durante una noche. Posteriormente se llevó a sequedad, se resuspendió con 7 ml de n-hexano y se filtró por columna de Silica gel (SiOH; 500 mg) (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Los pentafluorbencil ésteres se eluyeron con una mezcla de 7 ml de n-hexano/dietiléter (2:1 v/v). Se evaporaron a sequedad y el extracto se retomó con 100  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo y se inyectó en un GC-MS a fin de identificar y cuantificar los compuestos de interés.

Se utilizó un espectrómetro de masa Hewlett Packard (modelo 5970 B) combinado con un cromatógrafo de gases HO 5890. Las temperaturas programadas fueron las siguientes: desde 60 $^\circ\text{C}$  (1 min) a 180 $^\circ\text{C}$  (30 $^\circ\text{C}$   $\text{min}^{-1}$ );

desde 180°C (1 min) a 200°C (10°C min<sup>-1</sup>), desde 200°C (1 min) a 270°C (5°C min<sup>-1</sup>). El espectro de masa se obtuvo a un voltaje de ionización de 70 eV.

## 6.2. Cuantificación de ácido abscísico y metabolitos

Los extractos secos de las muestras conteniendo ABA y sus metabolitos se resuspendieron con 100 µl de MeOH para la purificación y análisis mediante un cromatógrafo Alliance 2695 (Waters, Inc., California, USA) equipado con una bomba cuaternaria con auto inyector de muestra. Se utilizó una columna Resteck C18 (Resteck USA, 2.1 x 100 mm, 5 µm) a 25°C, con un volumen de inyección de 10 µl. La elución se llevó a cabo en gradiente con un sistema de solvente binario: 0.2% HOAc en H<sub>2</sub>O (solvente B)/ MeOH (solvente A) a una velocidad de flujo de 200 µl min<sup>-1</sup>, procediendo con las siguientes proporciones (v/v) de solvente A: (t (min), %A):(0, 40), (25, 80). Al final de cada corrida se establecieron 7 min de equilibración del sistema y columna. La identificación y cuantificación de ABA y sus metabolitos se realizó mediante un espectrómetro de masa de doble cuadrupolo (Micromass Quatro Ultimatm PT, Manchester City, UK). Todos los análisis se realizaron utilizando la fuente de electrospray en modo de ionización negativo. La cuantificación se llevó a cabo por inyección de las muestras en modo SIR. La adquisición de datos por SIR se realizó por monitoreo de iones parentales para ABA, <sup>2</sup>D<sub>6</sub>-ABA, PA, <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-PA, DPA, <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-DPA y ABA-GE, <sup>2</sup>H<sub>5</sub>-ABA-GE respectivamente.

## 7. Determinación de parámetros de estrés oxidativo

### 7.1. Contenido de malondialdehído

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

lipoperoxidación se expresó como nmol de MDA formado, usando un coeficiente de extinción de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## 7.2. Determinación de enzimas antioxidantes

Para la determinación de superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) se homogeneizaron 250 mg de hojas en 1,5 ml del buffer de extracción (50 mM de buffer fosfato (pH 7,4), 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 1 g de polivinilpirrolidona (PVP) y 0,5% (v/v) de Tritón X-100, en condiciones de frío. Los homogenatos se centrifugaron a 10.000 g por 20 min y el sobrenadante se utilizó para el análisis. La actividad de SOD se midió en espectrofotómetro, según Beyer y Fridovich (1987). En este estudio una unidad de SOD se define como la cantidad requerida para inhibir un 50% la fotoreducción de nitroblue tetrazolium. La actividad específica de SOD se calculó como unidades/mg de proteínas. Los resultados se expresaron en porcentaje del control.

Para la estimación de la actividad de ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11) 300 mg de hojas se colocaron en 1,5 ml del medio homogeneizador (50 mM de buffer fosfato (pH 7,0), 0,1 mM de EDTA, 5 mM de ascorbato y 1% PVP). Para el ensayo de actividad enzimática, la relación de peróxido de hidrógeno dependiente de la oxidación del ácido ascórbico, se determinó en una reacción mixta que contenía 50 mM de buffer fosfato (pH 7,4), 5 nM de ácido ascórbico y extracto de enzima (Chen y Asada, 1989). La reacción se inició con el agregado de 100  $\mu\text{l}$  de 0,1 mM (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la tasa de oxidación del ácido ascórbico se estimó por el descenso de la absorbancia a 290 nm por 3 min. La actividad específica de APX se expresó como porcentaje del control.

La concentración de proteínas fue determinada espectrofotométricamente usando albúmina bovina como estándar (Bradford, 1976).

## 7.3. Determinación de compuestos antioxidantes no enzimáticos

Glutation reducido (GSH) y tioles no proteicos (TNP) se extrajeron por homogeneización de 250 mg de hojas en 2 ml 0,1 N de HCl (pH 2), 1% (w/v) de PVP y se centrifugó a 10.000 g a 4°C durante 10 min (Schupp y Rennenberg, 1988). La cantidad de GSH del sobrenadante se estimó incubando 100  $\mu\text{l}$  de la

alícuota con buffer fosfato (0,5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), conteniendo 1 g/l de ácido ascórbico y 0,5 g/l de ácido glioxílico (pH 6,8), por 5 min a 60°C. La solución se colocó rápidamente en hielo. 100  $\mu\text{l}$  del reactivo de Ellman (solución de DTNB) se agregó a todos los tubos, se mezcló y centrifugó a 12.000 rpm por 2 min. Se midió la absorbancia a 412 nm. El tubo control contenía el buffer y el estandar de GSH (preparado de una solución GSH stock, diluyendo 4 mM en una proporción 1:10) (Ball, 1966). Los resultados obtenidos se expresaron como  $\mu\text{moles}$  GSH/g de PF.

Para la determinación de tioles no proteicos se usó el reactivo de Ellman. 200  $\mu\text{l}$  del sobrenadante se mezcló con buffer fosfato (0,5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 mM EDTA, pH 8) y 100  $\mu\text{l}$  de solución de DTNB (6 mM DTNB, 50 mM buffer potasio fosfato, pH 7,4) se agregaron para iniciar la reacción. Luego de 15 min de incubación a 30°C, se midió la absorbancia a 412 nm y se corrigió con DTNB/control sin enzima. Los resultados se expresaron como mMoles DTNB/g de PF.

## 8. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la evaluación de parámetros de crecimiento, niveles hormonales y estrés oxidativo se sometieron a prueba de normalidad por el test de Kolmogorov-Smirnov. Luego los datos se analizaron con el programa estadístico STATGRAPHICS 5.1 por el test ANOVA simple por la comparación de valores medios por test de Fisher de diferencias mínimas significativas (LSD, por sus siglas en inglés) a un nivel de  $p \leq 0.05$ . Los datos obtenidos del estudio de la recuperación de plantas, se analizaron comparativamente entre cultivares en cada tiempo de medición por el test LSD,  $p \leq 0.05$  (STATGRAPHICS 5.1). Para citocininas se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, ANOVA de una vía,  $p \leq 0.05$ .

# **RESULTADOS**

*ESTRÉS POR FRÍO EN Digitaria eriantha: FORRAJERA PROMISORIA PARA ZONAS SEMIÁRIDAS*

## RESULTADOS

### 1. Peso fresco, peso seco y longitud de hojas y raíces

La importancia de *Digitaria eriantha* como especie forrajera determina la necesidad de evaluar el efecto de las bajas temperaturas sobre la producción de biomasa.

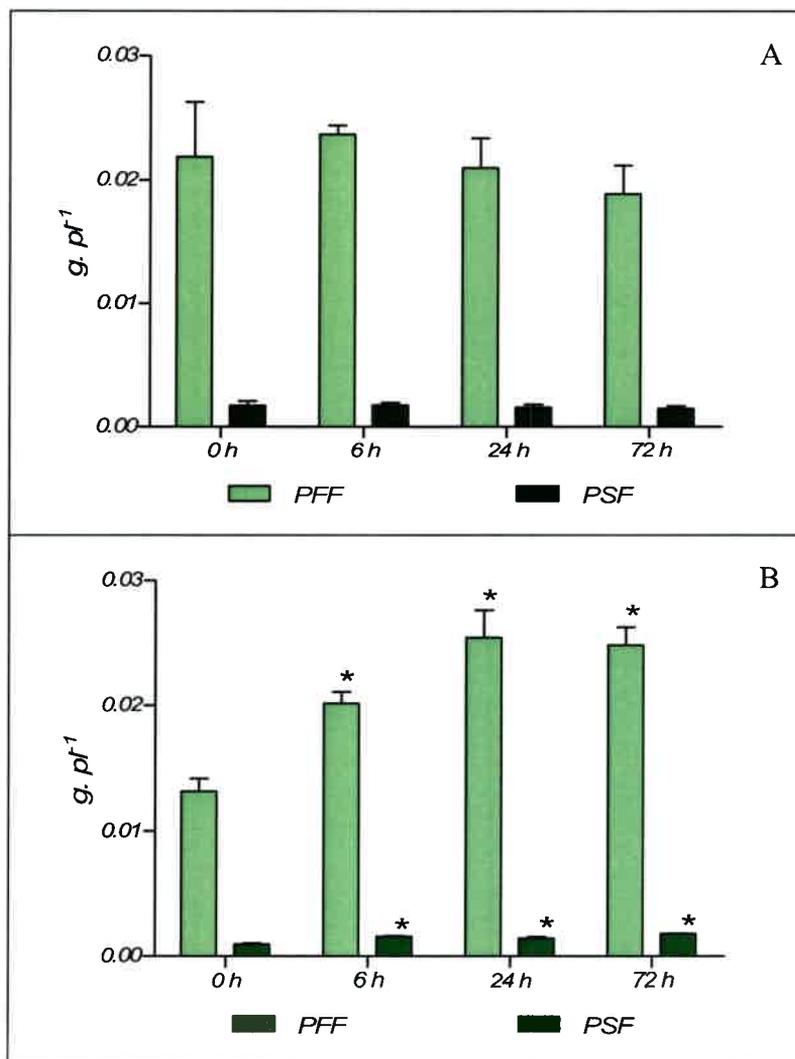


Fig. 9. Peso fresco y peso seco de hojas de *Digitaria eriantha*. A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA. Datos expresados como media  $\pm$  ES para  $n = 3$ . \* Indican diferencias significativas entre muestras (Statgraphics,  $P \leq 0,05$ ).

En la Fig. 9 se presentan los resultados de la evaluación de peso fresco foliar (PFF) y peso seco foliar (PSF) en los dos cultivares de *Digitaria eriantha*. El cv. Sudafricana no modificó su biomasa por efecto del frío; no se observaron diferencias significativas en PFF y PSF respecto al control en ninguno de los tratamientos (Fig. 9A). Por el contrario, el cv. Mejorada INTA acumuló biomasa a pesar del tratamiento con frío, ya que el PFF y el PSF aumentó en forma significativa a las 6, 24 y 72 h respecto al control (Fig. 9B).

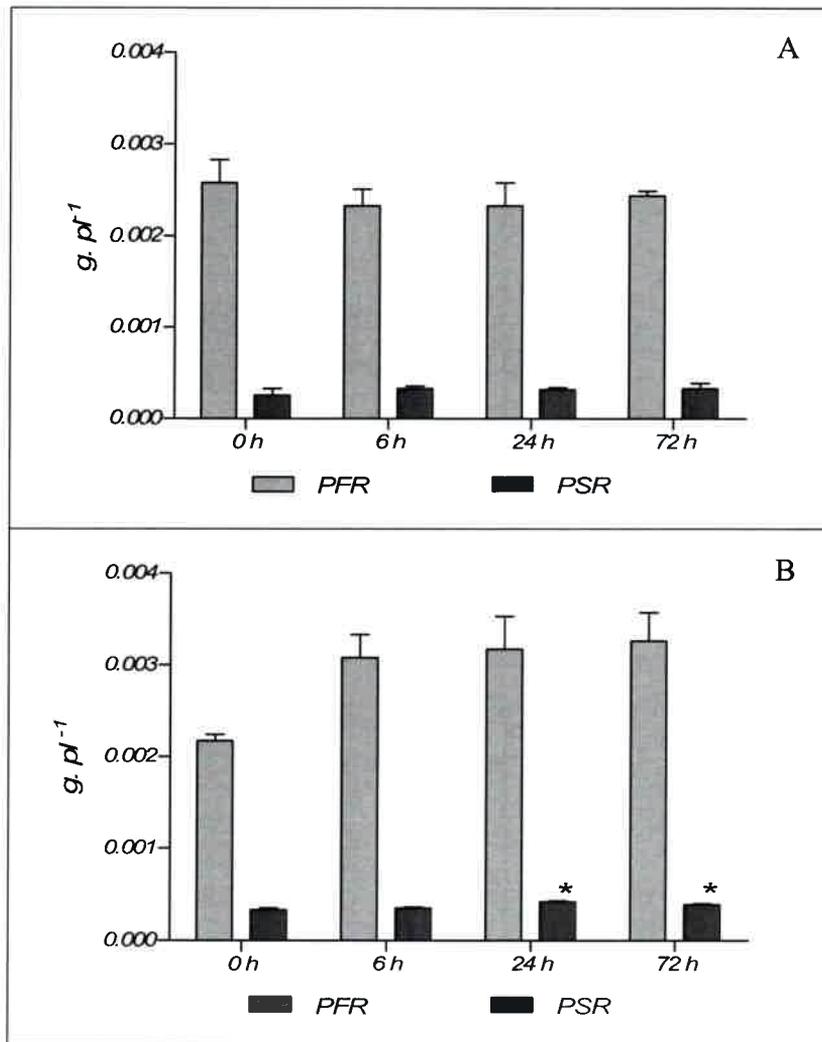


Fig. 10. Peso fresco y peso seco de raíces de *Digitaria eriantha*. A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA. Datos expresados como media  $\pm$  ES para  $n = 3$ . \* Indican diferencias significativas entre muestras (Statgraphics,  $P \leq 0,05$ ).

En raíces, se mantuvo el mismo comportamiento en ambos cultivares. El peso fresco de raíces (PFR) y el peso seco de raíces (PSR) no se modificaron en el cv. Sudafricana por efecto del frío (Fig. 10A), mientras que en el cv. Mejorada INTA, si bien el PFR no se modificó con los tratamientos a baja temperatura, el PSR se incrementó a las 24 y 72 h respecto al control (Fig. 10B).

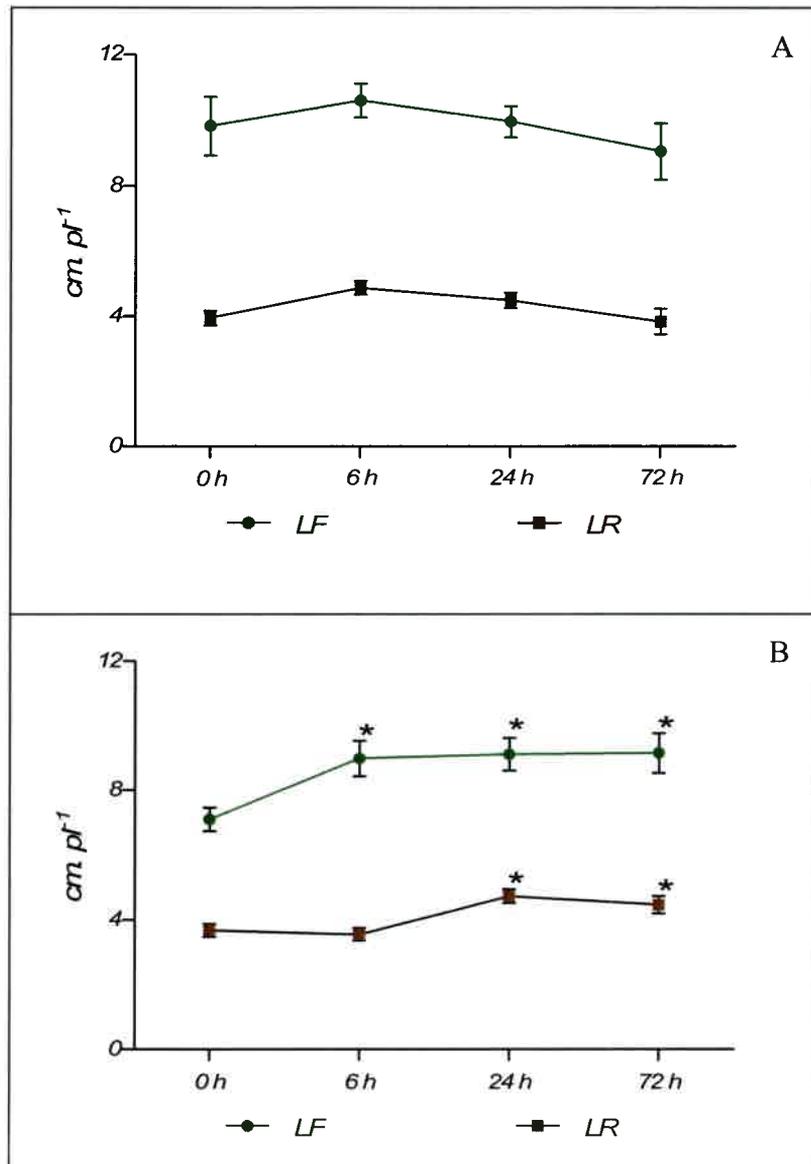


Fig. 11. Longitud de hojas y raíces de *Digitaria eriantha*. A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA. Datos expresados como media  $\pm$  ES para  $n = 12$ . \* Indican diferencias significativas entre muestras (Statgraphics,  $P \leq 0,05$ ).

La longitud foliar (LF) y radicular (LR) en Sudafricana no se modificaron por efecto de la baja temperatura (Fig. 11A). En contraposición, Mejorada INTA continuó su crecimiento sin verse afectada por el frío. La LF aumentó significativamente en todos los tratamientos (6, 24 y 72 h) y la LR también se incrementó en forma significativa a partir de las 24 h (Fig. 11B).

### 1.1. Evaluación de la recuperación

El porcentaje de recuperación del peso seco de hojas (PSF) mostró diferencias significativas entre ambos cultivares de *Digitaria eriantha*. El cv. Mejorada INTA se recuperó con mayor rapidez e intensidad a partir de los 7 días posteriores al tratamiento con baja temperatura respecto a Sudafricana, y esta tendencia continuó hasta los 21 días de recuperación (Fig. 12).

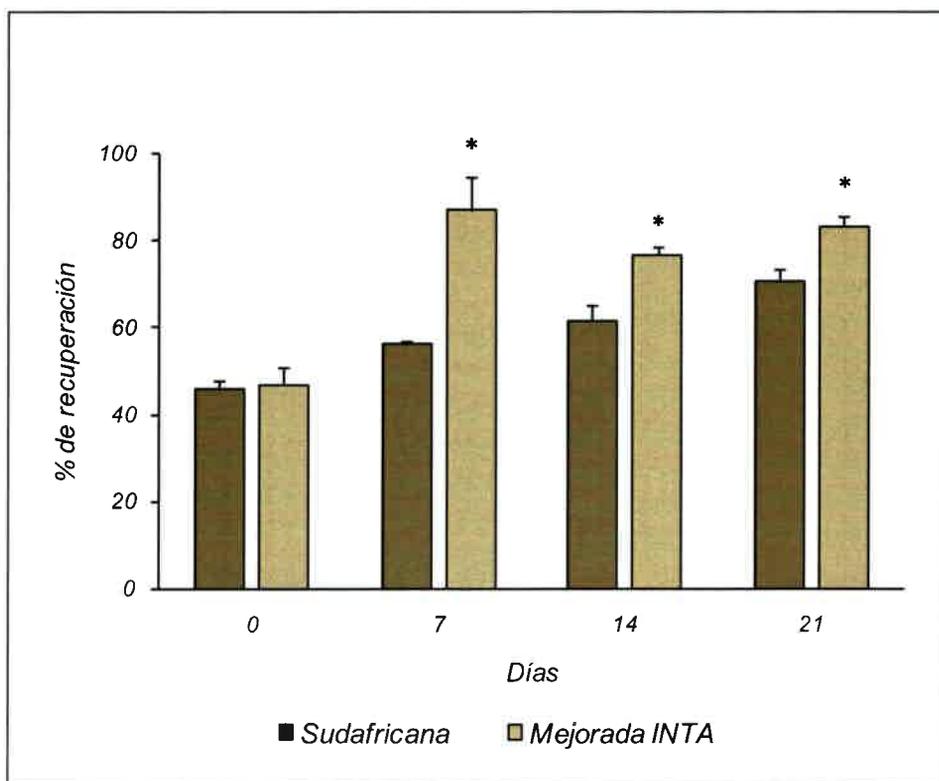


Fig. 12. Porcentaje de recuperación del peso seco de hojas de *Digitaria eriantha* cvs. Sudafricana y Mejorada INTA, inmediatamente después del frío (tiempo 0) y a los 7, 14 y 21 días posteriores. Datos expresados como media  $\pm$  ES para  $n = 3$ . \* Indican diferencias significativas entre muestras (Statgraphics,  $P \leq 0,05$ ).

La Fig. 13 muestra el grado de recuperación de las plantas después de 72 h a baja temperatura, medido en variación de peso fresco foliar (PFF). En el tiempo 0 (inmediatamente después del tratamiento) y luego de 7 días de recuperación, ambos cultivares mostraron más del 35% de disminución del PFF. A los 14 días los dos cultivares mostraron una leve recuperación y a los 21 días el PFF en Mejorada INTA tuvo una recuperación superior al 90%, mientras que en el cv. Sudafricana no superó el 70% representado esto una diferencia significativa entre cultivares.

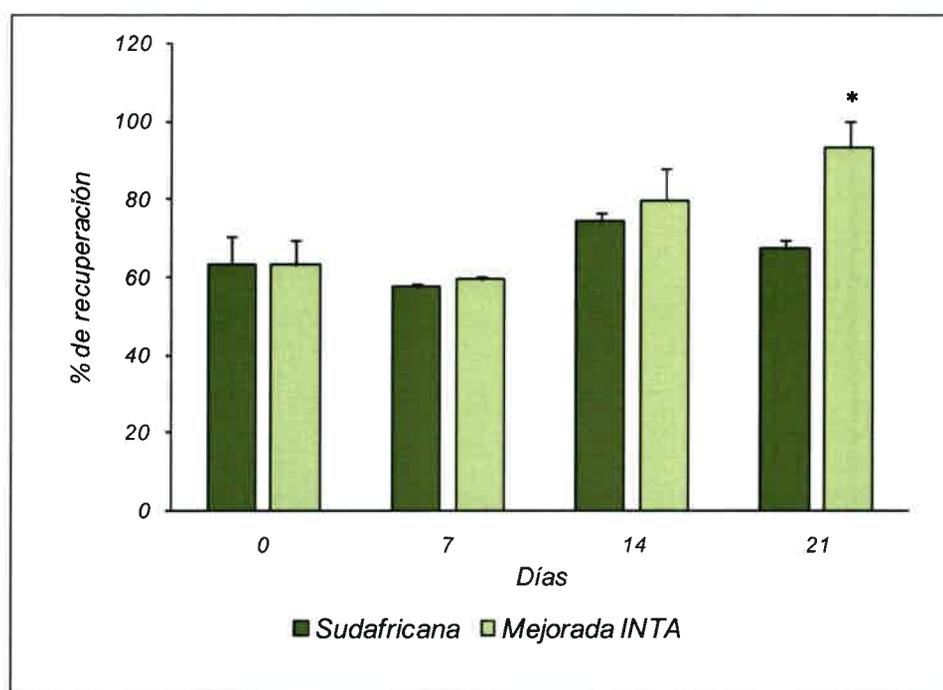


Fig. 13. Porcentaje de recuperación del peso fresco de hojas de *Digitaria eriantha* cvs. Sudafricana y Mejorada INTA, inmediatamente después del frío (tiempo 0) y a los 7, 14 y 21 días posteriores. Datos expresados como media  $\pm$  ES para  $n = 3$ . \* Indican diferencias significativas entre muestras (Statgraphics,  $P \leq 0,05$ ).

En cuanto a la longitud foliar los cultivares de *Digitaria eriantha* no mostraron diferencias significativas entre ellos en los diferentes tiempos de recuperación (Fig. 14).

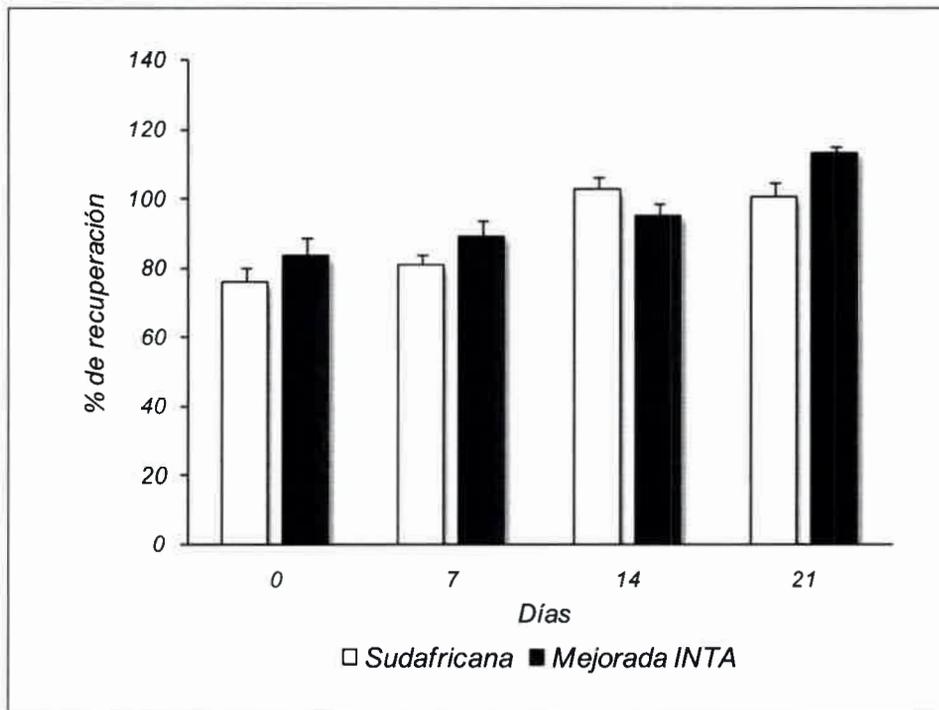


Fig. 14. Porcentaje de recuperación de la longitud de hojas de *Digitaria eriantha* cvs. Sudafricana y Mejorada INTA, inmediatamente después del frío (tiempo 0) y a los 7, 14 y 21 días posteriores. Datos expresados como media  $\pm$  ES para  $n = 3$ . \* Indican diferencias significativas entre muestras (Statgraphics,  $P \leq 0,05$ ).

## 2. Pigmentos fotosintéticos

En el cv. Sudafricana la clorofila *b* se incrementó a las 6 h y luego descendió a las 72 h de estrés por frío respecto al control, el contenido de clorofila *a* mostró un comportamiento similar al observado en la clorofila *b* (Fig. 15A). No obstante, en Mejorada INTA, los contenidos de clorofila *a* y *b* no se modificaron en los tratamientos con baja temperatura (Fig. 15B). Además, en ambos cultivares el contenido de clorofila *a* fue superior al de clorofila *b*. Por otra parte, el contenido de carotenoides fue similar al de clorofila *b* y luego del frío los carotenoides permanecieron cercanos a los valores del control en ambos cultivares, no existiendo diferencias significativas en ninguno de los tratamientos (Fig. 15A, B).

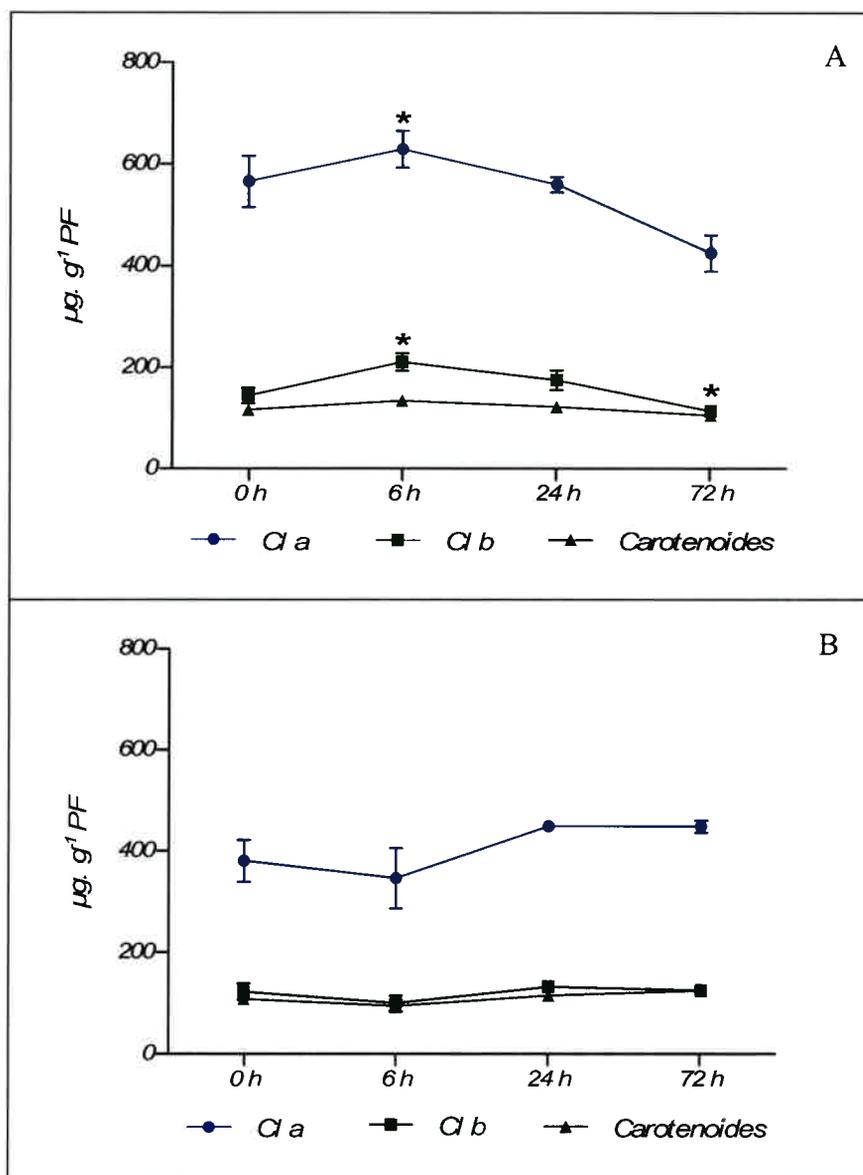


Fig. 15. Contenido de clorofilas *a*, *b* y carotenoides en hojas de *Digitaria eriantha*. A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA. Datos expresados como media  $\pm$  ES para  $n = 4$ . \* Indican diferencias significativas entre muestras (Statgraphics,  $P \leq 0,05$ ).

### 3. Anatomía por microscopia óptica

#### 3.1. Anatomía del tallo

En la Fig. 16 se observan los cortes anatómicos de la región apical del tallo principal de plantas de *Digitaria eriantha* cvs. Sudafricana y Mejorada INTA, controles y estresadas con frío por períodos de 24 y 72 h.

En los brotes de plantas control todas las células presentaron las características propias de los tejidos jóvenes que conforman esta zona. Además, se observaron trazas procambiales distribuidos por toda la superficie. El meristema apical de la yema terminal y de las yemas axilares se observan protegidos por primordios foliares como así también por vainas de hojas adultas. En su gran mayoría las células de esta región poseen una tonalidad celeste que se corresponde con la naturaleza celulósica de sus paredes primarias (Fig. 16A, B).

Los cortes anatómicos de la región apical del tallo principal de las plantas de *Digitaria eriantha* cv. Sudafricana, expuestas durante 6 h a baja temperatura, mostraron, en la región central del tallo y en posición subapical, células que habían adquirido una coloración rojiza-amarronada, probablemente debido a una acumulación de antocianinas. Estas células al ser observadas con mayor aumento, mostraron su contenido celular precipitado. Ambas características indican la presencia de tejido alterado. Sin embargo, en el cv. Mejorada INTA no se observaron diferencias anatómicas respecto al control (datos no mostrados).

A las 24 h de frío, en Sudafricana se observó un incremento de la coloración amarronada. Los tejidos en las proximidades del meristema apical y descendiendo hacia la base del tallo se presentaron afectados y se observaron varias yemas axilares dañadas (Fig. 16C). Por otra parte, en Mejorada INTA en la zona cercana al meristema apical se presentó la misma coloración atípica que en Sudafricana; sin embargo, sólo se observaban afectadas las células de un área reducida y no se encontraron comprometidas las yemas axilares (Fig. 16D). Además, en Mejorada INTA el tejido se encontró menos alterado y el contenido celular se observó precipitado solo en algunas células a nivel de las vainas o en tejido subapical (Fig. 16D).

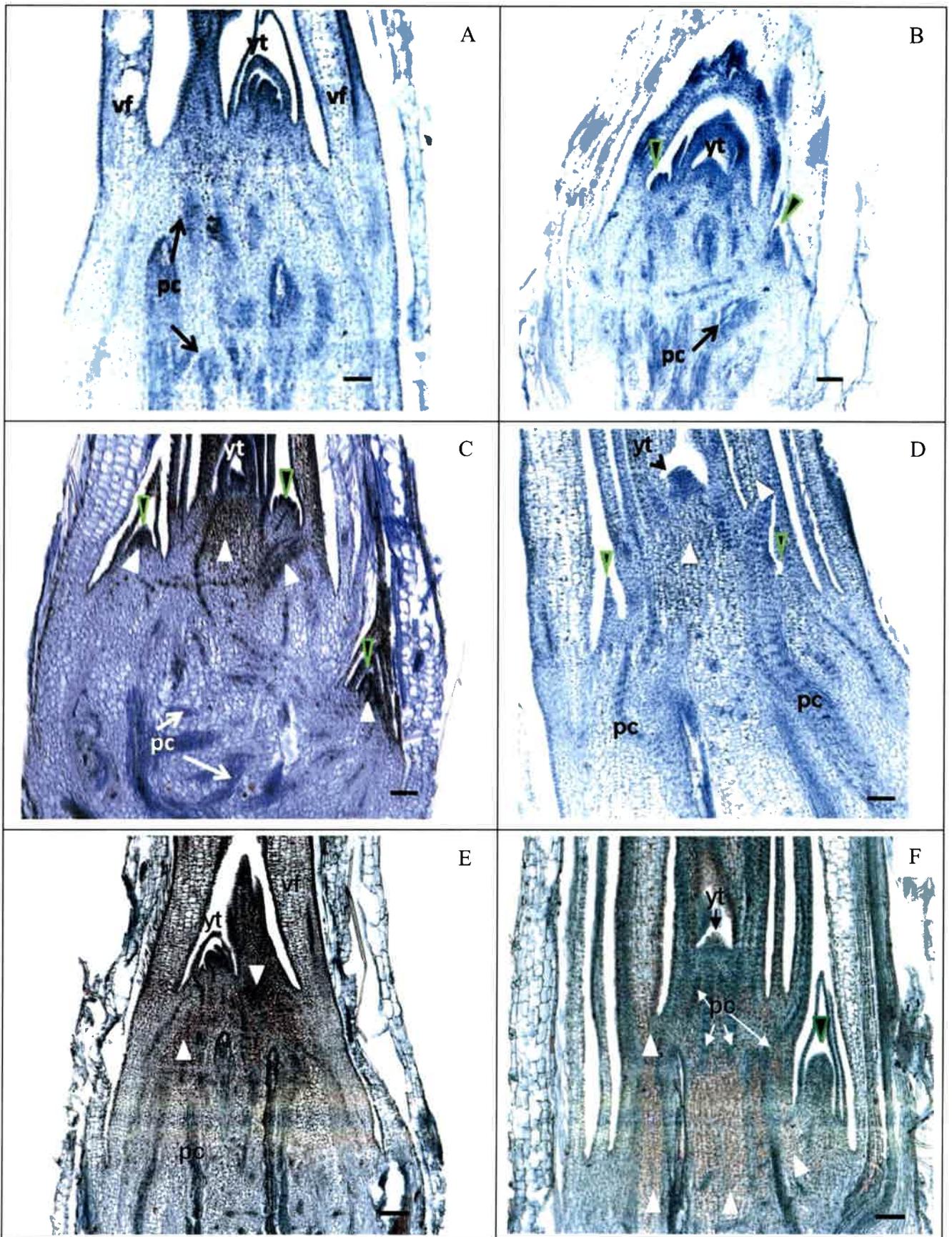


Fig. 16. Sección longitudinal de la región apical del brote de *Digitalia eriantha*. Control, A: cv. Sudafricana, B: cv. Mejorada INTA. 24 h de frío, C: cv. Sudafricana, D: cv. Mejorada INTA. 72 h de frío, E: cv. Sudafricana, F: cv. Mejorada INTA. Referencias: pc, trazas de procambium; vf, vaina foliar; yt, yema apical terminal; flecha verde, yema axilar; flecha blanca, daño causado por frío. Escala: 200  $\mu$ m.

En Sudafricana con 72 h de estrés los cortes longitudinales mostraron que la coloración amarronada alcanzó hasta la base del tallo, afectando por completo a yemas axilares en algunos casos; asimismo, el tejido se observó completamente dañado, con contenido celular precipitado y células muertas (Fig. 16E). A igual nivel de exposición al frío en la región apical del brote, el cv. Mejorada INTA mostró tejido dañado en el tallo principal, mientras que las yemas axilares basales mantuvieron sus tejidos con características normales (Fig. 16F).

Luego de 120 h (5 días) de exposición a frío, en el cv. Sudafricana la coloración atípica afectó todos los tejidos desde el meristema apical hasta la base del tallo, y en la mayoría de las muestras analizadas también estaban afectadas las yemas axilares basales (Fig. 17A). A igual tratamiento, en Mejorada INTA, el frío afectó los tejidos del tallo en menor proporción y sólo se evidenciaron dañadas las yemas axilares en algunas pocas muestras. Asimismo la mayoría de las plantas de este cultivar presentaron tallos con tejidos normales y yemas basales sanas (Fig. 17B).

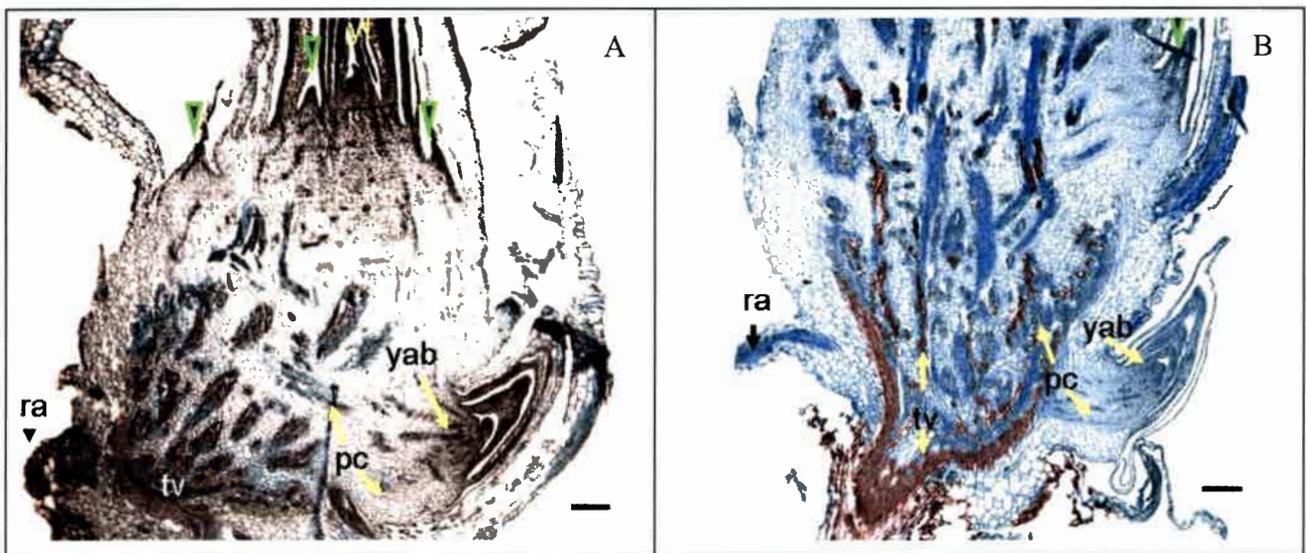


Fig. 17. Sección longitudinal de la región apical del tallo principal de *Digitaria eriantha* a 5 días de estrés por frío. A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA. Referencias: pc, trazas de procambium; ra, raíz adventicia; tv, tejido vascular; vf, vaina foliar; yab, yema axilar basal; yt, yema apical terminal; flecha verde, yema axilar. Escala: 200  $\mu$ m.

### 3.2. Anatomía de la hoja

El estudio de anatomía foliar se realizó en los tratamientos de mayor exposición a baja temperatura, es decir a las 72 y 120 h, que fueron los tiempos donde las alteraciones del brote fueron más evidentes en ambos cultivares.

En la Fig. 18 se muestran cortes transversales de hojas control de los dos cultivares de *Digitaria eriantha* en donde se distingue la anatomía Kranz característica de este tipo de especies. Además, se observan la epidermis abaxial y adaxial. Entre ambas epidermis, en el mesófilo, se observan los haces vasculares rodeados por las células de la vaina parenquimática en donde se presentan cloroplastos amiláceos ubicados hacia la pared tangencial externa, luego se encuentran células de parénquima clorofílico que se disponen radialmente formando una corona por fuera de la vaina parenquimática.

El tratamiento de 72 h de estrés por frío afectó las hojas de ambos cultivares. En el cv. Sudafricana los cloroplastos de la vaina y del parénquima clorofílico se observaron hinchados ocupando gran parte de la célula que los contiene, asimismo los cloroplastos del parénquima aparecieron descoloridos. Además, algunas células de la vaina y del parénquima clorofílico perdieron sus plástidos y parecen estar vacías (Fig. 18). Las hojas del cv. Mejorada INTA fueron menos afectadas por el frío, solamente los cloroplastos del parénquima clorofílico se observaron hinchados y descoloridos (Fig. 18).

Cuando las plantas fueron expuestas durante 120 h a baja temperatura, en el cv. Sudafricana se observó que tanto los cloroplastos amiláceos como los del parénquima clorofílico habían perdido su coloración y forma característica, se presentaban dilatados formando cúmulos lo que dificulta su reconocimiento. En Mejorada INTA, los cloroplastos del parénquima clorofílico se observan afectados como en Sudafricana. Sin embargo, los cloroplastos amiláceos ubicados en la vaina, aparentan conservar su integridad a pesar de observarse hinchados (Fig. 18).

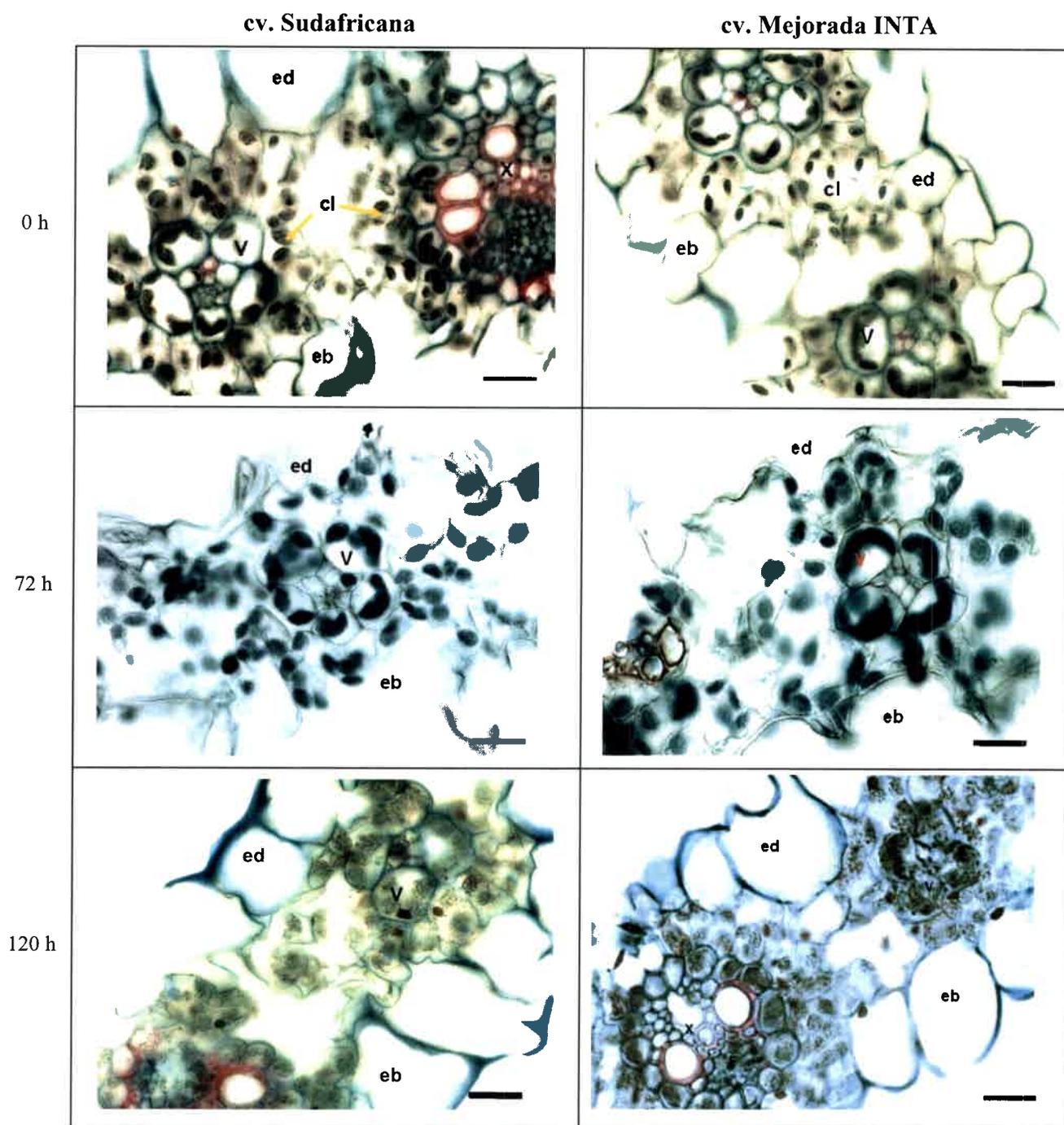


Fig. 18. Sección transversal de hojas de *Digitaria eriantha* cvs. Sudafricana y Mejorada INTA. Referencias: cl, clorénquima; eb, epidermis abaxial; ed, epidermis adaxial; F, floema; V, vaina del haz; X, xilema. Escala: 10  $\mu$ m.

### 3. Ultraestructura

Con el objeto de analizar los daños causados por la baja temperatura, se estudió la ultraestructura foliar mediante microscopía electrónica de transmisión, en los dos cultivares de *Digitaria eriantha* en condiciones control y con 72 h de frío.

En la Fig. 19 se observan los cloroplastos amiláceos de hojas de plantas control y tratadas con baja temperatura del cv. Sudafricana. En las células de la vaina, los cloroplastos amiláceos ocupan la mayor parte de la célula, los gránulos de almidón presentan forma elíptica y se encuentran distribuidos uniformemente; además las células de la vaina en que se encuentran ubicados poseen forma regular (Fig. 19A). En los tejidos tratados con 72 h de frío, los límites entre los cloroplastos no se evidenciaron con claridad y adquirieron la forma de las células que los contiene, probablemente debido a la presión de las paredes celulares ocasionados por la pérdida de presión osmótica resultante de la pérdida de agua. Los gránulos de almidón se encuentran reducidos en número y forma (Fig. 19B).

En hojas de plantas control de Mejorada INTA los cloroplastos amiláceos de las células de la vaina presentan gránulos de almidón de forma elíptica y están distribuidos de manera uniforme. Además, la célula donde están contenidos posee forma normal (Fig. 20A). Luego de 72 h de frío, la pared celular se observó retraída; sin embargo, los cloroplastos amiláceos no se encuentran deformados y los gránulos de almidón son de tamaño similar a los observados en el control (Fig. 20B).

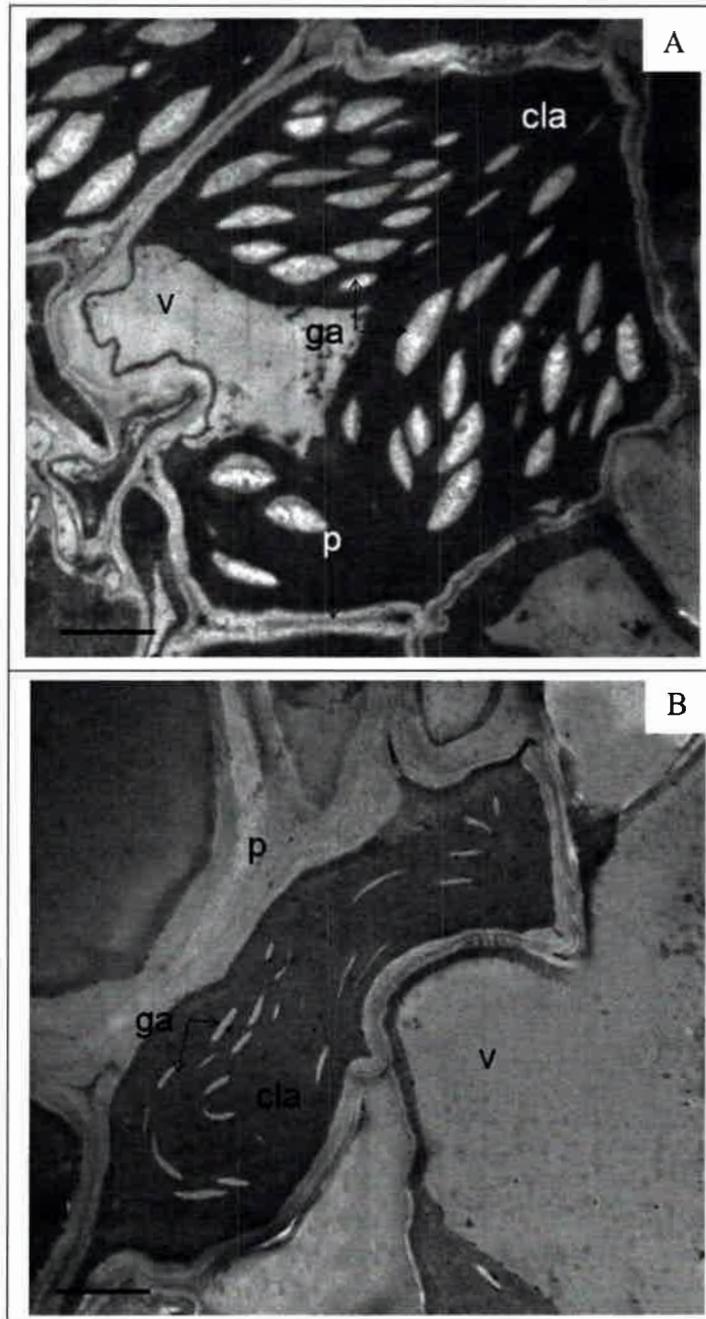


Fig. 19. Cloroplastos amiláceos de *Digitaria eriantha* cv. Sudafricana. A: Plantas control. B: 72 h de frío. Referencias: c: citoplasma; cl: cloroplasto del parénquima; cla: cloroplasto amiláceo; ga: gránulos de almidón; p: pared celular; v: vacuola. Escala: 2  $\mu$ m.

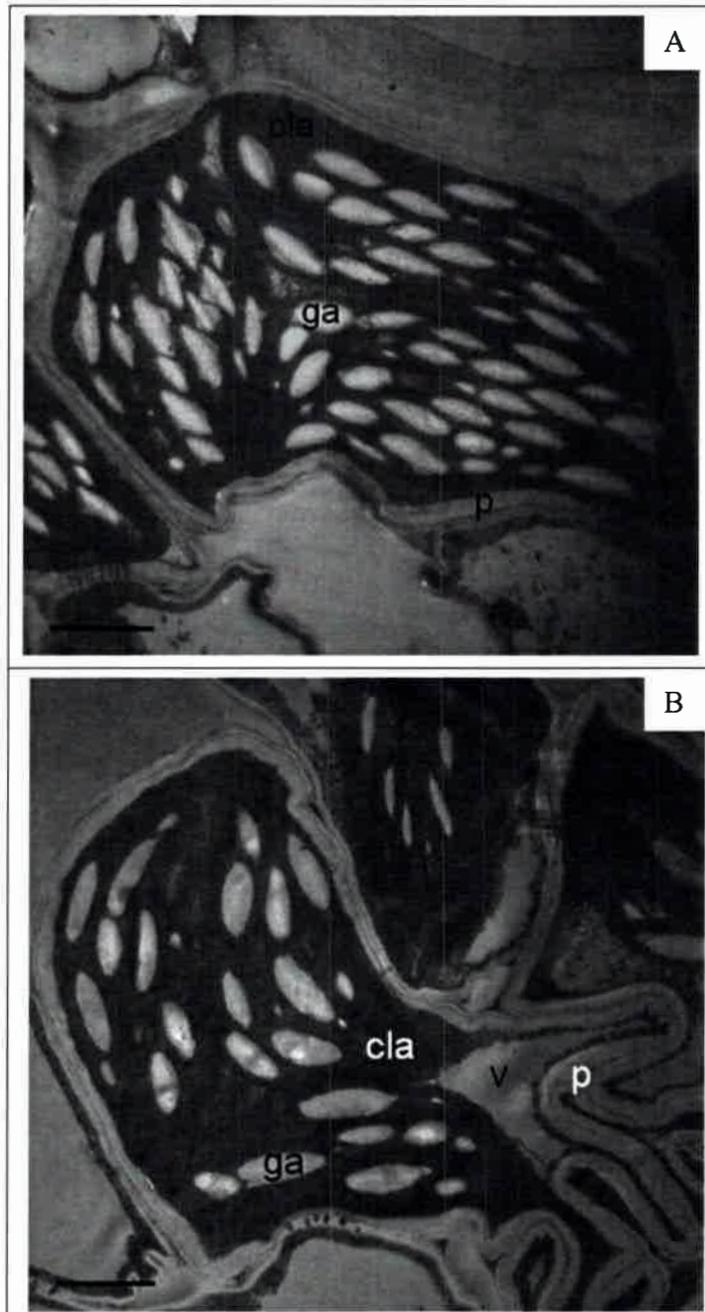


Fig. 20. Cloroplastos amiláceos de *Digitaria eriantha* cv. Mejorada INTA. A: Plantas control. B: 72 h de frío. Referencias: c: citoplasma; cla: cloroplasto amiláceo; ga: gránulos de almidón; p: pared celular; v: vacuola. Escala: 2  $\mu$ m.

En las Figs. 21 y 22 se presentan los cloroplastos del parénquima clorofílico de ambos cultivares. En plantas control del cv. Sudafricana, los cloroplastos presentan forma elíptica con grandes gránulos de almidón y están rodeados de citoplasma (Fig. 21A). En las plantas tratadas, los cloroplastos son

más pequeños, con menor número de gránulos de almidón. El citoplasma que los rodea se observa laxo, las paredes celulares se observan retraídas y con espacios intercelulares mayores que en el control (Fig. 21B). Además, se observan algunas células totalmente colapsadas y se distingue mayor número de lisosomas.

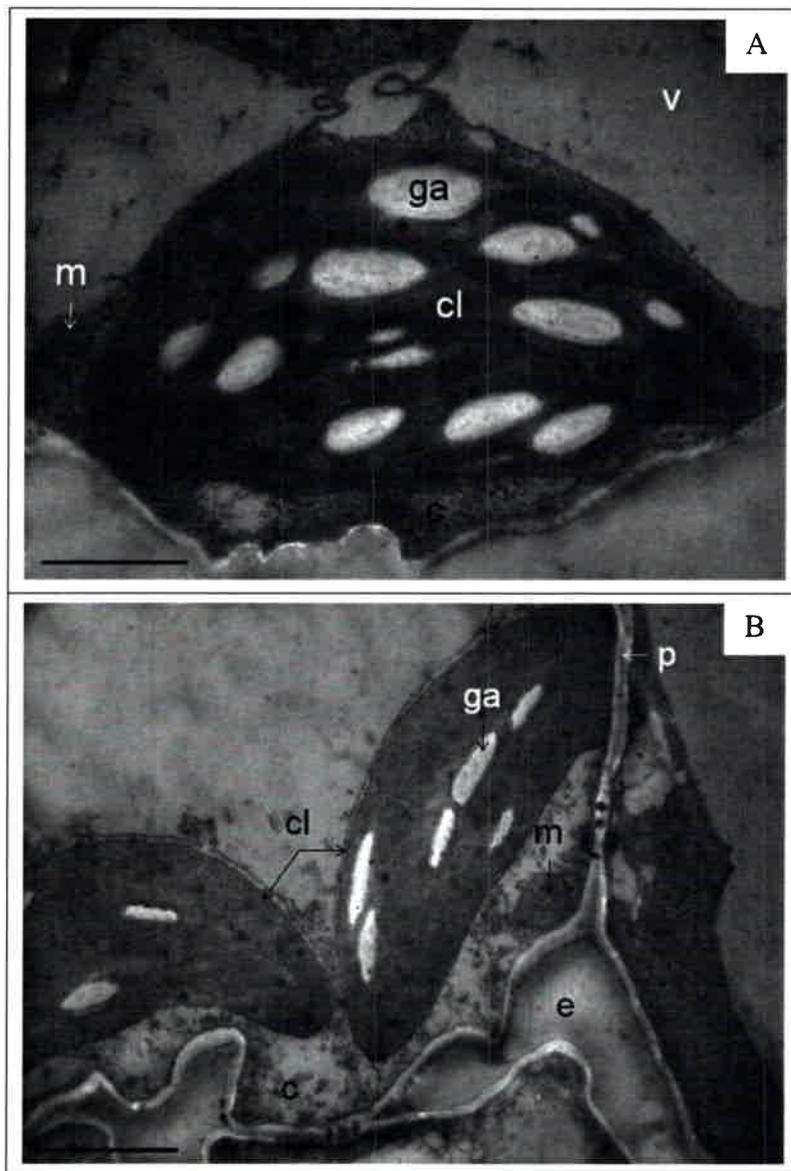


Fig. 21. Cloroplastos del parénquima de *Digitaria eriantha* cv. Sudafricana. A: Plantas control. B: 72 h de frío. Referencias: c: citoplasma; cl, cloroplasto; e: espacio intercelular; ga: gránulos de almidón; m: mitocondria; p: pared celular; v: vacuola. Escala: 2  $\mu$ m.

En el control del cv. Mejorada INTA se pudo observar que los cloroplastos son de menor tamaño respecto a los de Sudafricana (Fig. 21A y 22A), además, están rodeados de citoplasma y presentan forma elíptica con gránulos de almidón grandes (Fig. 22A). En las plantas tratadas, los cloroplastos conservan su integridad y presentan gránulos de almidón de tamaño y forma normal. Las paredes celulares se observan poco deformadas (Fig. 22B). En este cultivar también se presentan algunas células colapsadas con paredes celulares y citoplasma alterado.

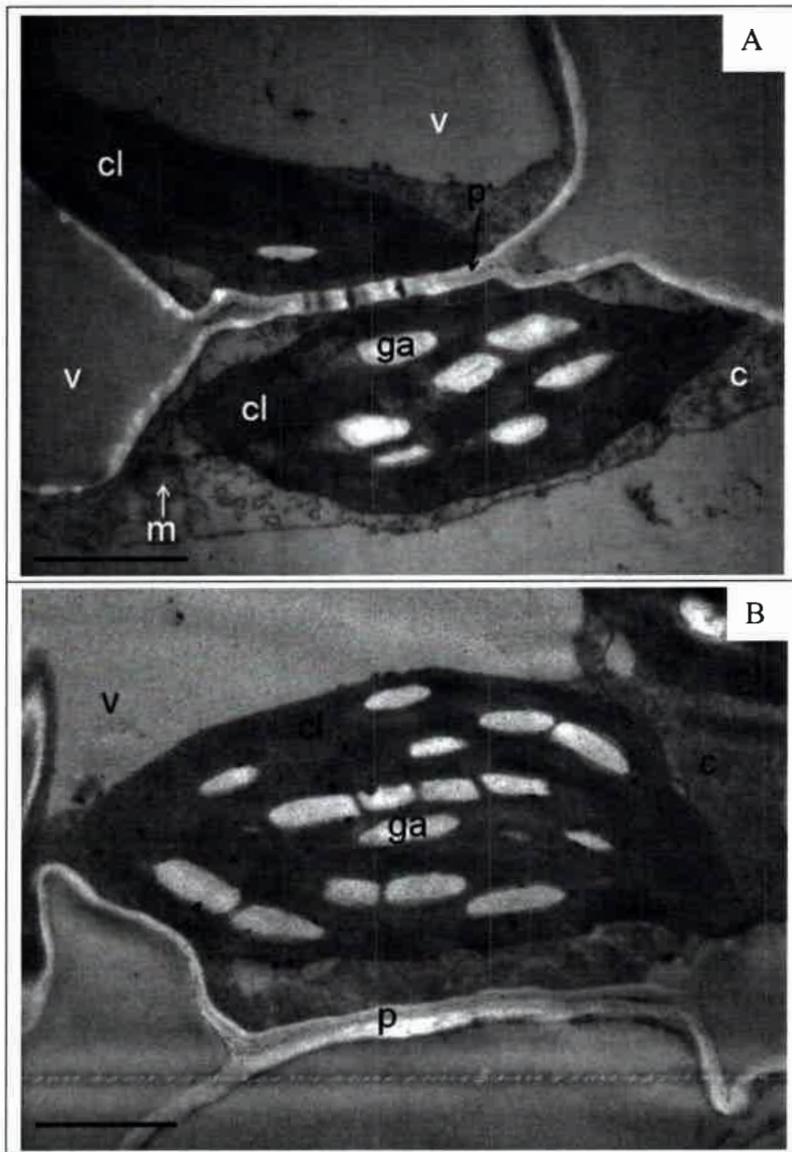


Fig. 22. Cloroplastos del parénquima de *Digitaria eriantha* cv. Mejorada INTA. A: Plantas control. B: 72 h de frío. Referencias: c: citoplasma; cl, cloroplasto; ga: gránulos de almidón; p: pared celular; v: vacuola. Escala: 2  $\mu\text{m}$ .

En cuanto a la ultraestructura de mitocondrias, los resultados se muestran en la Fig. 23. En hojas de plantas control de ambos cultivares de *Digitaria eriantha* estas organelas presentan forma redondeada y se encuentran rodeadas de citoplasma. El tratamiento con frío por 72 h no modificó la estructura de las mitocondrias en ningún cultivar (Fig. 23).

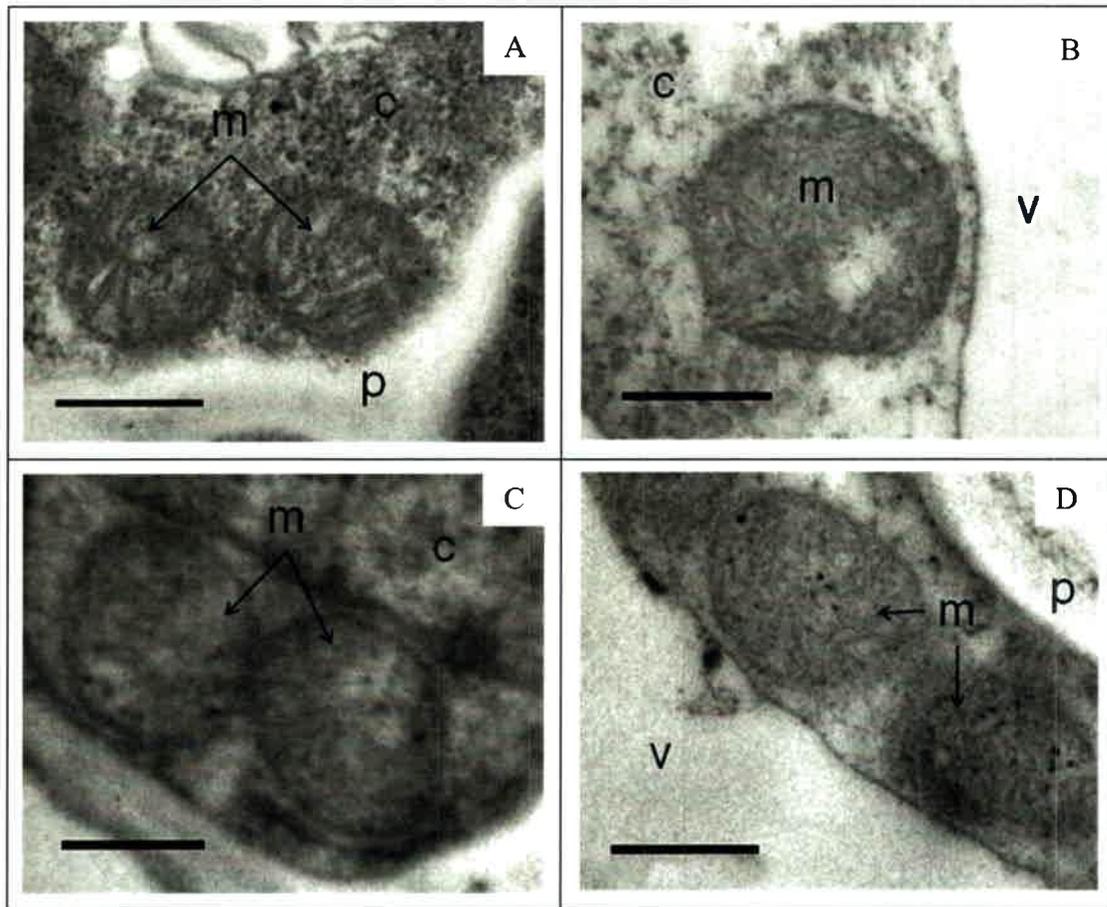


Fig. 23. Mitocondrias de *Digitaria eriantha*. Cv. Sudafricana, A: Control, C: 72 h de frío. Cv. Mejorada INTA, B: Control, D: 72 h de frío. Referencias: c: citoplasma; m: mitocondria; p: pared celular; v: vacuola. Escala: 0,5  $\mu\text{m}$ .

La pared de las células del parénquima foliar sufrieron una fuerte retracción por el frío, aunque sus características físicas no se alteraron (Fig. 24C y D) en comparación con las paredes celulares de plantas control (Fig. 24A, B).

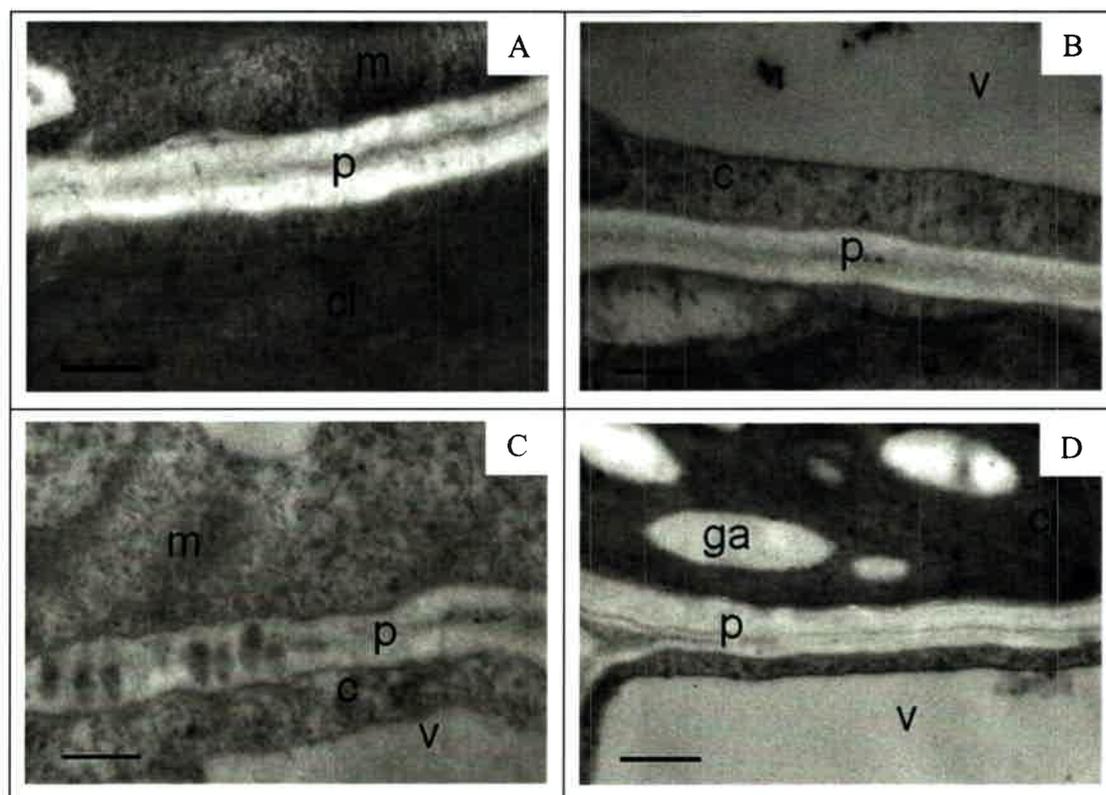


Fig. 24. Pared celular de *Digitaria eriantha*. Cv. Sudafricana, A: Control, C: 72 h de frío. Cv. Mejorada INTA, B: Control, D: 72 h de frío. Referencias: c: citoplasma; cl, cloroplasto; m: mitocondria; p: pared celular; v: vacuola. Escala: 0,5  $\mu\text{m}$ .

## 5. Hormonas de crecimiento

### 5.1. Citocininas endógenas en hojas de *Digitaria eriantha*

En plantas de ambos cultivares de *Digitaria eriantha*, controles y tratadas con baja temperatura, se cuantificaron isopentenil adenina (iP) e isopentenil adenosina (iPA); sin embargo, la presencia de zeatina (Z) y ribósido de zeatina (RZ) no fue detectada.

En el cv. Sudafricana, el contenido de iP no se modificó a las 6 y 24 h de exposición al frío, sin embargo, a las 72 h se observó una abrupta disminución, cercana al 50% del contenido del control (Fig. 25A). Mientras que en Mejorada INTA el contenido de iP no presentó cambios significativos por efecto del frío (Fig. 25B).

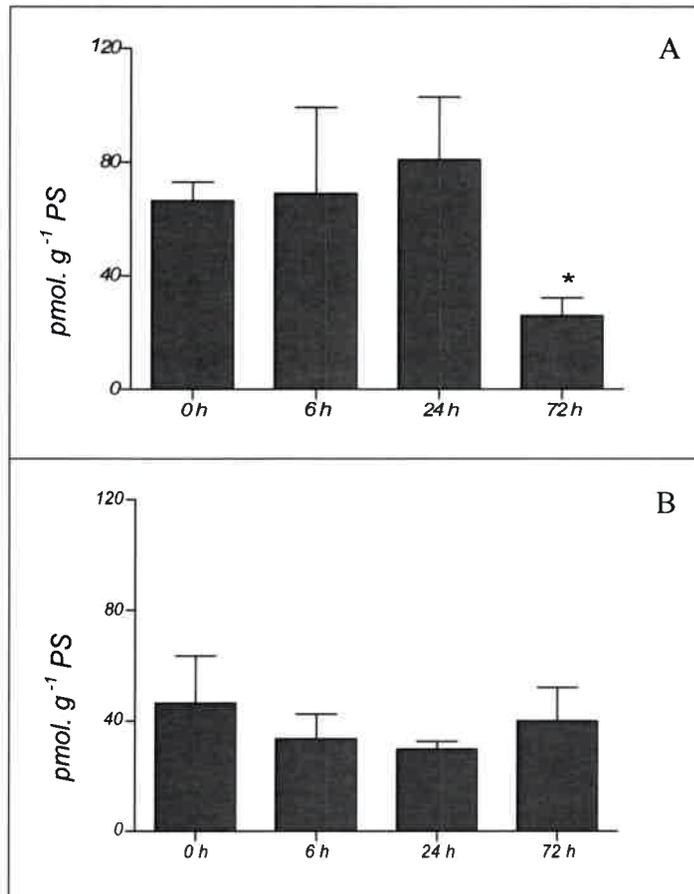


Fig. 25. Contenido de iP en hojas de *Digitaria eriantha*. A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA. Datos expresados como media  $\pm$  ES para  $n = 3$ . (Statgraphics,  $P \leq 0,05$ ).

Por otra parte, el nivel de iPA en ambos cultivares no mostraron diferencias significativas respecto al control (Fig. 26A, B).

El nivel de las bases y ribósidos de citocininas fueron superiores en el cv. Sudafricana respecto a Mejorada INTA en las hojas de plantas control (Fig. 25 y 26), pero luego de 72 h de estrés los niveles de iP e iP A fueron más elevados en Mejorada INTA.

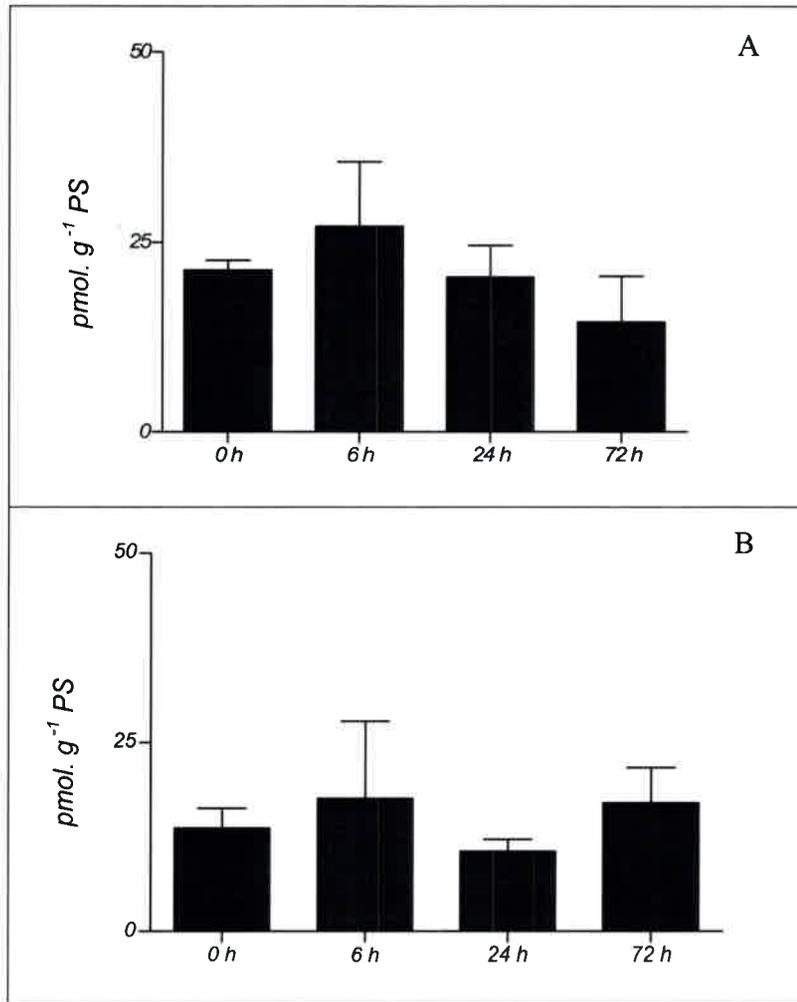


Fig. 26. Contenido de iPA en hojas de *Digitaria eriantha*. A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA. Datos expresados como media  $\pm$  ES para  $n = 3$ . (Statgraphics,  $P \leq 0,05$ ).

En las hojas de plantas control del cv. Sudafricana no se detectaron las citocininas DHZ y RDHZ; sin embargo, ambas se encontraron a las 6 h de estrés por frío (Tabla 1). En Mejorada INTA, DHZ fue detectada en hojas de plantas control y se mantuvo constante hasta las 6 h de estrés, mientras que RDHZ sólo fue detectada a las 6 h (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de dihidrozeatina (DHZ) y ribósido de dihidrozeatina (RDHZ) en *Digitaria eriantha* cvs. Sudafricana y Mejorada INTA. Datos expresados como media  $\pm$  ES (n = 3), nd: no detectado.

Cultivar	Tiempo (h)	DHZ (pmol. g <sup>-1</sup> PS)	RDHZ (pmol. g <sup>-1</sup> PS)
Sudafricana	0	nd	nd
	6	28,24 $\pm$ 7,2	18,94 $\pm$ 1,4
	24	nd	nd
	72	nd	nd
Mejorada INTA	0	27,17 $\pm$ 20,3	nd
	6	29,43 $\pm$ 7,1	15,53 $\pm$ 1,0
	24	nd	nd
	72	nd	nd

## 5.2. Auxinas endógenas en hojas de *Digitaria eriantha*

El contenido de ácido indol-3-acético (AIA) en el cv. Sudafricana disminuyó significativamente a 6, 24 y 72 h de estrés a baja temperatura (Fig. 27A). En Mejorada INTA, se observó un incremento significativo en el nivel de AIA a las 24 y 72 h respecto al control (Fig. 27B). Los niveles endógenos de esta hormona fueron superiores en el cv. Sudafricana respecto a Mejorada INTA.

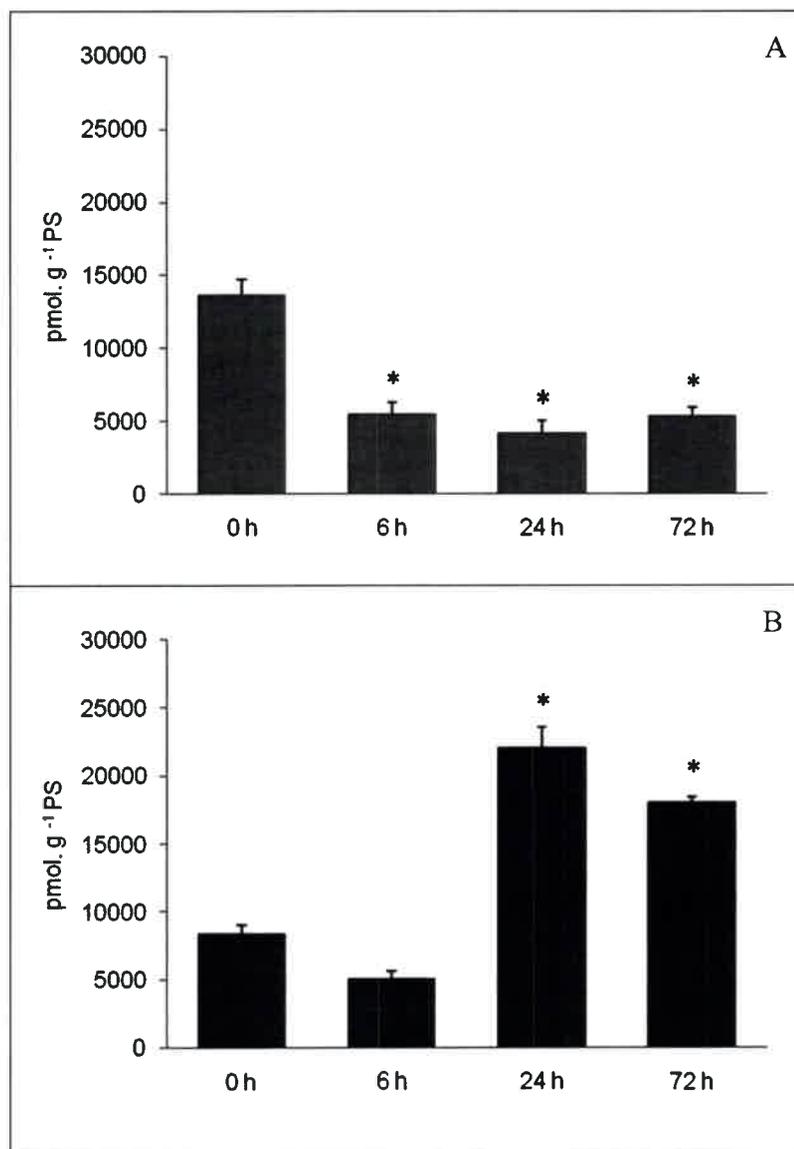


Fig. 27. Contenido de AIA en hojas de *Digitaria eriantha*. A: cv. Sudafricana; B: cv. Mejorada INTA. Datos expresados como media  $\pm$  ES para  $n = 4$ . (Statgraphics,  $P \leq 0,05$ ).

## 6. Contenido endógeno de jasmonatos en plantas tratadas con frío

El ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), JA y derivados (11-OH-JA, 12-OH-JA) fueron detectados en ambos cultivares de esta especie forrajera.

El contenido endógeno de JA en las hojas control de Mejorada INTA fue superior al encontrado en el cv. Sudafricana. Frente a baja temperatura el contenido de JA se modificó de manera similar en los dos cultivares. Este

compuesto disminuyó significativamente sus niveles a las 24 y 72 h de tratamiento con baja temperatura en ambos cultivares. En Mejorada INTA los niveles de JA en todos los tiempos de tratamiento con frío fueron mayores que en Sudafricana (Fig. 28A, B).

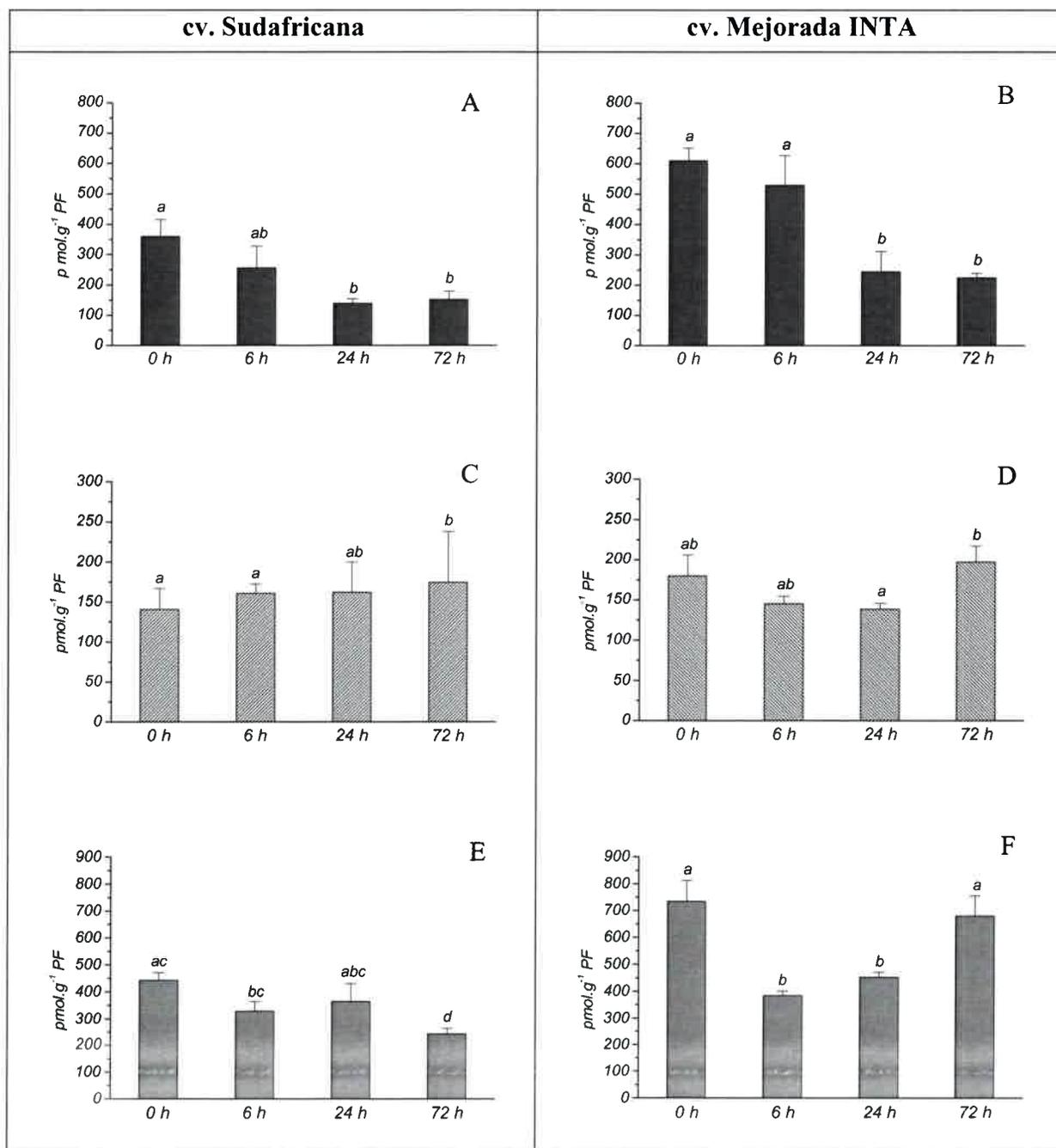


Fig. 28. Niveles endógenos de JAs en *Digitaria eriantha* cvs. Sudafricana y Mejorada INTA a 6, 24 y 72 h de frío. Datos expresados como media  $\pm$  ES (n = 3). Letras distintas indican valores que difieren significativamente a  $P \leq 0,05$ . A y B: JA. C y D: OPDA. E y F: 12-OH-JA.

El contenido de OPDA fue ligeramente menor en el cv. Sudafricana que en Mejorada INTA. Las hojas de Sudafricana incrementaron el nivel de OPDA a las 72 h de estrés por frío (Fig. 28C), mientras que Mejorada INTA no mostró cambios en el contenido de OPDA en respuesta al frío (Fig. 28C, D).

El contenido del derivado hidroxilado 12-OH-JA fue mayor en el cv. Mejorada INTA respecto a Sudafricana. En hojas de Sudafricana se observó un descenso de 12-OH-JA a las 72 h respecto a hojas control. Por otra parte, en el cv. Mejorada INTA el contenido de 12-OH-JA disminuyó a las 6 y 24 h de estrés por frío y a las 72 h el contenido alcanzó nuevamente el nivel de las hojas control (Fig. 28E, F).

El contenido del hidroxilado 11-OH-JA fue mucho menor que el de los otros compuestos, no observándose cambios en este derivado en ningún cultivar (datos no mostrados).

## 7. Contenido de ácido abscísico y sus metabolitos

El ácido abscísico (ABA), ácido dihidrofaseico (DPA), ácido faseico (PA) y ABA éster glucosa (ABA-GE) fueron detectados en hojas de ambos cultivares de *Digitaria eriantha*.

En el cv. Sudafricana se observó un incremento de ABA a las 24 y 72 h respecto a las hojas control. En Mejorada INTA el contenido de ABA se incrementó paulatinamente desde las 6 h de tratamiento con baja temperatura. Los valores de ABA en el cv. Mejorada INTA a las 72 h duplica el nivel de Sudafricana en el mismo tiempo de exposición (Fig. 29A, B).

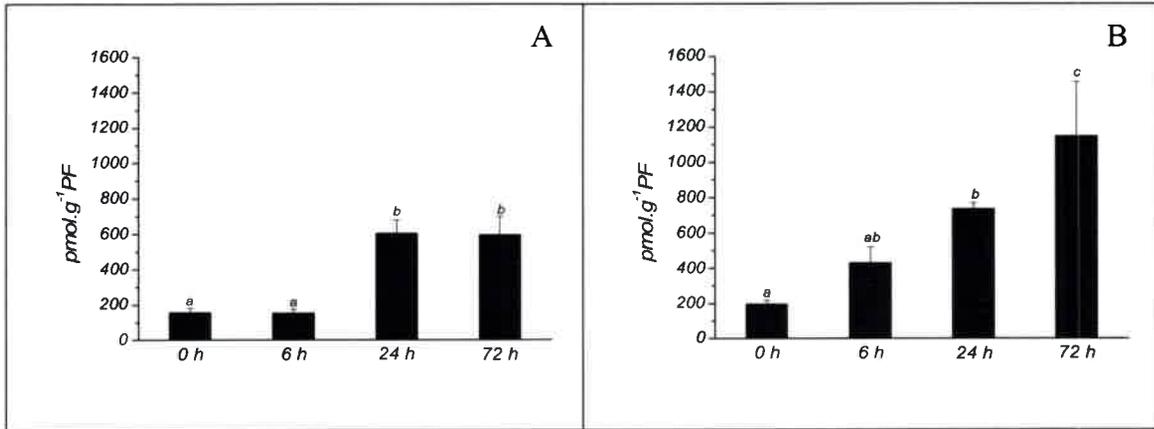


Fig. 29. Niveles endógenos de ABA en *Digitaria eriantha* a 6, 24 y 72 h de frío. A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA. Datos expresados como media  $\pm$  ES (n = 3). Letras distintas indican valores que difieren significativamente a  $P \leq 0,05$ .

El contenido de PA fue alto en hojas control de Sudafricana respecto al cv. Mejorada INTA. En el cv. Sudafricana el nivel de PA disminuyó a las 6 y 24 h de tratamiento de frío y alcanzó los valores del control a las 72 h. Por otra parte, en el cv. Mejorada INTA el contenido de PA se mantuvo sin cambios hasta el final del tratamiento (Fig. 30).

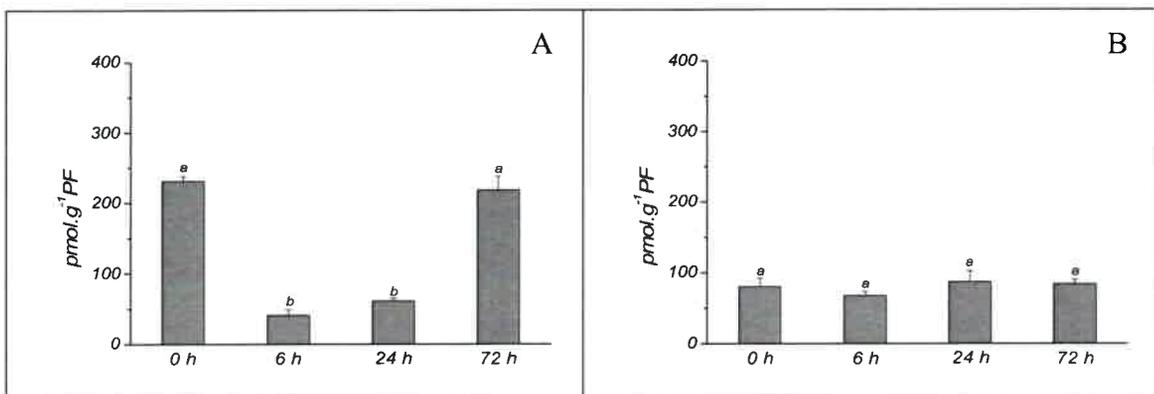


Fig. 30. Niveles endógenos de PA en *Digitaria eriantha* a 6, 24 y 72 h de frío. A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA. Datos expresados como media  $\pm$  ES (n = 3). Letras distintas indican valores que difieren significativamente a  $P \leq 0,05$ .

En cuanto al metabolito DPA, se observó que el contenido endógeno en el cv. Sudafricana supera el nivel de las hojas de Mejorada INTA. Los tratamientos

con baja temperatura disminuyeron el nivel de DPA en el cv. Sudafricana a las 6 h de estrés por frío (Fig. 31A), mientras que en Mejorada INTA no se observaron diferencias entre los tratamiento de frío y las hojas control (Fig. 31B).

El nivel de ABA-GE en hojas del cv. Sudafricana disminuyó a las 24 y 72 h de tratamiento con baja temperatura (Fig. 32A). Por otra parte, en el cv. Mejorada INTA se observó un incremento en los niveles de este metabolito a las 24 h (Fig. 32B).

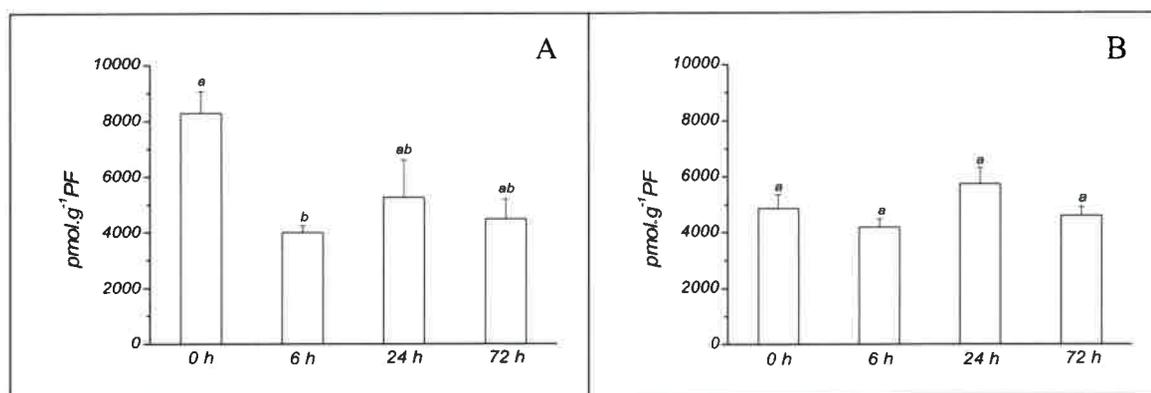


Fig. 31. Niveles endógenos de DPA en *Digitaria eriantha* a 6, 24 y 72 h de frío. A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA. Datos expresados como media  $\pm$  ES (n = 3). Letras distintas indican valores que difieren significativamente a  $P \leq 0,05$ .

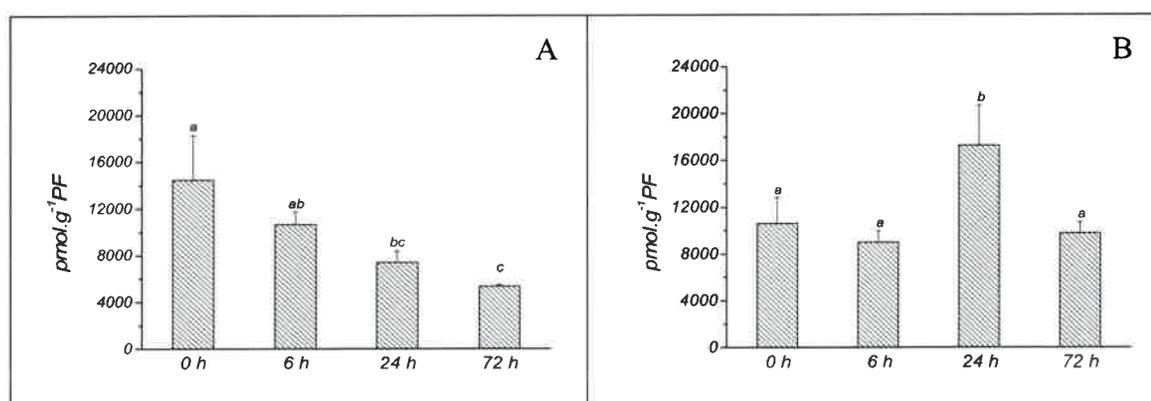


Fig. 32. Niveles endógenos de ABA-GE en *Digitaria eriantha* a 6, 24 y 72 h de frío. A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA. Datos expresados como media  $\pm$  ES (n = 3). Letras distintas indican valores que difieren significativamente a  $P \leq 0,05$ .

## 8. Defensas antioxidantes en plantas bajo estrés

El análisis para determinar si los ácidos grasos insaturados son oxidados y transformados en aldehídos complejos como MDA, mostró en ambos cultivares de *Digitaria eriantha* la presencia de este compuesto luego de los tratamientos con baja temperatura. El nivel de MDA fue superior en el cv. Mejorada INTA respecto al cv. Sudafricana en todos los tiempos de tratamientos de estrés (Fig. 33A, B).

En las hojas de plantas control (0 h) el contenido de MDA fue menor en el cv. Sudafricana que en el cv. Mejorada INTA (Fig. 33A, B). En Sudafricana se observó un incremento significativo en los niveles de MDA a las 24 y 72 h de tratamiento con frío respecto al control (Fig. 33A), mientras que en Mejorada INTA no se observaron cambios significativos (Fig. 33B).

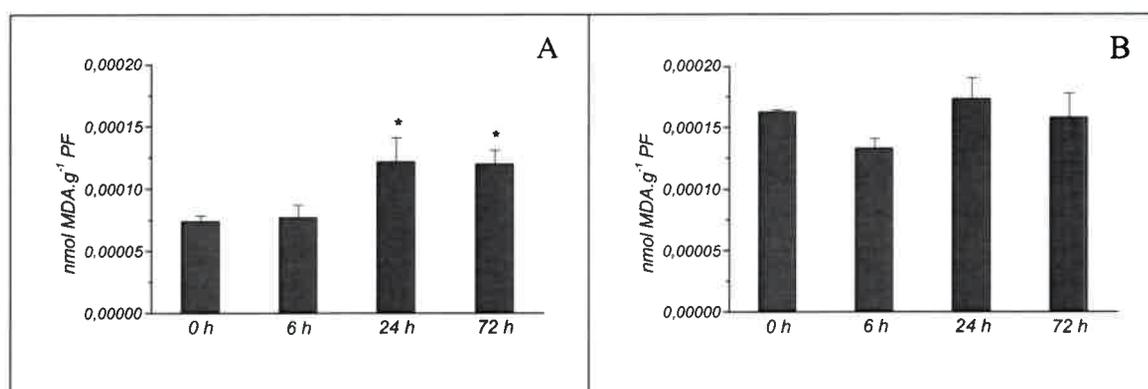


Fig. 33. Niveles de malondialdehído (MDA) en hojas de *Digitaria eriantha* a 6, 24 y 72 h de estrés por frío A: cv. Sudafricana. B: cv. Mejorada INTA. Datos expresados como media  $\pm$  ES (n = 5). \* Indica valores que difieren significativamente a  $P \leq 0,05$ .

### 8.1. Enzimas antioxidantes

La actividad de las enzimas antioxidantes (SOD y APX) fue diferente entre los dos cultivares. En el cv. Sudafricana, SOD disminuyó significativamente a las 24 y 72 h de frío respecto a las hojas control. En el cv. Mejorada INTA la actividad de esta enzima descendió suavemente a las 6 y 24 h de tratamiento con baja temperatura y a las 72 h alcanzó nuevamente los valores

de las hojas control, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 34A).

Por otra parte, en el cv. Sudafricana se observó un notable incremento de APX, superando a las 6 h, seis veces a la actividad de las hojas control; a las 24 h siete veces y a las 72 h diez veces. En Mejorada INTA no se observaron cambios significativos en la actividad de APX (Fig. 34B).

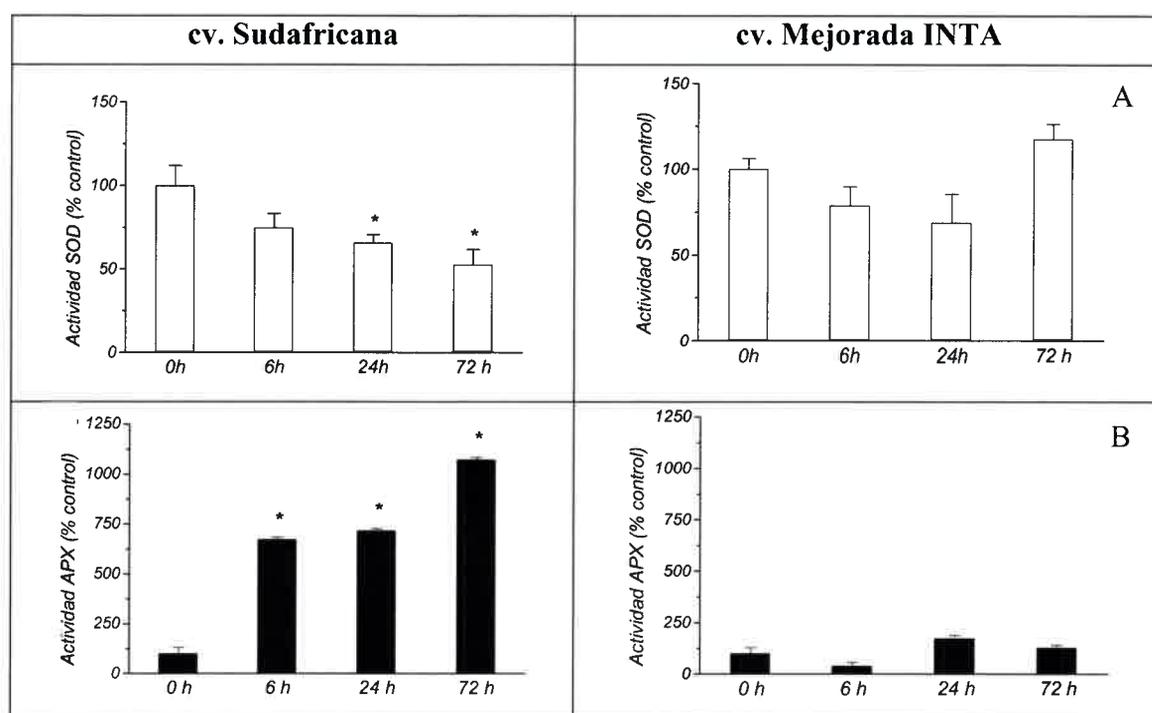


Fig. 34. Defensa antioxidante enzimática en hojas de *Digitaria eriantha* cvs. Sudafricana y Mejorada INTA a 6, 24 y 72 h de estrés por frío. Datos expresados como media  $\pm$  ES (n = 6). \* Indica valores que difieren significativamente a  $P \leq 0,05$ . A: Superóxido dismutasa. B: Ascorbato peroxidasa.

## 8.2. Antioxidantes no enzimáticos

La Tabla 2 muestra el contenido de glutatión reducido (GSH) y de tioles no proteicos (TNP) en ambos cultivares de *Digitaria eriantha* en hojas control y sometidas a baja temperatura por períodos de 6, 24 y 72 h.

En todos los tratamientos, el nivel de GSH fue superior en el cv. Mejorada INTA respecto a Sudafricana. Sin embargo, en ambos cultivares no se

encontraron diferencias significativas en el contenido de este antioxidante frente al frío.

En las hojas de ambos cultivares se observó un incremento significativo de TNP a las 24 y 72 h de estrés por frío, respecto a hojas de plantas control.

Tabla 2. Contenido de GSH y TNP en hojas de *Digitaria eriantha* cvs. Sudafricana y Mejorada INTA. Datos expresados como media  $\pm$  ES (n = 5). \* Indica valores que difieren significativamente a  $P \leq 0,05$ .

Cultivar	Tiempo (h)	GSH ( $\mu$ M GSH. $g^{-1}$ PF)	TNP (mM DTNB. $g^{-1}$ PF)
Sudafricana	0 h	1251,73 $\pm$ 58,5	66,89 $\pm$ 3,62
	6 h	1375,66 $\pm$ 47,2	91,79 $\pm$ 7,65
	24 h	1156,07 $\pm$ 103,9	<b>122,04 <math>\pm</math> 8,48*</b>
	72 h	1437,63 $\pm$ 133,8	<b>151,05 <math>\pm</math> 16,40*</b>
Mejorada INTA	0 h	2171,5 $\pm$ 165,9	56,394 $\pm$ 4,35
	6 h	1893,0 $\pm$ 129,4	47,816 $\pm$ 5,20
	24 h	2660,9 $\pm$ 251,0	<b>112,45 <math>\pm</math> 6,0*</b>
	72 h	2732,4 $\pm$ 104,4	<b>112,94 <math>\pm</math> 3,0*</b>

Los resultados obtenidos para cada cultivar se resumen en las Fig. 35 y 36. En el cv. Sudafricana los cambios en la defensa antioxidante y el incremento en el contenido de MDA, sugieren que las bajas temperaturas inducirían la producción de EROs, lo cual indica la existencia de un desbalance entre los antioxidantes y pro-oxidantes celulares. Por el contrario, en el cv. Mejorada INTA, la estabilidad de las defensas antioxidantes y en el contenido de MDA, sugieren que el frío no modifica el estado óxido-reducción de las células.

Fig. 35. Cultivar Sudafricana

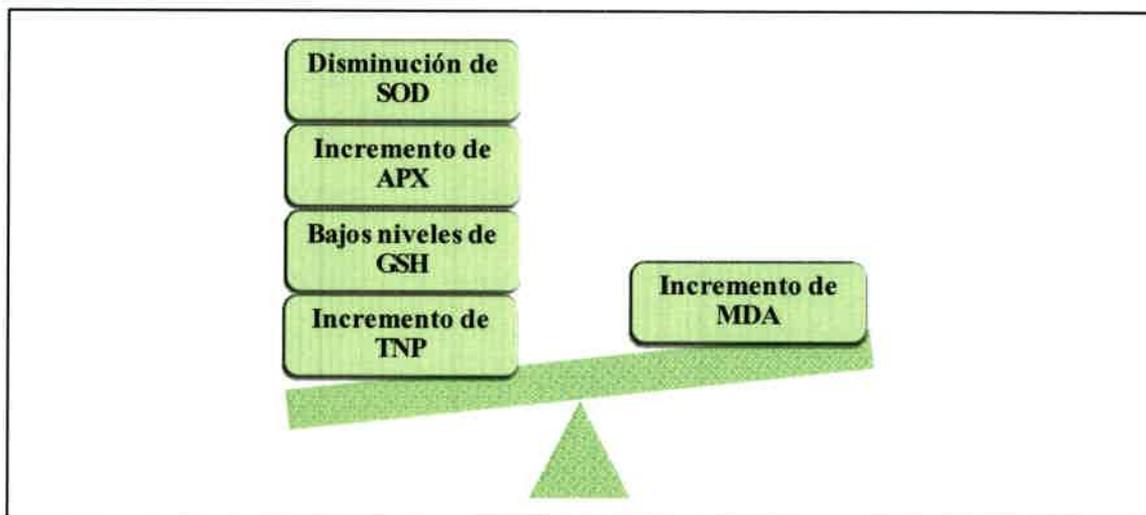


Fig. 36. Cultivar Mejorada INTA



# ***DISCUSIÓN***

*ESTRÉS POR FRÍO EN Digitaria eriantha: FORRAJERA PROMISORIA PARA ZONAS SEMIÁRIDAS*

## DISCUSIÓN

El efecto de las bajas temperaturas sobre una planta puede causar alteraciones metabólicas que determinen diferentes grados de sensibilidad a este factor de estrés. El propósito de este trabajo fue establecer si *Digitaria eriantha* cv. Mejorada INTA mostraba respuestas particulares que no se encontraban presentes en el cv. Sudafricana y que determinaron su mayor tolerancia al frío.

Algunos autores sugieren que el incremento de peso fresco refleja con más precisión el efecto de las bajas temperaturas en el crecimiento de los órganos de una planta. Esto es debido a que durante la aclimatación al frío una importante fracción del incremento en peso fresco corresponde a la deposición de muchos solutos, incluyendo carbohidratos no estructurales, proteínas, lípidos y aminoácidos (Levitt, 1980), mientras que el contenido celular de agua no es afectado (Tanino y col., 1990; Tognetti y Pontis, 1992). Las plantas de *D. eriantha* del cv. Sudafricana detuvieron su crecimiento por efecto del frío hecho demostrado en parámetros de peso fresco (PF), peso seco (PS) y longitud de los órganos vegetativos. Dado que *D. eriantha* es una especie forrajera, la reducción del crecimiento de las hojas es un efecto desfavorable que afecta el rendimiento futuro del cultivo. Además, el PF y el PS de las hojas de este cultivar se mantuvieron disminuidos aún en condiciones favorables luego del estrés, sugiriendo que el frío afecta fuertemente el crecimiento.

En Mejorada INTA, el peso fresco foliar (PFF), peso seco foliar (PSF), peso seco radicular (PSR), longitud foliar (LF) y longitud radicular (LR) se incrementaron luego de la exposición a baja temperatura (incluso a 72 h), evidenciando la existencia de estrategias de adaptación al frío que permitieron su crecimiento en estas condiciones. Además, Ercoli y col. (2004) proponen que la tolerancia al frío puede ser estimada por la habilidad de la planta de recuperarse luego de la interrupción de la exposición a la baja temperatura. En nuestro caso las plantas de Mejorada INTA evidenciaron una buena recuperación en el PFF y PSF, demostrando que este cultivar tiene la habilidad de recuperar rápidamente su crecimiento pocos días después del estrés por frío.

La producción potencial de biomasa de una planta depende de su estado fisiológico, por lo tanto un considerable descenso en el crecimiento y en la fotosíntesis, promueven la disminución del PS total. Así, los parámetros como PF

y PS varían en forma conspicua cuando las plantas crecen en condiciones de estrés. La productividad frente a condiciones de crecimiento adversas está directamente relacionada a los procesos de partición del PS y a la distribución temporal de biomasa (Willekens y col., 1997).

Asimismo, la pérdida de clorofila bajo estrés por frío ha permitido en cierta manera cuantificar el grado de daño que sufre la planta (Janowiak y Dörffling, 1996). Los cambios en el contenido de clorofilas a menudo son asociados con alteraciones en la actividad fotosintética en plantas sometidas a estrés abiótico (Molina y col., 2008). En nuestros resultados el cv. sensible Sudafricana disminuyó el contenido de las clorofilas *a* y *b*, lo que evidencia daños en el aparato fotosintético que probablemente determinan la disminución de los parámetros de crecimiento. Por el contrario, en el cv. Mejorada INTA el contenido de clorofilas no fue afectado, hecho que permitió a las plantas mantener su capacidad fotosintética y continuar creciendo.

Los estudios anatómicos realizados en *Digitaria eriantha* revelaron alteraciones en los tejidos del brote principal inducidas por frío. Algunas células presentaron su contenido celular precipitado y adquirieron una coloración anormal, diferente al característico color celeste de estos tejidos; esta coloración anormal probablemente se relacione a la presencia de antocianinas. El daño causado por el frío fue progresivo en los tejidos de ambos cultivares de *D. eriantha*, aunque más severos en Sudafricana en todos los tiempos de estrés.

El macollaje es uno de los rasgos agronómicos más importantes ya que el número de macollo por planta determina la productividad y el rendimiento del cultivo durante la estación de crecimiento. En nuestros resultados, la anatomía de los tallos del cv. Sudafricana mostraron daños en el brote principal que pueden afectar el crecimiento de la planta, y daños en las yemas axilares que pueden reprimir la producción de macollos. Este hecho es confirmado, al menos en parte, por el bajo PF y PS de hojas durante el período de recuperación.

En ambos cultivares la anatomía de la epidermis adaxial y abaxial y del parénquima de las hojas no mostró alteraciones inducidas por las bajas temperaturas. Sin embargo, los cloroplastos amiláceos del cv. Sudafricana manifestaron cambios anatómicos que probablemente afecten su funcionalidad. Esto concuerda con el descenso en los niveles de clorofila a las 72 h y con los aumentos en los niveles de OPDA, el cual se sintetiza a partir de las membranas

de los cloroplastos (Weber, 2002; Buseman y col., 2006; Boettcher y Weiler, 2007) dañadas, en este caso, por el estrés por frío, que liberaría ácidos grasos como el linolénico e iniciaría la síntesis de OPDA. En el cv. Mejorada INTA los cloroplastos amiláceos a pesar de observarse hinchados mantuvieron su forma característica. Paralelamente, los niveles de clorofilas y OPDA se mantuvieron constantes, revelando una mayor tolerancia a las bajas temperaturas.

La ultraestructura de las láminas foliares de ambos cultivares de *D. eriantha* fue analizada en plantas control y tratadas con 72 h de frío. La disminución del tamaño y número de gránulos de almidón de los cloroplastos en el cv. Sudafricana inducidos por las bajas temperaturas coincide con lo reportado por otros autores (Kratsch y Wise, 2000). En plantas de *cucumber*, incrementos en el contenido de MDA han sido asociados con cambios ultraestructurales en las membranas de los cloroplastos causados por el frío (Xu y col., 2008). Por lo tanto, los cambios observados en los cloroplastos de la vaina en el cv. Sudafricana pueden estar relacionados con el incremento de MDA reportado previamente en este cultivar (Garbero y col., 2011). Por otra parte, en el cv. Mejorada INTA los cloroplastos de plantas control se observaron más pequeños que en Sudafricana, no obstante, luego de 72 h de frío manifestaron menor daño; diferencias similares han sido encontradas en la ultraestructura de cloroplastos en cultivares de *Cucumis sativus* con diferente tolerancia al frío (Xu y col., 2008).

Además, las células de la vaina de ambos cultivares presentaron una fuerte retracción de la pared celular que probablemente incide en la deformación de los cloroplastos amiláceos. En Sudafricana los cloroplastos amiláceos fueron más dañados que en Mejorada INTA, lo que confirmaría los cambios observados en los estudios anatómicos. Asimismo, las mitocondrias permanecieron inalteradas por el estrés por frío en ambos cultivares, coincidiendo con lo informado para otras especies (Nessler y Wernsman, 1980; Wise y Naylor, 1987).

Dado que el crecimiento está relacionado a las condiciones ambientales en las que se desarrolla la planta, es factible que las hormonas que lo promueven también lo estén.

Estudios anteriores han determinado que las bajas temperaturas afectan el transporte y la señalización de la auxina ácido indol-3-acético (AIA) en plantas de *Arabidopsis* (Shibasaki y col., 2009). Además, Bai y col. (2011) encontraron un rápido incremento de AIA en hojas y raíces de dos especies de *Malus* con

diferente tolerancia a hipoxia. Los autores sugieren que existiría un rol esencial de AIA en las respuestas fisiológicas de las raíces al estrés, que estaría relacionado con la inducción del crecimiento de la planta y contribuiría a tolerar el exceso de agua.

Por otra parte, las variaciones de los niveles de CQs en respuesta a factores abióticos son diferentes de acuerdo a la especie evaluada. En poroto, los contenidos de citocininas se incrementaron frente a estrés salino, particularmente por un aumento en los niveles de ribósidos en raíces (Atanassova y col., 1999). Por el contrario, en cultivares de cebada, las CQs descendieron en tallos y hojas luego de un incremento en la concentración de NaCl (Kuiper y col., 1990).

En nuestro estudio, la evaluación de AIA en el cv. Sudafricana manifestó una reducción mayor al 60% respecto al control en todos los tratamientos a baja temperatura. Similar a estos resultados, Yurekli y col. (2004) encontraron que en plantas de *Phaseolus vulgaris* sensibles a salinidad, los niveles de AIA disminuían luego de la aplicación de NaCl. Asimismo, en el cv. Sudafricana también se encontraron reducciones en el nivel de iP. En otros estudios, la prolongada exposición a bajas temperaturas alargó la duración del ciclo celular y condujo a un descenso en el crecimiento de las plantas, indicando que la alteración de CQs podría ser parte de una vía de regulación frente a estrés (Xia y col., 2009).

En contraposición, en el cv. tolerante Mejorada INTA el nivel de AIA se incrementó a las 24 y 72 h de estrés. Esta respuesta coincide con los incrementos de AIA hallados en la especie tolerante a salinidad *Phaseolus acutifolius* luego de 48 y 72 h de tratamiento con NaCl (Yurekli y col., 2004). Respecto a las CQs, en Mejorada INTA sólo se observó un suave descenso de citocininas a las 24 h de frío manteniendo luego sus niveles.

Los resultados de CQs indican que iP e iPA estarían implicadas en el crecimiento de *Digitaria eriantha* bajo condiciones ambientales estresantes, aunque no se descarta que DHZ y RDHZ (que fueron detectados en el control y a las 6 h) tengan algún rol en la respuesta de las plantas al frío.

Las CQs también pueden afectar parámetros fotosintéticos como síntesis y degradación de cloroplastos; acumulación de clorofilas y proteínas fotosintéticas, estructura y ultraestructura de cloroplastos, transporte de electrones y actividad enzimática (Synková y col., 1997). En el cv. Sudafricana, el aumento en el

contenido de clorofila *a* y *b* a las 6 h de estrés coincidió con el pico de concentración de DHZ y RDHZ; asimismo, los niveles de clorofila *b* disminuyeron significativamente a las 72 h, conforme descende el nivel total de CQs. Por el contrario, en el cv. Mejorada INTA los niveles de clorofilas *a* y *b* se mantuvieron estables frente a los tratamientos con baja temperatura al igual que las citocininas.

Los resultados encontrados en el cv. Sudafricana permiten elaborar un perfil de respuesta al estrés que ayuda a entender su sensibilidad al frío. La baja temperatura disminuyó los niveles de AIA y CQs; la reducción de iP e iPA inducirían la disminución en el contenido de las clorofilas *a* y *b*, lo que evidencia alteraciones en la actividad fotosintética. Estas alteraciones inducidas por el frío se ven reflejadas en la disminución de los parámetros de crecimiento. Por el contrario, en el cultivar tolerante Mejorada INTA las hormonas de crecimiento y las clorofilas no son afectadas por la baja temperatura y determinan que las plantas continúen creciendo.

Además, en el cv. Sudafricana se observaron mayores contenidos endógenos basales de auxina y citocininas respecto a Mejorada INTA, este hecho se manifiesta en el mayor crecimiento inicial observado en Sudafricana (Fig. 9, 10 y 11); sin embargo, los niveles hormonales y el crecimiento de este cultivar son más afectados luego de la aplicación del frío (Fig. 25, 26 y 27). Es probable que los bajos niveles hormonales observados en el cv. Mejorada INTA sea otro factor que determine la mayor tolerancia a bajas temperaturas.

A pesar de que JA y ABA han sido muy bien descritos como señales químicas involucradas en estrés biótico y abiótico, es aún limitada la información que relaciona ambas hormonas con el factor ambiental de bajas temperaturas. Nuestra evaluación de JAs en follaje de *Digitaria* establece una estrecha relación entre estos compuestos, el crecimiento y el estrés por frío (Garbero y col., 2011). Las hojas del cv. Sudafricana presentaron un contenido basal menor que el cv. Mejorada INTA y el tratamiento con frío disminuyó no sólo el contenido de JA sino también el de 12-OH-JA. De esta forma, se muestra una estrecha relación de la sensibilidad al frío del cv. Sudafricana con el bajo contenido de JA y su hidroxilado 12-OH-JA. El leve incremento de OPDA a las 72 h en respuesta al tratamiento con frío en el cv. Sudafricana puede ser explicado como una consecuencia del daño en las membranas; el estrés por frío podría liberar OPDA

de las formas esterificadas de monogalactosyl diacyl glycerol-OPDA, especialmente en membranas de cloroplastos. Otra posibilidad sería la liberación de ácidos grasos monogalactosyl diacyl glycerol de la membrana para la posterior biosíntesis de OPDA (Weber, 2002; Buseman y col., 2006; Boettcher y Weiler, 2007). Mientras que en Mejorada INTA, el frío no produjo diferencias en el nivel de OPDA respecto al control.

En *Digitaria* las diferencias en la acumulación de OPDA/JA/12-OH-JA son indicadores de la participación de estos compuestos en la respuesta diferencial de ambos cultivares al estrés. Así, la inducción de numerosos genes por JA/JAME (metil jasmónico), aunque no por 12-OH-JA sugiere que la acumulación diferencial de JAs contribuiría a estimular la expresión de algunos genes en combinación con la disminución de la expresión causada por JA hidroxilado (Miersch y col., 2008). Por lo tanto, la hidroxilación de JA podría representar un bloqueo en la señal de JA a través de la estimulación de algunos genes y una fuerte represión de otros.

La hormona JA fue primeramente asociada como molécula señal en respuesta a ataques de patógenos, sin embargo es probable que los daños asociados a las bajas temperaturas induzcan respuestas similares a aquellas provocadas por estrés biótico en plantas (Wong y col., 2006). Se ha demostrado que la aplicación de JAME reprime genes regulados por frío (COR) (Jung y col., 2007) y además, este compuesto puede ser usado para reducir los daños por frío en frutos (González-Aguilar y col., 2004). Por otra parte, se han encontrado cambios en los niveles de transcriptos relacionados a JA luego de la aplicación de frío (Wong y col., 2006).

La complejidad de las respuestas que las especies presentan frente al estrés por frío revelan claramente que las mismas no se producen de manera aisladas sino que trabajan en conjunto con numerosas moléculas señales, entre ellas el ácido abscísico.

Estudios anteriores revelaron que genotipos de maíz con mayor tolerancia al frío acumularon más cantidades de ácido abscísico que los genotipos sensibles, lo que indicaría la existencia de un rol protector de ABA (Janowiak y col., 2002). Además, genes regulados por frío (COR) aumentaron sus niveles de expresión frente a tratamientos con ABA (Wang y col., 1995).

Nuestros resultados (Garbero y col., 2011) muestran altos incrementos en los niveles de ABA en el cv. Mejorada INTA que pueden estar relacionados a la mayor tolerancia a las bajas temperaturas que presenta este cultivar. Por otra parte, los niveles de los catabolitos de ABA frente a baja temperatura fueron marcadamente diferentes entre los cultivares. Los niveles de PA, DPA y ABA-GE en hojas de Sudafricana descendieron. Sin embargo, en Mejorada INTA se observó sólo un incremento de ABA-GE. Estos resultados sugieren que en el cv. Mejorada INTA, los incrementos en los niveles de ABA son producidos por síntesis de novo y no por la interrupción de la vía catabólica que inactiva a ABA por oxidación. Las diferencias observadas en ABA y sus catabolitos entre los dos cultivares de *Digitaria eriantha* serían otros puntos importantes que determinan la mayor tolerancia del cv. Mejorada INTA a las bajas temperaturas.

Por otra parte, la interacción entre JA y ABA ha sido estudiada en plantas sometidas a estrés biótico. Adie y col. (2007) sugieren que ABA regula la expresión de genes de defensa a través de la activación de la biosíntesis de JA luego de la infección con patógenos. Sin embargo, una interacción antagonista entre ABA y la señalización con jasmonato-etileno ha sido observada en la expresión de genes de defensa y resistencia a enfermedades (Anderson y col., 2004). Así mismo, estudios posteriores realizados en *Arabidopsis thaliana* frente a estrés abiótico sugieren que JAME afecta la expresión de genes relacionados a ABA involucrados en la respuesta al estrés abiótico (Huang y col., 2008), existiendo un efecto antagonista entre JA y ABA (Jung y col., 2007). Nuestros resultados muestran incrementos en el nivel de ABA que son acompañados por la disminución en el contenido de JA revelando una misma respuesta a las bajas temperaturas en ambos cultivares de *D. eriantha*.

Considerando los cambios diferenciales en JAs y ABA y catabolitos causados por el frío en los dos cultivares de *Digitaria eriantha* analizados, en este trabajo también se intenta establecer correlaciones entre estrés por frío, respuesta del sistema de defensa antioxidante y variaciones hormonales.

Del análisis de los resultados surge que el frío provocó un incremento en los niveles de MDA mayor al 65% a las 24 y 72 h de estrés respecto al control, en follaje de Sudafricana y no se observaron cambios en el cv. Mejorada INTA. Puesto que la estabilidad de la membrana puede ser un indicativo de tolerancia a estreses y ser relacionado con una mayor adaptación a campo (Premachandra y

col., 1991; Premachandra y col., 1992), la acumulación de MDA en el cv. Sudafricana podría estar directamente vinculada con la mayor sensibilidad al frío que presenta este cultivar.

El estrés oxidativo es provocado por incrementos en los niveles de EROs y para aliviar sus efectos las plantas están equipadas con un sistema de defensa antioxidante enzimático, que incluye entre otras enzimas a SOD y APX. En el cv. Sudafricana el descenso en la actividad de SOD y el marcado incremento en la actividad de APX, sugiere que habría un aumento de  $H_2O_2$  frente a las bajas temperaturas. El incremento observado en la actividad de APX coincide con lo reportado por otros autores en callos de *Arabidopsis thaliana* y plántulas de arroz expuestas a bajas temperaturas (O'Kane y col., 1996; Kank y Saltveit, 2002). El balance entre la actividad de SOD y APX en células es crucial para determinar el nivel del radical superóxido y de  $H_2O_2$  (Dorey y col., 1998). Recientemente se ha sugerido que  $H_2O_2$  cumple un rol central en las vías de regulación, particularmente en los mecanismos de respuesta temprana (24 h) luego del estrés por frío (Yun y col., 2010). Como SOD es usualmente considerada la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo, el descenso de la actividad de esta enzima puede ser uno de los factores que determinan la sensibilidad al frío del cultivar Sudafricana. Por el contrario, las actividades de SOD y APX no presentaron cambios significativos en el cv. Mejorada INTA, indicando que estos resultados son consistentes con la estabilidad en los contenidos de MDA.

La defensa antioxidante no enzimática, que incluye entre otros compuestos a los tioles no proteicos (TNP) estaría activada como otra respuesta a estrés por frío, ya que en ambos cultivares de *Digitaria eriantha* se observó un incremento significativo de estos compuestos. Sin embargo, el cv. Mejorada INTA duplicó el valor del cv. Sudafricana en todos los tratamientos, siendo éste otro punto diferencial entre ambos cultivares, que probablemente estén involucrados en la mayor resistencia frente al estrés por frío del cv. Mejorada INTA. Los TNP, cuando no son usados para la síntesis de fitoquelatinas, son utilizados para remover el  $H_2O_2$  convirtiéndolo a agua vía el camino de Halliwell-Asada, junto con APX.

Glutación reducido (GSH) es el mayor TNP en las plantas, es un componente común en las células y desempeña variadas funciones en el metabolismo. En hojas de ambos cultivares de *Digitaria eriantha* se observó una

tendencia a la acumulación de GSH frente al estrés por frío. El aumento del contenido de GSH en las plantas puede ser un paso crítico para reducir los daños del estrés y las fluctuaciones de este compuesto pueden ser consideradas como un indicador del estado redox de las células de vegetales (Kocsy y col., 2000a, b; Kocsy y col., 2001).

En general, en tiempos breves de tratamiento con frío (6 h) no se observan diferencias respecto al control en los parámetros de estrés oxidativo y hormonales en ambos cultivares, así las respuestas comienzan a explicitarse recién a las 24 y 72 h, debido quizá a que la generación de compuestos de defensa requiere cierta acumulación de horas frío para generarse.

Uno de los eventos provocado por la peroxidación de los lípidos y la acumulación de  $H_2O_2$  es la inducción de la vía de señalización de los JAs (Zhao y col., 2001). Maksymiec y col. (2007) postularon que los JAs pueden influir directamente en procesos oxidativos y modificar la respuesta a factores de estrés.

Recientemente, se ha establecido un nexo entre los JAs y  $O^{2-}$  a través de aplicaciones exógenas de JA y JAME. En cultivo de raíces de *Panax ginseng* JAME causó una disminución de la actividad de SOD y se indujo la formación de  $O^{2-}$ ; asimismo, se incrementó la actividad de APX. Así, la alteración en la actividad de enzimas antioxidantes causadas por JAME puede prevenir el estrés oxidativo a pesar del incremento en la formación de  $O^{2-}$  (Babar Ali y col., 2006). En concordancia, la “elicitación” con JA en un cultivo celular de *Morinda elliptica* produjo un incremento en APX hasta el día 3, pero la actividad de esta enzima luego de 6 días decayó abruptamente (Chong y col., 2005).

También ABA, ha sido asociado a la actividad de enzimas antioxidantes, dando un cierre a las diferentes respuestas antioxidantes. Por ejemplo, aplicación de ABA a plántulas de maíz incrementó la actividad de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Jiang y Zhang, 2001; 2002).

Nuestros resultados (Garbero y col., 2011) muestran un marcado incremento en los niveles de ABA en ambos cultivares de *Digitaria eriantha* sumándose a los restantes mecanismos de control del estrés frente a bajas temperaturas. En contraste con lo observado por otros autores que utilizaron ABA exógeno, en el cv. Mejorada INTA no se observaron incrementos en la actividad de las enzimas antioxidantes y sólo hubo un aumento significativo en los niveles de TNP, sugiriendo que ABA protegería a las células del daño

oxidativo. Esto coincidiría con lo informado por Agarwal y col. (2005), quienes encontraron un descenso significativo del estrés oxidativo en plántulas de trigo tratadas con ABA.

En el cv. Sudafricana los aumentos de ABA estuvieron acompañados por importantes incrementos en la actividad de APX y en los contenidos de TNP, pero a pesar de ello también aumentaron los niveles de MDA, lo cual demostraría que este cultivar pone en juego todos los mecanismos de defensa, probablemente debido a su mayor sensibilidad al frío.

Los diversos parámetros evaluados en este trabajo mostraron respuestas diferentes al frío según el cultivar. Además de afectar el crecimiento y producir alteraciones anatómicas, se pone en evidencia la interacción existente entre los cambios hormonales, la alteración de indicadores bioquímicos, lo que revela la complejidad de las respuestas al estrés por frío relacionadas con la sensibilidad/tolerancia a este factor de estrés.

Para una mejor comprensión de los resultados obtenidos en la Fig. 37 se integran las respuestas de ambos cultivares al estrés por frío.

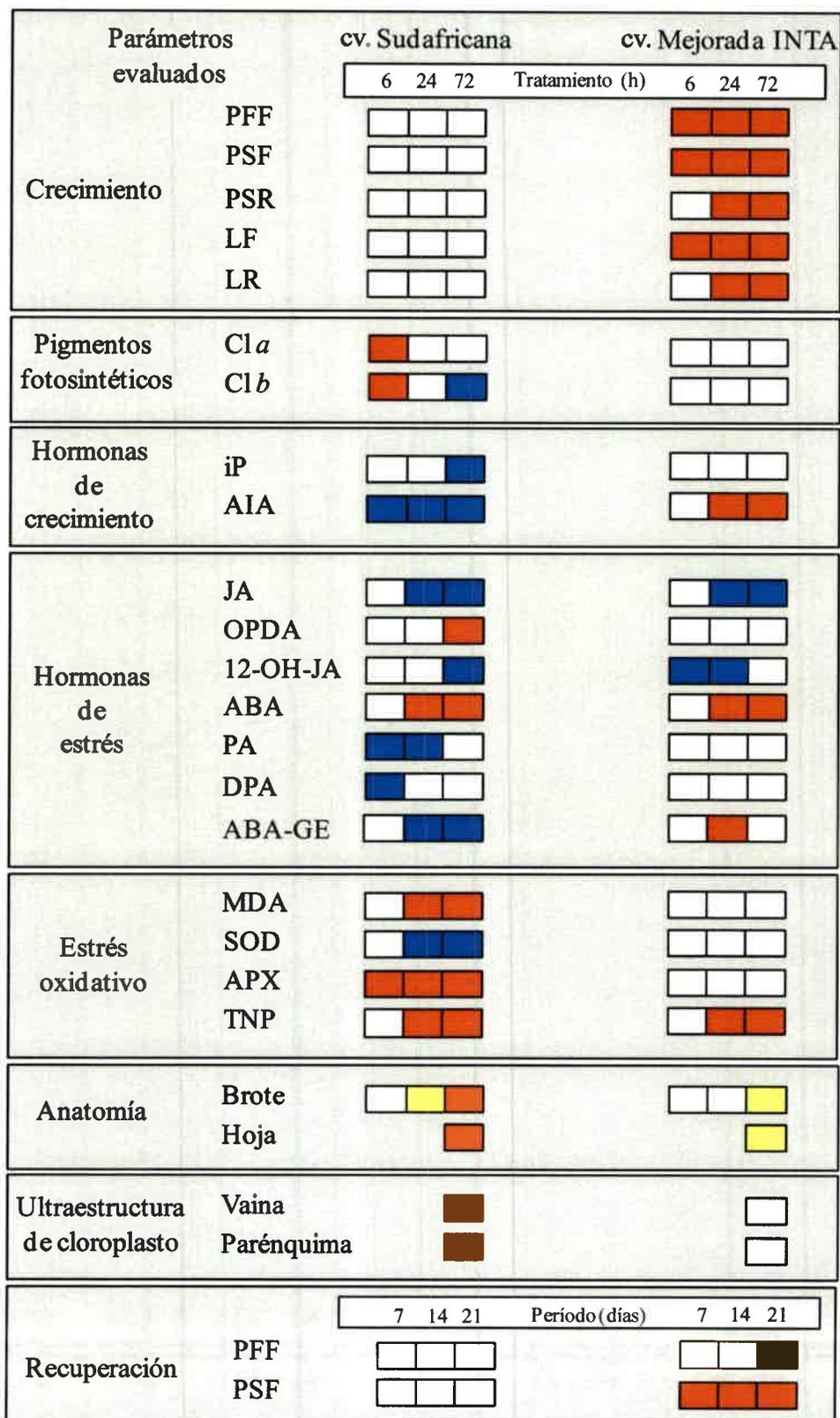


Fig. 37. Respuestas de *Digitaria eriantha* cvs. Sudafricana (sensible) y Mejorada INTA (tolerante) al estrés por frío. Referencias: Rojo: Incremento; Azul: Descenso; Blanco: Sin cambios; Amarillo: Leves cambios; Naranja: Daños significativos.

# **CONCLUSIONES**

*ESTRÉS POR FRÍO EN Digitaria eriantha: FORRAJERA PROMISORIA PARA ZONAS SEMIÁRIDAS*

## CONCLUSIONES

A partir de los estudios realizados en ambos cultivares de *Digitaria eriantha* se desarrollaron modelos de respuesta al estrés por frío.

El diagrama de respuesta del cv. Sudafricana y las conclusiones que se desprenden de él se enuncian a continuación.

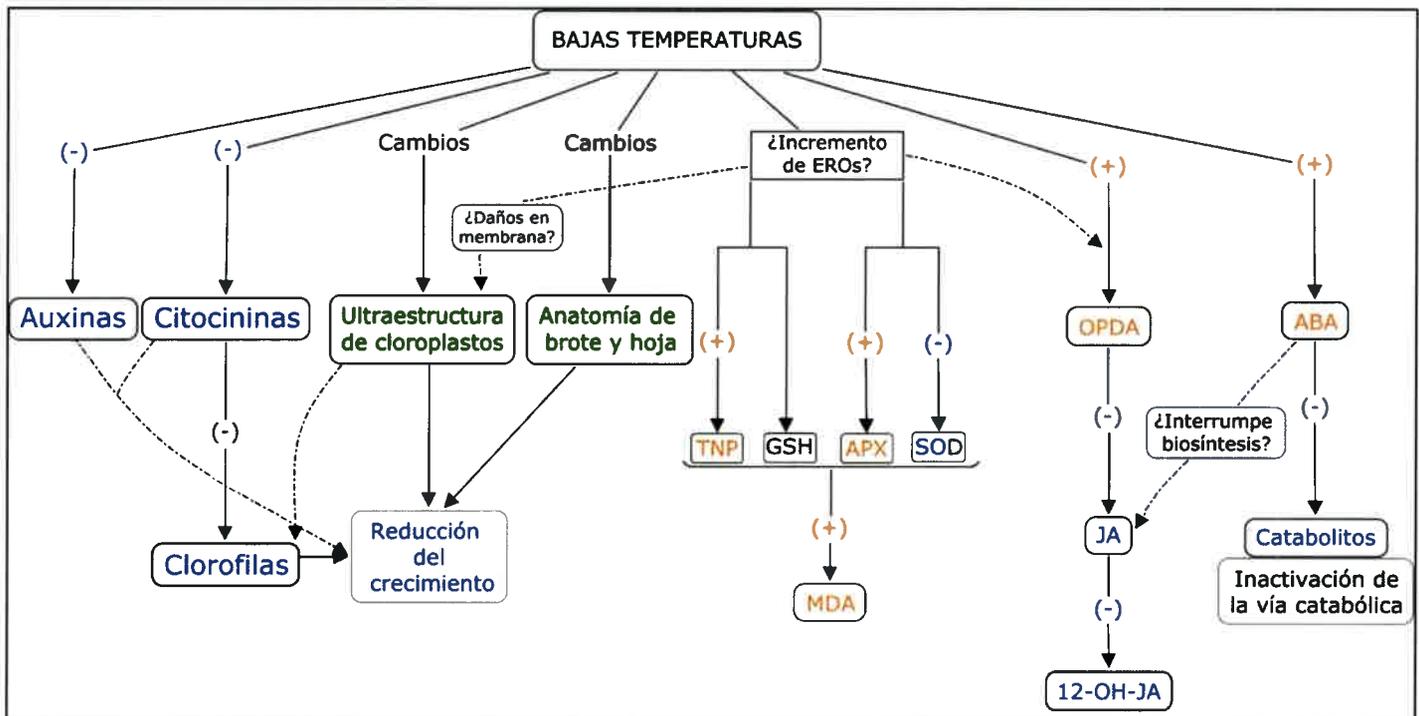


Fig. 38. Modelo de las respuestas observadas en *Digitaria eriantha* cv. Sudafricana frente a estrés con bajas temperaturas sobre parámetros hormonales, bioquímicos, anatómicos y la interrelación entre ellos. ABA, ácido abscísico; APX, ascorbato peroxidasa; EROs, especies reactivas al oxígeno; JA, ácido jasmónico; OPDA, ácido 12-oxofitodienoico; SOD, superóxido dismutasa; MDA, malondialdehído; TNP, tioles no proteicos; 12-OH-JA, 12-hidroxi-jasmónico.

Referencias: Azul, Descenso; Naranja, Incremento, Verde: Alteraciones; Líneas punteadas, hipótesis; Letras grandes: Valores endógenos superiores al otro cultivar.

- El estrés por frío produjo el descenso de AIA y citocininas (particularmente iP) acompañado de la reducción en el contenido de clorofilas, determinando la detención del crecimiento.
- Las modificaciones en el brote de las plantas que afectan a la yema apical y las yemas axilares contribuyen a la disminución del crecimiento y afectan la producción de futuros macollos.
- Los cambios anatómicos de las hojas, confirmados por estudios ultraestructurales, y la disminución de clorofilas indican daños en el aparato fotosintético.
- El frío probablemente produce aumentos de EROs que inducen el incremento de TNP y la modificación de la actividad de enzimas antioxidantes, sin embargo aumenta el MDA sugiriendo daños en las membranas celulares.
- Las EROs determinarían los aumentos de OPDA, no obstante la disminución de los niveles de JA y 12-OH-JA indican la interrupción de la biosíntesis de estos JAs, mediada probablemente por ABA.
- La sensibilidad al frío está relacionada a los bajos niveles endógenos de JA y 12-OH-JA.
- La baja temperatura indujo incrementos en ABA e inactivación de la vía catabólica.

El diagrama de respuesta del cv. Mejorada INTA y las conclusiones que se desprenden de él se enuncian a continuación.

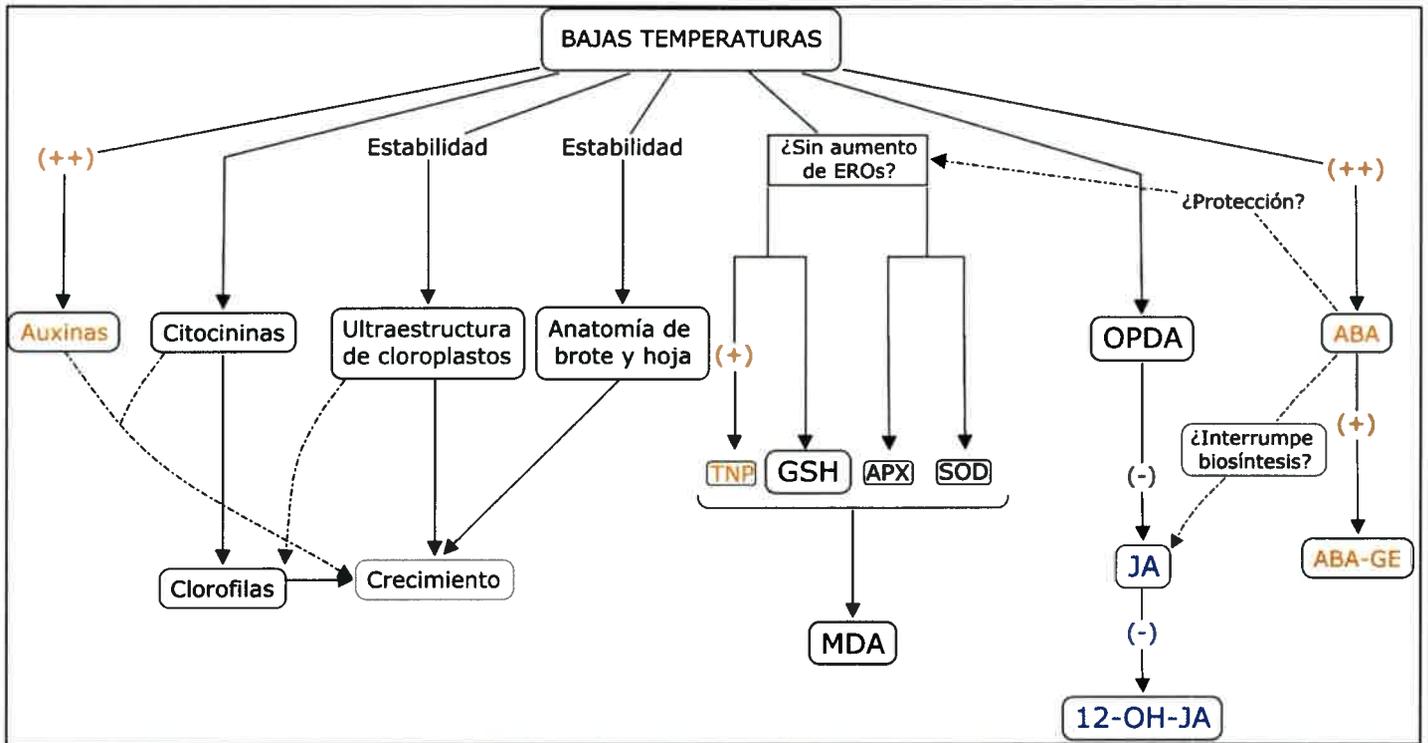


Fig. 39. Modelo de las respuestas observadas en *Digitaria eriantha* cv. Mejorada INTA frente a estrés con bajas temperaturas sobre parámetros hormonales, bioquímicos, anatómicos y la interrelación entre ellos. ABA, ácido abscísico; ABA-GE, ácido abscísico ester glucosa; APX, ascorbato peroxidasa; JA, ácido jasmónico; OPDA, ácido 12-oxofitodienoico; SOD, superóxido dismutasa; MDA, malondialdehído; TNP, tioles no proteicos; 12-OH-JA, 12-hidroxi-jasmónico.

Referencias: Azul, Descenso; Naranja, Incremento, Líneas punteadas, hipótesis, Letras grandes: Valores endógenos superiores al otro cultivar.

- Los incrementos de auxinas y la estabilidad de citocininas y clorofilas determinan la continuidad del crecimiento y la rápida recuperación luego del frío.
- La estructura anatómica de tallos y hojas y la ultraestructura de cloroplastos no fue modificada y favoreció el crecimiento.
- La baja temperatura no produciría aumentos de EROs o bien éstos son controlados por el incremento de TNP y los altos niveles endógenos de GSH. La estabilidad en el nivel de MDA revelaría que no existen daños en las membranas celulares.
- La tolerancia al frío está relacionada a los altos niveles endógenos de GSH, JA y 12-OH-JA, y a la estabilidad de la actividad de las enzimas antioxidantes.
- ABA interrumpiría la formación de JA y su hidroxilado 12-OH-JA.
- Los altos incrementos de ABA están relacionados con la tolerancia al frío. Además ABA estaría implicado en la protección celular del ataque de las EROs.



# **BIBLIOGRAFÍA**

*ESTRÉS POR FRÍO EN Digitaria eriantha: FORRAJERA PROMISORIA PARA ZONAS SEMIÁRIDAS*

**BIBLIOGRAFÍA**

- Adie B.A.T., Pérez-Pérez J., Pérez-Pérez M.M., Godoy M., Sánchez-Serrano J-J., Schmelz E.A., Solano R. 2007 ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19: 1665-1681
- Agarwal S., Sairam R.K., Srivastava G.C., Meena R.C. 2005 Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Biologia Plantarum* 49: 541-550
- Allen D.J., Ort D.R. 2001 Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends Plant Science* 6: 36-42
- Anderson J.M., Chow W.S., Park Y.I. 1995 The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynthesis Research* 46: 129-139
- Anderson J.P., Badruzaufari E., Schenk P.M., Manners J.M., Desmond O.J., Ehlert C., Maclean D.J., Ebert P.R., Kazan K. 2004 Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 3460-3479
- Anderson M.D., Prasad T.K., Martin B.A., Stewart C.R. 1994 Differential gene expression in chilling-acclimated maize seedlings and evidence for the involvement of abscisic acid in chilling tolerance. *Plant Physiol* 105: 331-339
- Andrade A., Vigliocco A., Alemano S., Miersch O., Abdala G. 2005 Endogenous jasmonates and octadecanoids during germination and seedling development: their relation with hypersensitive tomato mutants to abiotic stress. *Seed Sci. Res.* 15: 309-318
- Argueso C.T., Ferreira F.J., Kieber J.J. 2009 Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, Cell and Environment* 2009: 1-14
- Arteca R.N. 1997 Flooding. In Prasad M.N.V. (Ed). *Plant Ecophysiology*. John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, E.E.U.U. pp 151-172
- Ashikari M., Sakakibara H., Lin S., Yamamoto T., Takashi T. 2005 Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 309: 741-45
- Atanassova L.Y., Stoyanov I.G., Pissarska M.G. 1999 Salt-induced responses of endogenous cytokinins in pea plants. *Biologia Plantarum* 42 (Suppl.): S73
- Babar Ali M., Yu K.W., Hahn E.J., Paek K.Y. 2006 Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic

- antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Rep.* 25: 613-620
- Bai T., Yin R., Li C., Ma F., Yue Z., Shu H. 2011 Comparative analysis of endogenous hormones in leaves and roots of two contrasting *Malus* species in response to hypoxia stress. *J Plant Growth Regul.* EN PRENSA. DOI 10.1007/s00344-010-9173-9
- Ball C.R. 1966 Estimation and identification of thiols in rat spleen after cysteine or glutathione treatment: relevance to protection against nitrogen mustards. *Biochem. Pharmacol.* 15: 809-816
- Balsevich J.J., Cutler A.J., Lamb N., Friesen L.J., Kurz E.U., Perras M.R., Abrams S.R. 1994 Response of cultured maize cells to (+)-abscisic acid, (-)-abscisic acid and their metabolites. *Plant Physiology* 106: 135-142
- Beyer F.W., Fridovich I. 1987 Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analyt. Biochem.* 161: 559-566
- Boese S.R., Huner N.P.A. 1990 Effect of growth temperature and temperature shifts on spinach leaf morphology and photosynthesis. *Plant Physiology* 94: 1830-1836
- Boettcher C., Weiler E.W. 2007 cyclo-Oxilipin-galactolipids in plants: occurrence and dynamics. *Planta* 226: 629-637
- Bracale M., Coraggio L. 2003 Chilling and freezing stresses in plantas: cellular response and molecular strategies for adaptation. In: di Troppi L.S. and Pawlick - Skowronska B. (Eds). *Abiotic Stresses in Plants*. Klumer Academic Publishers Box 17, 3300 AA Dordrecht. The Netherlands. pp 23-52
- Bradford M.M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Bueno P., Piqueras A., Kurepa J., Savourè A., Verbruggen N., Montagu M.V., Inzè D. 1998 Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. *Plant Science* 138: 27-34
- Buseman C.M., Tamura P., Sparks A.A., Baughman E.J., Maatta S., Zhao J., Roth M.R., Esch S.W., Shah J., Williams T.D., Welti R. 2006 Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* 142: 28-39
- Bussotti F., Bettini D., Grossoni P., Mansuino S., Nibbi R., Soda C., Tani C. 2002 Structural and functional traits of *Quercus ilex* in response to water availability. *Environmental and Experimental Botany* 47: 11-23

- Castelli S.L., Grunberg K., Muñoz N., Griffa S., López Colomba E., Ribotta A., Biderbost E., Luna C. 2010 Oxidative damage and antioxidant defenses as potential indicators of salt-tolerant *Cenchrus ciliaris* L. genotypes. *Flora* 205: 622-626
- Chen G.X., Asada K. 1989 Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isoenzymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol.* 30, 987
- Chong T.M., Abdullah M.A., Fadzillah N.M., Lai O.M., Lajis N.H. 2005 Jasmonic acid elicitation of anthraquinones with some associated enzymes and non-enzymic antioxidant response in *Morinda alliptica*. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 469-477
- Conconi A., Smerdon M.J., Howe G.A., Ryan C.A. 1996 The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature* 383: 826-829
- Cook B.G., Pengelly B.C., Brown S.D., Donnelly J.L., Eagles D.A., Ranco M.A., Hanson J., Mullen B.F., Partridge I.J., Peters M., Schultze-Kraft R. 2005 Tropical Forages: an interactive selection tool., CD-ROM, CSIRO, DPI F (Qld), CIAT and ILRI, Brisbane, Australia
- CUANDO EL INGENIO HACE LA DIFERENCIA. 2009 Diario La Nación. 12 de diciembre de 2009. Suplemento: Campo. Buenos Aires, Argentina
- Cutler A.J., Squires T.M., Loewen M.K., Balsevich J.J. 1997 Induction of (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase by (+)-abscisic acid in cultured maize cells. *Journal of Experimental Botany* 48: 1787-1795
- Davies P.J. 1995 Plant hormones. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers
- Davies W.J., Zhang J. 1991 Root Signals and the Regulation of Growth and Development of Plants in Drying Soil. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 55-76
- Di Giambatista A. 2006 Efecto del estrés por frío y sequía en parámetros morfofisiológicos de dos especies forrajeras (*Trichloris crinita* "nativa" y *Digitaria eriantha* "introducida"). Pag. 1-101. Tesis de grado. Villa Mercedes. San Luis. Argentina
- Dobrev P.I., Kamínek M. 2002 Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 950: 21-29
- Dombrowski J.E. 2003 Salt stress activation of wound-related genes in tomato plants. *Plant Physiology* 132: 2098-2107

- Dorey S., Baillieul F., Saindrenan P., Fritig B, Kauffmann S. 1998 Tobacco class I and class II catalases are differentially expressed during elicitors-induced hypersensitive cell death and localized acquired resistance. *Mol. Plant-Microbe Interaction* 11: 1102-1109
- Dunstan D.I., Bock C.A., Abrams G.D., Abrams S.R. 1992 Metabolism of (+)-abscisic and (-)-abscisic acid by somatic embryo suspension-cultures of white spruce. *Phytochemistry* 31: 1451-1454
- Elstner E.F. 1991 Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In: Pell E.J. and Steffen K.L. (Eds). *Active oxygen species, oxidative stress and plant metabolism*. Rockville, MD: The American Society of Plant Physiologists. pp 13-25
- Equiza M.A., Miravé J.P., Tognietti J.A. 2001 Morphological, anatomical and physiological responses related to differential shoot root growth inhibition at low temperature in spring and winter wheat. *Annals of Botany* 87: 67-76
- Ercoli L., Mariotti M., Masoni A., Arduini I. 2004 Growth responses of sorghum plants to chilling temperature and duration of exposure. *Europ. J. Agronomy* 21: 93-103
- Escudero C. 2006 Cultivo *in vitro* de una gramínea forrajera introducida en Argentina, *Digitaria eriantha*. Pag. 1-98. Tesis de grado. Villa Mercedes. San Luis. Argentina
- Fernández B., Centeno M.L., Feito I., Sánchez-Tmés R., Rodríguez A. 1995 Simultaneous analysis of cytokinins, auxins and abscisic acid by combined immunoaffinity chromatography, high performance chromatography and immunoassay. *Phytochemical analysis* 6: 49-54
- Feussner I., Wasternack C. 2002 The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 275- 297
- Foyer C.H., Lelandais M., Kunert K.J. 1994 Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant* 92: 696-717
- Foyer C.H., López-Delgado H., Dat J.E., Scott D.I. 1997 Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.* 100: 241-254
- Fraga M.F., Rodriguez R., Cañal M.J. 2000 Rapid quantification of DNA methylation by high performance capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 21: 2990-2994
- Frasinelli C, Martínez Ferrer J., Del Castello E. 1998 Avances en el conocimiento de *Digitaria eriantha*. Resultados preliminares en sistemas de cría e invernada en INTA-Forrajerías Avanzadas
- Frasinelli C., Martínez Ferrer J. 1999 Resultados preliminares en sistemas de cría e invernada. In INTA-Forrajerías Avanzadas S.A. 3º Jornada Técnica sobre Digigrass (*Digitaria eriantha*). Villa Mercedes (SL), Marzo 24: 9-27

- Fridovich I. 1986 Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 58: 61-97
- Gan S., Amasino R.M. 1995 Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270: 1986-1988
- Garbero M., Pedranzani H., Zirulnik F., Molina A., Pérez-Chaca M.V., Vigliocco A., Abdala G. 2011 Short-term cold stress in two cultivars of *Digitaria eriantha*: Effects on stress-related hormones and antioxidant defense system. *Acta Physiologiae Plantarum* 33 (2): 497-507
- Gazeau C.M. 1985 Influence of the temperature and of the duration of a cryoprotective treatment on the cold resistance of wheat seedlings. Ultrastructure of the leaf primordial nucleolus. *Canadian Journal of Botany* 63: 663-671
- Gilmour S.J., Hajela R.K., Thomashow M.F. 1988 Cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 87: 745-750
- Giraldo-Cañas D. 2005 Las especies colombianas del género *Digitaria* (poaceae: panicoideae: paniceae). *Caldasia* 27 (1): 25-87
- Giulietti J.D., Echeverría J.C., Collado A.D. 2003 Condicionantes históricos de la desertificación en San Luis. In: Aguilera M.O. and Panigatti J.L. (Eds). *Con las Metas Claras*. pp 11-24
- González-Aguilar G.A., Tiznado-Hernandez M.E., Zavaleta-Gatica R., Martínez-Tellez M.A. 2004 Methyl jasmonate treatments reduce chilling injury and activate the defense response of guava fruits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 694-701
- Guan L., Scandalios J.G. 1998a Two structurally similar maize cytosolic superoxide dismutase genes, *Sod4* and *Sod4A*, respond differentially to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiol.* 117: 217-224
- Guan L., Scandalios J.G. 1998b Effects of the plant growth regulator abscisic acid and high osmoticum on the developmental expression of the maize catalase genes. *Physiol. Plant* 104: 413-422
- Guy C.L., Haskell D. 1987 Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. *Plant Physiol.* 84: 872-878
- Hagemeyer J. 1997 Salt. In: Prasad M.N.V. (Ed). *Plant Ecophysiology*. John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, E.E.U.U. pp 173-206.
- Haldimann P., Fracheboud Y., Stamp P. 1996 Photosynthetic performance and resistance to photoinhibition of *Zea mays* L. leaves grown at sub-optimal temperature. *Plant, Cell and Environment* 19: 85-92

- Haldimann P. 1999 How do changes in temperature during growth affect leaf pigment composition and photosynthesis in *Zea mays* genotypes differing in sensitivity to low temperature?. *Journal of Experimental Botany* 50: 543-550
- Halitschke R., Kessler A., Baldwin I.T. 2004 Silencing the jasmonate cascade: Induced plant defenses and insect populations. *Science* 305: 665-668
- Halliwell, B. 2006 Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141: 312-322
- Halliwell B., Gutteridge J. 2007 *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4<sup>th</sup>. Oxford University Press, Oxford, UK
- Hansen H., Dörffling K. 1999 Changes of free and conjugated abscisic acid and phaseic acid in xylem sap of drought-stressed sunflower plants. *Journal of Experimental Botany* 50: 1599-1605
- Heath R.L., Packet L. 1968 Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198
- Huang D., Wu W., Abrams S.R., Cutler A.J. 2008 The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *Journal of Experimental Botany* 59 (11): 2991-3007
- Hull M.R., Long S.P., Jahnke L.S. 1997 Instantaneous and developmental effects of low temperature on the catalytic properties of antioxidant enzymes in two *Zea* species. *Australian Journal Plant Physiology* 24: 337-343
- Huner N.P.A., Palta J.P., Li P.H., Carter J.V. 1981 Anatomical changes in leaves of *Puma rye* in response to growth at cold-hardening temperatures. *Botanical Gazette* 142: 55-62
- Janowiak F, Dörffling K. 1996 Chilling of maize seedlings: changes in water status and abscisic acid concentration in ten genotypes differing in chilling tolerance. *J. Plant Physiol.* 147: 582-588
- Janowiak F., Maas B., Dörffling K. 2002 Importance of abscisic acid for chilling tolerance of maize seedlings. *Journal of Plant Physiology* 159 (6): 635-643
- Jeong Y-C, Nakamura J., Upton P., Swenberg J. 2005 Pyrimido [1,2- $\alpha$ ]-purin-10(3H)-one, M1G, is less prone to artifact than base oxidation. *Nucleic Acids Res.* 33: 6426-6434
- Jiang M.Y., Zhang J.H. 2001 Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiol.* 4: 1265-1273

- Jiang M.Y., Zhang J.H. 2002 Role of abscisic acid in water stress induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Free Radical Res.* 36: 1001-1015
- Jiménez A., Hernández J.A., del-Río L.A., Sevilla F. 1997 Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.* 114: 275-284
- Johansen D.A. 1940 *Plant Microtechnique VI - VII*. Mc. Graw - Hill Book, New York
- Jung C., Lyou S.H., Yeu S.Y., Kim M.A., Rhee S., Kim M., Lee J.S., Choi Y.D., Cheong J-J. 2007 Microarray-based screening of jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 26: 1053-1063
- Kang H.M., Saltveit M.E. 2002 Antioxidant enzymes and DPPH-radical scavenging activity in chilled and heat-shocked rice (*Oryza sativa* L.) seedlings radicles. *J. Agric. Food Chem.* 50 (3): 513-518
- Kimball S.L., Salisbury F.B. 1973 Ultrastructural changes of plant exposed to low temperatures. *American Journal of Botany* 60: 1028-1033
- King J.J., Stimart D.P. 1998 Genetic analysis of variation for auxin-induced adventitious root formation among eighteen ecotypes of *Arabidopsis thaliana* L. *Heynh. Journal of Heredity* 89: 481-487
- Kocsy G., Brunner M., Ruesegger A., Stamp P., Brunold C. 1996 Glutathione synthesis in maize genotypes with different sensitivities to chilling. *Planta* 198: 365-370
- Kocsy G., Ballmoos P., Suter M., Ruesegger A., Galli U., Szalai G., Galiba G., Brunold C. 2000a Inhibition of glutathione synthesis reduces chilling tolerance in maize. *Planta* 211: 528-536
- Kocsy G., Szalai G., Vagujfalvi A., Stehli L., Orosz G., Galiba G. 2000b Genetic study of glutathione accumulation during cold hardening in wheat. *Planta* 210: 295-301
- Kocsy G., Galiba G., Brunold C. 2001 Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiol. Plant.* 113: 158-164
- Körner C., Larcher W. 1988 Plant life in cold climates. In: Long S.P. and Woodward F.I. (Eds). *Plants and temperature*. Symposia of the Society for Experimental Biology. Cambridge: The Company of Biologists Limited
- Kratsch H.A., Wise R.R. 2000 The ultrastructure of chilling stress. *Plant Cell and Environment* 23: 337-350
- Krause G.H., Grafflage S., Rumich-Bayer S., Somersalo S. 1988 Effects of freezing on plant mesophyll cells. In: Long S.P. and Woodward F.I. (Eds). *Plants and Temperature*. The Company of Biologists Limited, Cambridge. Symposia of the Society for experimental Biology 42: 311-327

- Kuiper D., Schuit J., Kuiper P.J.C. 1990 Actual cytokinin concentrations in plant tissue as an indicator for salt resistance in cereals. *Plant Soil* 123: 243-250
- Kumari G., Reddy A., Naik S., Kumar S., Prasanthi J., Sriranganayakulu G., Reddy P., Sudhakar C. 2006 Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase isozymes in peanut seedlings. *Biologia Plantarum* 50 (2): 219-226
- Lalk I., Dörffling K. 1985 Hardening, abscisic acid, proline and freezing resistance in two winter wheat varieties. *Physiology Pl.* 63: 287-292
- Law D.M., Davies P.J. 1990 Comparative indole-3-acetic acid levels in the slender pea and other pea phenotypes. *Plant Physiology* 93: 1539-1543
- Lee D.H., Lee C.B. 2000 Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci.* 159: 75-85
- Leshem Y.Y. 1988 Plant senescent processes and free radicals. *Free Radical Biology and Medicine* 5: 39-49
- Letham D.S. 1994 Cytokinins as phytohormones - sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. In: Mok D.W.S. and Mok M.C. (Eds). *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*. Boca Raton, FL. USA: CRC Press. pp 57-80
- Leung J., Giraudat J. 1998 Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 199-222
- Levitt J. 1980 Responses of plants to environmental stresses, vol. 1, Chilling, freezing, and high temperature stress. New York: Academic Press
- Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R. 1983 Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591-592
- Ljung K., Bhalerao R.P., Sandberg G. 2001 Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant Journal* 28: 465-474
- Lukatkin A.S. 2002a Contribution of oxidative stress to the development of cold-induced damage to leaves of chilling-sensitive plants: 1. Reactive oxygen species formation during plant chilling. *Russian Journal of Plant Physiology* 49 (5): 622-627
- Lukatkin A.S. 2002b Contribution of oxidative stress to the development of cold-induced damage to leaves of chilling-sensitive plants: 2. The activity of antioxidant enzymes during plant chilling. *Russian Journal of Plant Physiology* 49 (6): 782-788

- Ma Y.Y., Zhang Y.L., Shao H., Lu J. 2010 Differential physio-biochemical responses to cold stress of cold-tolerant and non-tolerant grapes (*Vitis* L.) from china. *Journal of Agronomy & Crop Science* 196: 212-219
- Maksymiec W., Wójcik M., Krupa Z. 2007 Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. *Chemosphere* 66: 421-427
- Miersch O., Günther T., Fritsche W., Sembdner G. 1993 Jasmonates from different fungal species. *Natural Product Letters* 2: 293-299
- Miersch O., Bohlmann H., Wasternack C. 1999 Jasmonates and related compounds from *Fusarium oxysporum*. *Phytochemistry* 50: 517-523
- Miersch O., Neumerkel J., Dippe M., Stenzel I., Wasternack C. 2008 Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytologist* 177: 114-127
- Mittler R., Zilinskas B.A. 1991 Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiol.* 97: 962-968
- Mok M.C. 1994 Cytokinins and plant development - An overview. In: Mok D.W.S. and Mok M.C. (Eds). *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*. Boca Raton, Florida: CRC Press. pp 155-166
- Molina A.S., Nievas C., Pérez Chaca M.V., Garibotto F., González U., Marsá S., Luna C., Giménez M.S., Zirulnik F. 2008 Cadmium-induced oxidative damage and antioxidative defense mechanisms in *Vigna mungo* L. *Pl. Gr. Reg.* 56: 285-295
- Moncaleán P., Alonso P., Centeno M.L., Cortizo M., Rodríguez A., Fernández B., Ordás R.J. 2005 Organogenic responses of *Pinus pinea* cotyledons to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. *Tree Physiology* 25: 1-9
- Mueller M.J. 2004 Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 441-448
- Murata Y., Pei Z.M., Mori I.C., Schroeder J.I. 2001 Abscisic acid activation of plasma membrane  $Ca^{2+}$  channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell* 13: 2513-2523
- Murphy C., Wilson J.M. 1981 Ultrastructural features of chilling-injury in *Episcia repans*. *Plant, Cell and Environment* 4: 261-265
- Nessler C.L., Wernsman E.A. 1980 Physiological observations of extranuclear temperature-sensitive lethality in *Nicotiana tabacum* L. *Botanical Gazette* 141: 9-14

- Nilsen E.T., Orcutt D.M. 1996 Physiology of plants under stress. Abiotic factors. John Wiley & Sons, INC, New York
- Nishida I., Murata N. 1996 Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 541-568
- Noctor G., Arisi A.M., Jouanin L., Kunert K.J., Rennenberg H., Foyer C.H. 1998 Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Bot.* 49: 623-647
- O'Kane D., Gill V., Boyd P., Burdon R. 1996 Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta* 198 (3): 371-377
- Oliveira J.G, da Costa Aguiar Alves P.L., Vitória A.P. 2009 Alterations in chlorophyll a fluorescence, pigment concentrations and lipid peroxidation to chilling temperature in coffee seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 67: 71-76
- Ortuño A., Sánchez-Bravo J., Moral J.R., Acosta M., Sabater F. 1990 Changes in the concentration of indole-3-acetic-acid during the growth of etiolated lupin hypocotyls. *Physiologia Plantarum* 78: 211-217
- Parchmann S., Gundlach H., Mueller M.J. 1997 Induction of 12-Oxo-Phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiology* 115: 1057-1064
- Pedranzani H., Racagni G., Alemano S., Miersch O., Ramírez I., Peña Cortés H., Machado-Domenech E., Abdala G. 2003 Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regul.* 41 (2): 149-158
- Pedranzani H., Ruiz M., Garbero M., Terenti O. 2005 Efecto de baja temperatura sobre distintos parámetros de producción en *Digitaria eriantha* cv. Mejorada INTA. *Phyton* 2005: 121-126
- Pedranzani H., Sierra de Grado R., Vigliocco A., Miersch O., Abdala G. 2007 Cold and water stresses produce changes in endogenous jasmonates in two populations of *Pinus pinaster* Ait. *Plant Growth Regulation* 52: 111-116
- Porra R.J. 2002 The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. *Photosynthesis Research* 73: 149-156
- Prasad T.K. 1996 Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant J.* 10 (6): 1017-1026
- Premachandra G.S., Soneoka H., Kanya M., Ogata S. 1991 Cell membrane stability and leaf surface wax content as affected by increasing water deficit in maize. *J. Exp. Bot.* 42: 167-171

- Premachandra G.S., Soneoka H., Fujita H., Ogata S. 1992 Leaf water relations, osmotic adjustment, cell membrane stability, epi-cuticular wax load and growth as affected by increasing water deficits in *Sorghum*. *J. Exp. Bot.* 43: 1569-1576
- Privitello M.J.L., Leporati J.L., Gabutti E.G., Sager R.L. 2004 Cambios en el perfil nutricional de *Digitaria eriantha* Steudel sp. *Eriantha* cv. Irene por factores climáticos. In Producción y calidad nutricional de forrajeras cultivadas y nativas del semiárido sanluiseño. pp 145-149
- Quader H., Hofmann A., Schnepf E. 1989 Reorganization of the endoplasmic reticulum in epidermal cells of onion bulb scales after cold stress: Involvement of cytoskeletal elements. *Planta* 177: 273-280
- Quiroga A.M. 2003 Respuestas morfofisiológicas de *Digitaria eriantha* Steudel subsp. *eriantha* y producción de callos como germoplasma factible para seleccionar plantas resistentes al frío. Pag. 1-66. Tesis de grado. Villa Mercedes. San Luis. Argentina
- Quiroga A.M., Pedranzani H.E., Rodriguez R., Abdala G.I. 2004 Metilación de ADN genómico en dos cultivares de *Digitaria eriantha* a bajas temperaturas. *Pastos y Forrajes* 27 (4): 317-320
- Rabotnikof C.M., Hernández O.A., Stritzler N.P., Gallardo M., Funes E., Villar C.A. 1986a Evaluación de especies forrajeras estivales en la región pampeana semiárida. I. Determinación de pared celular, lignina y desaparición de materia seca en bolsitas de *B. intermedia*, *E. curvula*, *D. eriantha*, *P. antidotale* y *S. leiantha* bajo condiciones de diferimiento. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 6 (1-2): 47-56
- Rabotnikof C.M., Stritzler N.P., Hernández O.A. 1986b Evaluación de especies forrajeras estivales en la región pampeana semiárida. II. Determinación de producción de materia seca, persistencia, proteína y digestibilidad *in vitro* de *B. intermedia*, *E. curvula*, *D. eriantha*, *P. antidotale* y *S. leiantha* bajo condiciones de diferimiento. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 6 (1-2): 57-66
- Rao, M.V., H. Lee, R.A. Creelman, J.E. Mullet, Davis K.R. 2000 Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell* 12: 1633-1646
- Rapparini F., Tam Y.Y., Cohen J.D., Slovin J.P. 2002 Indole-3-Acetic acid metabolism in *Lemna gibba* undergoes dynamic changes in response to growth temperature. *Plant Physiology* 128: 1410-1416
- Rasheed R., Wahid A., Ashraf M., Basra S.M.A. 2010 Role of proline and glycinebetaine in improving chilling stress tolerance in sugarcane buds at sprouting. *International Journal of Agriculture & Biology* 12: 1-8
- Reinoso H., Sosa L., Reginato M., Luna V. 2005 Histological alterations induced by sodium sulfate in the vegetative anatomy of *Prosopis strombulifera* (Lam.) Benth. *Word Journal of Agricultural Sciences* 1 (2): 109-119

Rimieri P., Funes M.O., Del Castello E.R. 1997 Creación de cultivares mejorados e identificables de *Poa ligularis* y *Digitaria eriantha*. Informe de convenio. In INTA, EEA San Luis. Informe Técnico de proyectos (Área de Producción Animal): 183-184

Sakakibara H. 2005 Cytokinin biosynthesis and regulation. Vit. Hor. 72: 271-287

Sakakibara H. 2006 Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. Annu. Rev. Plant Biol. 57: 431-449

Sakata T., Oshino T., Miura S., Tomabeche M., Tsunaga Y., Higashitani N., Miyazawa Y., Takahashi H., Watanabe M., Higashitani A. 2010 Auxins reverse plant male sterility caused by high temperatures. PNAS 107 (19): 8569-8574

Salisbury F.B., Ross C.W. 1992 Plant physiology, 4th edn. Belmont, California: Wadsworth Publishing Company

Samuelson M.E., Larsson C-M. 1993 Nitrate regulation of zeatin riboside levels in barley roots: effects of inhibitors of N assimilation and comparison with ammonium. Plant Science 93: 77-84

SAN LUIS BUSCA MEJORAR SU GANADARÍA. 1997 Diario La Nación. 17 de mayo de 1997. Suplemento: Campo. Buenos Aires, Argentina

Sauter A., Davies W.J., Hartung W. 2001 The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the rate of the hormone on its way from root to shoot. J. Exp. Bot. 52: 1991-1997

Schmelz E.A., Alborn H.T., Tumlinson J.H. 2003 Synergistic interactions between volicitin, jasmonic acid, and ethylene mediated insect-induced volatile emission in *Zea mays*. Plant Physiology 117: 403-412

Schupp R., Rennenberg H. 1988 Diurnal changes in the glutathione content of spruce needles (*Picea abies* L.). Plant Sci. 57: 113-117

Shao H.B., Chu L.Y., Lu Z.H., Kang C.M. 2008 Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. International Journal of Biological Sciences 1: 8-14

Shibasaki K., Uemura M., Tsurumi S., Rahman A. 2009 Auxin response in *Arabidopsis* under cold stress: Underlying molecular mechanisms. The Plant Cell 21: 3823-3838

Silva Colomer J.H., Guevara J.C., Marchi A., Estevez O.R., Stasi C.R. 1991 Native grasses and the nutrition of the breeding cow in the arid plain of Mendoza, Argentina. J. Arid Environm. 20: 113-118

Snedden W.A., Fromm H. 1998 Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. Trends in Plant Science 3: 299-304

- Sonoike K. 1998 Various aspects of inhibition of photosynthesis under light/chilling stress: photoinhibition at chilling temperatures versus chilling damage in the light. *J. Plant Res.* 111: 121-129
- Starr C., Taggart R. 2008 *Biología: La unidad y la diversidad de la vida*. Cengage Learning (Ed). Undécima edición. pp 495-498
- Steven H.S., Zeevaart J.A.D. 2004 Abscisic acid biosynthesis and metabolism. In: Davies P.J. (Ed). *Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action!*. Klumer Academic Publishers. pp 137-155
- Strassner J., Schaller F., Frick U.B. 2002 Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *Plant J.* 32: 585-601
- Synková H., Wilhelmová N., Šesták Z., Pospíšilová J. 1997 Photosynthesis in transgenic plants with elevated cytokinin contents. In: Pessaraki M. (Ed). *Handbook of Photosynthesis*. Marcel Dekker, New York - Basel - Hong Kong. pp 541-552
- Taiz L., Zeiger E. 1991 *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Redwood City, California
- Takei K., Sakakibara H., Taniguchi M., Sugiyama T. 2001 Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant Cell Physiol.* 42: 85-93
- Tanino K., Wiser C.J., Fuchigami L.H., Chen T.H.H. 1990 Water content during abscisic acid induced freezing tolerance in bromegrass cells. *Plant Physiology* 93: 460-464
- Taylor A.O., Rowley J.A. 1971 Plants under climatic stress. I. Low temperature, high light effects on photosynthesis. *Plant Physiology* 47: 713-718
- Thomashow M.F. 1999 Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 571-599
- Tognetti J.A., Pontis H.G. 1992 Relaciones hídricas durante la aclimatación del trigo al frío. XIX Actas Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. pp 51-52
- Toribio M.B., Laborde H., Brevendan R.E., Terenti O.A. 1998 Growth and water relations of *Digitaria eriantha* under soil moisture stress and defoliation. In American Society of Agronomy. Annual Meeting. Abstracts. E.E. U.U. pp 113-114
- Veneciano J.H., Terenti O.A. 1997 Efectos de la defoliación y la fertilización nitrogenada en el rendimiento y calidad de *D. eriantha* Steudel subsp. *eriantha* cv. Irene. *Rev. Fac. Agronomía (UNLPam)* 9 (2): 41-56

- Veneciano J.H. 1999a Informes anuales internos de la E.E.A. San Luis. INTA. Planes y proyectos de Evaluación de forrajeras perennes en Jardín de Introducción
- Veneciano J.H. 1999b Producción y calidad de forraje. 3° Jornada Técnica sobre Digigrass (*Digitaria eriantha*). Villa Mercedes (SL), Marzo 24: 1-3
- Veneciano J.H., Terenti O.A., Federigi M.E. 2002 Factores climáticos y pasturas megatérmicas perennes. Revista de la Sociedad Rural de Jesús María, Cba. 130: 39-42
- Veneciano J.H., Terenti O.A., Funes M.O. 2003 Valoración de recursos forrajeros nativos e introducidos. In: Aguilera M.O. and Panigatti J.L. (Eds). Con las Metas Claras. pp 125-140
- Veneciano J.H. 2006 Gramíneas estivales perennes para ambientes semiáridos: características y productividad. INTA San Luis, Información Técnica 171: 84
- Walton D.C., Li Y. 1995 Abscisic acid biosynthesis and metabolism. In: Davies P.J. (Ed). Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp 140-175
- Wang H., Datla R., Georges F., Loewen M., Cutler A.J. 1995 Promoters from kin1 and cor6.6, two homologous *Arabidopsis thaliana* genes: transcriptional regulation and gene expression induced by low temperature, ABA, osmoticum and dehydration. Plant Mol. Biol. 28: 605-617
- Wang W.B., Kim Y.H., Lee H.S., Deng X.P., Kwak S.S. 2009 Differential antioxidation activities in two alfalfa cultivars under chilling stress. Plant Biotechnol. Rep. 3: 301-307
- Wasternack C., Parthier B. 1997 Jasmonate signalled plant gene expression. Trends Plant Sci. 2: 302-307
- Weber H. 2002 Fatty acid-derived signals in plants. Trends in Plant Science 7: 217-225
- Weiler E.W., Albrecht T., Groth B., Xia Z.Q., Luxem M., Liss H., Andert L., Spengler P. 1993 Evidence for the involvement of jasmonates and their octadecanoid precursors in the tendril coiling response of *Bryonia dioica*. Phytochem. 32: 591-600
- Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmülling T. 2001 Regulation of plant growth by cytokinin. Proceedings National Academy of Science USA 98: 10487-10492
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmülling T. 2003 Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plant show multiple developmental alterations indicating opposite function of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. Plant Cell 15: 2532-2550
- Willekens H., Inze D., Van Montagu M., Van Camp W. 1997 Catalase in plants. Mol. Breed. 1: 207-228

Wise R.R., McWilliam J., Naylor A.W. 1983 A comparative study of low temperature-induced ultrastructural alterations of three species with differing chilling sensitivities. *Plant Cell and Environment* 6: 525-535

Wise R.R., Naylor A.W. 1987a Chilling-enhanced photooxidation. The peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure. *Plant Physiology* 83: 272-277

Wise R.R., Naylor A.W. 1987b Chilling-enhanced photooxidation: evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiology* 83: 278-282

Wise R.R. 1995 Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosynth. Res.* 45: 79-97

Wong C.E., Li Y., Labbe A., Guevara D., Nuin P., Whitty B., Diaz C., Golding G.B., Gray G.R., Weretilnyk E.A., Griffith M., Moffatt B.A. 2006 Transcriptional profiling implicates novel interactions between abiotic stress and hormonal responses in *Thellungiella*, a close relative of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 140: 1437-1450

Woodward A.W., Bartel B. 2005 Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany* 95: 707-735

Xia J., Zhao H., Liu W., Li L., He Y. 2009 Role of cytokinin and salicylic acid in plant growth at low temperatures. *Plant Growth Regul.* 57: 211-221

Xu P-L., Guo Y-K., Bai J-G., Shang L., Wang X-J. 2008 Effects of long-term chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light. *Physiologia Plantarum* 132: 467-478

Yun J.G., Hayashi T., Yazawa S., Katoh T., Yasuda Y. 1996 Acute morphological changes of palisade cells of *Saintpaulia* leaves induced by a rapid temperature drop. *Journal of Plant Research* 109: 339-342

Yun K-Y., Park M.R., Mohanty B., Herath V., Xu F., Mauleon R., Wijaya E., Bajic V.B., Bruskiewich R., De los Reyes B.G. 2010 Transcriptional regulatory network triggered by oxidative signals configures the early response mechanisms of japonica rice to chilling stress. *BMC Plant Biology*: 10-16

Yurekli F., Porgali Z.B., Turkan I. 2004 Variations in abscisic acid, indole-3-acetic acid, gibberellic acid and zeatin concentrations in two bean species subjected to salt stress. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 46: 201-212

Zeevaart J.A.D. 1999 Abscisic acid metabolism and its regulation. In: Hooykaas P.J.J., Hall M.A.K. and Libbenga R. (Eds). *Biochemistry and molecular biology of plant hormones*. Amsterdam: Elsevier. pp 189-207

Zhang J., Schurr U., Davies W. J. 1987 Control of stomatal behaviour by abscisic acid which apparently originates in the roots. *Journal of Experimental Botany* 38 (7): 1174-1181

Zhang J., Davies W.J. 1989 Sequential response of whole plant water relations to prolonged soil drying and the involvement of xylem sap ABA in the regulation of stomatal behavior of sunflower plants. *New Phytol.* 113: 167-174

Zhang J., Davies W.J. 1990 Does ABA in the xylem control the rate of leaf growth in soil-dried maize and sunflower plants? *J. Exp. Bot.* 41 (9): 1125-1132

Zhang J., Cui S., Li J., Wei J., Kirkham M.B. 1995 Protoplasmic factors, antioxidants responses, and chilling resistance in maize. *Plant Physiol. Biochem.* 33: 567-575

Zhang Y., Hao-Ru T., Ya L. 2008 Variation in antioxidant enzyme activities of two strawberry cultivars with short-term low temperature stress. *World Journal of Agricultural Sciences* 4 (4): 458-462

Zhao J., Hu Q., Guo Y.Q., Zhu W.H. 2001 Elicitor-induced indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell culture is related to  $Ca^{+2}$  influx and the oxidative burst. *Plant Sci.* 161: 423-431

Zolman B.K., Yoder A., Bartel B. 2000 Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. *Genetics* 156: 1323-1337

U.N.R.C  
Biblioteca Central



59526

60526