

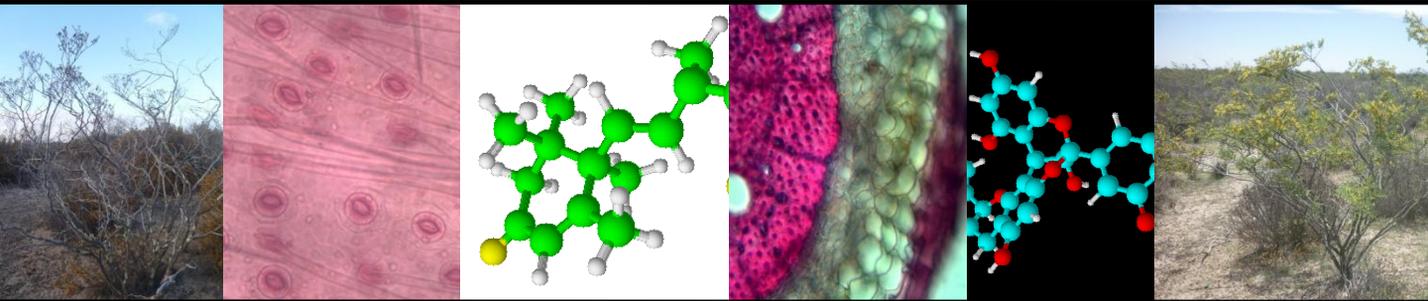
Universidad Nacional de
Río Cuarto



Centro Nacional
Patagónico



RESPUESTAS MORFO-FISIOLÓGICAS Y METABÓLICAS DE RESISTENCIA A LA SEQUÍA EN PASTOS Y ARBUSTOS DEL MONTE PATAGÓNICO



Tesis Doctoral
Mic. María Celeste Varela

Directora: Dra. María Virginia Luna
Co-directora: Dra. Ana María Cenzano

Río Cuarto, Cba, Argentina. 22 de Abril 2016



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICO-QUIMICAS Y
NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctor
en Ciencias Biológicas

**RESPUESTAS MORFO-FISIOLÓGICAS Y METABÓLICAS DE
RESISTENCIA A LA SEQUÍA EN PASTOS Y ARBUSTOS DEL
MONTE PATAGÓNICO**

Mic. María Celeste Varela

DIRECTOR: Dra. María Virginia Luna

CO-DIRECTOR: Dra. Ana María Cenzano

Río Cuarto, 22 de Abril 2016

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas, fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del departamento de Ciencias Naturales de la facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Bajo la dirección de la Dra. María Virginia Luna. El trabajo a campo, muestreos y procesamiento de muestras se llevaron a cabo en la reserva de vida silvestre “La Esperanza” y en el laboratorio de Ecofisiología y Bioquímica Vegetal del Instituto para el Estudio de los Ecosistemas Continentales Patagónicos en el Centro Nacional Patagónico-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CENPAT-CONICET), bajo la supervisión de la co-directora Dra. Ana María Cenzano.

DIRECTOR DE TESIS: Dra. María Virginia Luna

CO-DIRECCIÓN: Dra Ana María Cenzano

Aprobado por el tribunal de Tesis

Dra. Celina Mercedes Luna

Dra. Rosana Noemí Malpassi

Dra. José Beltrano

“Y luego, cuando ante ti se abran muchos caminos y no sepas cuál recorrer, no te metas en uno cualquiera al azar: siéntate y aguarda. Respira con la confiada profundidad con que respiraste el día en que viniste al mundo, sin permitir que nada te distraiga: aguarda y aguarda más aún. Quédate quieta, en silencio, y escucha a tu corazón. Y cuando te hable, levántate y ve donde él te lleve.”

Donde el corazón te lleve, **Susanna Tamaro**

Para mi sobrina y Ahijada, Agustina

AGRADECIMIENTOS

Manifiesto mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que durante todo este tiempo me han apoyado y acompañado en el desarrollo del presente trabajo:

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por concederme el lugar de trabajo y la oportunidad de crecer profesionalmente. Al Centro Nacional Patagónico por el espacio concedido durante mis campañas de muestreo.

A mis directoras de Tesis, Dra. Virginia Luna y Dra. Ana Cenzano, por su paciencia, sus consejos y su confianza hacia mí a la hora de llevar a cabo cada paso de esta tesis, teniendo en cuenta y lidiando con la obsesión de su becaria.

A mis compañeros de laboratorio, de cátedra y de trabajo: Julia Iparraguirre, Analía Llanes, Mariana Reginato, Genoveva Devinar, Oscar Masciarelli, Natali Riera, Paula Castillo, Maximiliano Escalante, Romina Molina, Ana Furlan, Herminda Reinoso y Claudia Travaglia. Por el intercambio de ideas, el trabajo en conjunto, los aportes desinteresados y los mates y buena onda durante el trabajo.

A los que me acompañaron y ayudaron durante mis campañas de muestreo en Puerto Madryn: Paula Escudero, Luciano Natali, Soledad Martinez, Agustina Revellino, Analía Carrera, Victoria Campanella y a los integrantes del Instituto Patagónico Para el Estudio de los Ecosistemas Continentales-CENPAT.

A los que me acompañaron, ayudaron y me hicieron parte de sus costumbres y cultura durante mi Pasantía en la ciudad de Denizli: Dr. Idris Arslan, Şefika Emine Arslan, Fatma Gül Akar, Esra Ak, Melike Hazal Yıldız, Yeliz Tanış, Erdem Dilmen, Mesut Kaldır Mustafa Oğuzhan Sert, Carmen y Raquel.

A mis padres, Glin y Osito, y mis hermanos Franco y Bruno, por el apoyo e incentivo para lograr cada uno de mis objetivos respetando mis decisiones, por estar siempre aconsejando y acompañándome incondicionalmente, sobre todo cuando una idea se me pone en la cabeza y mi obstinación me impide abandonarla.

A ese grupo de amigas q desde la pre-adolescencia hasta hoy, siguen al lado mío compartiendo cada momento de mi vida y apoyándome. A Maga, Cami y Pau, por

esas largas charlas de interés general donde los consejos, las opiniones y las risas me han llevado a crecer y madurar durante todo este camino.

Al grupo de amigos de la universidad, que a pesar de las distancias y caminos diferentes, hemos encontrado momentos y lugares, algunos de los menos imaginados, para reencontrarnos, seguir compartiendo y creando historias. Porque los logros de uno son los logros de todos. A Anita, Vasca y Orne por sus charlas, consejos, confidencias y tantas otras anécdotas compartidas. A Tana, porque a pesar de la distancia, el vínculo amistoso creció y seguirá creciendo, acompañado por la sincronicidad de nuestras vidas que bordea lo increíble.

A Lucila Valsecchi, Eirini Vanikioti, Dona Geagea y a todas las mujeres del “circulo de soñadoras” que muchas veces sin saberlo, fueron la receta justa para no bajar los brazos en esos momentos donde la duda y la incertidumbre se adueñan de uno. Porque defienden, demuestran y enseñan que cuando trabajamos en cada “sueño” siempre se logra.

A esas mujeres que el linaje me dio, y que el destino decidió que durante esta etapa era el mejor momento para conocernos. Carmen, Sandra y Tere: mujeres que admiro por su tenacidad, su convicción, y su empoderamiento, que ha hecho que logren y sigan logrando sus sueños de vida.

A esos nuevos amigos que la vida me cruzo; Tato Martini y Euge Fernández. Por esas charlas tan íntimas e introspectivas, por enseñarme a pensar menos y sentir más. Por su empatía y honestidad emocional que desde un principio, hicieron que nuestros momentos compartidos sean de lo más hermosos y enriquecedores.

A todos aquellos que me acompañan, apoyan y fueron parte de esta etapa de mi vida.

RESUMEN

El estrés hídrico es el principal estrés abiótico que afecta el crecimiento de especies nativas en regiones semiáridas. El Monte Patagónico se caracteriza por poseer un clima semiárido con régimen termométrico templado-frío y gran amplitud térmica diaria y estacional. Las precipitaciones medias se encuentran por debajo de los 200 mm anuales y generalmente se concentran en invierno o primavera. La vegetación se caracteriza por estructuras de parches isodiamétricos alternados con suelo desnudo. Los parches generalmente están formados por arbustos como iniciadores de los mismos y pastos en la periferia o bien en matas aisladas. Las especies nativas de estas regiones desarrollan diferentes estrategias de resistencia a la sequía para sobrevivir y coexistir en el mismo hábitat. Especies nativas de regiones semiáridas han sido clasificadas como tolerantes o evitadoras según el mecanismo de resistencia a la sequía que desarrollan, teniendo en cuenta las diferentes adaptaciones a nivel anatómico, bioquímico y fisiológico que presentan. Sin embargo, existe escasa bibliografía sobre el estudio a campo de diferentes mecanismos de resistencia a la sequía en especies nativas del Monte Patagónico.

La hipótesis de este trabajo plantea que las adaptaciones a nivel anatómico, bioquímico y fisiológico de especies clasificadas en diferentes grupos de mecanismos de resistencia a la sequía, permiten establecer un gradiente de xerofitismo-mesofitismo con correspondencia con los grupos funcionales de plantas definidos desde un punto de vista eco-fisiológico. Se seleccionaron dos especies de arbustos: *Larrea divaricata* (tolerante) y *Lycium chilense* (evitadora) y dos especies de pastos: *Pappostipa speciosa* (tolerante) y *Poa ligularis* (evitadora) con diferentes estrategias. Estas especies fueron estudiadas a lo largo de un año, contrastando su comportamiento entre las cuatro estaciones, midiendo las precipitaciones y temperaturas a lo largo del año. Para las adaptaciones a nivel anatómico se realizaron análisis de cortes histológicos de hojas y raíces. Los resultados mostraron plasticidad a nivel foliar en el caso de las especies tolerantes, para minimizar la pérdida de agua durante las estaciones secas y mantener el metabolismo basal, mientras que las especies evitadoras pierden sus hojas durante las estaciones secas. Entre las adaptaciones a nivel bioquímico se estudió el contenido de pigmentos fotosintéticos, el contenido de compuestos fenólicos, la capacidad antioxidante de estos compuestos y el daño oxidativo. Los resultados mostraron un aumento en el contenido de pigmentos durante la estación de mayor disponibilidad hídrica coincidiendo con la estación de floración y fructificación. Se observó la producción de compuestos fenólicos en las cuatro especies, siendo mayor en las especies tolerantes y, a su vez, un aumento durante las

estaciones de menor disponibilidad hídrica. La capacidad antioxidante de los mismos mostró correlación positiva con la variación de su contenido entre las estaciones. Como indicador de estrés oxidativo se evaluó el contenido de malondialdehído (MDA) observándose que en *L. divaricata* los valores aumentaron en las estaciones secas mientras que el *L. chilense* no variaron. En cambio, en ambas especies de pastos aumentó el contenido de MDA durante las estaciones secas tanto en hojas como en raíces. También se determinaron las fitohormonas endógenas: Ácido abscísico (ABA) y su forma conjugada como glucosil-éster (ABA-GE), Giberelinas 1 y 3 (GA₁ y GA₃) y ácido indol 3-acético (AIA). El contenido de GAs y AIA no varió durante las estaciones en las cuatro especies en estudio. El contenido de ABA disminuyó durante las estaciones secas, aumentando el contenido de ABA-GE, mientras que en las especies evitadoras no se observó variación de ABA ni de ABA-GE, proponiendo que la función del ABA en el caso de especies tolerantes es el de respuesta rápida frente a estrés, mientras que en el caso de especies evitadoras su función está más relacionada con el mantenimiento del crecimiento normal en situaciones no estresantes.

Entre los parámetros fisiológicos se midió la altura de las plantas y solo varió *P. ligularis* debido a su corto ciclo de vida. La biomasa aérea aumentó en primavera-verano en las especies tolerantes, mientras que en las evitadoras no se pudo comparar debido a su mecanismo de pérdida de hojas durante las estaciones secas (*L. chilense*) o ciclos de vida cortos (*P. ligularis*). La biomasa radical sólo varió en *P. ligularis*, incrementándose al final de su ciclo de vida. El contenido relativo de agua (CRA) en hojas aumentó en primavera-verano en las especies evitadoras mientras que no varió a lo largo del año en las especies tolerantes en las cuales se obtuvieron los valores mayores. Por último, se realizaron análisis multivariados donde se combinaron todos los parámetros posibles a fin de identificar comportamientos similares o diferentes entre los dos mecanismos de resistencia estudiados. Para el caso de las hojas se observaron marcados agrupamientos donde se diferenció cada especie y estación, mientras que en raíces fue difícil separar en grupos sugiriendo comportamientos similares entre evitadoras y tolerantes. A pesar de los agrupamientos marcados, los resultados de estos análisis multivariados muestran que existe una gran variabilidad en los valores obtenidos para cada variable sugiriendo que, a pesar de los diferentes mecanismos de resistencia a la sequía, todas las especies tienen comportamientos xerofíticos en diferentes niveles, apoyando la idea de un gradiente de xerofitismo- mesofitismo entre las especies que coexisten en el Monte Patagónico.

SUMMARY

Drought stress is the main abiotic stress affecting growth and development of plants in semiarid regions. Patagonian shrublands are characterized by a semiarid climate, with large daily and seasonal temperature variations and annual rainfalls below 200 mm, concentrated in winter and/or spring. The vegetation of Patagonian shrublands is heterogeneously distributed in isodiametric patches alternating with bare soil. The patches generally include a large variety of species, dominated by shrubs surrounded by grasses or only grasses forming isolated bushes. Native species of semiarid regions had developed different strategies to face drought to survive and coexist in the same habitat. According to the strategy used, plants were classified in two main eco-physiological groups: Tolerant and Avoidant. However, there is scarce literature about studies on native species from Patagonian Monte displaying different drought resistant mechanisms under field conditions. Based on this background, we hypothesize that anatomical, biochemical and physiological adaptations of species classified in different drought resistant mechanisms or strategies, allow to establish a xerophytism-mesophytism gradient in correspondence with defined eco-physiological functional groups. Two shrubs and two grasses with different drought resistant mechanisms were selected: *Larrea divaricata* (Tolerant shrub), *Lycium chilense* (avoidant shrub), *Pappostipa speciosa* (tolerant grass) and *Poa ligularis* (avoidant grass). This species were studied over a year, contrasting their behavior through out the four seasons and measuring the rainfalls and temperatures along the year. Analysis of histological sections from leaves and roots were performed showing leaf plasticity in tolerant species to minimize water loss during drought seasons, meanwhile the avoidant species lost their leaves. Biochemical determinations consisted on photosynthetic pigment content, phenols content, their antioxidant capacity and oxidative damage. Photosynthetic pigments increased when water availability increased, which match with the flowering/fructification season. The four species and especially tolerant species produced phenolic compounds which increased during drought seasons. The antioxidant capacity had positive correlation with the phenolic compounds content. Production of malondialdehyde (MDA) was measured as oxidative damage indicator. MDA content enhanced in shrubs during the drought seasons in *L. divaricata*, meanwhile there were no differences between seasons in *L. chilense*. Instead, in both grasses MDA content increased during the drought seasons in leaves and roots. The plants hormones measured were abscisic acid (ABA) and their conjugated form Abscisic acid glucose ester (ABA-GE), Gibberelins 1 and 3 (GA₁ and GA₃) and indol acetic acid (AIA). Endogenous GAs and AIA showed no variations along seasons in the four species under study. In tolerant species endogenous free ABA decreased and

endogenous ABA-GE increased during the drought seasons. In avoidant species endogenous ABA and ABA-GE did not vary. These results would indicate that in tolerant species ABA is mainly related with fast responses to drought stress, whilst in avoidant species ABA is mainly related with normal growth maintenance during non-stressing situations. Physiological parameters such as plant height, leaves and roots dry weight and relative water content (CRA). Plant height only changed between seasons in *P. ligularis*. Leaf dry weight increased during spring-summer in tolerant species, meanwhile in avoidant species it was impossible to compare between seasons because of leaf loss. Root dry weight did not change in all species. Contrarily to tolerant species, CRA increased in leaves from avoidant species in spring-summer, despite tolerant CRA values were always higher than in avoidant species. Finally, different multivariate analyses were made to combine all the parameters measured to identify different or similar behaviors between the two drought resistant mechanisms studied. The multivariate analysis of leaves shows remarkable clusters between each species and seasons; but in roots it was not possible to separate clusters showing similarities between tolerant and avoidant species. The great variability observed in all the parameters measured suggests that no matter which drought resistant strategy they employ, the four species show xerophytic behavior at different levels supporting the idea of a xerophytism-mesophytism gradient in the species that coexist in the Patagonian rangelands.

ÍNDICE

	Página
INDICE DE TABLAS	VI
INDICE DE FIGURAS	VII
ABREVIATURAS	XI

INTRODUCCIÓN

1. Ecosistemas áridos-semiáridos	1
1.1. El Monte Patagónico	1
1.2. Vegetación del Monte Patagónico Chubutense	2
2. Mecanismos de adaptación a la sequía	4
2.1. Estrategias adaptativas a nivel anatómico frente a la sequía	7
2.1.1. Bajo condiciones controladas de laboratorio	7
2.1.2. Estudios a campo	9
2.2. Estrategias adaptativas a nivel bioquímico frente a la sequía	9
2.2.1. Compuestos Fenólicos	9
2.2.2. Biosíntesis de Polifenoles	14
2.3. Fitohormonas	16
2.3.1. Papel de las fitohormonas en las respuestas a estrés	16
2.3.2. Acido Abscísico (ABA)	17
2.3.3. Auxinas	19
2.3.4. Giberelinas (GAs)	20

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo	24
Objetivo General	24
Objetivos específicos	24

MATERIALES Y METODOS

1. Área de estudio	26
2. Variables medio-ambientales analizadas	27
2.1. Cambios estacionales en precipitación y temperatura	27
2.2. Contenido de agua en el suelo	27
3. Material vegetal	27
4. Variables analizadas en la planta	28
4.1. Altura total	28
4.2. Biomasa aérea y subterránea	29
4.3. Estado hídrico de la planta	29
4.4. Análisis Anatómico	29
4.4.1. Extracción de Epidermis	29
4.5. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos	31
4.5.1. Extracción de clorofila	31
4.5.2. Extracción de carotenoides	31
4.5.3. Cálculo para la concentración de pigmentos	31
4.6. Extracción y cuantificación de polifenoles por espectrofotometria	31
4.6.1. Extracción de polifenoles	31
4.6.2. Cuantificación de fenoles totales	32
4.6.3. Flavonoides totales	32

4.6.4. Flavan-3-oles totales	33
4.6.5. Proantocianidinas	34
4.6.6. Acidos tartárico y flavonoles	34
4.6.7. Determinación de la actividad antioxidante del extracto	35
4.7. Identificación y determinación de la estructura química de compuestos polifenólicos	36
4.7.1. Extracción y aislamiento	36
4.7.2. Separación por HPLC/UV	37
4.7.3. Determinación de la estructura química por HPLC-ESI-MS	37
4.7.4. Determinación capacidad antioxidante del extracto	38
4.8. Evaluación del contenido de MDA como indicador de estrés oxidativo	38
4.9. Evaluación del contenido endógeno de fitohormonas por LC/MS-MS	39
5. Análisis estadísticos	40

RESULTADOS

1. Descripción del área de estudio	41
2. Datos climáticos de la zona de muestreo	41
2.1. Cambios estacionales de precipitación y temperatura	41
2.2. Determinación del contenido de agua en el suelo	42
3. Descripción de las especies en estudio	43
4. Variables analizadas en la planta	46
4.1 Altura total	46
4.2. Biomasa aérea	48

4.3 Biomasa subterránea	49
4.4. Estado hídrico de la planta	49
4.4.1. Contenido relativo de agua en hojas	49
4.4.2. Contenido relativo de agua en raíces	51
4.5. Análisis anatómico	52
4.5.1. Parámetros morfo-histológicos de las hojas verdes	52
4.5.2. Parámetros morfo-histológicos de las raíces finas	54
4.5.3. Estomas y tricomas de <i>L. divaricata</i>	55
4.6. Determinación de pigmentos fotosintéticos	57
4.7. Determinación de polifenoles por espectrofotometría	58
4.7.1. Fenoles totales	58
4.7.2. Flavonoides totales	60
4.7.3. Flavan-3-oles totales	60
4.7.4. Proantocianidinas	60
4.7.5. Acido tartárico	63
4.7.6. Flavonoles	63
4.7.7. Capacidad antioxidante del extracto de polifenoles	66
4.8. Determinación de la estructura química de cada compuesto polifenólico	67
4.8.1. Compuestos identificados	67
4.8.2. Capacidad antioxidante del extracto de polifenoles	72
4.9. Determinación del daño oxidativo	74
4.9.1. Contenido de malondialdehído (MDA)	74
4.10. Determinación del contenido endógeno de fitohormonas	75
4.10.1. Ácido abscísico (ABA)	75

4.10.2. Ácido abscísico glicosilado (ABA-GE)	77
4.10.3. Ácido indol acético (AIA)	79
4.10.4. Giberelinas	81
5. Correlación entre las diferentes variables analizadas	85
5.1. Análisis de correlación y regresión lineal	85
5.2. Análisis de componentes principales (ACP)	86
5.3. Análisis discriminante lineal	90
DISCUSIÓN	
1. El Monte Patagónico	93
2. Mecanismos de adaptación a la sequía de cada especie en estudio	94
2.1. <i>Larrea divaricata</i>	94
2.2. <i>Lycium chilense</i>	98
2.3. <i>Pappostipa speciosa</i>	100
2.4. <i>Poa ligularis</i>	103
3. Correspondencia de los parámetros en estudio con los mecanismos de resistencia a la sequía	105
3.1. Arbustos	105
3.2. Pastos	105
4. Modelo propuesto de integración de las cuatro especies	106
CONCLUSIÓN	108
BIBLIOGRAFÍA	109

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Nomenclatura de las estrategias hídricas	6
2	Clasificación del Material Vegetal de las especies en estudio	28
3	Parámetros medidos en los cortes histológicos	30
4	Datos de biomasa de hojas de las cuatro especies en las cuatro estaciones	48
5	Datos de biomasa de raíz de las cuatro especies en las cuatro estaciones	49
6	Características medidas en las fotografías de cortes transversales de hojas	53
7	Características medidas en las fotografías de cortes transversales de raíz	55
8	Muestras analizadas en la Universidad de Pamukkale, Turquía	67
9	Compuestos identificados en las especies en estudio en dos estaciones del año	68
10	Comparación entre las especies en estudio	84
11	Correlación (R y R ²) entre la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles	85
12	Correlación (R y R ²) entre el contenido de agua del suelo con diferentes variables	86

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	Regiones Fitogeográficas de la Argentina	3
2	Clasificación de los no-flavonoides.	11
3	Estructura de los flavonoides.	11
4	Clasificación de los flavonoides.	12
5	Clasificación de las proantocianidinas	13
6	Ejemplos de taninos condensados.	13
7	Ejemplos de taninos hidrolizables	14
8	Biosíntesis de polifenoles	15
9	Biosíntesis y catabolismo de ABA	19
10	Rutas metabólicas de la síntesis de AIA	21
11	Biosíntesis de GAs	22
12	Localización de la zona de muestreo	26
13	Curva de calibración para fenoles totales	32
14	Curva de calibración para Flavonoides totales	33
15	Curva de calibración para Flavan-3-oles totales	33
16	Curva de calibración para Proantocianidinas	34
17	Curva de calibración para ácido tartárico y flavonoles	35
18	Curva de calibración para la determinación de la actividad antioxidante del extracto.	36
19	Curva de calibración para el cálculo de nmoles de MDA	39
20	Fotografías de la zona de muestreo: Refugio “La Esperanza”	41
21	Cambios estacionales de precipitaciones y temperaturas	42

22	Contenido de agua del suelo a diferentes profundidades en las cuatro estaciones	43
23	Fotografías de <i>L. divaricata</i> en otoño y primavera.	44
24	Fotografías de <i>L. chilense</i> en otoño y primavera	44
25	Fotografías de <i>P. speciosa</i> en otoño y primavera	45
26	Fotografías de <i>P. ligularis</i> en primavera	46
27	Altura total de arbustos: <i>L. divaricata</i> y <i>L. chilense</i> y pastos: <i>P. speciosa</i> y <i>P. ligularis</i>	47
28	Contenido relativo de agua en hojas de arbustos y pastos	50
29	Contenido relativo de agua en raíz de arbustos y pastos	51
30	Fotografías de cortes transversales a mano alzada de hojas de <i>L. divaricata</i> , <i>L. chilense</i> , <i>P. speciosa</i> y <i>P. ligularis</i>	52
31	Fotografías de preparados permanentes de cortes transversales de hojas de <i>L. divaricata</i> en primavera, <i>L. divaricata</i> en otoño, <i>L. chilense</i> en primavera y <i>L. chilense</i> en otoño	53
32	Fotografías de cortes transversales de raíz de <i>L. divaricata</i> , <i>L. chilense</i> , <i>P. speciosa</i> y <i>P. ligularis</i> .	54
33	Gráficos de número de estomas de <i>L. divaricata</i> en las distintas caras y número de tricomas de <i>L. divaricata</i> en las distintas caras.	56
34	Concentración de clorofila <i>a</i> y clorofila <i>b</i> en hojas de las especies en estudio	57
35	Concentración de carotenoides en hojas de las especies en	58

	estudio	
36	Contenido de fenoles totales en hojas de arbustos y pastos	59
37	Contenido de flavonoides totales en hojas de arbustos y pastos.	61
38	Contenido de proantocianidinas en hojas de arbustos y pastos	62
39	Contenido de ácido tartárico en hojas de arbustos y pastos	64
40	Contenido de flavonoles en hojas de arbustos y pastos	65
41	Actividad antioxidante de polifenoles en arbustos y pastos.	66
42	Estructuras químicas de compuestos hallados en <i>Larrea divaricata</i>	69
43	Estructuras químicas de compuestos hallados en <i>Lycium chilense</i>	70
44	Estructuras químicas de compuestos hallados en raíz de <i>Pappostipa speciosa</i> durante la estación de primavera	71
45	Estructuras químicas de compuestos hallados en hoja y raíz de <i>Pappostipa speciosa</i> durante la estación de otoño	72
46	Capacidad antioxidante del extracto de polifenoles en hojas de <i>L. divaricata</i> y <i>L. chilense</i> , y en hoja y raíz de <i>P. speciosa</i>	73
47	Contenido de MDA en hojas de los arbustos: <i>L. divaricata</i> y <i>L. chilense</i> y de los pastos: <i>P. speciosa</i> y <i>P. ligularis</i>	74
48	Contenido de MDA en raíces de los arbustos: <i>L. divaricata</i> y <i>L. chilense</i> y de los pastos: <i>P. speciosa</i> y <i>P. ligularis</i>	75
49	Contenido endógeno de ABA en hojas de arbustos (<i>L.</i>	76

	<i>divaricata</i> y <i>L. chilense</i>) y pastos (<i>P. speciosa</i> y <i>P. ligularis</i>)	
50	Contenido endógeno de ABA en raíces de arbustos (<i>L. divaricata</i> y <i>L. chilense</i>) y pastos (<i>P. speciosa</i> y <i>P. ligularis</i>)	77
51	Contenido endógeno de ABA-GE en hojas de arbustos (<i>L. divaricata</i> y <i>L. chilense</i>) y pastos (<i>P. speciosa</i> y <i>P. ligularis</i>)	78
52	Contenido endógeno de ABA-GE en raíces de arbustos (<i>L. divaricata</i> y <i>L. chilense</i>) y pastos (<i>P. speciosa</i> y <i>P. ligularis</i>)	79
53	Contenido endógeno de AIA en hojas de arbustos (<i>L. divaricata</i> y <i>L. chilense</i>) y pastos (<i>P. speciosa</i> y <i>P. ligularis</i>)	80
54	Contenido endógeno de AIA en raíces de arbustos (<i>L. divaricata</i> y <i>L. chilense</i>) y pastos (<i>P. speciosa</i> y <i>P. ligularis</i>)	81
55	Contenido endógeno de GAs en hojas. GA ₁ en arbustos (<i>L. divaricata</i> y <i>L. chilense</i>), GA ₁ en pastos (<i>P. speciosa</i> y <i>P. ligularis</i>), GA ₃ en arbustos (<i>L. divaricata</i> y <i>L. chilense</i>) y GA ₃ en pastos (<i>P. speciosa</i> y <i>P. ligularis</i>)	82
56	Contenido endógeno de GAs en raíces. GA ₁ en arbustos (<i>L. divaricata</i> y <i>L. chilense</i>), GA ₁ en pastos (<i>P. speciosa</i> y <i>P. ligularis</i>), GA ₃ en arbustos (<i>L. divaricata</i> y <i>L. chilense</i>) y GA ₃ en pastos (<i>P. speciosa</i> y <i>P. ligularis</i>)	83
57	Análisis de componentes principales en arbustos	88
58	Análisis de componentes principales en pastos	89
59	Análisis discriminante lineal en arbustos	91
60	Análisis discriminante lineal en pastos	92
61	Modelo propuesto de integración	107

ABREVIATURAS

ψ : Potencial Hídrico

μ l: microlitros

μ m: micrómetros

ABA: ácido abscísico/ En tablas y gráficos representa los valores del variable contenido endógeno de ácido abscísico en las muestras

ABA-GE: Acido abscísico glucosil-éster/ En tablas y gráficos representa los valores del variable contenido endógeno de ácido abscísico glucosil-éster en las muestras

Abs: Absorbancia

ABTS: ácido 2,2'-Azinobis-3-etibenzotiazolin-6-sulfónico/ En tablas y gráficos representa los valores de la variable actividad antioxidante de las muestras.

ABTS^{•+}: radical catiónico del ácido 2,2'-Azinobis-3-etibenzotiazolin-6-sulfónico

Ac: ácido

ACP: análisis de componentes principales

ADL: análisis discriminante lineal

AIA: ácido indol 3-acético/ En tablas y gráficos representa los valores del variable contenido endógeno de ácido indol 3-acético en las muestras

AlCl₃: Cloruro de aluminio

ANOVA: análisis de la varianza

APX: Enzima ascorbato peroxidasa

ATP: adenosin trifosfato

CAR: En tablas y gráficos representa los valores del variable contenido carotenoides de las muestras

CAT: enzima catalasa

CDP: copalil difosfato

CENPAT: Centro Nacional Patagónico

CKs: Citoquininas

CLOR: En tablas y gráficos representa los valores del variable contenido de clorofilas totales de las muestras

cm: Centrimetros

C_n: Carbono. *n* representa la enumeración del carbono en la estructura química de esqueleto carbonado.

CO₂: Dióxido de carbono

CoA: Coenzima A

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

COOH: grupo carboxilo

CP: componentes principales

CPS: copalil difosfato sintasa

CRA: Contenido relativo de agua/ En tablas y gráficos representa los valores de la variable contenido relativo de agua.

DAD: detector de arreglo de diodos

DMACA: p-(dimetilamino)-cinemaldehido

DPA: Acido dihidrofaseico

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilihidracil

E: Este

EC: eje canónico

EROs: Especies reactivas del oxígeno

ESI: fuente de ionización por electrospray

ET: Etileno

FAA: solución fijadora de tejidos vegetales a base de Formaldehido, Alcohol y ácido Acético.

FeSO₄: Sulfato férrico

FT: En tablas y gráficos representa los valores del variable contenido de fenoles totales de las muestras

G: Acido Gálico

g: gramo

G3P: Gliceraldehido-3-fosfato

GA₁: Giberelina 1/ En tablas y gráficos representa los valores del variable contenido endógeno de Giberelina 1 en las muestras

GA₃: Giberelina 3/ En tablas y gráficos representa los valores del variable contenido endógeno de Giberelina 3 en las muestras

GA₄: Giberelina 4

- GA₇**: Giberelina 7
- GAs** : Giberelinas
- GGDP**: Geranil geranil difosfato
- GR**: Enzima glutatión reductasa
- H₂O**: agua
- HCl**: ácido clorhídrico
- HHDP**: ácido hexahydroxidifenico
- HPLC/UV**: Cromatografía líquida de alta eficacia con detección ultravioleta
- HPLC**: Cromatografía líquida de alta eficacia
- HPLC-ESI-MS**: Cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a espectrometría de masas de ionización por electroespray
- HRESIMS**: espectros de masa de alta resolución por ionización electroespray
- hs**: horas
- I%**: porcentaje de inhibición
- I**: En tablas y gráficos representa la estación invierno
- IAM**: Indolacetaminda
- IAOX**: indol-3-acetaldoxima
- IPP**: Isopentenilpirofosfato
- KAO**: ácido kaurenico oxidasa
- Km**: kilómetro
- KO**: kaurenico oxidasa
- KS**: kaurenico sintasa
- l**: litro
- LC/MS-MS**: Cromatografía líquida-espectrometría de masas tandem
- LC**: cromatógrafo líquido
- Lc**: En tablas y gráficos representa la especie *Lycium chilense*
- Ld**: En tablas y gráficos representa la especie *Larrea divaricata*
- m/z**: Representación de la variable *relación masa carga* de una partícula, utilizada en espectrometría de masas.
- M**: concentración molar
- m**: metro

MDA: malondialdehído/ En tablas y gráficos representa los valores de la variable peroxidación lipídica de las muestras.

MeOH: Alcohol metílico

mg: miligramo

MI: muestra insuficiente para llevar a cabo la técnica

min: minutos

ml: mililitro

mm: Milimetro

mM: solución milimolar

MS²: tipo de escaneo de masas en la cromatografía líquida de alta eficacia

NADP⁺: Dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato oxidado

NaNO₂: nitrato de sodio

NaOH: hidróxido de sodio

NE: Noreste

NH₄Ac: acetato de amonio

nm: nanómetro

O: Oeste/ En tablas y gráficos representa la estación Otoño

O: oxígeno

O₂⁻: Anión superóxido

°C: grado centígrado

OH: grupo hidroxilo

°T: temperatura

p/v: solución peso en volumen

P: En estadística también llamado P valor. Es la probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula.

P: En tablas y gráficos representa la estación primavera

PA: Acido faseico

PF: Peso fresco

PGG: Pentagalloil glucosa

PH: Peso Húmedo

PIN: Familia de proteínas transmembrana específicas de plantas que actúan como transportadores secundarios de auxinas y sus metabolitos.

PI: En tablas y gráficos representa la especie *Poa ligularis*

ppm: partes por millón

Ps: En tablas y gráficos representa la especie *Pappostipa speciosa*

PS: peso seco

PT: peso turgente

R: Coeficiente de correlación

R²: coeficiente de determinación

RE: Reticulo endoplasmático

rpm: revoluciones por minuto

S: Sur

SOD: enzima superóxido dismutasa

SWC: En tablas y gráficos representa los valores del variable contenido de agua en el suelo

TAM: Triptamina

TBA: ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

Trolox: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2 ácido carboxílico

TRP: triptófano

UNRC: Universidad Nacional de Río Cuarto

UV: ultravioleta

v/v: Solución volumen en volumen

V: En tablas y gráficos representa la estación verano

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Ecosistemas áridos-semiáridos

Geográficamente, las regiones desérticas de la Tierra se dividen en tres categorías de acuerdo con el total de lluvia que reciben: zonas extremadamente áridas las cuales tienen por lo menos 12 meses consecutivos sin lluvia; zonas áridas, con precipitaciones anuales menores a 250 mm, y zonas semiáridas con precipitaciones anuales entre 250 y 500 mm y un régimen de precipitaciones estacionales. Las regiones áridas y semiáridas se caracterizan por poseer, además de escasas precipitaciones, marcadas amplitudes térmicas anuales, fuertes vientos y baja humedad atmosférica. Los ecosistemas áridos y extremadamente áridos son denominados desiertos, donde la cobertura vegetal está ausente, mientras que los ecosistemas semiáridos constituyen las estepas y generalmente tienen una cobertura vegetal reducida (Meigs, 1953). En regiones semiáridas el déficit hídrico es el factor ambiental preponderante que modela el patrón de vegetación, el cual se encuentra distribuido heterogéneamente formando parches de vegetación isodiamétricos donde existe mayor concentración de materia orgánica, nutrientes, semillas y en algunos casos mayor disponibilidad hídrica que en las áreas de suelo desnudo (Noy-Meir, 1973; Bertiller y col., 2004).

La gran extensión territorial de Argentina, especialmente latitudinal, lleva a la existencia de varios climas a lo largo de todo el país. Los climas áridos y semiáridos comprenden La Puna, los Andes de Catamarca, La Rioja, San Juan y gran parte de la Patagonia (Menutti y Menutti, 1983).

1.1. El Monte Patagónico

El Monte Patagónico (Fig. 1) ocupa un área de aproximadamente 42000 km² en el NE de la Patagonia que se extiende desde el centro y E de Neuquén y Río Negro hasta el NE de Chubut, más específicamente entre 42-44° 20´S y 64-68° O (Soriano, 1950). Se caracteriza por poseer un clima árido-semiárido con un régimen termométrico templado-frío con temperaturas medias anuales mayores a los 13 °C e inferiores a los 15 °C, observándose una gran amplitud térmica tanto estacional como diaria. Las precipitaciones oscilan por debajo de los 200 mm y pueden estar distribuidas a lo largo de todo el año o bien concentradas en invierno y/o primavera (Cabrera, 1976).

Las geoformas y suelos predominantes del Monte Patagónico dan lugar a cierta heterogeneidad espacial de la vegetación, desde matorrales cerrados hasta estepas arbustivas dominados por las formas biológicas de pastos perennes y arbustos. La vegetación presenta una estructura de parches isodiamétricos formados por arbustos bajos, intermedios y altos, y pastos, alternados con áreas de tamaño variable sin cobertura vegetal o con matas aisladas de pastos perennes y arbustos de bajo porte (Bertiller y col., 2004).

1.2. Vegetación del Monte Patagónico Chubutense

Como se describió anteriormente el Monte Patagónico posee arbustos bajos, altos y pastos perennes. Entre los arbustos altos (de 1 a 3 metros de altura) podemos encontrar *Larrea divaricata*, *Larrea nitida*, *Chuquiraga erinacea*, *Lycium chilense*, *Junellia seriphoides*, *Condalia microphylla*, *Prosopidastrum globosum*, *Schinus johnstonii* y *Monttea aphylla*. Entre los arbustos de porte bajo (de 0,5 a 1,2 metros de altura) podemos encontrar *Atriplex lampa*, *Chuquiraga avellanadae*, *Prosopis denudans* y *Prosopis alpataco*. Por otro lado, el estrato gramíneo (de 0,1 a 0,5 metros de altura) está dominado por pastos perennes donde las especies más frecuentes son *Nasella tenuis*, *Poa ligularis* y *Pappostipa speciosa*, entre otros (Cabrera, 1976 ; Bertiller y col., 1981; Beeskow y col., 1987; Ares y col., 1990; Bertiller y col., 1991; León y col., 1998; Cenzano y col., *en prensa*). Todas estas especies poseen gran variación de estrategias adaptativas relacionadas con la conservación de agua y nutrientes (Bertiller y col., 1995; 2005; 2006).

Las fluctuaciones de disponibilidad hídrica dadas por el clima de la región permite la coexistencia de grupos dominantes de la vegetación (pastos y arbustos) que poseen distintos comportamientos fenológicos. *Larrea divaricata* y *Pappostipa speciosa* son especies siempreverdes que presentan comportamientos fenológicos asociados a su habilidad para explorar suelos a diferentes profundidades (Bertiller y col., 1991).

Entre los arbustos se encuentran *Larrea divaricata*, vulgarmente llamado jarilla, el cual es un arbusto siempreverde, de raíces profundas, con comportamiento de tipo árido activo, ya que su actividad fenológica se desarrolla sin interrupciones durante el período seco independientemente de la disponibilidad hídrica del suelo. Por otro lado, el arbusto *Lycium chilense* (yaoyín o coralillo) posee un comportamiento árido pasivo, con hojas caducas en la estación seca y su actividad fenológica se restringe al periodo invierno-primavera o a lo sumo se extiende al verano temprano cuando el suelo superficial se mantiene húmedo y la disponibilidad de nitrógeno inorgánico es mayor (Bertiller y col., 1991).



Fig. 1. Regiones Fitogeográficas de la Argentina (Burkart y col., 1999 modificado)

Entre los pastos dominantes se destacan *Poa ligularis*, *Nasella tenuis* y *Pappostipa speciosa*, los cuales constituyen más del 90% de la biomasa herbácea de la comunidad vegetal. *Poa ligularis* (coirón poa) es una especie dioica, anemófila de amplia distribución en el Monte Patagónico (Boelcke, 1957; Correa, 1978). Es considerada una planta adquisitiva/mesofítica debido a su elevado recambio foliar, elevada velocidad de crecimiento, gran potencialidad para captura de recursos y pierde sus hojas durante la estación seca. Por otra parte, *Pappostipa speciosa* (coirón duro) es considerada una especie conservativa/xerofítica, debido a que posee elevada concentración de lignina en sus hojas, pubescencia foliar, baja velocidad de crecimiento y comportamiento similar a una especie perennifolia (Pazos y col., 2007).

En cuanto a los patrones de distribución espacial, los pastos se concentran en la periferia del canopy de los arbustos, mientras que los arbustos se pueden hallar con igual intensidad en micrositios asociados a los parches ó en las áreas de suelo desnudo entre parches. Es por esto que los arbustos pueden señalarse como colonizadores o iniciadores de pequeños parches en las áreas de suelo desnudo, y tanto pastos como arbustos ser responsables del crecimiento isodiamétrico de los parches de la vegetación (Bertiller y col., 2004).

2. Mecanismos de adaptación a la sequía

Las fluctuaciones de disponibilidad hídrica dadas por el clima de la región permiten la coexistencia de grupos dominantes de vegetación que poseen distintos comportamientos fenológicos. En condiciones de campo la respuesta a la escasez de agua es compleja y difícil de estudiar aisladamente ya que existe la superposición de otros tipos de factores ambientales tales como la intensidad de los vientos, la radiación solar, o la fluctuación de temperatura diaria (elevada durante el día y baja durante la noche). Por lo tanto, las plantas poseen diversas estrategias para hacer frente a la sequía, como evitación o tolerancia (Levitt, 1980), las cuales varían con el genotipo e involucran cambios adaptativos (Chaves y col., 2002).

Existen diferentes mecanismos de respuesta a la sequía (regulación del comportamiento estomático, cambios morfológicos en las hojas, osmorregulación, producción de metabolitos secundarios, etc.) que a las plantas les permiten aumentar la tolerancia al estrés hídrico. En ecosistemas naturales, las plantas tolerantes a sequía son aquellas que tienen la capacidad de desarrollarse y sobrevivir en un ambiente seco. Muchos

autores han clasificado las plantas de ambientes semiáridos según las respuestas morfo-fisiológicas, creando grandes grupos de acuerdo a la estrategia utilizada (Tabla 1). Actualmente, la clasificación más utilizada por ecólogos y ecofisiólogos es la propuesta por Levitt (1980) quien clasificó a las plantas de regiones semiáridas en dos grandes grupos según el mecanismo de resistencia a la sequía que presentan: plantas que evitan el estrés y plantas que toleran el estrés. Las primeras se caracterizan por tener un ciclo de vida corto antes del periodo de sequía intenso (inclusive adelantan la floración frente a un déficit hídrico prematuro) o por tener una corta estación de crecimiento (Sherrard y Maherali, 2006). También poseen estrategias para la conservación del agua como presencia de cutículas gruesas, pérdida de hojas, reducción de la transpiración, sistema radical profundo, entre otras. Las segundas tienen la capacidad de mantener sus parámetros fisiológicos normales aún durante largos periodos de sequía. Poseen estrategias tales como: ajuste osmótico, módulo de elasticidad elevado, diferentes mecanismos antioxidantes y producción de metabolitos secundarios tales como compuestos fenólicos y/o lignina (Reddy y col., 2004; Westoby y col., 2002). Como ejemplo se puede nombrar a la especie *Larrea tridentata* (arbusto C3 siempreverde que domina el desierto de América del Norte), en la cual pequeños pulsos de agua posibilitan su supervivencia e incrementan la capacidad de responder a periodos de sequía duraderos. El contenido de agua de *Larrea tridentata* en el desierto de Mojave varía entre 0,5 a 1,0 ml/g PS dependiendo de la estación, siendo más elevado durante la primavera (posterior a las lluvias de invierno). A su vez posee un elevado nivel de ácido abscísico (ABA) durante la estación seca y mantiene la integridad fisiológica durante el estrés hídrico aunque reduce al máximo la eficiencia fotosintética (Yan y col. 2000; Hamerlynck y Huxman, 2009).

Debido a que las plantas de regiones áridas se clasifican en función de las características de los diferentes nichos ecológicos que poseen, se hace muy difícil catalogar una especie vegetal en uno de los grupos y por eso es necesario centrarse en los mecanismos que emplea cada especie para adaptarse al ecosistema.

Tabla 1: Nomenclatura de las estrategias hídricas. Se muestran las equivalencias de los términos y clasificaciones más empleados. Se incluye en cursiva el término en inglés originalmente empleado por el autor (Valladares y col., 2004).

	Levitt (1980)	Turner (1986)	Kozlowski et al. (1991)	Jones (1992)	Larcher (1995)
Descripción	Resistencia a la sequía Drought resistance	Resistencia a la sequía Drought resistance	Tolerancia a la sequía Drought resistance	Tolerancia a la sequía Drought resistance	Resistencia a la sequía Drought resistance
Especies que completan el ciclo vital antes del estrés	Evasión <i>Scape</i>	Evasión <i>Scape</i>	Evitación <i>Avoidance</i>	Evitación <i>Avoidance</i>	Elusiva de sequía (árido pasiva) <i>Drought evading (arid-passive)</i>
Especies que evitan la deshidratación celular	Evitación <i>Avoidance</i>	Tolerancia con alto potencial hídrico <i>Tolerance with high ψ</i>	Aplazamiento de deshidratación <i>Deshydration postponement</i>	Evitación <i>Avoidance</i>	Evitadora de desecación (árido-activo) <i>Dessication avoidant (arid-active)</i>
Especies que toleran la deshidratación celular	Tolerancia <i>Tolerance</i>	Tolerancia con bajo potencial hídrico <i>Tolerance with low ψ</i>	Tolerancia a deshidratación <i>Dehydration tolerance</i>	Tolerancia <i>Tolerance</i>	Tolerante de desecación (árido-tolerante) <i>Dessication tolerant (arid-tolerant)</i>

2.1. Estrategias adaptativas a nivel anatómico frente a la sequía

2.1.1. Bajo condiciones controladas de laboratorio

Debido a que las plantas responden a las variaciones ambientales a través de ajustes a nivel fisiológico, anatómico e histológico, es importante estudiar las especies nativas de las regiones áridas y semiáridas no sólo desde un punto de vista fisiológico y bioquímico, sino también analizando las características anatómicas e histológicas que ayudan a comprender mejor los mecanismos de adaptación a la sequía.

Un gran número de parámetros anatómicos han sido utilizados para caracterizar individuos o poblaciones xerofíticas. Estudios de anatomía foliar comparada permitieron establecer correlaciones con parámetros fisiológicos (Medri y Lleras, 1983). Asimismo, muchos autores han postulado la existencia de variaciones anatómicas en hojas bajo diferentes condiciones ecológicas. La existencia de correlación entre algunas características xerofíticas y las condiciones de disponibilidad hídrica del medio ha sido informada (Ristic y Cass, 1991; Belhadj y col., 2007). Asimismo, diversos factores ambientales producen cambios estructurales que llevan a xerofitismo (Shields, 1950; Esaú, 1960). Por ello, determinadas características anatómicas pueden ser utilizadas como indicadores de tolerancia a la sequía (Martin y Zieri, 2003).

Algunas de las características más utilizadas para caracterizar al xerofitismo son: e hojas, mayor número de estomas por unidad de área y estomas pequeños, células epidérmicas chicas, cutícula gruesa, mayor número de células del mesófilo con espacios intercelulares más pequeños (Merkulov y col., 1997), presencia de ceras cuticulares (Cameron y col., 2002); y en raíz, inhibición en la expansión de células de la corteza, del periciclo, de los haces vasculares y del parénquima radial, reducción en el número de células en todos los tejidos a excepción de la corteza (donde la división celular cesa antes de la exposición a estrés) y engrosamiento de la pared de las células parenquimáticas (Joyce y col., 1983).

Dado que en plantas, la mayor parte del agua se pierde a través de los estomas, se considera que la forma más eficiente para mejorar la tolerancia a la sequía ocurre debido a modificaciones en el comportamiento de las células oclusivas (Jong Kuk Na, 2005).

Por otra parte, estudios realizados en raíces han demostrado que especies xerofíticas pueden resistir mayores déficits de disponibilidad hídrica que las especies mesofíticas, pero a costo de reducir la conductividad hidráulica (Pockman y Sperry, 2000; Hacke y Sperry, 2001; McElrone y col., 2004). Un aspecto importante de la respuesta de las plantas a la

sequía es que al disminuir la disponibilidad de agua del suelo, la tensión hidráulica a lo largo del sistema planta-suelo aumenta, al punto que la continuidad de la columna de agua del xilema se pierde por cavitación y el transporte de agua es reducido o interrumpido (Tyree y Sperry, 1989; Higgs y Wood, 1995; Atkinson y Taylor, 1996). El límite de tensión del xilema antes de la cavitación depende del diámetro del conducto (Atkinson y Taylor 1996), y se ha postulado que las raíces de especies en condiciones de sequía con conductos de mayor diámetro son más propensas a la cavitación que aquellas que poseen conductos de menor diámetro (Lovisolo y Schubert, 1998; Corcuera y col., 2004; Holste y col., 2006); aquellas que presenten proporcionalmente paredes celulares gruesas podrían ser capaces de tolerar altas tensiones sin colapsar (Hacke y col., 2001).

A medida que el estrés hídrico progresa, la anatomía de los tejidos de la raíz cambia, induciendo el desarrollo de barreras apoplásticas para el transporte de agua e iones a nivel de la endodermis (Stasvoski y Peterson, 1991; Taleisnik y col., 1999). La presencia de esta capa representa una estrategia adaptativa fundamental de plantas que sobreviven en ambientes adversos (North y Nobel, 1995; Peyrano y col., 1997; Zimmermann y Steudle, 1998; Schreiber y col., 1999; Zimmermann y col., 2000; Reinoso y col., 2004, 2005). Se conoce que el déficit hídrico reduce el crecimiento de la raíz y causa una pronunciada suberización del apoplasto y quizás también, afecta a los canales de transporte de agua. Taleisnik y col. (1999) observaron que la pérdida de agua en plantas bajo estrés hídrico es menor en las plantas que poseen exodermis que en las plantas sin exodermis y que los tejidos viejos de la raíz liberan menos cantidad de agua al ambiente que los jóvenes. Por otro lado, Rieger y Litvin (1999) realizaron mediciones en plantas controles y estresadas de diferentes especies de pastos y de plantas leñosas y propusieron que la existencia de exodermis suberizada tiene influencia en la conductancia hidráulica de toda la raíz. Sin embargo, la resistencia de la corteza dada por la presencia de Bandas de Caspari en la endodermis parece ser igual o de mayor importancia que la de las capas suberizadas.

En raíces de maíz expuestas a sequía se observó una suberización pronunciada de la endodermis y exodermis para proteger los tejidos vasculares del déficit hídrico (Sharp y Davies, 1985; Stasvoski y Peterson, 1991). Jupp y Newman (1987) observaron que en cebada y pastos perennes que se encuentran bajo estrés hídrico, las células de la corteza de la raíz mueren dando lugar a una espesa y gruesa exodermis y endodermis.

2.1.2. Estudios a campo

Se ha demostrado que, ante condiciones adversas, algunas especies poseen la estrategia de aumentar (en tamaño o número) las células del esclerénquima (Castro-Diéz y col., 1999; Bussoti y col., 2002). A su vez, las hojas de plantas xerofíticas se caracterizan por una baja relación superficie/volumen (Karabourniotis y Bornman, 1999, Richardson y Berlyn, 2002) como resultado de cambios en el número y tamaño de las células (Chartzoulakis y col., 2000), y mayor densidad de estomas y sistemas vasculares (Bolhar-Nordenkamp, 1987).

Otras características que ayudan a minimizar la pérdida de agua durante la sequía incluyen el enrollamiento foliar (Schwabe y Lionakis, 1996), pubescencia foliar (Pallioti y col., 1994; Karabourniotis y Bornman, 1999; Liakoura y col., 1999), cutícula gruesa, capa de cera epicuticular (León y Bukovac, 1978; Liakoura y col., 1999; Richardson y Berlyn, 2002), tejidos muy lignificados (Richardson y Berlyn, 2002), y células del mesófilo pequeñas con menor espacio intercelular (Bongi y col., 1987; Mediavilla y col., 2001). Tales características van acompañadas con frecuencia por la acumulación de mucílago y otros metabolitos secundarios (Margaris, 1981).

2.2. Estrategias adaptativas a nivel bioquímico frente a la sequía

2.2.1. Compuestos Fenólicos

La mayoría de las especies vegetales, y particularmente las nativas de regiones semiáridas, poseen sistemas antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos que le permiten sobrevivir ante condiciones adversas. Estas condiciones de estrés ambiental limitan la fijación de CO₂ y reducen la regeneración de NADP⁺, causando una sobre-reducción de la cadena transportadora de electrones fotosintética, donde el oxígeno se convierte en un aceptor alternativo de electrones, formando anión superóxido (O₂^{•-}). Por lo tanto, la sequía produce en consecuencia un estrés oxidativo (Smirnoff, 1993).

En el apoplasto, las especies reactivas del oxígeno (EROs) son generadas por peroxidasas dependientes del pH, por aminoxidasas y, principalmente por la actividad del complejo NADPH oxidasa. Dado el alto grado de toxicidad y reactividad de las EROs su producción y acumulación debe estar bajo un fuerte control. Es por esto que las plantas disponen de un sistema antioxidante enzimático, siendo las principales enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y

glutación reductasa (GR) (Jiang y Zhang, 2002), las cuales constituyen una estrategia para minimizar el daño oxidativo (Scandalios y col., 1997).

Adicionalmente, las especies que viven en ambientes extremos disponen de amortiguadores redox no enzimáticos que protegen contra el daño oxidativo, evitando que las EROs alcancen niveles incompatibles con el metabolismo normal de las células (Sies, 1993; Rice-Evans y col., 1997). Cuando las plantas se encuentran expuestas a largos periodos de estrés abiótico, la producción de metabolitos secundarios se ve incrementada para la protección de estructuras celulares que pueden ser dañadas a causa de la producción excesiva de EROs (Sies, 1993; Naczki y Shahidi, 2004). Los amortiguadores redox se caracterizan por ser moléculas donadoras de electrones capaces de reaccionar con las EROs para neutralizar los radicales libres y así prevenir que los mismos reaccionen con las estructuras celulares. Entre los amortiguadores redox existe un grupo de moléculas con gran capacidad antioxidante, los compuestos fenólicos, los cuales, en los últimos años, han sido de gran interés para diversos grupos de investigación (Sreenivasulu y col., 2000; Higdon and Frei, 2003; Shahidi and Zhong, 2010; Krishnaiah et al., 2011; Silva et al., 2007; Surweswaran et al., 2007; Isabelle et al., 2010; Moore et al., 2005).

Los compuestos fenólicos, o también llamados polifenoles, se consideran metabolitos secundarios debido a que no son esenciales en procesos primarios de desarrollo y crecimiento, pero sí son de vital importancia en la interacción de la planta con el ambiente y la supervivencia ante ambientes adversos (Nigam, 2009). Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en frutos, hojas y semillas de muchas especies vegetales. El perfil de polifenoles que posee cada órgano y cada especie es particular, ya que existen diferentes clases de polifenoles que se diferencian en polaridad, tamaño y estructura química y se acumulan en distintas concentraciones.

Estos compuestos se caracterizan por tener en su estructura química al menos un anillo aromático con uno o más grupos funcionales hidroxilos. Debido a que son compuestos que se han comenzado a estudiar recientemente, no existe una clasificación universal de los mismos, por lo que diferentes autores los han clasificado en diferentes grupos dependiendo de su estructura química (Crozier y col., 2009; Motilva y col., 2013; Khanbabaee y van Ree, 2001). Una de las clasificaciones se basa en el número de anillos de fenol que contienen, en los elementos estructurales que unen estos anillos entre sí, y en la cantidad de grupos funcionales presentes (Crozier y col., 2009). En esta clasificación los compuestos se agrupan en tres grandes grupos: no-flavonoides, flavonoides y taninos. Los no-flavonoides son moléculas químicas que poseen al menos un anillo fenólico con diferentes números de

grupos hidroxilos; este grupo incluye fenoles simples, ácidos fenólicos, fenil-alcoholes, estilbenos, chalconas y lignanos (Fig. 2). Los ácidos fenólicos se dividen en: derivados del ácido benzoico (esqueleto C₆-C₁) y derivados del ácido cinámico (esqueleto C₆-C₃). El esqueleto carbonado de los estilbenos se compone de C₆-C₂-C₆ y el esqueleto de las chalconas se compone de C₆-C₃-C₆ unido a un anillo heterocíclico y/o a un compuesto fenólico con una estructura de anillo abierto. Los lignanos se forman de dos fenil-alcoholes unidos por medio de un anillo de cinco carbonos (Crozier y col., 2009) (Fig. 2).

Por otro lado los compuestos del grupo de los flavonoides se caracterizan por tener un corazón fenilcromano de C₁₅ compuesto de dos anillos aromáticos unidos por una cadena carbonada (C₆-C₃-C₆) y constituyen el grupo de compuestos fenólicos más abundantes (Fig. 3). En este grupo se incluyen antocianinas, antocianidinas, flavonoles, flavonas, flavononas, flavanonoles, isoflavonas, flavan-3-oles, flavan-4-oles, flavan-3,4-oles, entre otros (Fig. 4) (Motilva y col., 2013).

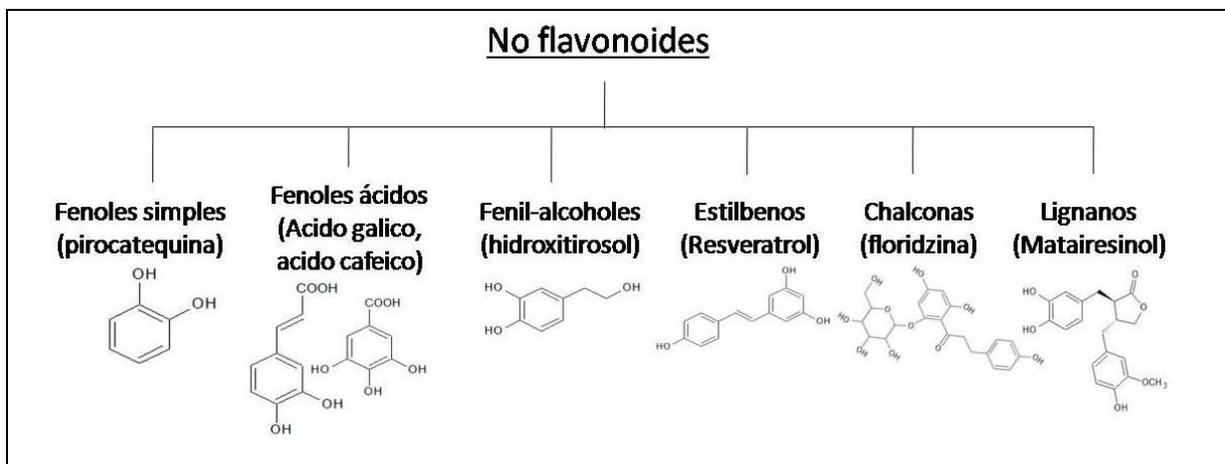


Fig. 2. Clasificación de los no-flavonoides.

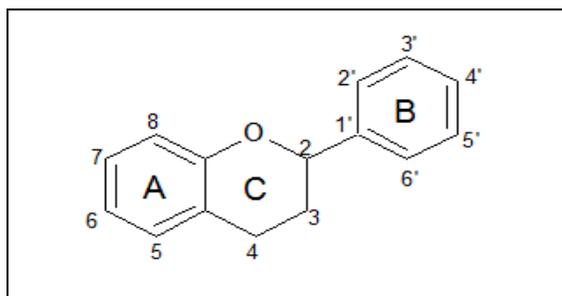


Fig. 3. Estructura de los flavonoides.

Por último, el tercer grupo denominado taninos o proantocianidinas se pueden subclasificar en taninos condensados y taninos hidrolizables (Khanbabaee y van Ree, 2001) (Fig. 5). Debido a que los taninos son polímeros de diferentes unidades monoméricas de flavonoides, hay autores que clasifican los taninos dentro del grupo de los flavonoides (Khanbabaee y van Ree, 2001). Los taninos condensados son polímeros de flavonoides que se forman por uniones carbono-carbono. Las proantocianidinas tipo A poseen uniones C₇-C₂ y una unión éter adicional (Fig. 6a) (Hümmer y Schreier, 2008), mientras que las proantocianidinas tipo B se caracterizan por tener uniones C₄-C₈ (Fig. 6b) o uniones C₄-C₆ (Fig. 6c) (Bravo, 1998). Por último, los taninos hidrolizables son polímeros de ácidos fenólicos unidos a un corazón de 5 o 6 carbonos. Dentro de los taninos hidrolizables se encuentran los gallotaninos: poligalloil ester de glucosa (provenientes del ácido gálico) unidos a un corazón de carbonos (Fig. 7a) y los ellagitaninos: polímeros de ácido hexahydroxidifenico (HHDP) (provenientes de ácido elágico) unidos a un corazón formado por glúcido(s) (Fig. 7b) (Khanbabaee y van Ree, 2001).

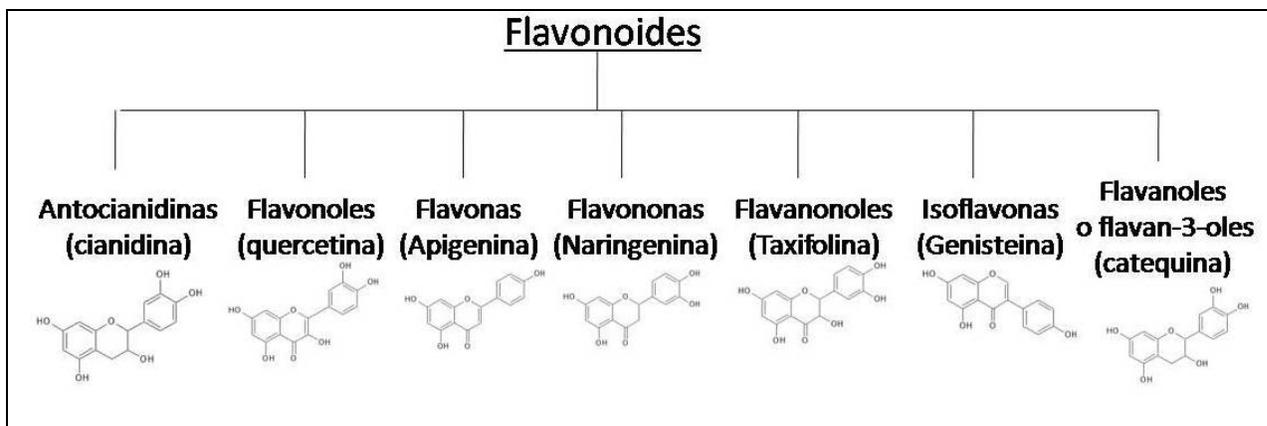


Fig. 4. Clasificación de los flavonoides.

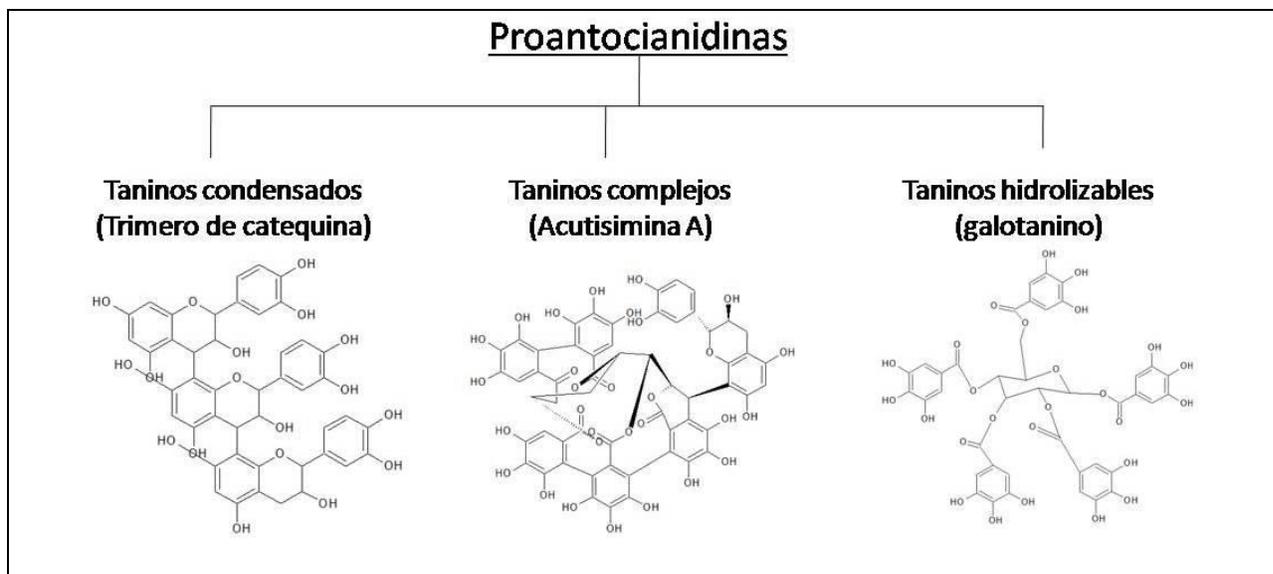


Fig. 5. Clasificación de las proantocianidinas

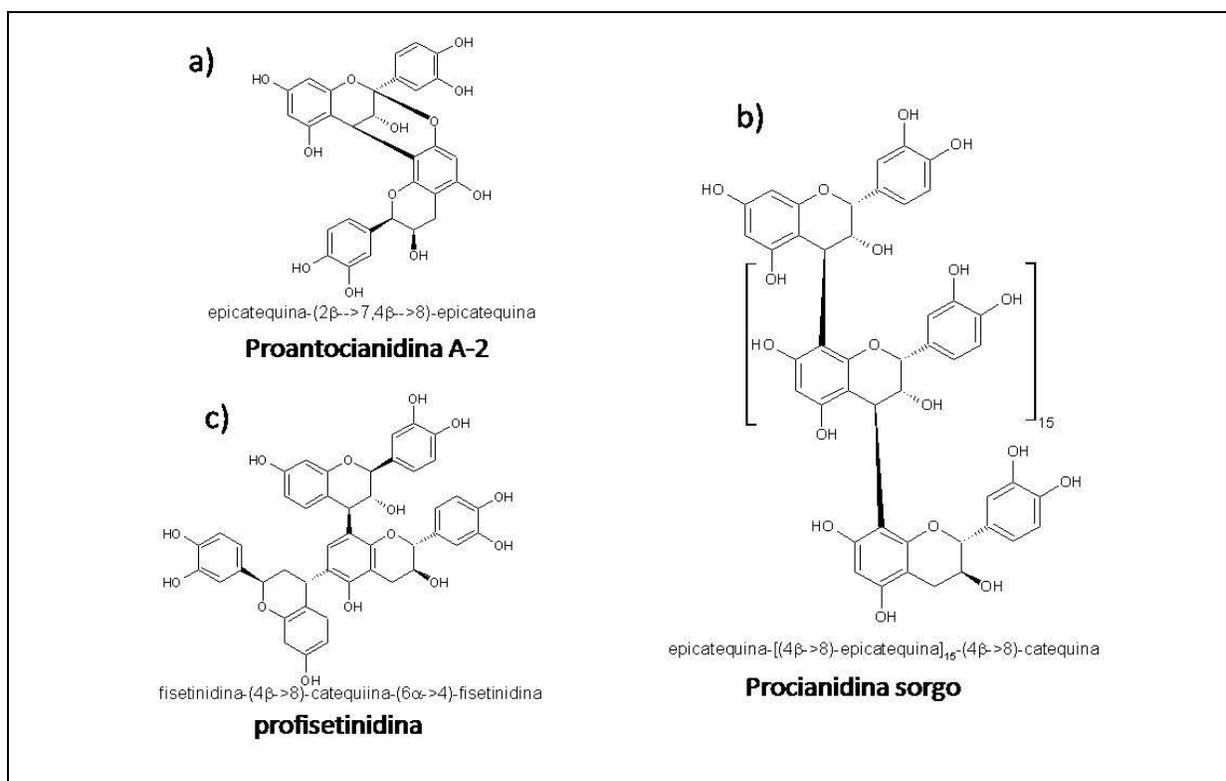


Fig. 6. Ejemplos de taninos condensados.

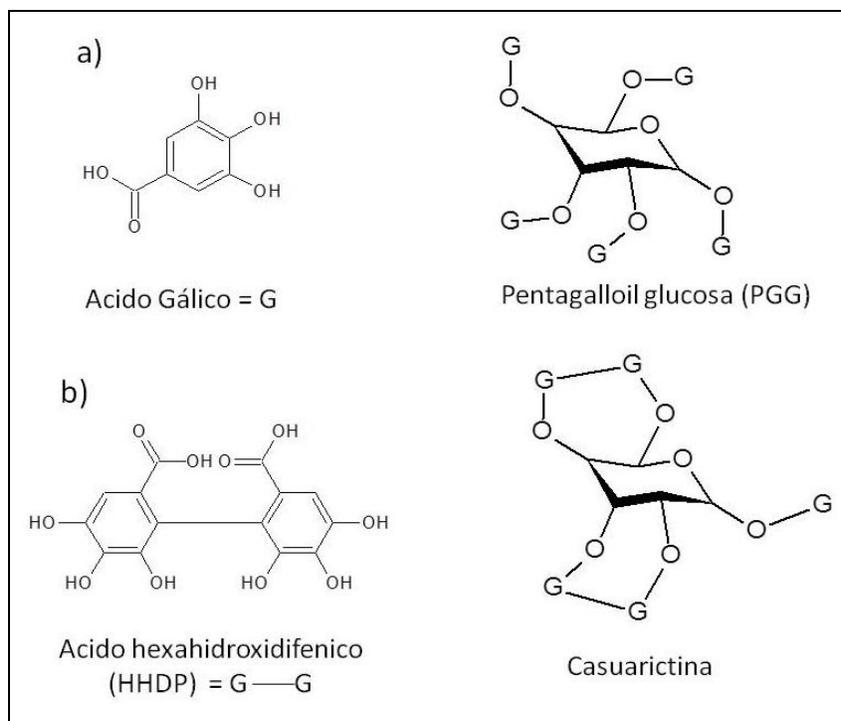


Fig. 7. Ejemplos de taninos hidrolizables.

2.2.2. Biosíntesis de polifenoles

Los polifenoles son productos del metabolismo secundario de las plantas y se forman a través de dos importantes rutas primarias: del ácido siquímico y de los poliacetatos (Bravo, 1998). La ruta del ácido siquímico sintetiza aminoácidos aromáticos, como fenilalanina o tirosina y luego sintetiza ácidos cinámicos y sus derivados, dando lugar a la formación de fenoles simples, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados de fenilpropano. Esta ruta es dependiente de la luz y se inicia en los plastidios por condensación de eritrosa-4-fosfato (procedente de la vía de las pentosas fosfato) y fosfoenolpiruvato (proveniente de la glucólisis). Luego de algunas modificaciones se obtiene el ácido siquímico del que derivan algunos fenoles. Posteriormente, el ácido trans-cinámico incorpora un grupo hidroxilo a nivel del anillo aromático dando la formación de ácido p-cumárico y luego una coenzima A transforma el ácido p-cumárico en p-cumaroilCoA que es el precursor activo de la mayoría de los fenoles de origen vegetal.

Por otro lado, la ruta de los poliacetatos conduce a la formación de las quinonas y xantonas. Esta ruta se inicia a partir de una molécula de acetilCoA y por medio de una serie de condensaciones origina los poliacetatos. Luego, por reducción de los poliacetatos se forman los ácidos grasos que por ciclizaciones dan una gran variedad de compuestos aromáticos. Existe una tercera ruta (la ruta mixta) la cual combina precursores de la vía del

ácido siquímico y precursores de la vía de los poliacetatos dando moléculas biológicamente activas pertenecientes al grupo de los flavonoides (Fig. 8) (Quiñones y col., 2012).

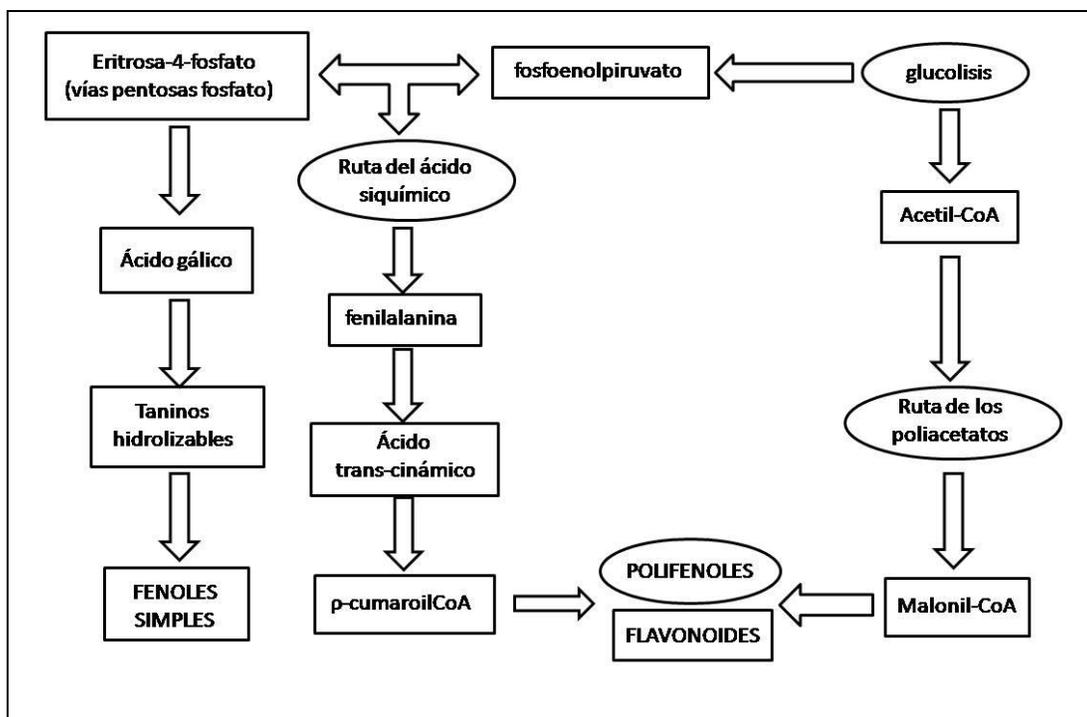


Fig. 8. Biosíntesis de polifenoles (Quiñones y col., 2012 modificado).

Diferentes estudios han demostrado que la especie nativa de los desiertos de América del norte emparentada con *L. divaricata*, *Larrea tridentata*, posee hojas cubiertas por una resina que posee gran proporción de compuestos fenólicos (Hyder y col., 2002; Martins y col., 2010). Estos compuestos brindan mayor tolerancia a la sequía debido a que evitan la transpiración, actúan como antioxidantes, protegen al tejido fotosintético contra la radiación UV, manteniendo la fotosíntesis neta a muy bajo potencial agua (Sharifi y col., 1988), intervienen en la alelopatía y evitan la herbivoría (Waterman y Mole, 1994). Su ocurrencia es tanto en hojas como en raíces donde su síntesis y acumulación es generalmente estimulada en respuesta a estrés biótico y abiótico (Naczki y Shahidi, 2004). Por lo tanto, el incremento en la concentración de estos compuestos bajo condiciones de sequía, podría ser considerado como un indicador de la resistencia a este factor (Hura y col., 2009).

Debido a la gran capacidad antioxidante de estos compuestos, en los últimos años ha sido de gran interés el aislamiento y elucidación de la estructura química de diferentes

grupos de polifenoles producidos por diversas especies vegetales ya que su actividad biológica puede ser aplicable a la industria farmacéutica y alimenticia (Okuda e Ito, 2011).

2.3. Fitohormonas

2.3.1. Papel de las fitohormonas en las respuestas a estrés

Las respuestas de las plantas frente al estrés implican cambios bioquímicos como modificaciones en el balance de hormonas vegetales endógenas, conocidas también como fitohormonas, e interconexión entre las diferentes vías de señalización hormonal (Pan y Wang, 2009; Hey y col., 2009).

Las fitohormonas han sido descritas como compuestos derivados de diferentes vías metabólicas que pueden actuar localmente (en el lugar de síntesis) o ser transportadas hacia un órgano blanco con el fin de regular el crecimiento y desarrollo de la planta, o en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico y biótico (Peleg y Blumwald, 2011).

La interacción de las plantas con el ambiente es mediada, en su mayor parte, por las fitohormonas. Por ello, las modificaciones en el balance de las fitohormonas son consecuencia de la respuesta de la planta frente a los diferentes tipos de estrés. Algunas disminuyen los niveles mientras otras los aumentan y a su vez interactúan entre sí. Estas fluctuaciones hormonales alteran la dinámica celular, jugando un rol esencial en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas.

Actualmente, se conocen diferentes tipos de fitohormonas como auxinas, citoquininas (CKs), giberelinas (GAs), ácido abscísico (ABA), etileno (ET) y otros reguladores del crecimiento, tales como jasmonatos, salicilatos, brasinoesteroides, poliaminas, estringolactonas, entre otros, que controlan la mayoría de los procesos bioquímicos y fisiológicos (Davies, 2010; Iqbal y col., 2014).

Las fitohormonas tienen un rol importante como mediadores de la respuesta a estrés por lo cual, la planta puede “escapar” o sobrevivir frente a condiciones estresantes impuestas por el ambiente que la rodea (Skirycz y Inzé, 2010). El estrés abiótico causa alteración en la producción y/o distribución de las hormonas vegetales, promoviendo de esta manera la activación de mecanismos protectores específicos (Eyidogan y col., 2012). Es por esto que al censar una señal de estrés se dispara una cascada de traducción de señales, en la que las fitohormonas actúan como moléculas señales iniciadoras o mensajeros primarios (Harrison, 2012).

La principal hormona involucrada en la respuesta a estrés hídrico es el ABA, la cual media respuestas rápidas (asociadas por ejemplo, con la actividad de los canales iónicos para el cierre estomático) y respuestas lentas (activación de vías metabólicas de defensa) (Sreenivasulu y col., 2012). Las auxinas son hormonas asociadas principalmente con el crecimiento y el control del desarrollo, aunque, recientemente, la participación de las mismas en la respuesta a estrés abiótico ha sido propuesta durante la activación de genes (Coupe y col., 2006; Havlova y col., 2008). Las GAs intervienen en la regulación de la respuesta de la planta frente a estímulos externos (Chakrabarti y Mukherji, 2003). Particularmente, el estrés salino induce una rápida acumulación de GAs en plantas de nativas (Llanes y col., 2014). Asimismo, se ha informado que la acumulación de GA₃ favorece procesos metabólicos al intervenir en las vías de señalización de azúcares y enzimas antioxidantes (Iqbal y col., 2011).

2.3.2. Ácido Abscísico (ABA)

Es bien conocido que el nivel endógeno de ABA varía en función de los cambios ambientales, desempeñando un papel fundamental en los mecanismos de respuesta de tolerancia al estrés abiótico, principalmente hídrico y salino (Bray, 2002). El ABA le confiere a las plantas tolerancia a la sequía, a las bajas temperaturas y a la elevada concentración de sal en el suelo (Wasilewska y col., 2008). Por este motivo, ABA es definido como la principal hormona del estrés abiótico, debido a que su acumulación bajo estas condiciones y a su mediación en mecanismos fisiológicos y bioquímicos ayudan a la supervivencia de las plantas frente a este tipo de situaciones (Zhang y col., 2006).

La sequía del suelo causa una reducción de la absorción de agua por las raíces (North y Nobel, 1991) provocando la deshidratación celular con el consiguiente aumento rápido en el contenido endógeno de ABA (Zhang y col., 2006; Schachtman y Goodger, 2008). Algunos autores consideran que la sequía es detectada primero en las hojas como un cambio en el estado hídrico del mesófilo a consecuencia de la transpiración, ésto activa la biosíntesis de novo de ABA en hojas, conduciendo al cierre estomático (Christmann y col., 2007; Ikegami y col., 2009). Bajo condiciones de estrés más severo, el ABA se acumula en la raíz, donde se libera al xilema que lo transporta hacia la parte aérea de la planta. De esta manera, regula el movimiento estomático y la actividad del meristemática del tallo (Jiang y Hartung, 2007).

La participación del ABA en la regulación de estos procesos es mediada por cambios en su síntesis de novo y catabolismo (hidroxilación y conjugación) (Schwartz y col., 2003).

Los niveles de ABA son regulados dinámicamente mediante un balance entre síntesis, conjugación, transporte y degradación (Cutler y Krochko, 1999). La señal de ABA raíz-hoja es controlada mayoritariamente por la conjugación, siendo crucial en la determinación del destino de la señal y el control del cierre estomático (Ren y col., 2007).

La síntesis de ABA se realiza en cloroplastos del mesófilo foliar o en plástidos de células de la raíz a partir del clivaje de 9-*cis*-epoxicarotenoides cuyo producto xantoxina se traslada al citoplasma para ser convertido a través de una serie de pasos enzimáticos en ABA (Nambara y Marion-Poll, 2005; Schroeder y Nambara, 2006). El catabolismo de ABA ocurre a través de numerosas vías y, generalmente depende de la especie, estado de desarrollo o tipo de tejido (Feurtado y col., 2007). En la mayoría de los tejidos, la principal vía catabólica comienza con la hidroxilación del grupo metilo C-8' para formar un intermediario inestable 8'-hidroxi-ABA que se convierte espontáneamente en ácido faseico (PA) mediante una 8'-hidroxilasa; éste por reducción forma el ácido dihidrofaseico (DPA) (Zhou y col., 2003). ABA también puede conjugarse con glucosa formando el conjugado glucosil éster (ABA-GE) (Xu y col., 2002). ABA-GE también puede ser hidrolizado por β -glucosidasas produciendo ABA libre activo (Lee y col., 2006) (Fig. 9). Hasta el momento se ha postulado que ABA-GE podría actuar como señal hormonal del estrés a larga distancia, siendo liberado al xilema en grandes cantidades (Jiang y Hartung, 2007; Llanes y col. 2014) o como forma de almacenamiento (Sauter y Hartung, 2002).

Dietz y col. (2000) informaron que bajo estrés salino se libera ABA del ABA-GE por β -glucosidasas, y en *Arabidopsis* estas enzimas producen ABA bioactivo capaz de inducir el cierre estomático y así brindar mayor tolerancia al estrés por sequía (Lee y col., 2006) sugiriendo que ABA y ABA-GE actuarían juntos creando e intensificando la señal de estrés por sequía. Resultados similares fueron descritos en la halófito nativa *Prosopis strombulifera* en respuesta a salinidad (Llanes y col. 2014). Otros autores observaron que durante la rehidratación celular, el ABA apoplástico es metabolizado a sus productos inactivos tales como PA, DPA y ABA-GE en el simplasto de manera de permitir la apertura estomática (Sauter y Hartung, 2002; Srivastava, 2002).

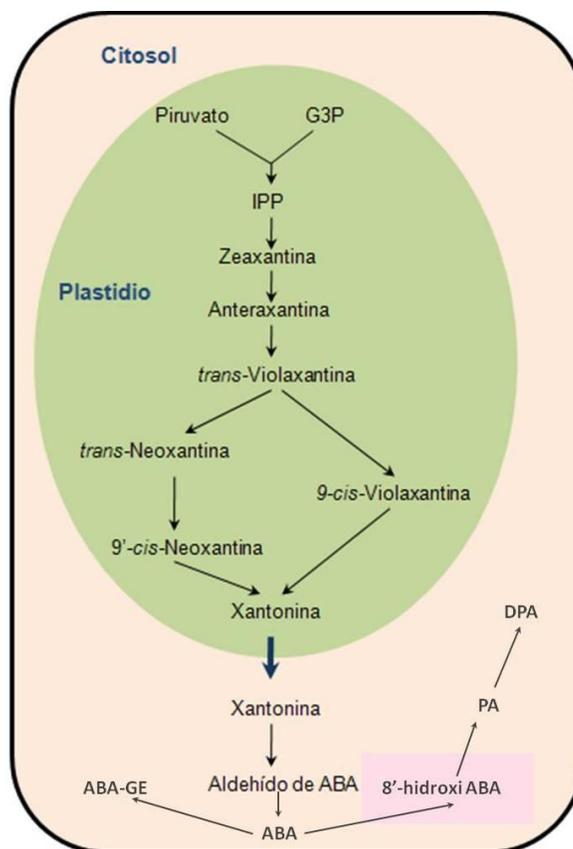


Fig. 9. Biosíntesis y catabolismo de ABA

(Nambara y Marion-Poll, 2005; Schroeder y Nambara, 2006, con modificaciones).

La acumulación de ABA ha sido descrita para diversas especies mesofíticas (Jiang y Zhang, 2002; Qin y Zeevaart, 2002). En xerofíticas, a pesar de que se han informado algunos genes que codifican factores de transcripción de la vía de señalización de ABA, el papel de esta hormona no ha sido dilucidado (Zhang y col., 2004). A su vez, escasos estudios han informado cambios en los niveles de ABA en especies nativas de la Patagonia (Abernethy y McManus, 1998). Recientemente, estudios bajo condiciones controladas en pastos autóctonos del Monte Patagónico revelaron mayores niveles de ABA en la especie menos xerofítica, sugiriendo que esta hormona media una respuesta plástica de resistencia a la sequía de manera particular para cada grupo funcional (Cenzano y col., 2014).

2.3.3. Auxinas

Las auxinas fueron la primera familia de hormonas vegetales descubiertas. La primera auxina identificada se llamó ácido indol-3-acético (AIA). AIA es la principal hormona involucrada en procesos fisiológicos de regulación del crecimiento, tales como elongación del

tallos, diferenciación celular, tropismo, desarrollo de los tejidos vasculares y dominancia apical (Wang y col., 2001; Woodward y Bartel, 2005; Teale y col., 2006).

A pesar de ser AIA la primera hormona descubierta su biosíntesis aún no se conoce completamente debido a su complejidad, esto sugiere que los niveles de AIA son finamente regulados por su papel fundamental en el desarrollo de la planta (Fahad y col., 2015). Se conoce que los ápices de coleoptilos, tallos y hojas jóvenes, cambium y semillas en desarrollo son lugares de biosíntesis de ABA. Se han descrito al menos dos rutas biosintéticas para AIA: vía triptófano dependiente y vía triptófano independiente (Mano y Nemoto, 2012) (Fig. 10). Luego de su síntesis, AIA puede ser inactivado por oxidación (descarboxilativa o no-descarboxilativa) o conjugación con azúcares y aminoácidos (Ljung, 2012). Diferentes investigadores han propuesto que AIA estaría involucrado en el control de respuestas del desarrollo de la planta frente a condiciones adversas e inclusive en el control del crecimiento bajo diferentes tipos de estrés (Eyidogan y col., 2012). En diferentes especies, se ha informado el incremento de AIA libre (Iqbal y col., 2014) y un cross-talk con la señalización de auxinas (Jung y Park, 2011) frente a salinidad, y un aumento en la concentración de AIA endógeno frente a estrés hídrico, estrés por calor y la combinación de ambos (Dobra y col., 2010).

2.3.3. Giberelinas (GAs)

Las GAs constituyen una amplia familia de diterpenos tetracíclicos ácidos e incluyen compuestos biológicamente activos que regulan el crecimiento de las plantas. A la fecha se han identificado alrededor de 130 GAs naturales, a pesar de lo cual sólo cuatro se consideran las formas biológicamente activas (GA_1 , GA_3 , GA_4 , GA_7) en la regulación del crecimiento y desarrollo induciendo la germinación, la floración, la elongación del tallo y retrasando la senescencia de hojas y frutos (Hedden y Thomas, 2012). Las GAs naturales poseen un anillo de ent-giberelano de 20 átomos de carbono o de 19 átomos de carbono.

La biosíntesis de GAs se puede dividir en 3 etapas de acuerdo con la compartimentalización celular y las enzimas involucradas. La primera etapa, denominada etapa de ciclación, se lleva a cabo en los plástidos dando como resultado la formación de ent-kaureno a partir de ácido mevalónico. La segunda etapa (etapa de reacciones de oxidoreducción) ocurre en membranas del retículo endoplasmático, donde el ent-kaureno es oxidado a GA_{12} . Por último en la tercera etapa (etapa de oxidaciones) ocurre en el citosol donde esta primera giberelina formada, GA_{12} , es oxidada hasta la formación de las GAs biológicamente activas (Fig. 11) (Hedden, 2012). Se han descrito muchos mecanismos de

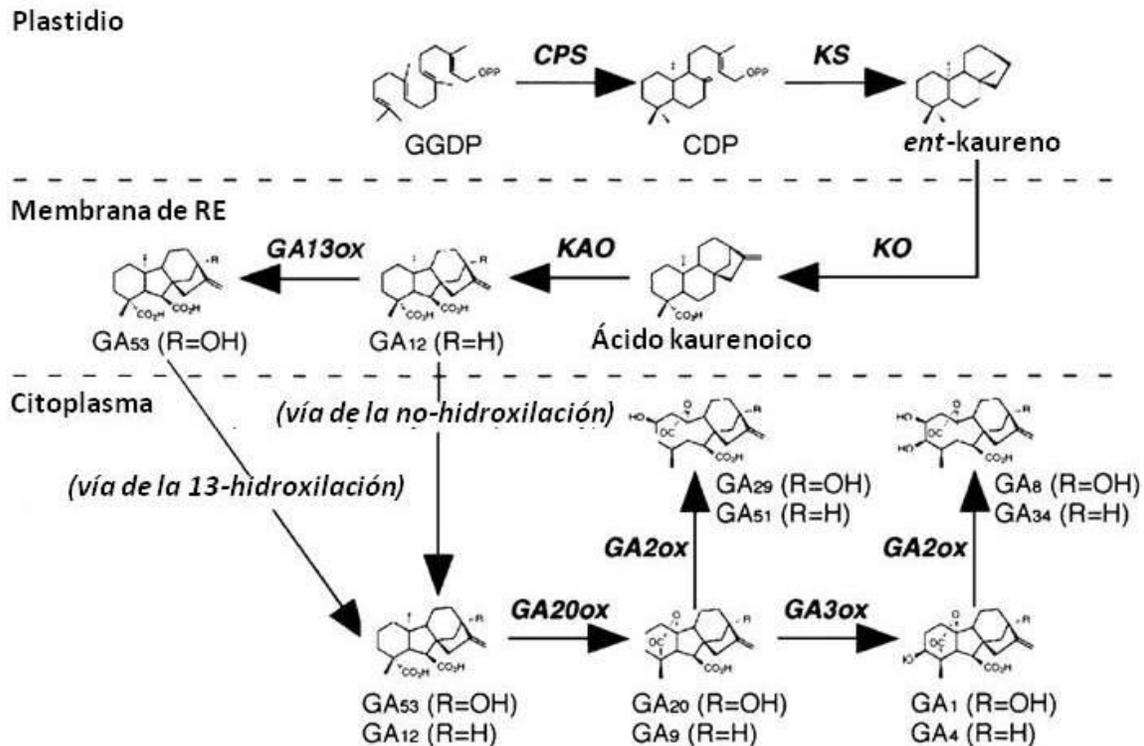


Fig. 11: Biosíntesis de GAs (Hedden (2012) con modificaciones).

Las hormonas vegetales y su interacción de forma sinérgica y/o antagónica resultan de gran interés para la comprensión de los mecanismos de adaptación de diferentes especies vegetales y sus atributos ecológicos (Farsworth, 2004).

La plasticidad fisiológica se refiere a rasgos característicos tales como la capacidad de regular la apertura estomática y, por ende la tasa fotosintética que permiten a una especie adaptarse a las variables del ambiente como intensidad lumínica y transpiración (Sultan, 2000). En este contexto algunos rasgos funcionales de plantas están fuertemente relacionados con la aptitud y el éxito de los individuos en un entorno determinado, y proporcionan buenos indicadores sobre la ecología de las especies (Nicotra y col., 2010).

Asimismo, el estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo y crecimiento de especies vegetales, en conjunto con la influencia del medio ambiente sobre las respuestas plásticas de las plantas, tales como plasticidad fisiológica, estructural, bioquímica y metabólica (Sultan, 2000), lleva a comprender los diferentes mecanismos de adaptación de las diferentes formas de vida que habitan ambientes adversos (Weyers y Paterson 2001). Es por esto que comprender las respuestas eco-fisiológicas de especies vegetales y su

integración con señales ambientales desde un enfoque holístico del ecosistema, llevaría a una mejor interpretación de los atributos de diferentes comunidades vegetales y su adaptación a los diferentes ambientes.

Por todo lo expuesto y, ante la carencia de estudios sobre los mecanismos bioquímicos y fisiológicos de especies nativas de ambientes áridos bajo condiciones de campo, la identificación de caracteres bioquímicos y hormonales que poseen roles funcionales en la adaptación a la sequía puede ser necesaria para la implementación de estrategias de conservación de especies de nuestro Monte Patagónico.

Por estos motivos, este estudio propone dilucidar los mecanismos de respuestas frente a la sequía impuesta naturalmente y su correlación con los tipos funcionales de plantas, e inferir un gradiente de mesofitismo-xerofitismo sustentado en caracteres morfológicos, fisiológicos y/o bioquímicos.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis de trabajo:

Las características morfo-fisiológicas y bioquímicas de las cuatro especies en estudio difieren según sus mecanismos de resistencia a la sequía (tolerancia o evitación) ante variaciones en la disponibilidad hídrica del suelo a lo largo del año y permiten establecer un gradiente de xerofitismo-mesofitismo y correspondencia con los grupos funcionales de plantas definidos desde el punto de vista eco-fisiológico.

Objetivo general:

Analizar los diferentes mecanismos morfo-fisiológicos y bioquímicos de resistencia a la sequía impuesta naturalmente en especies nativas del Monte Patagónico, y el efecto estacional del cambio en los pulsos de agua a lo largo del año sobre estos parámetros.

Objetivos específicos:

- **Objetivo 1:** Analizar los cambios estacionales de los pulsos de agua (eventos de precipitación) y de temperatura en el área de estudio.
- **Objetivo 2:** Realizar un análisis de las características morfo-histológicas de las cuatro especies nativas del Monte Patagónico.
- **Objetivo 3:** Determinar el contenido relativo de agua (CRA) de las hojas y raíces de las cuatro especies y el contenido de agua en el suelo en las cuatro estaciones.
- **Objetivo 4:** Determinar la concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides) en las hojas de las especies en estudio en las cuatro estaciones.
- **Objetivo 5:** Evaluar las variaciones cuali-cuantitativas de los grupos de polifenoles y su capacidad antioxidante en hojas y raíces de las especies en estudio a lo largo de las estaciones.
- **Objetivo 6:** Identificar y elucidar las estructuras químicas de polifenoles de las hojas de las especies en estudio durante las estaciones del año.

- Objetivo 7: Evaluar la producción de malondialdehído (MDA) de las hojas verdes y raíces finas como parámetro de estrés oxidativo en las especies en estudio durante las estaciones del año.
- Objetivo 8: Evaluar el contenido endógeno de ácido abscísico (ABA), ácido abscísico conjugado con éster glucosa (ABA-GE), ácido indol-3-acético (AIA) y giberelinas (GAs) en las hojas y raíces de las especies en estudio durante las estaciones del año.
- Objetivo 9: Analizar la correspondencia de los parámetros estudiados en los objetivos anteriores con los grupos funcionales definidos sobre la base de los mecanismos de resistencia a la sequía que presentan (tolerancia o evitación).

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Área de estudio

El Monte Patagónico ocupa un área de aproximadamente 42000 km² en el NE de la Provincia de Chubut, entre 42-44° 20'S y 64-68° O (Soriano, 1950) y en esta región, la precipitación no tiene un patrón estacional definido (Cabrera, 1976), siendo la precipitación media anual de 245 mm con un nivel máximo durante el otoño-invierno y la temperatura media anual es de 13,4°C (CENPAT-CONICET).

Los muestreos se realizaron en el Refugio de Vida Silvestre “La Esperanza” de Fundación Patagonia Natural ubicado a unos 75 km al norte de la ciudad de Puerto Madryn, el cual posee una superficie de 67 km² (42°07' 43.92"S y 64°57' 40.99"O) (Fig. 12). Se llevaron a cabo 4 campañas de muestreos, cada una correspondiente a una estación del año: otoño (mayo 2011), invierno (agosto 2011), primavera (noviembre 2011) y verano (febrero 2012).



Fig. 12: Localización de la zona de muestreo (Google Earth 5).

2. Variables ambientales analizadas

2.1. Cambios estacionales en precipitación y temperatura

Para determinar los cambios estacionales en la disponibilidad hídrica, se utilizaron los datos sobre precipitaciones y temperaturas medias registrados mediante un dataloger situado en el Refugio de Vida Silvestre “La Esperanza” de Fundación Patagonia Natural. Por tratarse de un estudio a campo y bajo condiciones naturales, los datos fueron contrastados entre las cuatro situaciones planteadas, sirviendo cada una como control respectivo de las otras.

2.2. Contenido de agua en el suelo

El contenido de agua se determinó mediante el método gravimétrico (Peters, 1965), el cual indica la relación entre el peso de la muestra húmeda y el peso de la muestra seca y se expresa en porcentaje de humedad según la fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = (\text{PH} - \text{PS}) / \text{PS} \times 100$$

Para ello, se tomaron 5 muestras de suelo ubicadas debajo de las especies en estudio a tres profundidades diferentes (10, 20 y 30 cm) y se colocaron inmediatamente en bolsas plásticas bien selladas para evitar la pérdida de humedad y para su traslado al laboratorio. En el laboratorio se registró el peso húmedo (PH) de cada una de ellas mediante balanza analítica, se secaron en estufa a 105° C durante 24-48 hs y luego se registró el peso seco (PS) de las mismas. La diferencia entre el peso de la muestra húmeda y la seca relacionada con el peso seco del suelo, determinó la cantidad de agua del suelo y representa el contenido de humedad en el momento de muestreo.

3. Material vegetal

Para este estudio se seleccionaron dos especies de arbustos altos que dominan el estrato superior de la vegetación, de una altura aproximada de 1,0 a 2,0 m: *Larrea divaricata* Cav. (follaje perenne) y *Lycium chilense* Miers ex Bert. (follaje deciduo) y dos especies de pastos que dominan el estrato comprendido entre 0,1 – 0,5 m: *Pappostipa speciosa* (Trin. et Rupr.) Romaschenko (follaje perenne) y *Poa ligularis* Nees. Ap. Steudel (follaje deciduo). El material vegetal (hojas verdes expandidas, hojas amarillas senescentes y raíces finas)

correspondiente a entre cinco y diez individuos de cada especie (de acuerdo a su abundancia) distribuidos al azar, fue cosechado en las cuatro campañas ya mencionadas. La obtención de las raíces finas (< 2 mm de diámetro, Gordon y Jackson, 2000) de los arbustos se realizó entre los 50-80 cm de profundidad, descubriéndose con sumo cuidado y siguiendo la raíz principal. El material (correspondiente a una planta) se colocó inmediatamente en frío y oscuridad, y se almacenó en conservadoras con hielo y refrigerantes para luego ser llevado hasta el Centro Nacional Patagónico (CENPAT-CONICET) para su clasificación. Las diferentes plantas se clasificaron de acuerdo a los diferentes órganos a analizar (Tabla 2) y se almacenaron a -80°C. El material vegetal fresco congelado se transportó a la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC). En la UNRC se liofilizó y se almacenó en oscuridad hasta el momento de su procesamiento para llevar a cabo los objetivos planteados.

Tabla 2: Clasificación del material vegetal dependiendo de las especies en estudio y de su presencia o ausencia en las campañas realizadas.

Otoño	<i>Larrea divaricata:</i>	Hoja Expandida	Hoja Apical	Raíz <2mm
	<i>Lycium chilense:</i>	Raíz <2mm		
	<i>Pappostipa speciosa:</i>	Hoja Verde	Hoja Amarilla	Raíz
	<i>Poa ligularis:</i>	Hoja Amarilla	Raíz	
Invierno	<i>Larrea divaricata:</i>	Hoja Expandida	Hoja Apical	Raíz <2mm
	<i>Lycium chilense:</i>	Raíz <2mm		
	<i>Pappostipa speciosa:</i>	Hoja Verde	Hoja Amarilla	Raíz
Primavera	<i>Larrea divaricata:</i>	Hoja Expandida	Hoja Apical	Raíz <2mm
	<i>Lycium chilense:</i>	Hoja Verde	Raíz <2mm	
	<i>Pappostipa speciosa:</i>	Hoja Verde	Raíz	
	<i>Poa ligularis:</i>	Hoja Verde	Raíz	
Verano	<i>Larrea divaricata:</i>	Hoja Expandida	Hoja Apical	Raíz <2mm
	<i>Lycium chilense:</i>	Hoja Verde	Raíz <2mm	
	<i>Pappostipa speciosa:</i>	Hoja Verde	Hoja Amarilla	Raíz
	<i>Poa ligularis:</i>	Hoja Verde	Hoja Amarilla	Raíz

4. Variables analizadas en la planta

4.1. Altura total

Previo a la recolección del material vegetal de los individuos elegidos al azar se registró la altura total de cada especie en estudio.

4.2. Biomasa aérea y subterránea

Una vez realizada la recolección del material vegetal y separado en hojas y raíces, se registró el peso seco y peso fresco de cada órgano. Para ello, se pesó el material fresco en balanza analítica y se lo llevó a liofilizar; luego de 24 a 48 hs de iniciado el proceso de liofilización (dependiendo de la cantidad de material obtenido) se pesó el material seco en balanza analítica.

4.3. Estado hídrico de la planta

Se determinó el contenido relativo de agua (CRA) de acuerdo al método de Xu y Zhou (2007). Para ello, se tomaron muestras de los órganos en estudio de cinco individuos de cada especie en las cuatro campañas realizadas y se colocaron en viales cerrados herméticamente para evitar la pérdida de humedad y para su traslado al laboratorio. En laboratorio se pesaron las muestras, llamándose a esto peso fresco (PF) y luego se colocaron en 25 ml de agua durante 24 hs, en oscuridad. Posteriormente se obtuvo el peso turgente (PT), y las muestras fueron llevadas a secar en estufa durante 48 hs a 80°C. Luego del secado se determinó el peso seco (PS). El CRA de las hojas verdes y de las raíces finas se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CRA} = (\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PT} - \text{PS}) \times 100$$

4.4. Análisis anatómico

Durante cada campaña, muestras de raíces y tallos de cada especie en estudio se fijaron en una solución de FAA (alcohol etílico 96°/agua/formol/ácido acético glacial; 50:35:10:5 v/v) y se almacenaron hasta realizar el análisis anatómico. A partir de ellas, se realizaron preparados semipermanentes utilizando cortes transversales realizados a mano alzada. Para ello, las secciones fueron coloreadas por 15 segundos con safranina, lavadas con agua corriente y montadas en un portaobjeto sobre glicerina diluida al 10% con agua destilada. Posteriormente se colocó sobre las mismas un cubreobjeto que fue sellado con esmalte de uñas.

4.4.1. Extracción de epidermis

Este método se aplicó en 10 hojas previamente fijadas en FAA de *L. divaricata*. Las hojas se hirvieron en alcohol 96% durante 10 min. Posteriormente se colocaron en estufa de cultivo (70°C) en una solución acuosa de hidróxido de potasio al 10% durante 3-4 días.

Luego fueron lavadas con agua corriente hasta limpieza del reactivo y se colocaron en cápsula de Petri con una solución de hipoclorito de sodio al 50%, se las dejó reposar unos minutos hasta que se tornaran transparentes y se lavaron con agua corriente. Posteriormente, bajo microscopio estereoscópico se separaron ambas epidermis del resto del mesófilo y las epidermis fueron montadas en portaobjeto con glicerina diluida cuidando que la cara a observar quedara para arriba. Para completar el preparado semipermanente se colocó un cubreobjeto que se selló con esmalte de uñas.

Los preparados semipermanentes obtenidos fueron observados con un microscopio Zeiss Estándar 16 y fotografiados con un microscopio Zeiss Axiophot, con un equipo de captura y digitalización de imagen AxioVision con cámara Axio CamHRc. Las mediciones de las diferentes imágenes se realizaron con el software Image Pro-plus 4.5.

Para cada epidermis se midió el número de estomas y/o tricomas por campo (1,38 mm x 1,03 mm). Debido a que los cortes fueron realizados a mano alzada, y por ello era difícil la visualización de ciertas estructuras, se midieron diferentes parámetros para cada especie y órgano (Tabla 3).

Tabla 3: Parámetros medidos en los cortes histológicos realizados a mano alzada semipermanentes.

Especie	Órgano	Parámetros medidos
<i>L. divaricata</i>	Hoja	Espesor de la hoja (μm) Ancho de la hoja (μm) Distancia entre haces (μm) N° de haces
<i>L. chilense</i>	Hoja	Espesor de la hoja (μm) Ancho de la hoja (μm)
<i>L. divaricata</i> , <i>L. chilense</i>	Raíz	Radio de la raíz (μm) Radio del cilindro central (μm) Ancho del floema (μm) Ancho del parénquima cortical (μm)
<i>P. speciosa</i> , <i>P. ligularis</i>	Hoja	Área de la lámina (μm^2) Área tejido de sostén (μm^2) Radio haces vasculares (μm)
<i>P. speciosa</i> , <i>P. ligularis</i>	Raíz	Radio del cilindro central (μm) Radio vasos xilemáticos del metaxilema (μm) N° de vasos xilemáticos del metaxilema

4.5. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

4.5.1. Extracción de clorofila

Se pesaron 200 mg de peso seco de hojas, se homogeneizó con nitrógeno líquido y se agregaron 10 ml de acetona 80%, almacenando 1 h. a 4° C. Luego, se centrifugaron las muestras durante 5 min a 5000 rpm. El sobrenadante se colocó en tubo limpio para posterior lectura en espectrofotómetro a 650 y 665 nm (clorofila *a* y *b*, respectivamente). El ensayo se llevó a cabo por triplicado de cada campaña y especie.

4.5.2. Extracción de carotenoides

El volumen total de la extracción anterior se colocó en ampolla de decantación agregando 5 ml de NaOH 1M agitando bien para saponificación. Se agregó 15 ml de éter sulfúrico, agitando por 1 min para luego particionar. Se pasó la fracción etérea a un tubo limpio para posterior lectura en espectrofotómetro a 450 nm. El ensayo se llevó a cabo por triplicado de cada campaña y especie.

4.5.3. Cálculo para determinar la concentración de pigmentos

La concentración de clorofila *a*, *b*, clorofilas totales y carotenos se determinó aplicando la formula de Vernon (1960) y Mc Kinney (1941).

<p>Clorofila a: 11,63 (Abs. 665) – 2,39 (Abs. 650)</p> <p>Clorofila b: 20,11 (Abs. 650) – 5,18 (Abs. 665)</p> <p>Clorofilas totales: 6,45 (Abs. 665) + 17,72 (Abs. 650)</p> <p>Carotenos: Abs. 450 x Volumen x (10/2500)</p>
--

4.6. Extracción y cuantificación de polifenoles por espectrofotometría

4.6.1. Extracción de polifenoles

El material vegetal liofilizado proveniente de raíces (200 mg aproximadamente) se trituró con nitrógeno líquido. Se adicionaron 10 ml del solvente de extracción (metanol/agua 80:20 v/v) y se colocó en agitación por 30 minutos en oscuridad, repitiendo este paso tres veces. Luego de cada agitación, el líquido de extracción fue separado de los restos sólidos por centrifugación (8.000 rpm, 15 min. a 4°C). El volumen final del extracto fue reducido a

entre 3-6 ml por rotavapor, filtrado con filtros 0,45 μm y dividido en alícuotas de 2 ml. Los extractos fueron guardados a -80°C para su posterior análisis químico. El ensayo se llevo a cabo por triplicado de cada campaña y especie.

4.6.2. Cuantificación de fenoles totales

Los fenoles totales fueron determinados con el método de Folin-Ciocalteu, adaptado a nuestras muestras, de acuerdo con Barbolan y col. (2003). Se mezclaron 25 μl del extracto polifenólico, 1,25 ml de agua destilada y 125 μl del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó y se esperó 8 min. Luego se le adicionó 0,5 ml de solución de carbonato de sodio al 20% y 0,6 ml de agua destilada para un volumen final de 2,4 ml. La mezcla final se agitó para homogeneizar y se dejó reposar por 30 min para que tomara lugar la reacción y se estabilizara. Se empleó ácido gálico como estándar para la construcción de la curva de calibración (Fig. 13) y se midió la absorbancia a 760 nm (Waterman y Mole, 1994). El contenido de fenoles totales fue calculado como mg equivalentes de ácido gálico.

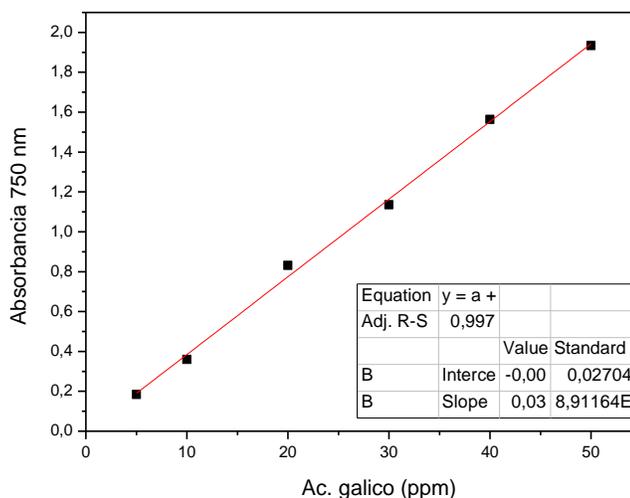


Fig. 13. Curva de calibración para fenoles totales.

4.6.3. Flavonoides totales

Los flavonoides totales fueron cuantificados de acuerdo con Kim y col. (2003). A 100 μl de muestra de extracción, se le adicionaron 60 μl de NaNO_2 5% y se dejó reposar 5 min. Luego se le adicionó 40 μl AlCl_3 10% y se dejó reposar otros 5 min. Se agregó 400 μl de NaOH 1 M. El contenido de la reacción fue diluido en 200 μl de agua destilada y homogeneizado. Se empleó epicatequina como estándar para la construcción de la curva de

calibración (Fig. 14) y se midió la absorbancia a 510 nm. El contenido de flavonoides fue calculado como mg equivalentes de catequina.

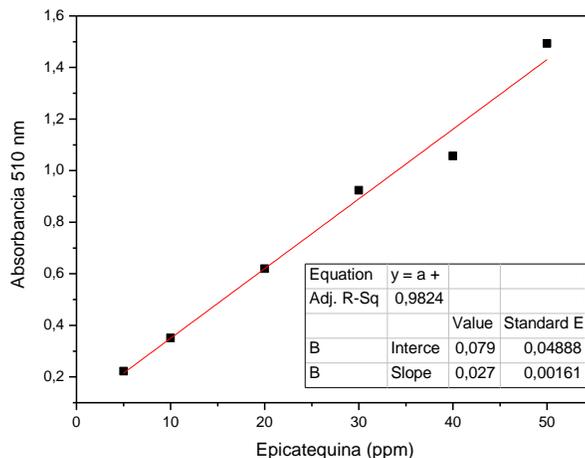


Fig. 14. Curva de calibración para Flavonoides totales.

4.6.4. Flavan-3-oles totales

Los flavan-3-oles totales fueron determinados luego de una derivatización con p-(dimetilamino)-cinemaldehido (DMACA) de acuerdo con Nigel y Glories (1991). Se diluyeron 10 µl de muestra de extracción con 90 µl de metanol (MeOH). Luego se agregó 250 µl HCl (0,24 N en MeOH), 250 µl de solución DMACA (0,2% en MeOH) y 250 µl de MeOH. A la mezcla se le dejó reaccionar a temperatura ambiente hasta el final de la reacción (30 min aproximadamente). Se empleó epicatequina como estándar para la construcción de la curva de calibración (Fig. 15) y se midió la absorbancia a 640 nm. El contenido de flavan-3-oles totales fue calculado como mg equivalentes de catequina.

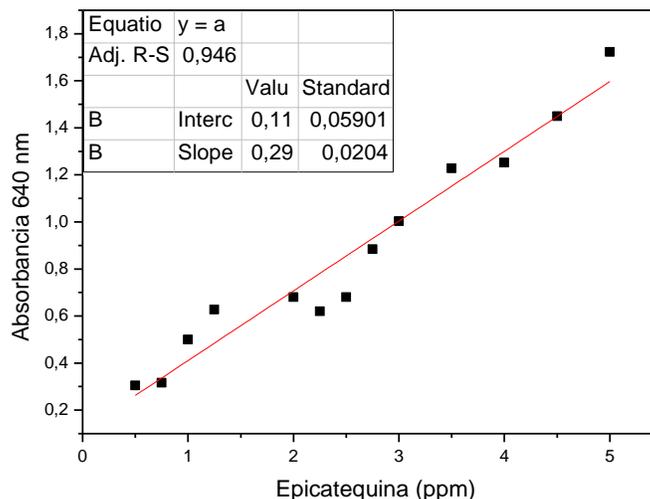


Fig. 15. Curva de calibración para Flavan-3-oles totales.

4.6.5. Proantocianidinas

Las proantocianidinas o taninos condensados fueron determinados por el método descrito por Waterman y Mole (1994). Se preparó el reactivo de Butanol mezclando 128 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ con 5 ml de HCl concentrado y 100 ml de n-butanol. Una alícuota de 50 μl de muestra fue mezclada con 700 μl del reactivo de butanol y calentado a 95°C en baño de agua por 45 min. Las muestras se enfriaron, y se le adicionó 250 μl de n-butanol. Se empleó cianidina como estándar para la construcción de la curva de calibración (Fig. 16) y se midió la absorbancia a 550 nm. El contenido de taninos condensados se calculo como mg de equivalentes de cianidina.

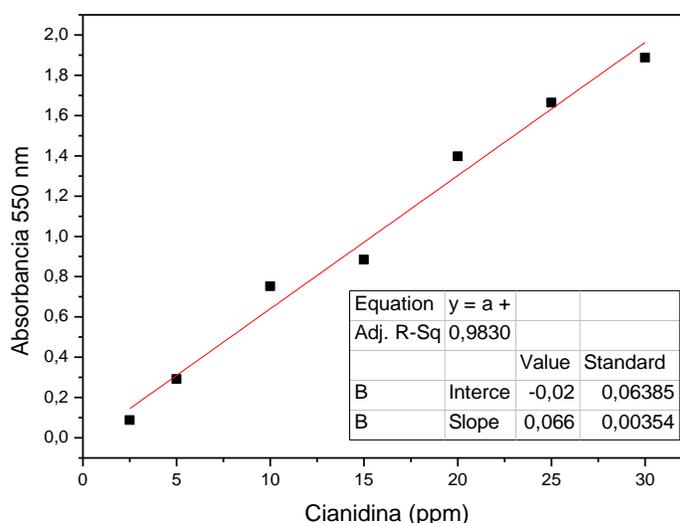


Fig. 16. Curva de calibración para Proantocianidinas.

4.6.6. Ácidos tartárico y flavonoles

Una versión modificada del método Glories fue usada para estimar el contenido de ácido tartárico y flavonoles (Romani y col., 1996). Una alícuota de 25 μl de muestra fue diluida con 225 μl de etanol 10%. Luego se agregaron 250 μl de HCl 0,1% en 95% de etanol y 1 ml de HCl al 2%. Se mezcló la solución y se esperó 5 min. Se empleó ácido cafeico y quercetina como estándares para la construcción de las curvas de calibración para ácido tartárico (Fig. 17a) y flavonoles (Fig. 17b), respectivamente. Para ácido tartárico se midió la absorbancia a 320 nm y para flavonoles a 360 nm. La cantidad de ésteres de ácido tartárico y flavonoles se calculó como mg de equivalentes de ácido cafeico y quercetina, respectivamente.

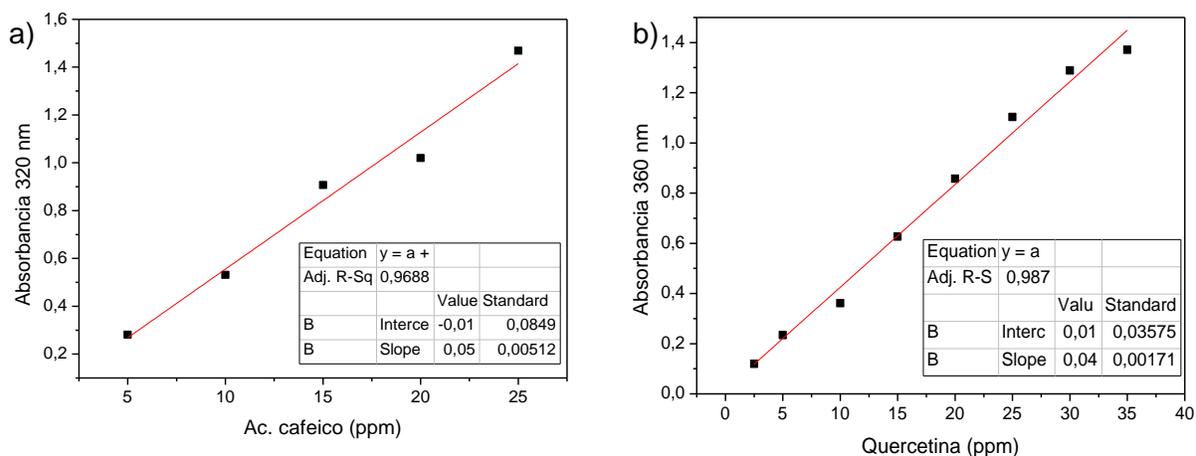


Fig. 17. Curva de calibración para a) ácido tartárico y b) flavonoles.

4.6. 7. Determinación de la actividad antioxidante del extracto

La actividad antioxidante del extracto se determinó utilizando la técnica de decoloración del radical catiónico del ácido 2,2'-Azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS^{•+}). Para llevar a cabo esta técnica se generó el radical ABTS^{•+} mezclando una solución stock de ABTS^{•+} con persulfato de potasio. La solución ABTS^{•+} se colocó en oscuridad durante 16 h hasta lograr la estabilidad del reactivo. Luego se diluyó en etanol hasta lograr una absorbancia de $0,700 \pm 0,020$ a 734 nm (Rice-Evans y col., 1996). Se tomaron 100 μ l de muestra diluida en metanol 80% y se le adicionó 1 ml de la solución ABTS^{•+} en etanol hasta alcanzar una inhibición de la absorbancia entre 20-80% con respecto al blanco. Se mezcló 1 ml de la solución ABTS^{•+} en etanol con 100 μ l de muestra diluida en metanol 80% para lograr una inhibición de la absorbancia entre 20-80% con respecto al blanco.

La absorbancia fue registrada luego de 4 min. de reacción a 734 nm. Se empleó una solución 2,5 mM de 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2 ácido carboxílico (Trolox) para la construcción de la curva patrón (Fig. 18). La curva patrón se construyó con la molaridad de Trolox (de 0 a 16 μ M) en el eje de las abscisas y el porcentaje de inhibición de la absorbancia en el eje de las ordenadas.

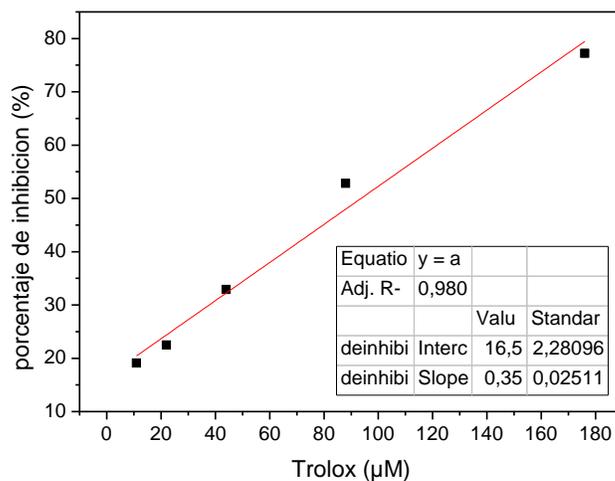


Fig. 18. Curva de calibración para la determinación de la actividad antioxidante del extracto.

Para el cálculo de porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = [1 - (\text{Abs muestra}/\text{Abs blanco})] \times 100$$

La actividad antioxidante de las muestras se expresó como mg equivalentes de Trolox.

4.7. Identificación y determinación de la estructura química de compuestos polifenólicos

Muestras de hojas de *L. divaricata* y *L. chilense* y de raíces y hojas de *P. speciosa* y *P. ligularis* correspondientes a dos estaciones de pulso de agua contrastaste (otoño: sequía, primavera: humedad), fueron liofilizadas y trituradas con nitrógeno líquido. Las muestras homogeneizadas fueron transportadas hasta la Universidad de Pamukkale, Denizli, Turquía, donde se llevaron a cabo los siguientes ensayos:

4.7.1. Extracción y aislamiento

Aproximadamente 500 g de material vegetal liofilizado, molido fueron colocados en erlenmeyer junto con MeOH/H₂O 70:30 v/v en una proporción 1:5 p/v durante 6 hs a

temperatura ambiente. Luego de cada extracción, las muestras fueron filtradas y concentradas en evaporador rotatorio a 40°C y conservadas a 4°C. El extracto fue dializado en membranas sintéticas (Cellu-Sep H1) utilizando agua destilada para obtener una mezcla de polifenoles pre-purificada que fue conservada a 4°C durante 1 semana para que se lleve a cabo la hidrólisis de taninos solubles en agua. La solución obtenida fue filtrada, primero con papel de filtro (Whatman N°1, Kent, U.K.) y luego con filtros descartables (PTFE 0,45 µm). A continuación, a cada muestra, se le ajustó el pH entre 9-10 con hidróxido de sodio (0,8 M), ya que la degradación química con NaOH incrementa la eficiencia de separación por HPLC.

4.7.2. Separación por HPLC/UV

El análisis por HPLC fue llevado a cabo usando un equipo Waters, controlado por el programa Water millennium, el cual consiste en un auto inyector plus 717, bomba Water 600 E en combinación con un desgasificador en línea Waters 600 detector arreglo de diodo Waters 996. Se utilizó agua deionizada usando un sistema Millipore (milli-Q academic).

Para la separación de los compuestos puros se utilizaron columnas de HPLC Waters Atlantis C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm y Phenomenex C18 Luna-100, 250 x 10 mm, 5 µm. Los solventes de elución fueron (A) metanol y (B) ácido trifluoroacético en agua (0,01%). La elución comenzó con 20% de A hasta 70% de B por el término de 60 min. El flujo de corrida fue de 1,5 mL/min.

4.7.3. Determinación de la estructura química por HPLC-ESI-MS

Las fracciones obtenidas del análisis con HPLC/UV, fueron recuperadas y analizadas por HPLC-ESI-MS.

Las mediciones se llevaron a cabo utilizando HPLC Agilent 1100 Series, el cual incluye DAD, con columnas RP C18 (Macherey-Nagel Nucleo dur 100, 125 mm x 2mm, 5 µm), acoplado a API 2000, triple cuadrupolo LC/MS/MS, biosistema MDS Sciex y fuente ESI. Gradiente de elución: de MeOH:H₂O (10:90) a 100% MeOH por 20 min; luego mezcla isocrática con buffer NH₄Ac 2 mM por 10 min, a una velocidad de flujo 0,25 ml/min. Todos los extractos a analizar por LC-MS fueron disueltos en MeOH para su inyección. Los espectros HRESIMS fueron obtenidos en un espectrofotometro Bruker Daltonik microTOF-Q mass con fuente ESI. El análisis se llevó a cabo usando un espectro de masas Full-scan en modo ionización negativa y escaneo MS² desde m/z 100 hasta 6000. Los compuestos fueron identificados en base a la masa molecular de los iones obtenidos y al tipo de fragmentación

comparando con bases de datos online y graficando las estructuras químicas con el software ChemSketch (ACDLABS 11.0).

4.7.4. Determinación capacidad antioxidante del extracto

Para la medición de la capacidad antioxidante de las muestras se utilizó la técnica de secuestro del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) (Brand-Williams y col., 1995) basada en el cambio de color de la solución DPPH de violeta a amarillo debido al secuestro del radical libre por los antioxidantes. Se realizaron diluciones de las muestras en MeOH 90% (muestra pura, 1:2 y 1:4) y se le adicionó solución DPPH (6×10^{-5} M). La mezcla se incubó por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad y se midió la absorbancia a 517 nm en espectrofotómetro. El porcentaje de inhibición de DPPH (%) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$I\% = [(Abs_{control} - Abs_{muestra}) / Abs_{control}] \times 100$$

Donde $Abs_{control}$ corresponde a la absorbancia de la solución pura de DPPH al tiempo cero y $Abs_{muestra}$ corresponde a la absorbancia dada por las muestras luego del tiempo de incubación.

4.8. Evaluación del contenido de MDA como indicador de estrés oxidativo

La concentración de malondialdehído (MDA) se determinó como indicador de peroxidación de lípidos según Heath y Packer (1968). El ácido tiobarbitúrico (TBA) reacciona con el grupo aldehído del MDA (producto final de la lipoperoxidación) dando un compuesto (MDA-TBA) de color rosado que posee su máximo de absorbancia en 532 nm.

Para la extracción se utilizó 100 mg de material vegetal liofilizado correspondiente a raíces finas y hojas verdes expandidas. Se homogeneizó con nitrógeno líquido en 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v) y se centrifugó a 12.000 g durante 4 min. Luego, se tomaron 0,5 ml de sobrenadante y se agregó igual volumen de reactivo de determinación [(ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (v/v) en TCA 20% (p/v)]. Se calentaron las muestras a 95°C por 25 min., luego se enfriaron en baño de hielo y se centrifugaron a 9000 g durante 6 min. La absorbancia se midió a 532 nm en el sobrenadante usando un blanco de TBA y sustrayendo la absorbancia de turbidez a 600 nm. La cantidad de MDA se calculó en base a una curva realizada con concentraciones conocidas de tetraetoxipropano 1 mM (Fig. 19)

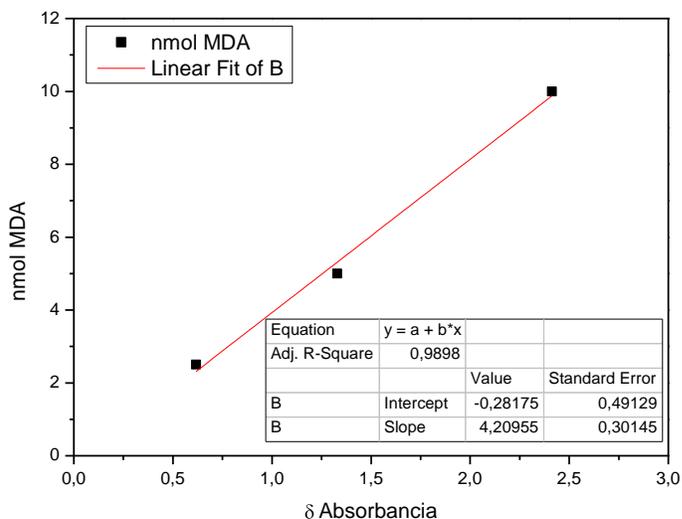


Fig. 19. Curva de calibración para el cálculo de nmoles de MDA.

4.9. Evaluación del contenido endógeno de fitohormonas por LC/MS-MS

Se emplearon 200 mg de material vegetal liofilizado correspondiente a hojas verdes expandidas y raíces finas, el cual fue homogeneizado con nitrógeno líquido. Posteriormente, se agregaron 5 ml de buffer de extracción (H_2O deionizada) y se ajustó a pH 2,8-3,0 con ácido acético. Como estándar interno se agregaron 50 ng de ácido abscísico (ABA) deuterado, ácido indol acético (AIA) deuterado, ácido abscísico glicosilado (ABA-GE) deuterado, Giberelina 1 (GA_1) deuterado y Giberelina 3 (GA_3) deuterado (Olchemim, Check Republic) y se dejó equilibrar 30 min en oscuridad a $4^\circ C$. Luego las muestras fueron centrifugadas (20 min a 8000 g) y se realizó una purificación por doble partición con acetato de etilo. La fase orgánica fue evaporada hasta sequedad y las muestras se retomaron con MeOH (100%). Se realizó una segunda evaporación en evaporador rotativo. Los extractos fueron nuevamente retomados con 50 μl de MeOH (100%) y se colocaron en viales específicos conteniendo insertos de 150 μl de capacidad. El equipo se programó para una inyección de 10 μl por cada muestra. Las corridas cromatográficas se realizaron en un cromatógrafo líquido (LC) Alliance (Waters 2695) con autoinyección y detector de UV, acoplado a un espectrómetro de masas tandem (MS-MS) Micromass Quattro Ultima Pt, monitoreado mediante el software Masslynx v4.1. Para la cuantificación de cada fitohormona, se emplearon curvas de calibración previamente construidas empleando el compuesto estándar puro. Finalmente los datos se expresaron como ng del compuesto/g PS de muestra.

5. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa estadístico INFOSTAT (2011 v.). Dependiendo de la variable respuesta analizada se comparó entre especies y estaciones del año (ANOVA a dos vías) o solamente entre estaciones (ANOVA a una vía). Los test a posteriori utilizados fueron Test de Tukey ($p < 0,05$) (en caso de experimentos balanceados) y test de Bonferroni ($p < 0,05$) (en caso de experimentos no balanceados). El n utilizado fue de entre 3 y 10, dependiendo de las variables respuestas analizadas y de los datos disponibles. Para la comprobación de los supuestos del ANOVA se utilizaron el test de Shapiro-Wilks para la Normalidad y el Test de Levene para la Homocedasticidad. En caso de incumplimiento de los supuestos del ANOVA se aplicó el test no-paramétrico Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Por otra parte, se realizó un análisis de regresión lineal entre los diferentes parámetros evaluados y se calcularon los coeficientes de correlación (R) y determinación (R^2). Las medias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

Asimismo, se llevaron a cabo análisis multivariados usando los datos obtenidos de las cuatro especies (*L. divaricata*, *L. chilense*, *P. speciosa*, *P. ligularis*), los dos órganos analizados (hojas verdes y raíces finas) y las cuatro estaciones (otoño, invierno, primavera y verano). El análisis de componentes principales (ACP) se llevó a cabo para visualizar la distribución de los valores obtenidos. El análisis discriminante lineal (ADL) se llevó a cabo para reducción de la dimensionalidad maximizando las varianzas entre las nuevas categorías creadas (*estación/especie* para todos cada tejido) y minimizando las varianzas dentro de las nuevas categorías creadas, con el objetivo de identificar los grupos funcionales definidos sobre la base de mecanismos de resistencia a la sequía (tolerancia o evitación).

Resultados

RESULTADOS

1. Descripción del área de estudio

Como se observa en las imágenes (Fig. 20) la vegetación del Monte Patagónico se encuentra distribuída en parches donde se agrupan las especies autóctonas, rodeadas de suelo desnudo. Los pastos se distribuyen en la periferia del canopeo de los arbustos y escasas veces se encuentran aislados en suelo desnudo, mientras que los arbustos son los colonizadores o iniciadores de los parches.



Fig. 20. Fotografías de la zona de muestreo: Refugio “La Esperanza”.

2. Datos climáticos de la zona de muestreo

2.1. Cambios estacionales de precipitación y temperatura

Los datos de precipitaciones y temperaturas máximas y mínimas fueron obtenidos de un dataloger situado en la zona de muestreo. Las precipitaciones medias estacionales no superaron los 10 mm, se registró una precipitación media significativamente mayor en primavera (7,3 mm) y menor en otoño (1,4 mm) con respecto a las demás estaciones. Los valores máximos de temperatura se registraron en verano (T° máxima = 28,9 °C y T° mínima= 12,8 °C) y los menores en invierno (T° máxima =15, 6 °C y T° mínima = 1,7 °C) (Fig. 21).

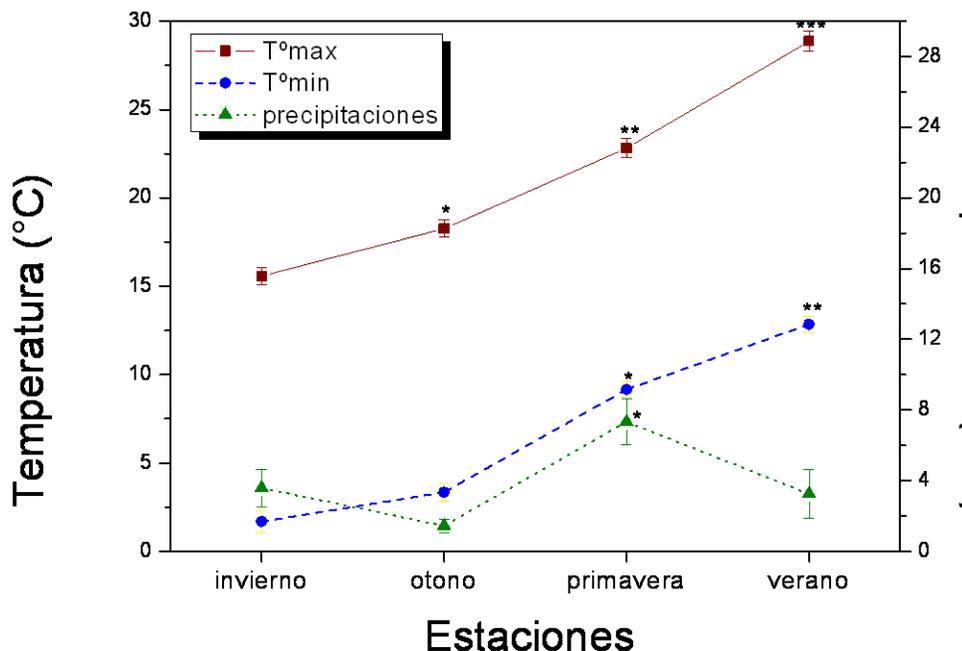


Fig. 21. Cambios estacionales de precipitaciones y temperaturas. ANOVA a una vía comparando entre estaciones. Test a posteriori de Bonferroni. *diferencias significativas ($p < 0,05$). **diferencias significativas ($p < 0,01$)

2.2. Determinación del contenido de agua en el suelo

Se compararon los porcentajes de humedad del suelo en las diferentes estaciones del año y las distintas profundidades (Fig. 22). En primavera hubo mayor porcentaje de humedad que en las demás estaciones. A los 10 cm de profundidad el porcentaje de humedad del suelo fue mayor en invierno, mientras que a los 20 y 30 cm fue mayor en primavera. Correlacionando estos resultados con los de precipitaciones y temperatura, se observa que la estación más húmeda y de mayor disponibilidad de agua para el desarrollo de las especies estudiadas es la primavera.

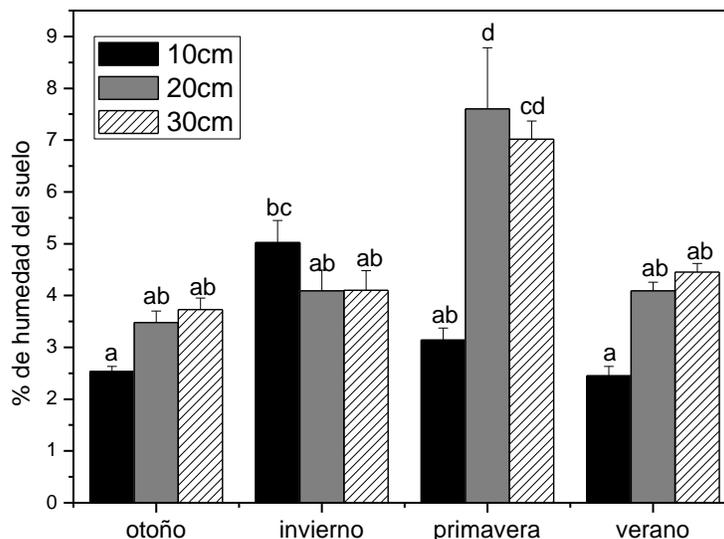


Fig. 22. Contenido de agua del suelo a diferentes profundidades en las cuatro estaciones. ANOVA a dos vías (variables explicativas: estación y profundidad). Letras diferentes muestran diferencias significativas con test a posteriori Bonferroni ($p < 0,05$)

3. Descripción de las especies en estudio

En otoño esta especie posee hojas pero en menor cantidad que en primavera, y la coloración de las hojas en primavera es verde mientras que en otoño es amarronada (Fig. 23a). En primavera se encuentra en estadio reproductivo observándose flores y frutos (Fig. 23b).

La especie *L. divaricata* se encuentra en: el centro de los parches junto con otras especies de arbustos (mayoritariamente con *Chuquiraga avellanadae*), en la periferia del parche o también sola en suelo desnudo.

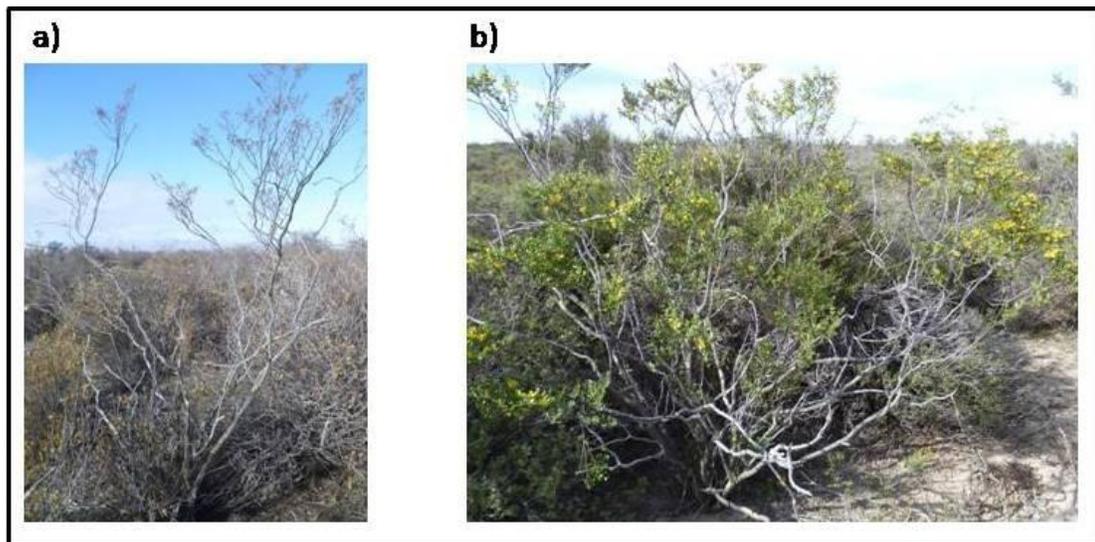
Larrea divaricata

Fig. 23. Fotografías de *L. divaricata* en a) otoño y b) primavera.

En otoño esta especie se encuentra en estadio de senescencia foliar y posterior pérdida de hojas (Fig. 24a), mientras que en primavera presenta gran cantidad de hojas verdes y frutos (Fig. 24b). Esta especie se encuentra en el centro de los parches junto con *Chuquiraga avellanadae*.

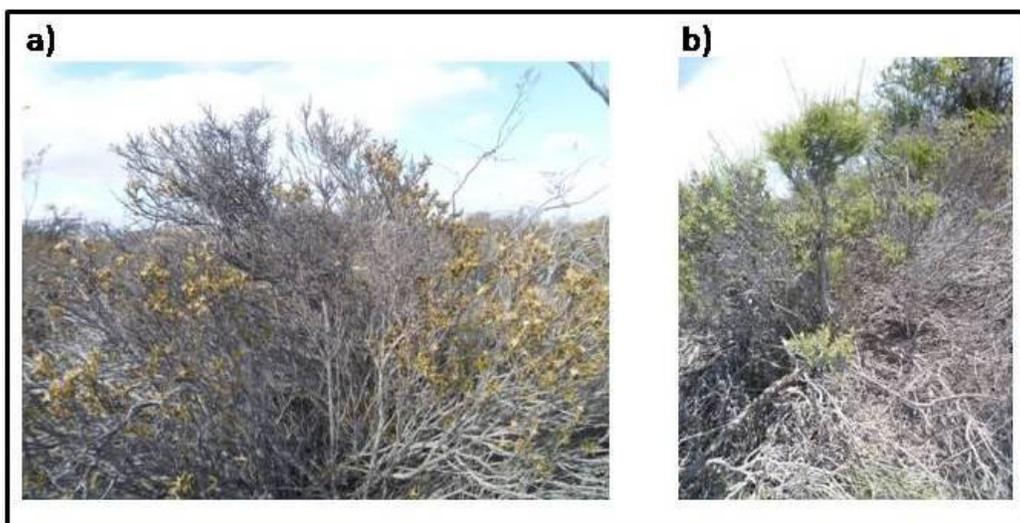
Lycium chilense

Fig. 24. Fotografías de *L. chilense* en a) otoño y b) primavera.

En otoño esta especie posee muy poca cantidad de hojas verdes y la mayoría son amarillas o senescentes, mientras que en primavera se encuentra en desarrollo vegetativo con mayor número de hojas verdes. A esta especie se la encuentra en la periferia del parche (Fig. 25).

Pappostipa speciosa

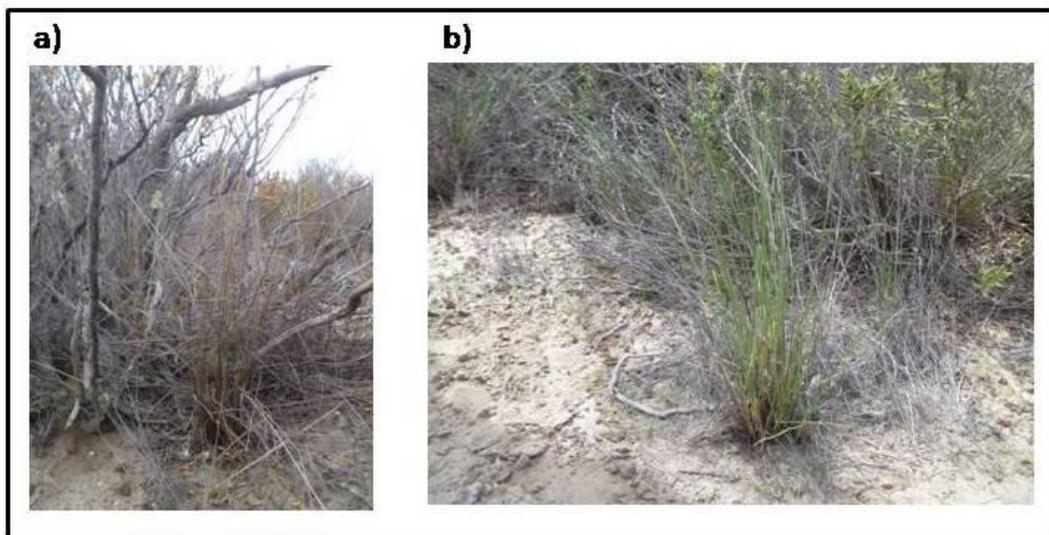


Figura 25. Fotografías de *P. speciosa* en **a)** otoño y **b)** primavera.

Esta especie, al comportarse como especie caducifolia durante la estación seca es muy difícil encontrarla en periodos de sequía. En primavera posee gran cantidad de hojas verdes y espigas (Fig. 26).

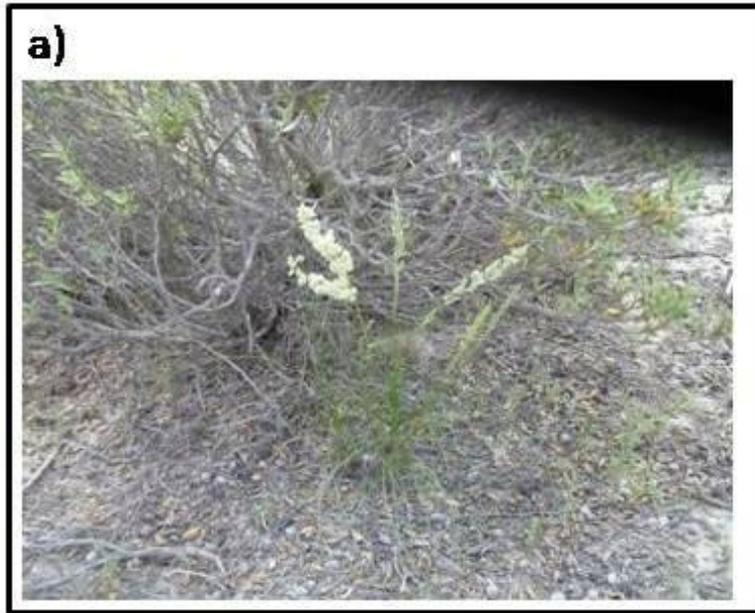
Poa ligularis

Fig. 26. Fotografías de *P. ligularis* en primavera.

4. Variables analizadas en la planta

4.1. Altura total

En los arbustos no se observó variación a lo largo de las estaciones en la altura total (Fig. 27a). En cuanto a los pastos la altura entre estaciones fue variable. *P. speciosa* fue encontrada en las cuatro estaciones y su altura fue significativamente mayor en verano. *P. ligularis* fue encontrada en todas las estaciones excepto durante el invierno, teniendo mayor altura en otoño (Fig. 27b).

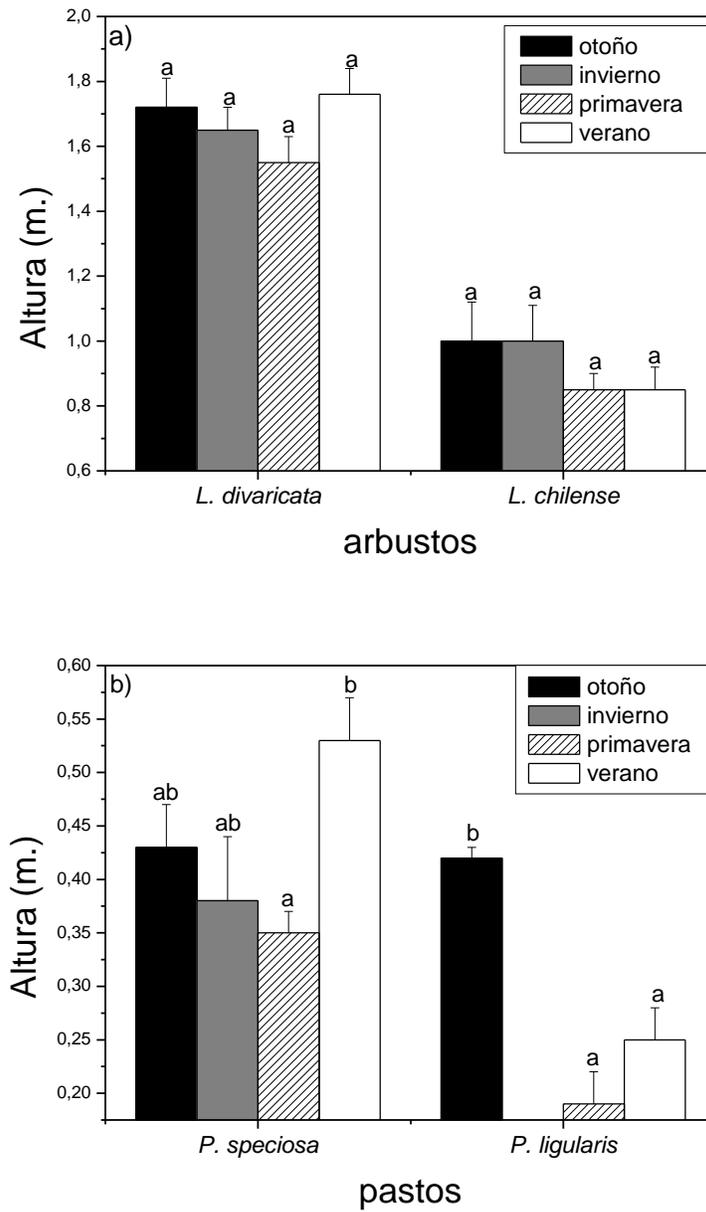


Fig. 27. Altura total de a) arbustos *L. divaricata* y *L. chilense* y b) pastos *P. speciosa* y *P. ligularis*. ANOVA a una vía para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas con test a posteriori Bonferroni ($p < 0,05$).

4.2. Biomasa aérea

L. divaricata al comportarse como una especie siempreverde tuvo hojas durante las cuatro estaciones y mayor biomasa en hojas en verano en comparación con las demás estaciones (Tabla 4). Por otro lado *L. chilense* al comportarse como una especie decidua tuvo hojas en primavera y verano, siendo mayor el número de hojas en primavera que en verano.

En cuanto a los pastos *P. speciosa*, se comporta como una especie siempreverde por lo que tuvo hojas durante las cuatro estaciones y no se vieron diferencias significativas en la biomasa entre las estaciones. *P. ligularis*, se comporta como una especie decidua por lo que solo se pudo muestrear en otoño, primavera y verano, no observándose diferencias significativas en la biomasa aérea entre estaciones (Tabla 4).

Tabla 4. Datos de biomasa de hojas de las cuatro especies en las cuatro estaciones. ANOVA a una vía para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas con test a posterior Bonferroni ($p < 0,05$).

Especie	En hojas	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
<i>L. divaricata</i>	Peso Fresco (g)	7,12±1,26 a	7,85±1,36 a	14,75±3,46 a	72,63±24,08 b
	Peso Seco (g)	4,68±0,84 a	4,87±0,8 a	6,12±1,51 a	38,03±11,86 b
<i>L. chilense</i>	Peso Fresco (g)	-----	-----	13,36±1,27 b	7,43±2,94 a
	Peso Seco (g)	-----	-----	8,03±1,19 b	3,03±1,14 a
<i>P. speciosa</i>	Peso Fresco (g)	1,43±0,35 a	0,90±0,44 a	3,47±0,60 a	4,63±1,72 a
	Peso Seco (g)	1,26±0,33 a	0,79±0,40 a	1,88±0,35 a	3,31±1,16 a
<i>P. ligularis</i>	Peso Fresco (g)	0,33±0,12 a	-----	0,45±0,19 a	0,53±0,25 a
	Peso Seco (g)	0,28±0,12 a	-----	0,21±0,08 a	0,39±0,16 a

4.3. Biomasa subterránea

La biomasa subterránea se mantuvo constante para las dos especies de arbustos y para *P. speciosa*. Como se mencionó anteriormente, *P. ligularis* tuvo mayor biomasa de raíz en verano (Tabla 5).

Tabla 5. Datos de biomasa de raíz de las cuatro especies en las cuatro estaciones. ANOVA a una vía para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas con test a posterior Bonferroni ($p < 0,05$).

Espece	En raíz	Otoño	Invierno	Primavera	verano
<i>L. divaricata</i>	Peso Fresco (g)	4,02±1 a	5,24±2,05 a	2,08±0,64 a	2,90±0,64 a
	Peso Seco (g)	2,97±0,71 a	3,64±1,35 a	1,31±0,41 a	2,27±0,46 a
<i>L. chilense</i>	Peso Fresco (g)	1,30±0,19 a	3,52±0,75 a	2,83±0,96 a	2,72±0,23 a
	Peso Seco (g)	1,07±0,15 a	2,55±0,53 a	1,91±0,68 a	1,92±0,12 a
<i>P. speciosa</i>	Peso Fresco (g)	6,32±2,40 a	3,32±2,38 a	4,22±0,89 a	10,84±4,05 a
	Peso Seco (g)	4,07±1,62 a	2,04±1,37 a	2,69±0,63 a	5,45±2,16 a
<i>P. ligularis</i>	Peso Fresco (g)	0,38±0,11 a	-----	0,37±0,10 a	1,51±0,36 b
	Peso Seco (g)	0,31±0,10 a	-----	0,28±0,07 a	0,87±0,16 b

4.4. Estado hídrico de la planta

4.4.1. Contenido relativo de agua en hojas

En *L. divaricata* no hubo diferencias significativas en el contenido relativo de agua (CRA) de las hojas entre las estaciones del año (Fig. 28a), mientras que el CRA de *L. chilense* fue mayor en verano. En cuanto a los pastos los valores de CRA en hojas de *P. speciosa* no variaron a lo largo de las estaciones, sin embargo el CRA de *P. ligularis* fue mayor en primavera (Fig. 28b).

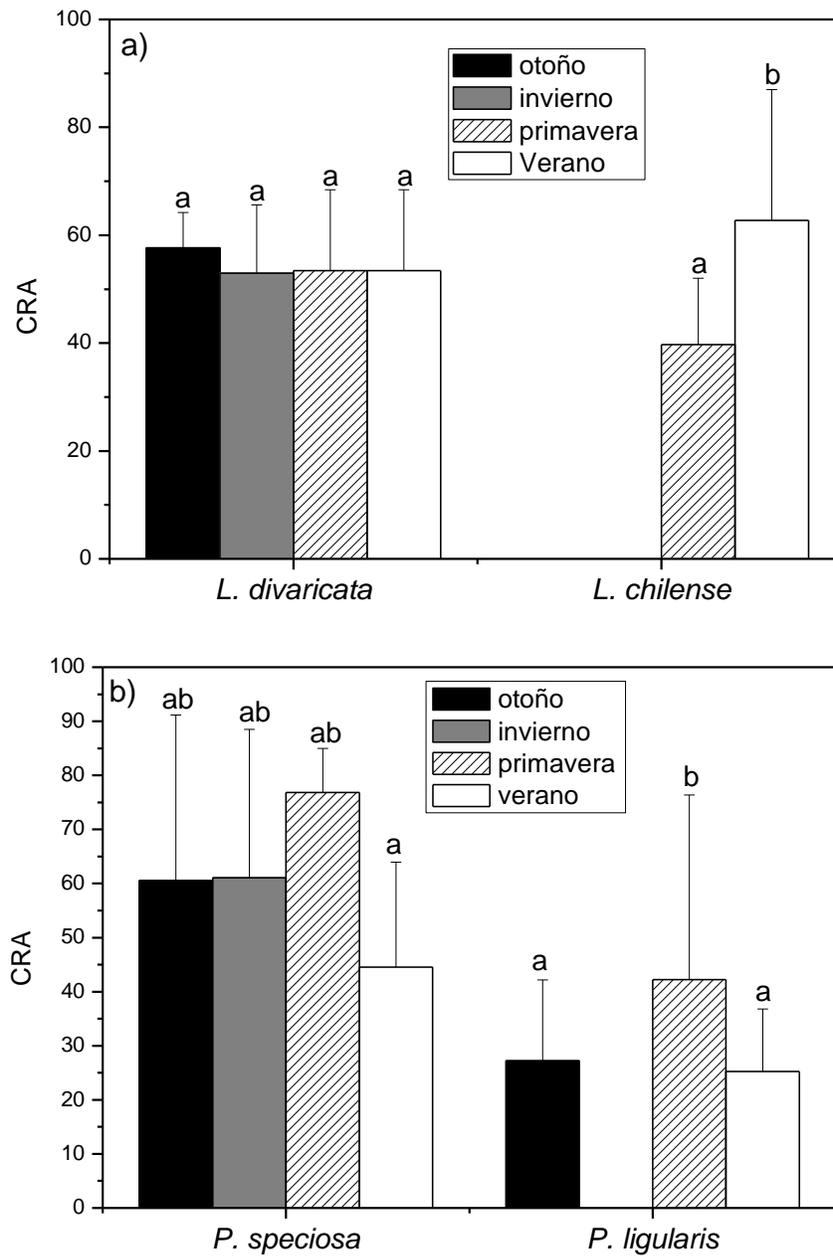


Fig. 28. Contenido relativo de agua en hojas de **a)** arbustos y **b)** pastos. ANOVA a una vía para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas con test a posteriori Bonferroni ($p < 0,05$).

4.4.2. Contenido relativo de agua en raíces

El CRA de raíz de los dos arbustos en estudio (Fig. 29a) y de *P. speciosa* (Fig. 29b) no mostró diferencias significativas entre las estaciones; mientras que el CRA de raíz de *P. ligularis* fue mayor en otoño que en las demás estaciones del año (Fig. 29b).

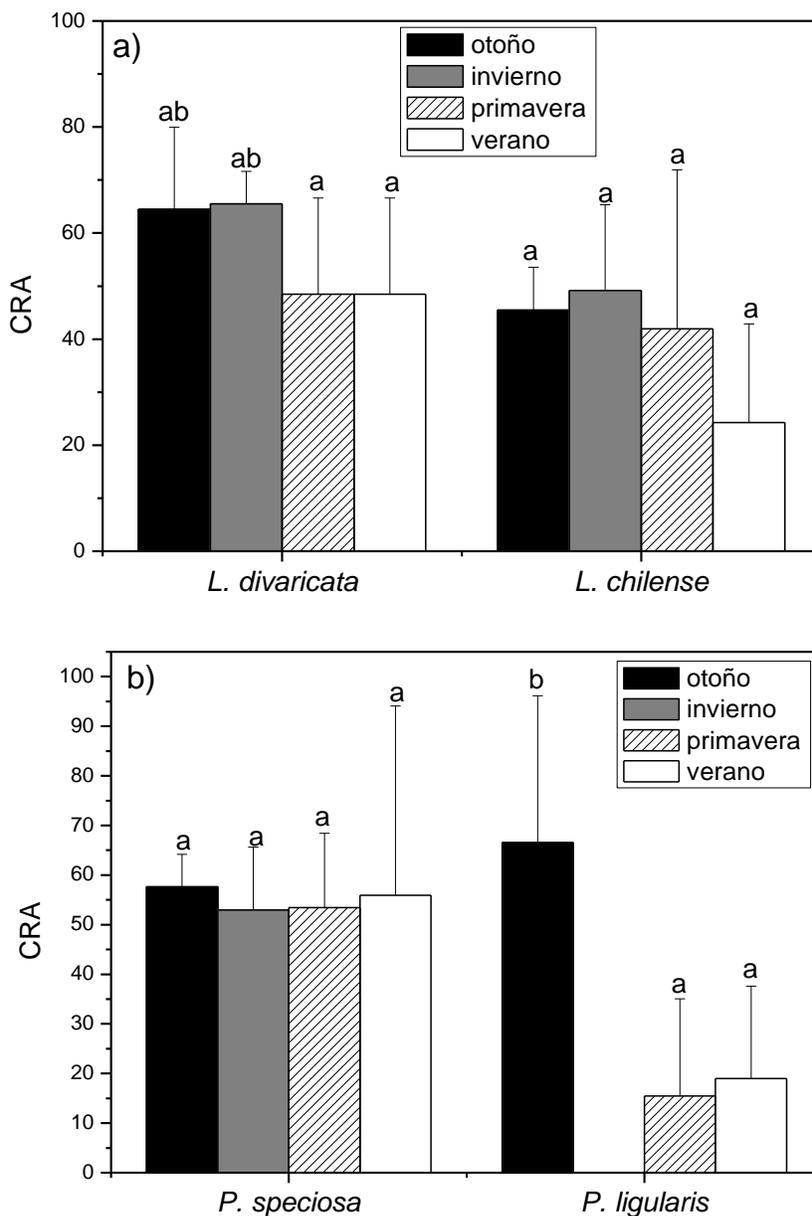


Fig. 29. Contenido relativo de agua en raíz de **a)** arbustos y **b)** pastos. ANOVA a una vía para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas con test a posteriori Bonferroni ($p < 0,05$).

4.5. Análisis anatómico

4.5.1. Parámetros morfo-histológicos de las hojas verdes

En las Fig. 30 y 31 se muestran, a modo de ejemplo, microfotografías de cortes transversales de hojas verdes de cada especie para mayor comprensión de los parámetros medidos.

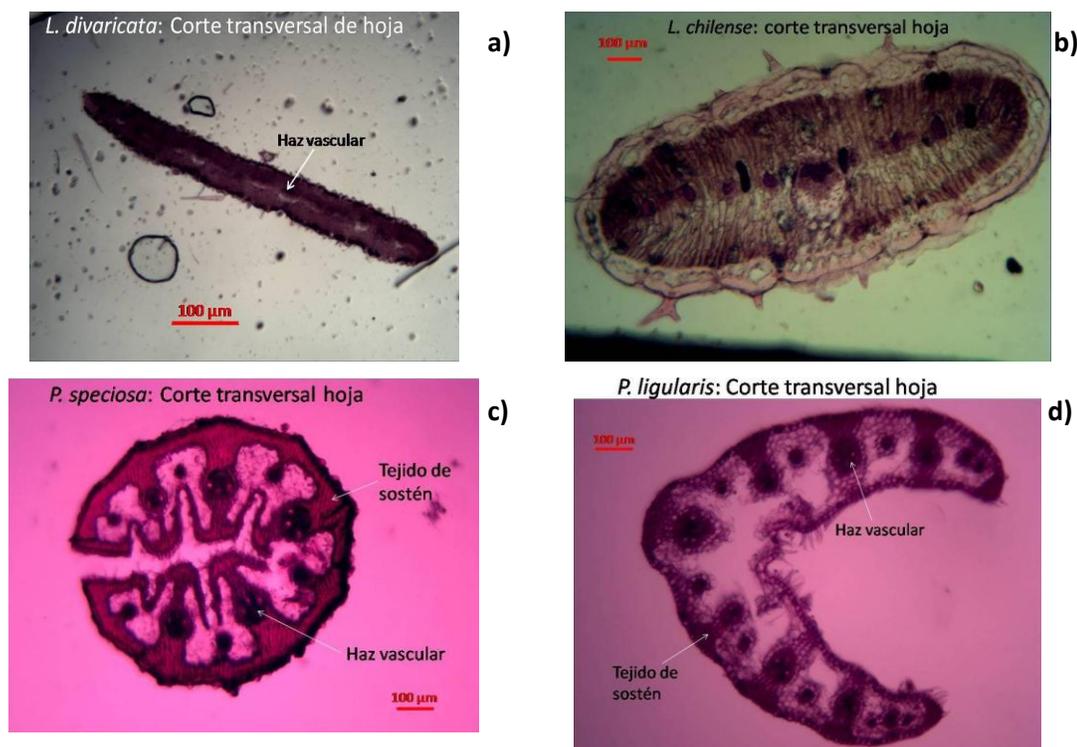


Fig. 30. Fotografías de cortes transversales a mano alzada de hojas de a) *L. divaricata*, b) *L. chilense*, c) *P. speciosa* y d) *P. ligularis*.

Los resultados obtenidos de las mediciones realizadas a los preparados semipermanentes y permanentes de hojas se muestran en la Tabla 6. Como se observa, *L. divaricata* tuvo mayor superficie foliar en la estación de verano y mayor distancia entre haces en primavera y verano, pero el número de haces vasculares no varió. Además, el espesor de las hojas fue significativamente menor en otoño que en las demás estaciones. *L. chilense* no mostró diferencias significativas en los parámetros medidos entre las estaciones de primavera y verano.

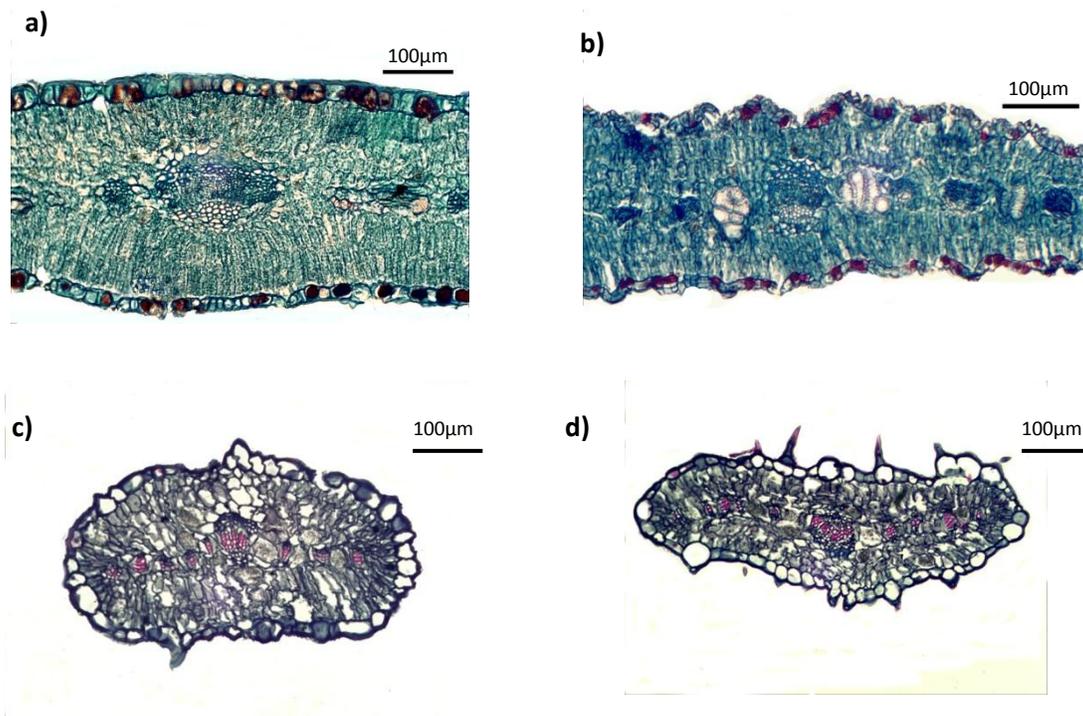


Fig. 31. Fotografías de preparados permanentes de cortes transversales de hojas de a) *L. divaricata* en primavera, b) *L. divaricata* en otoño, c) *L. chilense* en primavera y d) *L. chilense* en otoño.

Tabla 6: Características medidas en las fotografías de cortes transversales de hojas. ANOVA a una vía para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas con test a posterior Bonferroni ($p < 0,05$).

Especie	Características en hojas	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
<i>L. divaricata</i>	Espesor (μm)	3622.4 \pm 19.5a	3581.3 \pm 22.05b	4907.9 \pm 80.7b	5179.6 \pm 37b
	Ancho (μm)	310.3 \pm 4.3 ab	279.5 \pm 28.01a	374.07 \pm 21.9bc	398.4 \pm 9.7c
	Distancia entre haces (μm)	201.08 \pm 17.71a	206.3 \pm 10.54a	298.7 \pm 13.7b	321.03 \pm 31.4 b
	Nº de haces	20a	20 a	21a	20a
<i>L. chilense</i>	Espesor (μm)	-----	-----	1450.81 \pm 36.19a	1292.12 \pm 106.87a
	Ancho (μm)	-----	-----	585.01 \pm 22.69a	605.36 \pm 16.51a
	Distancia entre haces (μm)	-----	-----	118.91 \pm 11.12 a	113.95 \pm 13.42 a
	Nº de haces	-----	-----	10 a	9 a
<i>P. espiciosa</i>	Área total lámina (mm^2)	1,07 \pm 0,6 a	0,22 \pm 0,004 a	0,45 \pm 0,018 a	0,43 \pm 0,058 a
	Área tejido de sostén (mm^2)	0,16 \pm 0,017 a	0,149 \pm 0,058 a	0,184 \pm 0,017 a	0,171 \pm 0,017 a
	Radio haces vasculares (μm)	37,03 \pm 1,73 b	26,13 \pm 0,53 a	42,99 \pm 0,93 c	39,54 \pm 1,44 bc
<i>P. ligularis</i>	Área total lámina (mm^2)	0,40 \pm 0,02 b	-----	0,35 \pm 0,024 ab	0,28 \pm 0,021 a
	Área tejido de sostén (mm^2)	0,043 \pm 0,006 b	-----	0,045 \pm 0,005 b	0,024 \pm 1,44 a
	Radio haces vasculares (μm)	38,15 \pm 4,49 b	-----	26,24 \pm 1,41 a	19,74 \pm 0,49 a

Para los pastos (*P. speciosa* y *P. ligularis*), solo se pudieron realizar preparados semipermanentes. En *P. speciosa*, el área total de la lámina así como el área de tejido de sostén fue igual en las cuatro estaciones, mientras que el radio de los haces vasculares fue significativamente mayor en primavera y el menor radio se observó en invierno. Por último, en *P. ligularis* se observó mayor área total de la lámina y mayor área de tejido de sostén en otoño y primavera, mientras que el radio de los haces vasculares solo fue mayor en otoño.

4.5.2. Parámetros morfo-histológicos de las raíces finas

La Fig. 32 muestra a modo de ejemplo microfotografías de cortes transversales de raíces de cada especie para mayor comprensión de los parámetros medidos.

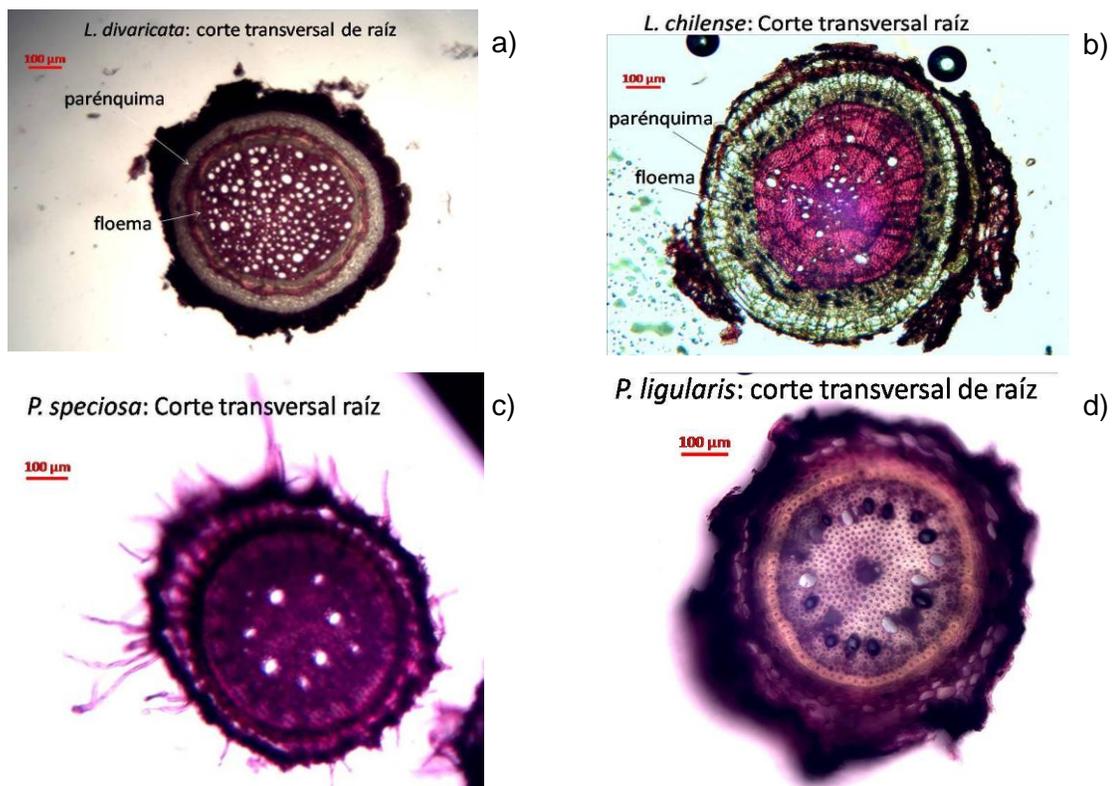


Fig. 32. Fotografías de cortes transversales de raíz de a) *L. divaricata*, b) *L. chilense*, c) *P. speciosa* y d) *P. ligularis*.

Los resultados obtenidos de los parámetros medidos en la raíz se muestran en la Tabla 7. En la raíz de *L. divaricata* todos los parámetros medidos tuvieron valores significativamente mayores en invierno que en las demás estaciones. Las raíces de *L. chilense* fueron de mayor tamaño en invierno que en las demás estaciones, sin embargo, el grosor del parénquima y del floema no varió significativamente entre las estaciones. La raíz de *P. speciosa* tuvo cilindro central de mayor diámetro en otoño e invierno y el diámetro de los vasos xilemáticos aumentó en invierno, sin embargo el número de vasos xilemáticos fue mayor en primavera. En raíces de *P. ligularis* se observó mayor diámetro del cilindro central y mayor diámetro de vasos xilemáticos en otoño, sin embargo el número de vasos del xilema fue mayor en primavera.

Tabla 7: Características medidas en las fotografías de cortes transversales de raíz. ANOVA a una vía para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas con test a posteriori Bonferroni ($p < 0,05$).

Especie	Características en raíz	Otoño	Invierno	primavera	verano
<i>L. divaricata</i>	Radio total (μm)	142,23 \pm 15,64 b	165,67 \pm 10,52 b	132,05 \pm 3,42 b	89,81 \pm 0,64 a
	Radio cilindro central (μm)	94,99 \pm 0,36 b	106,07 \pm 8,45 b	85,41 \pm 4,2 b	56,16 \pm 1,06 a
	Ancho floema (μm)	5,62 \pm 0,65 a	10,73 \pm 1,33 b	8,17 \pm 1,04 ab	5 \pm 0,49 a
	Ancho parénquima cortical (μm)	17,53 \pm 3,27 ab	21,56 \pm 0,97 b	21,35 \pm 3,36 ab	12,91 \pm 0,78 a
<i>L. chilense</i>	Radio total (μm)	377,73 \pm 25,53 a	498,07 \pm 18,35 b	365,24 \pm 19,13 a	401,87 \pm 21,65 ab
	Radio cilindro central (μm)	204,42 \pm 15,35 a	247,69 \pm 9,66 b	196,15 \pm 19,67 a	203,56 \pm 17,45 a
	Ancho floema (μm)	50,67 \pm 4,47 ab	129,93 \pm 45,90 a	32,17 \pm 6,58 a	43,76 \pm 7,53 ab
	Ancho parénquima cortical (μm)	48,56 \pm 3,2 a	50,98 \pm 2,75 a	46,67 \pm 1,98 a	41,67 \pm 2,46 a
<i>P. speciosa</i>	Radio cilindro central (μm)	171,20 \pm 6,09 b	175,25 \pm 3,53 b	161,35 \pm 1,85 a	153,12 \pm 7,96 a
	Radio vasos xilemáticos (μm)	9,65 \pm 0,38 a	12,98 \pm 0,37 b	10,4 \pm 0,48 a	10,42 \pm 0,65 a
	N° de vasos xilemáticos	8 ab	7 a	11 b	8 ab
<i>P. ligularis</i>	Radio cilindro central (μm)	231,5 \pm 5,38 c	-----	148,9 \pm 4,2 b	73,39 \pm 2,08 a
	Radio vasos xilemáticos (μm)	11,20 \pm 0,85 c	-----	7,99 \pm 0,58 b	4,53 \pm 0,36 a
	N° de vasos xilemáticos	11 ab	-----	15 b	7 a

4.5.3. Estomas y tricomas de *L. divaricata*

Debido al tamaño, dureza y presencia de ceras en las hojas de las especies en estudio solo se pudieron observar los estomas y tricomas de la especie *L. divaricata*.

La Fig. 33a, muestra el número de estomas por campo en las diferentes estaciones del año. Se observó la presencia de estomas tanto en la cara abaxial como en la cara adaxial. Dentro de una misma estación no hubo diferencias en el número de estomas entre

las dos caras de las hojas. Por otro lado, comparando entre estaciones se observó menor cantidad de estomas en primavera y mayor en otoño.

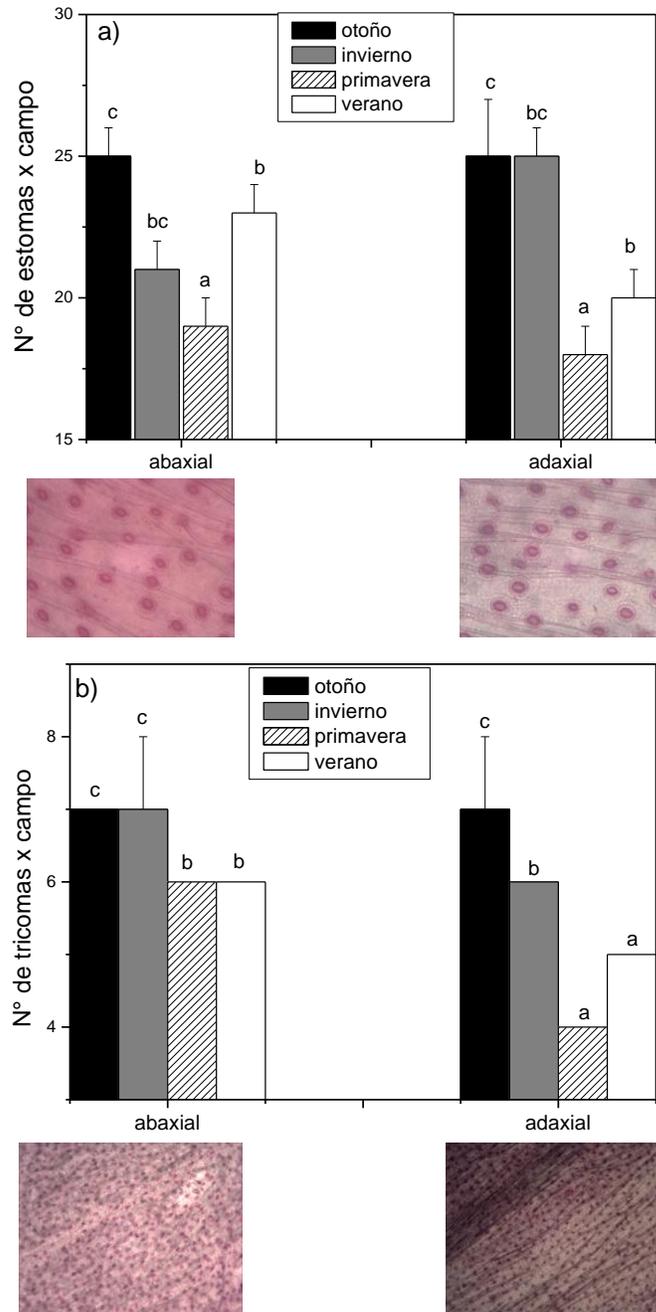


Fig. 33. Gráficos de a) número de estomas de *L. divaricata* en las distintas caras y b) número de tricomas de *L. divaricata* en las distintas caras. ANOVA a una vía para cada cara comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas con test a posteriori Bonferroni ($p < 0,05$).

La fig. 33b muestra el número de tricomas por campo en las diferentes estaciones del año. Se observó la presencia de tricomas en ambas caras de la hoja habiendo diferencias entre las caras en una misma estación. En las estaciones de invierno, primavera y verano hubo mayor cantidad de tricomas en la cara abaxial que en la cara adaxial, mientras que en otoño no hubo diferencias entre ambas caras. Por otra parte, comparando entre estaciones se observó mayor cantidad de tricomas en las estaciones de otoño e invierno que en las estaciones de primavera y verano.

4.6. Determinación de pigmentos fotosintéticos

Entre las mismas especies se observó un patrón similar de producción de clorofila *a* y clorofila *b*. Para todas las especies en estudio la mayor producción de clorofilas fue observada en primavera, mientras que la menor producción de clorofilas fue en otoño e invierno (Fig. 34). La mayor producción de carotenoides se observó en primavera-verano sólo para *L. divaricata*, mientras que para las demás especies no se encontraron diferencias significativas entre las estaciones del año (Fig. 35).

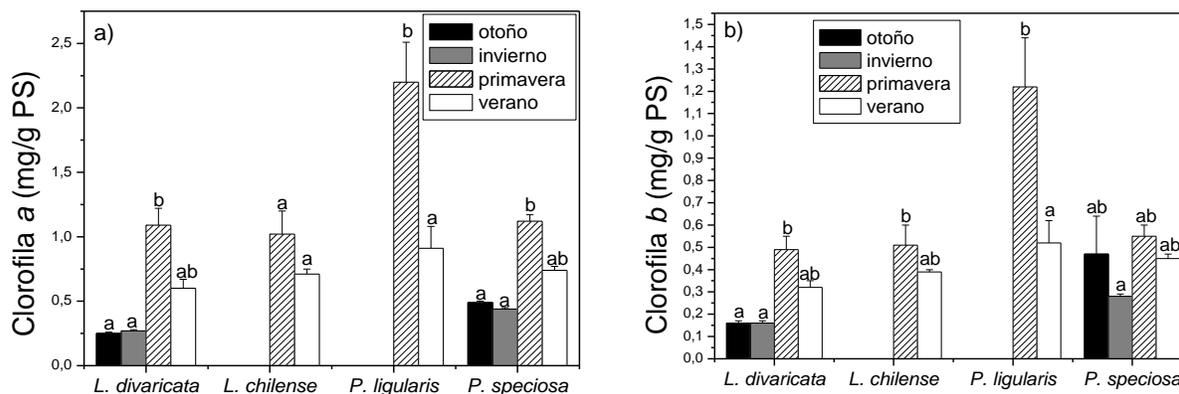


Fig. 34. Concentración de **a)** clorofila *a* y **b)** clorofila *b* en hojas de las especies en estudio. ANOVA a una vía para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas con test a posteriori Bonferroni ($p < 0,05$).

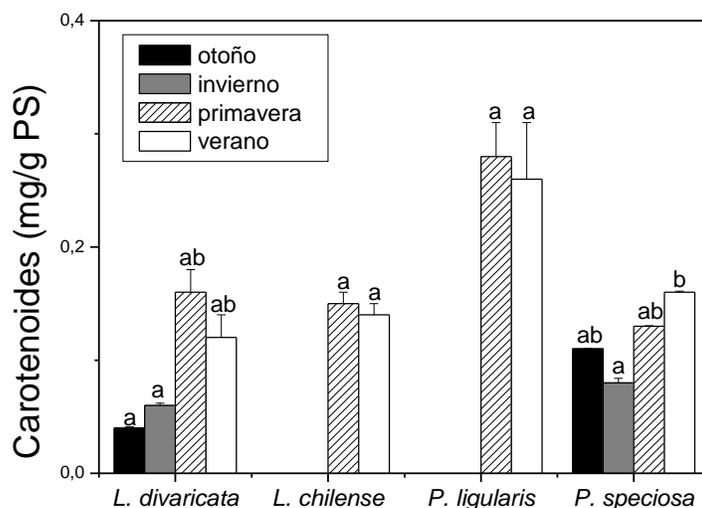


Fig. 35. Concentración de carotenoides en hojas de las especies en estudio. ANOVA a una vía para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas con test a posteriori Bonferroni ($p < 0,05$).

4.7. Determinación de polifenoles por espectrofotometría

4.7.1. Fenoles totales

Se detectaron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales entre las estaciones y entre los órganos vegetativos dependiendo de la especie analizada. El contenido de fenoles totales fue mayor en *L. divaricata* que en las demás especies, variando entre 50-80 mg/g PS para el caso de hojas y para raíces entre 15-45 mg/g PS (Fig. 36a). En *L. chilense* se mantuvo entre 20-30 mg/g PS en hojas, mientras que en las raíces fue menor a 10 mg/g PS (Fig. 36a). Los pastos tuvieron menor contenido de fenoles totales que los arbustos, en el caso de *P. speciosa* las hojas tuvieron entre 10-20 mg/g PS y las raíces entre 4-10 mg/g PS, y *P. ligularis* tuvo entre 2-13 mg/g PS (Fig. 36b). En *L. divaricata* el contenido fue mayor en las hojas que en las raíces, y en ambos órganos se observó mayor contenido en otoño en comparación con las demás estaciones (Fig. 36a). *L. chilense* también tuvo mayor contenido en hojas que en raíces, pero en las hojas solo fue mayor en primavera que en verano mientras que en las raíces no se modificó entre las estaciones (Fig. 36a). En el caso de *P. speciosa* el contenido fue mayor en las hojas que en las raíces; en las hojas fue mayor en invierno mientras que en las raíces fue mayor en primavera y menor en verano

(Fig. 36b). Por último *P. ligularis* no mostró diferencias en el contenido de fenoles totales entre ambos órganos, aunque en las hojas fue mayor en primavera y en las raíces fue mayor en otoño (Fig. 36b).

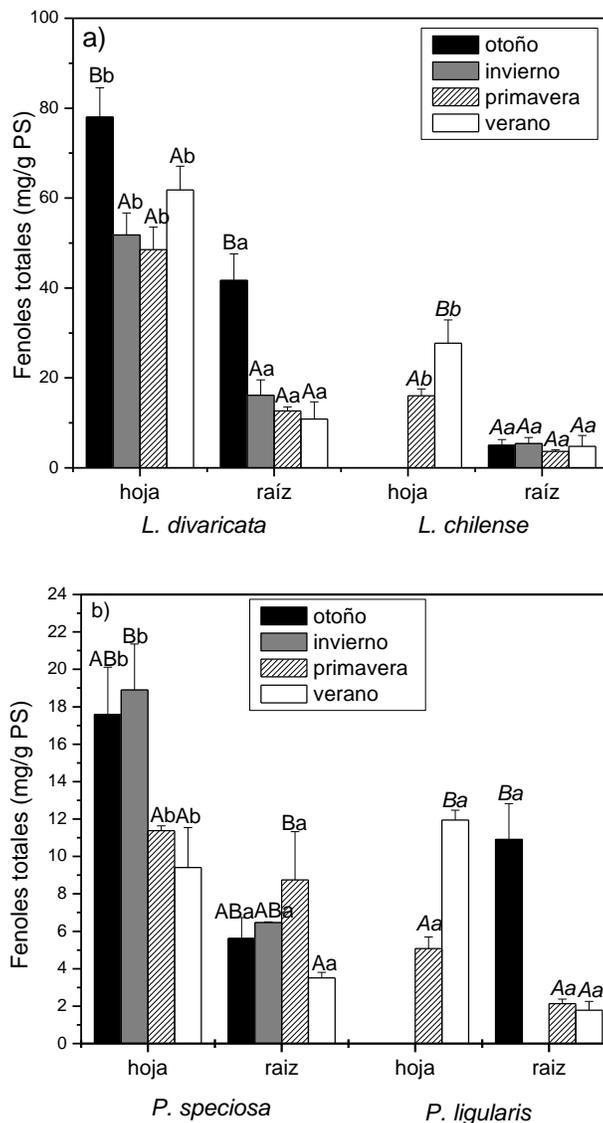


Fig. 36. Contenido de fenoles totales en hojas de **a)** arbustos y **b)** pastos. ANOVA a dos vías (variables explicativas: órganos y estaciones). Letras minúsculas muestran diferencias significativas entre órganos y letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre estaciones. Letras cursivas muestran el análisis de especies deciduas y letras no cursivas muestran el análisis de especies siempreverdes. Los resultados muestran diferencias significativas de acuerdo al test de Bonferroni ($p < 0,05$).

4.7.2. Flavonoides totales

En las hojas de *L. divaricata* el contenido de flavonoides totales fue entre 18-25 mg/g PS mientras que las raíces de este arbusto al igual que las hojas y raíces de *L. chilense* no superaron los 6 mg/g PS. En ambos arbustos, el contenido de flavonoides fue significativamente mayor en las hojas que en las raíces. En cuanto a los cambios en su contenido entre las estaciones del año, las hojas tuvieron mayor contenido de flavonoides totales en otoño y verano, mientras que las raíces tuvieron mayor contenido en otoño (Fig. 37a).

En el caso de los pastos no se encontraron diferencias significativas en el contenido de flavonoides entre ambos órganos y los valores obtenidos no superaron los 2,5 mg/g PS. El contenido de flavonoides en ambos órganos de *P. speciosa* no cambió entre las estaciones; mientras que en las raíces de *P. ligularis* fue mayor en otoño (Fig. 37b).

4.7.3. Flavan-3-oles totales

No se detectó la presencia de flavan-3-oles totales en ninguna de las especies analizadas, tanto en las hojas como en las raíces.

4.7.4. Proantocianidinas

El contenido de proantocianidinas fue similar para las cuatro especies en estudio. No se observó interacción entre las variables analizadas y en todas las especies el contenido de proantocianidinas fue mayor en las raíces que en las hojas. Por otro lado, en ninguna especie ni órgano analizado se encontraron diferencias significativas entre las estaciones (Fig. 38).

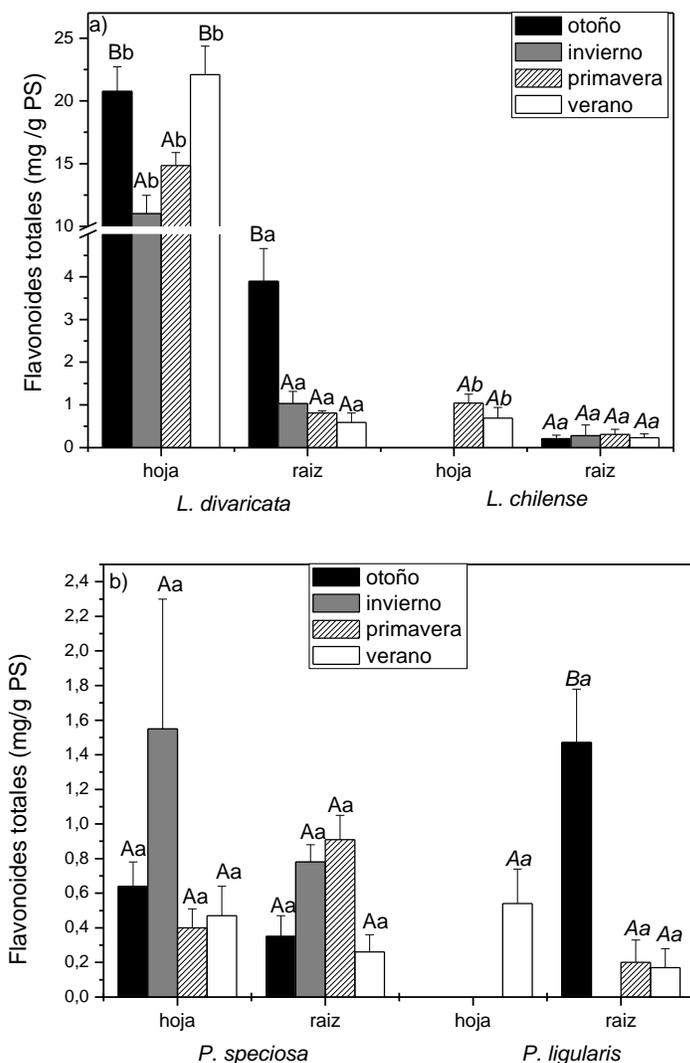


Fig. 37. Contenido de flavonoides totales en hojas de **a)** arbustos y **b)** pastos. ANOVA a dos vías (variables explicativas: órganos y estaciones). Letras minúsculas muestran diferencias significativas entre órganos y letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre estaciones. Letras cursivas muestran el análisis de especies deciduas y letras no cursivas muestran el análisis de especies siempreverdes. Los resultados muestran diferencias significativas de acuerdo al test de Bonferroni ($p < 0,05$).

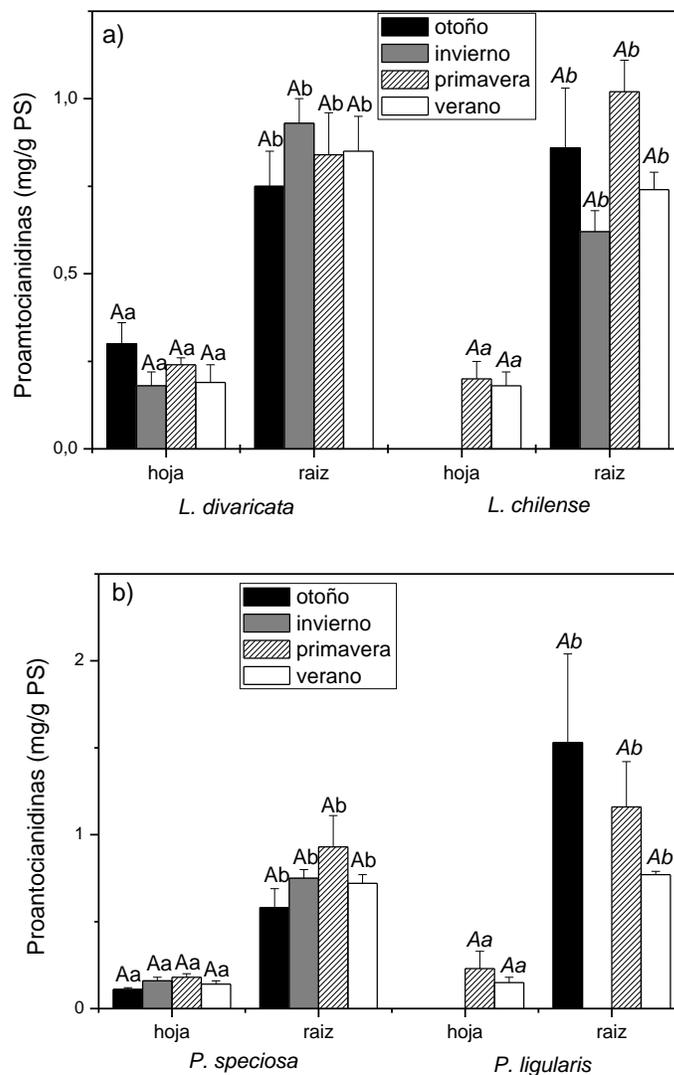


Fig. 38. Contenido de proantocianidinas en hojas de **a)** arbustos y **b)** pastos. ANOVA a dos vías (variables explicativas: órganos y estaciones). Letras minúsculas muestran diferencias significativas entre órganos y letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre estaciones. Letras cursivas muestran el análisis de especies deciduas y letras no cursivas muestran el análisis de especies siempreverdes. Los resultados muestran diferencias significativas de acuerdo al test de Bonferroni ($p < 0,05$).

4.7.5. Ácido tartárico

En los arbustos, el contenido de ácido tartárico fue mayor en las hojas. Las hojas de *L. divaricata* tuvieron mayor contenido en otoño con respecto a las demás estaciones, mientras que el contenido de ácido tartárico en *L. chilense* no se modificó a lo largo de las estaciones (Fig. 39a). En el caso de los pastos, tampoco se encontraron diferencias significativas entre las estaciones, y solo *P. speciosa* mostró diferencia entre órganos, siendo el contenido de ácido tartárico mayor en las hojas que en las raíces (Fig. 39b). Los pastos y *L. chilense* tuvieron entre 0,65- 4,48 mg/g PS de este compuesto, mientras que *L. divaricata* presentó mayor contenido (entre 2,24-6,89 mg/g PS).

4.7.6. Flavonoles

El contenido de flavonoles en los arbustos no mostró diferencias significativas entre las estaciones ni tampoco entre ambos órganos vegetativos, y sus valores se mantuvieron en un rango entre 1,32-3,8 mg/g PS (Fig. 40a). En los pastos tampoco se observaron diferencias significativas entre los órganos. Sin embargo, las hojas y las raíces de *P. speciosa* tuvieron mayor contenido de flavonoles en primavera, mientras que en las hojas de *P. ligularis* el mayor contenido de flavonoles se detectó en verano. El contenido de flavonoles en los pastos se mantuvo en un rango entre 0,83-3,69 mg/g PS (Fig. 40b).

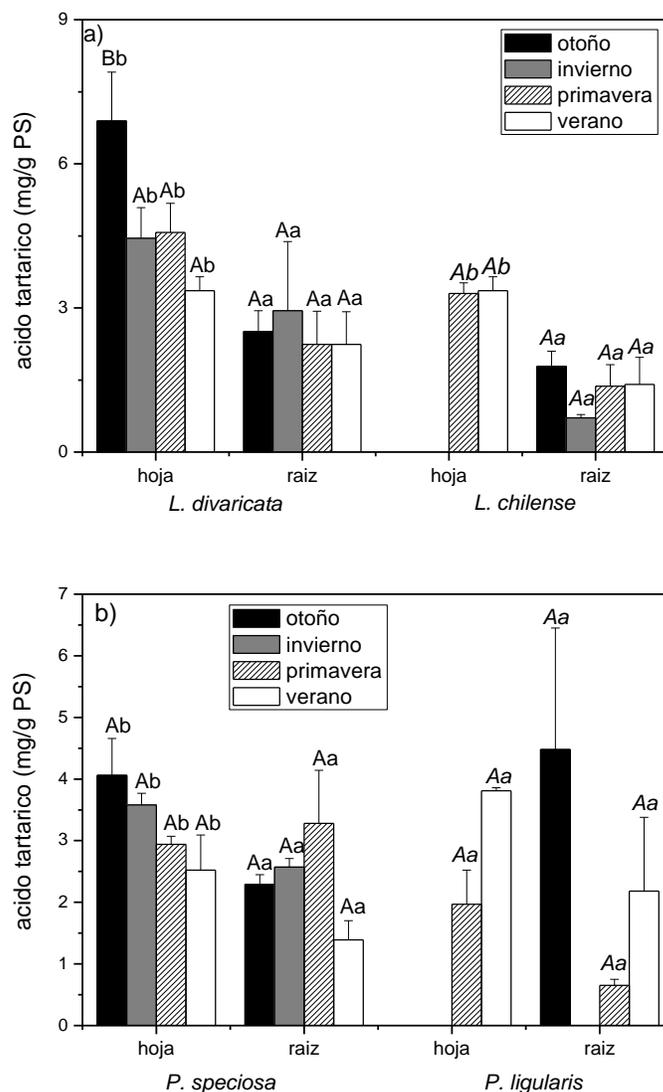


Fig. 39. Contenido de ácido tartárico en hojas de **a)** arbustos y **b)** pastos. ANOVA a dos vías (variables explicativas: órganos y estaciones). Letras minúsculas muestran diferencias significativas entre órganos y letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre estaciones. Letras cursivas muestran el análisis de especies deciduas y letras no cursivas muestran el análisis de especies siempreverdes. Los resultados muestran diferencias significativas de acuerdo al test de Bonferroni ($p < 0,05$).

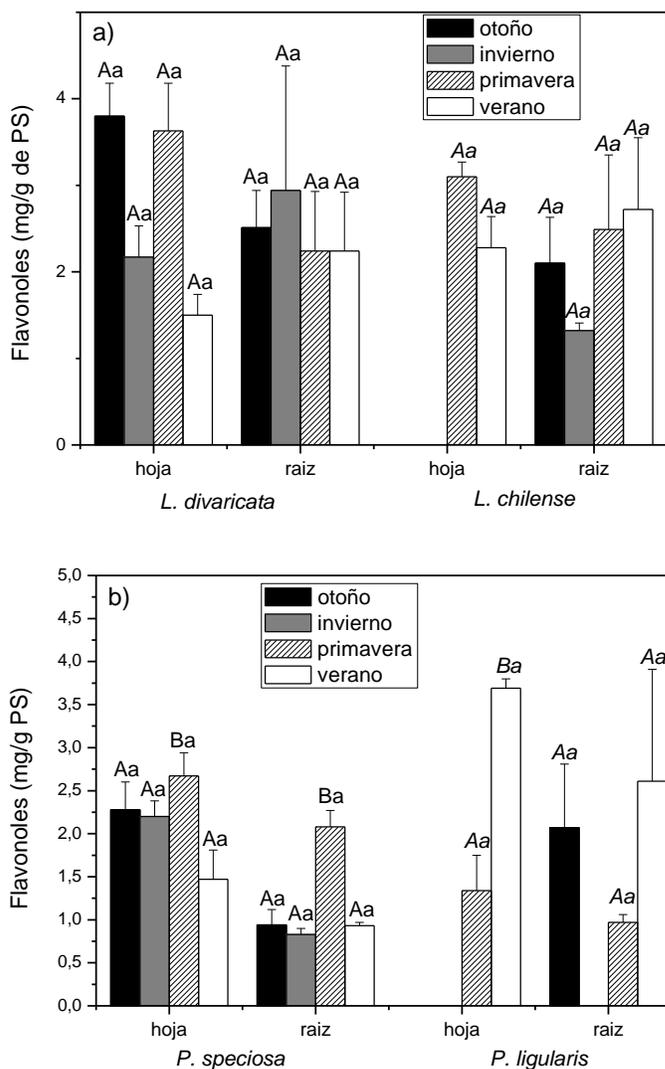


Fig. 40. Contenido de flavonoles en hojas de **a)** arbustos y **b)** pastos. ANOVA a dos vías (variables explicativas: órganos y estaciones). Letras minúsculas muestran diferencias significativas entre órganos y letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre estaciones. Letras cursivas muestran el análisis de especies deciduas y letras no cursivas muestran el análisis de especies siempreverdes. Los resultados muestran diferencias significativas de acuerdo al test de Bonferroni ($p < 0,05$).

4.7.7. Capacidad antioxidante del extracto de polifenoles

La actividad antioxidante de los extractos de polifenoles mostró diferencias significativas entre las hojas y las raíces de los arbustos, siendo mayor en las hojas. En *L. divaricata* la mayor actividad antioxidante se encontró en otoño, mientras que en *L. chilense* no cambió entre estaciones (Fig. 41a). En los pastos, las variables analizadas (órganos y estaciones) mostraron interacción significativa. En las hojas de *P. speciosa* la actividad antioxidante del extracto fue, en orden decreciente, otoño, invierno, primavera y verano, mientras que en las raíces fue mayor en primavera y verano. En las hojas de *P. ligularis* la mayor actividad antioxidante fue en verano, mientras que en las raíces fue en otoño (Fig. 41b).

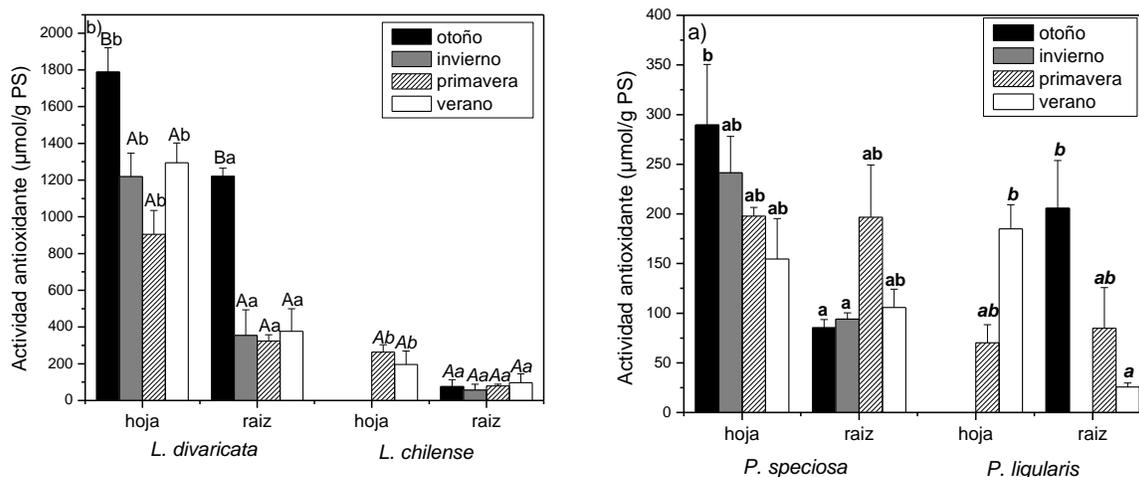


Fig. 41. Actividad antioxidante de polifenoles en **a)** arbustos y **b)** pastos. ANOVA a dos vías (variables explicativas: órganos y estaciones). Letras en negrita muestran diferencias significativas cuando se detectó interacción entre las variables analizadas. En ausencia de interacción letras minúsculas muestran diferencias significativas entre órganos y letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre estaciones. Letra cursiva muestra el análisis de especies deciduas y letras no cursivas muestran el análisis de especies de siempreverdes. Todos los resultados son de acuerdo al test de Bonferroni ($p < 0,05$).

4.8. Determinación de la estructura química de cada compuesto polifenólico

Debido a la cantidad de material disponible y a la complejidad de la muestra no fue posible lograr la separación de los compuestos de interés por HPLC/UV en todas las muestras de las cuatro especies en estudio (Tabla 8).

Tabla 8. Muestras analizadas en la Universidad de Pamukkale, Turquía.

Especie	Tejido	Estación del año	Identificación de polifenoles
<i>L. divaricata</i>	Hoja	otoño	+
<i>L. divaricata</i>	Hoja	primavera	+
<i>L. chilense</i>	Hoja	otoño	+
<i>L. chilense</i>	Hoja	primavera	+
<i>P. speciosa</i>	Hoja y Raíz	otoño	+
<i>P. speciosa</i>	Hoja y Raíz	primavera	+
<i>P. ligularis</i>	Hoja y Raíz	otoño	MI
<i>P. ligularis</i>	Hoja y Raíz	primavera	MI

El signo + indica que se obtuvieron resultados; **MI** indica que la cantidad de muestra fue insuficiente para lograr una buena purificación e identificación del compuesto

4.8.1. Compuestos identificados

En las especies y órganos en estudio se observaron compuestos que están presentes durante todo el año independientemente de la disponibilidad hídrica del suelo, mientras que otros compuestos solo fueron posibles de identificar en determinadas estaciones (Tabla 9). En las hojas de *L. divaricata* se identificaron algunos compuestos diferentes entre las estaciones y otros que solo estaban presentes en la estación seca (procianidina B1, ácido dihidronezoico y kaempferol conjugado con azúcares). Como no-flavonoides se observó la presencia de oleuropeina, mientras que dentro de los flavonoides se identificaron nobiletina, quercetina, kaempferol, epicatequina y catequina (estos 2 últimos formando parte de la estructura de procianidina B1) (Fig. 42).

Tabla 9. Compuestos identificados en las especies en estudio en dos estaciones del año.

	Primavera (Humedad)	Otoño (Sequía)
<i>L. divaricata</i> (hojas)	<ul style="list-style-type: none"> – Ácido gálico-3-galato – Nobiletina (3-methoxisinensetina) – Oleuropeina – Quercetina-3-O-(6"-acetil-galactosido) 7-O-rhamnosido 	<ul style="list-style-type: none"> – Ácido dihidrobenzoico – Ácido gálico-3-galato – Nobiletina (3-methoxisinensetina) – Oleuropeina – Quercetina-3-O-(6"-acetil-galactosido) 7-O-rhamnosido – Procianidinadímero B1 – Kaempferol 3-O-glucosil-ramnosil-glucosido
<i>L. chilense*</i> (hojas)	<ul style="list-style-type: none"> – Oleuropeina-aglicona 	<ul style="list-style-type: none"> – Oleuropeina-aglicona – Luteolina 7-O-diglucuronido – Quercetina-3-O-acetil-rhamnosido – Resveratrol – Escopoletina
<i>P. speciosa</i> (hojas)		<ul style="list-style-type: none"> – Luteolina – Escopoletina
<i>P. speciosa</i> (raíz)	<ul style="list-style-type: none"> – Ácido valoneico dilactona – Kaempferol 3-O-glucosil-rhamnosil-glucosido – Luteolina 7-O-diglucuronido – Malvidina-3-O-galactosido – p-Cumaroil ácido málico – Quercetina-3-O-acetil-rhamnosido – Resveratrol – Secoisolariciresinol 	<ul style="list-style-type: none"> – Ácido valoneico dilactona – Acetil eugenol – e-Viniferina – Galloil glucosa – Quercetina-3-O-(6"-malonil-glucosido)7-O-glucosido

*Para *L. chilense* la estación seca fue verano y no otoño, ya que en otoño pierde sus hojas

Las hojas de *L. chilense* mostraron presencia diferencial de compuestos entre las estaciones (verano: estación seca, primavera: estación húmeda), ya que en primavera sólo se pudo identificar oleuropeina-aglicona, mientras que en verano, se observó la presencia de dicho compuesto y algunos otros. Como no-flavonoides se halló escopoletina, resverastrol y oleuropeina, mientras que como flavonoides se hallaron quercetina y luteolina, algunos de ellos conjugados con azúcares (Fig. 43). En las hojas de *P. speciosa*, en primavera no se pudo identificar ningún compuesto conocido y en otoño se observó la presencia de un flavonoide (luteolina) y un no-flavonoide (escopoletina) ambos sin conjugar con azúcares. En cambio, en las raíces de esta especie se observó una alta presencia de compuestos fenólicos con un perfil diferente entre otoño y primavera, entre los que solo se repite el ácido valoneico dilactona en ambas estaciones. En primavera se observa la presencia de no-flavonoides (ácido valoneico dilactona, p-cumaroil ácido málico, resveratrol y secoisolariciresinol), mientras que los flavonoides se encontraron todos conjugados con

azúcares (kaempferol, luteolina, malvidina y quercetina) (Fig. 44). En otoño se observó la presencia de 3 no-flavonoides: Acetil eugenol, e-viniferina y, ácido gálico conjugado con glucosa mientras que solo se identificó un flavonoide (quercetina) conjugado con azúcares (Fig. 45).

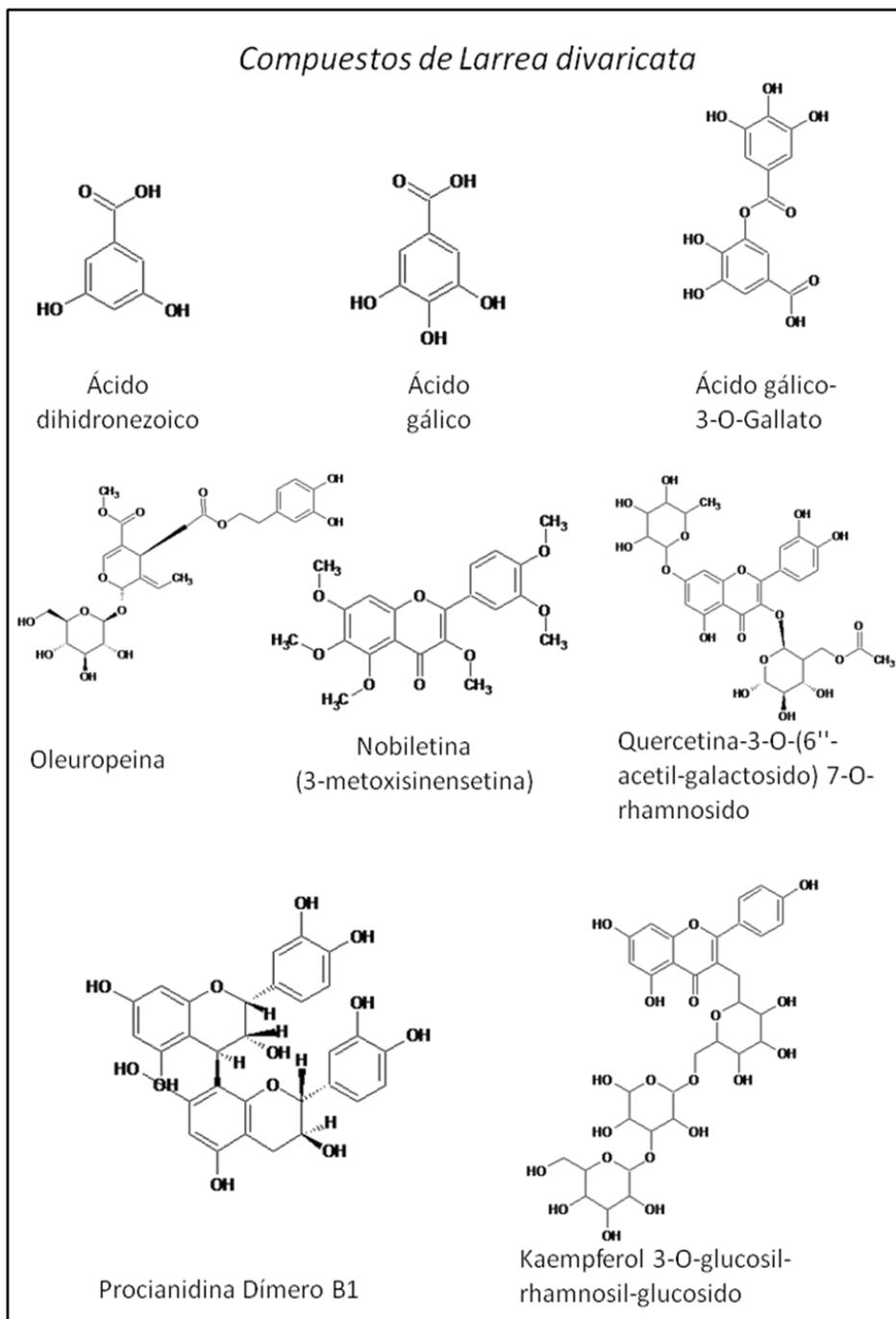


Fig. 42. Estructuras químicas de compuestos hallados en *Larrea divaricata*.

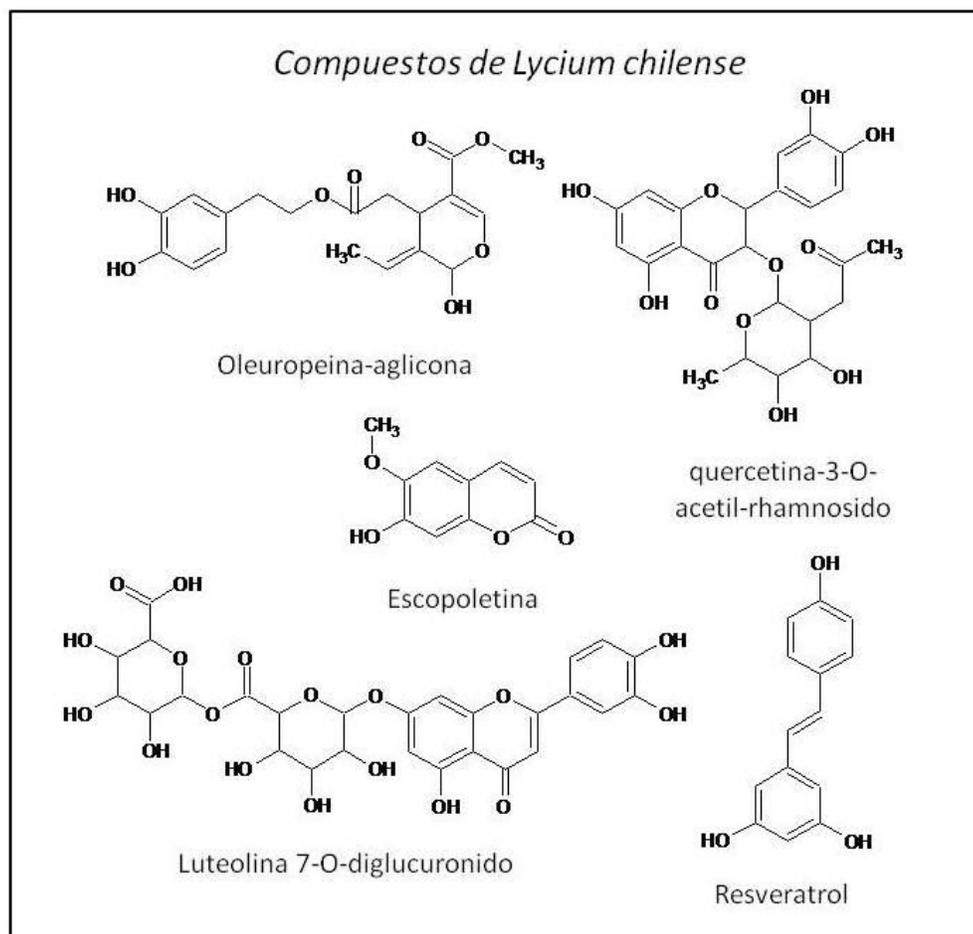


Fig. 43. Estructuras químicas de compuestos hallados en *Lycium chilense*.

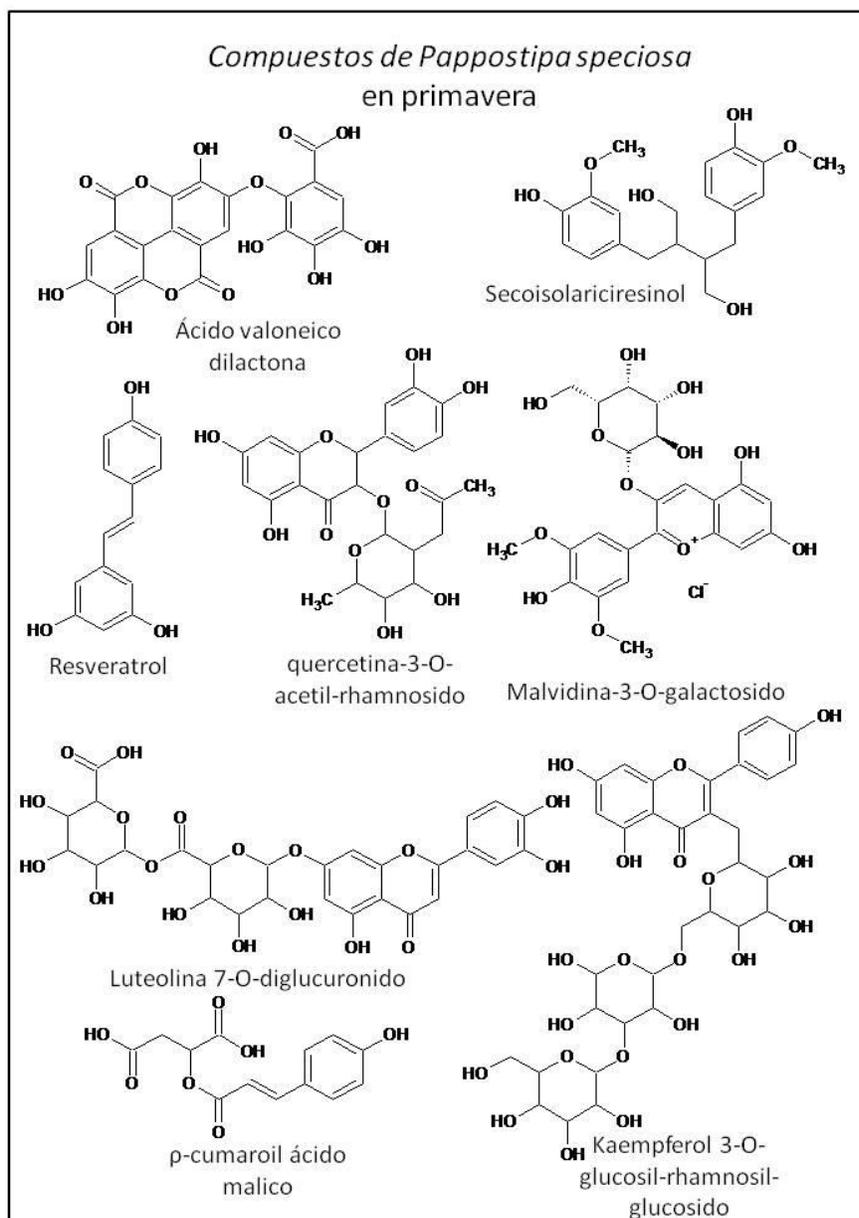


Fig. 44. Estructuras químicas de compuestos hallados en raíz de *Pappostipa speciosa* durante la estación de primavera.

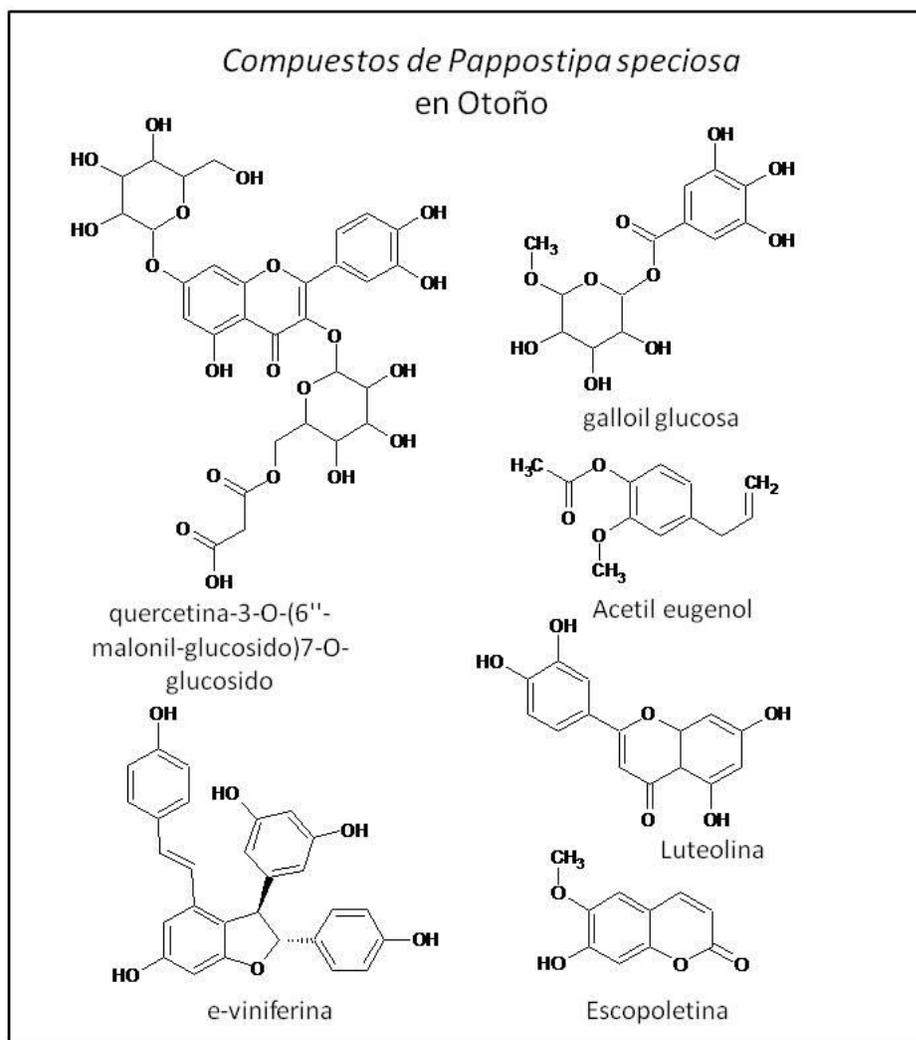


Fig. 45. Estructuras químicas de compuestos hallados en hoja y raíz de *Pappostipa speciosa* durante la estación de otoño.

4.8.2. Capacidad antioxidante del extracto de polifenoles

A los extractos obtenidos para el análisis de la estructura química, se les determinó la capacidad antioxidante. Estos extractos mostraron un porcentaje de inhibición del radical DPPH $\geq 50\%$. En el caso de *L. divaricata* no se encontraron diferencias entre ambas estaciones, y en el caso de *L. chilense* se observó mayor porcentaje de inhibición de DPPH en otoño que en primavera (Fig. 46a). *P. speciosa* fue la especie que mostró mayor

porcentaje de inhibición, pero no se encontraron diferencias entre las dos estaciones tanto en las raíces como en las hojas (Fig. 46b).

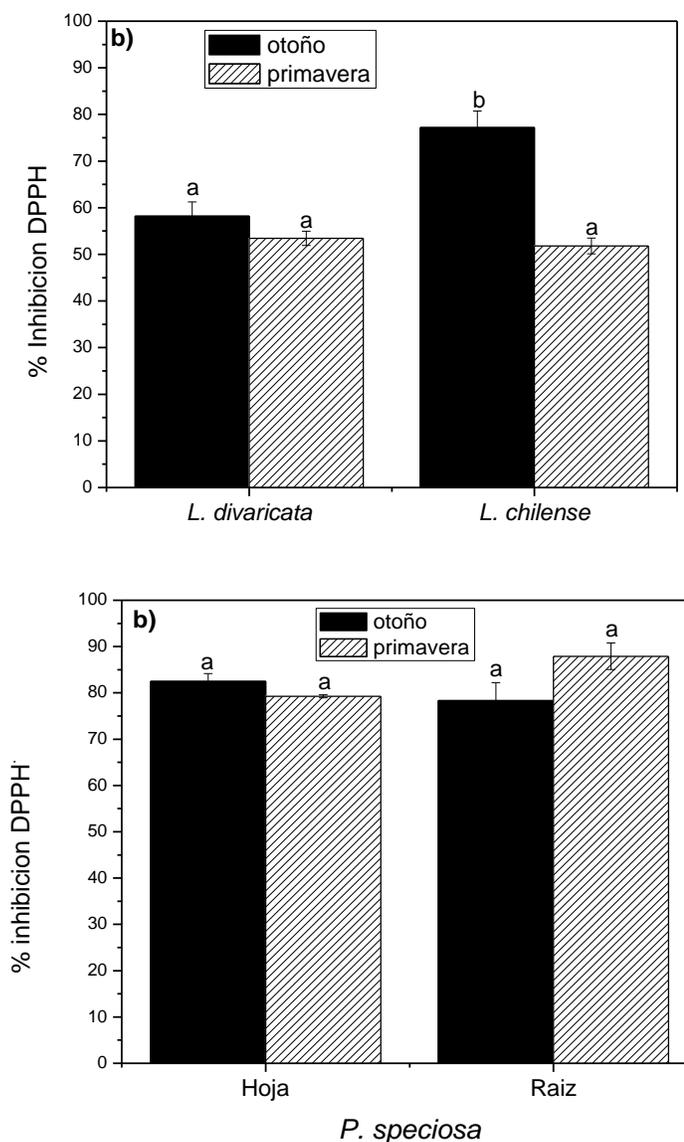


Fig. 46. Capacidad antioxidante del extracto de polifenoles en a) hojas de *L. divaricata* y *L. chilense* y b) en hoja y raíz de *P. speciosa*. ANOVA a una vía para cada especie y cada órgano comprando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas con test a posteriori Bonferroni ($P < 0,05$).

Observando la estructura química de los compuestos hallados (Fig. 42 a 45), podemos ver que la mayoría de los compuestos poseen anillos fenólicos unidos a glúcidos con grupos funcionales hidroxilos, metilos, ácidos y/o carbonilos, es decir grupos capaces de reaccionar frente a radicales libres, pudiendo funcionar como antioxidantes.

4.9. Determinación del daño oxidativo

4.9.1. Contenido de malondialdehído (MDA)

El daño oxidativo fue medido a través del contenido de MDA. Las hojas y raíces de los arbustos tuvieron menor contenido de MDA que los pastos (Fig. 47 y 48). En las hojas de *L. divaricata* el contenido de MDA se mantuvo constante durante las cuatro estaciones (Fig. 47a), mientras que en las raíces fue mayor en otoño y menor en invierno (Fig. 48a). En las hojas de *L. chilense* el contenido de MDA fue mayor en verano en comparación con primavera (Fig. 47a), mientras que en las raíces el contenido de MDA se mantuvo constante en las cuatro estaciones (Fig. 48a). Las hojas de *P. speciosa* mostraron un aumento de MDA en otoño en comparación con las demás estaciones, mientras que en raíces el aumento fue en otoño e invierno (Fig. 47b y 48b). Por último, en las hojas de *P. ligularis* el aumento de MDA se observó en primavera y verano en comparación con otoño, pero en raíces no hubo diferencia entre las estaciones (Fig. 47b y 48b).

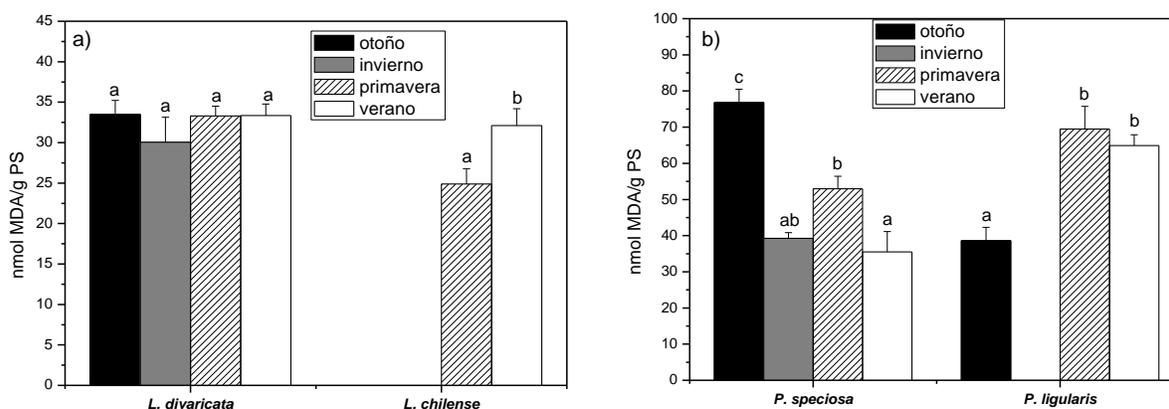


Fig. 47. Contenido de MDA en hojas de a) los arbustos *L. divaricata* y *L. chilense* y de b) los pastos *P. speciosa* y *P. ligularis*. ANOVA a una vía para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas con test a posteriori Bonferroni ($p < 0,05$).

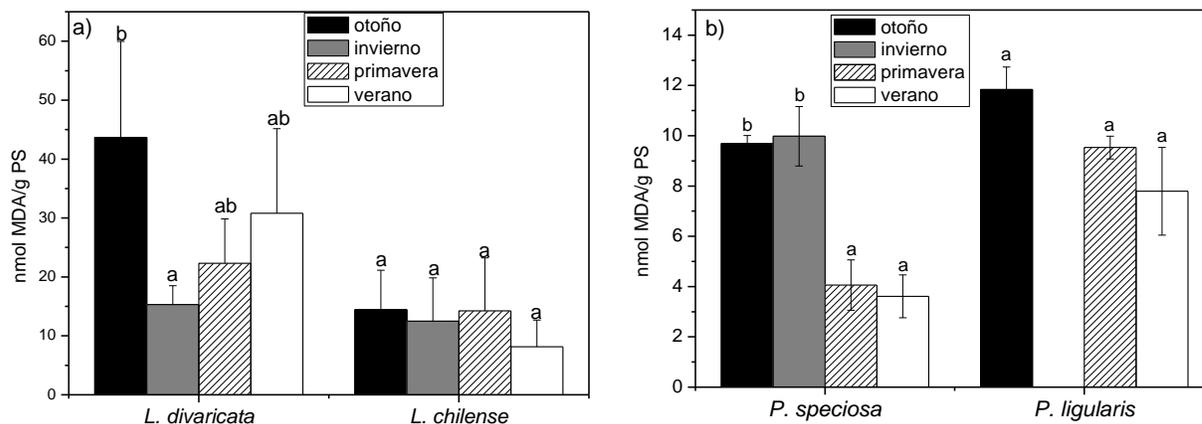


Fig. 48. Contenido de MDA en raíces de a) los arbustos *L. divaricata* y *L. chilense* y de b) los pastos *P. speciosa* y *P. ligularis*. ANOVA a una vía para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas con test a posteriori Bonferroni ($p < 0,05$).

4.10. Determinación del contenido endógeno de fitohormonas

4.10.1. Ácido abscísico (ABA)

Se realizó la determinación del contenido endógeno de ABA en las hojas y se comparó entre las especies y las estaciones. En el arbusto *L. divaricata* (siempreverde), el contenido de ABA fue mayor en primavera con respecto a las demás estaciones, pero no hubo diferencias significativas respecto a *L. chilense* (decidua) (Fig. 49a). Entre los pastos, *P. speciosa* (siempreverde) tuvo mayor contenido de ABA en primavera que en las demás estaciones; no obstante, *P. ligularis* (decidua) no mostró diferencias significativas en el contenido de ABA durante primavera y verano (Fig. 49b).

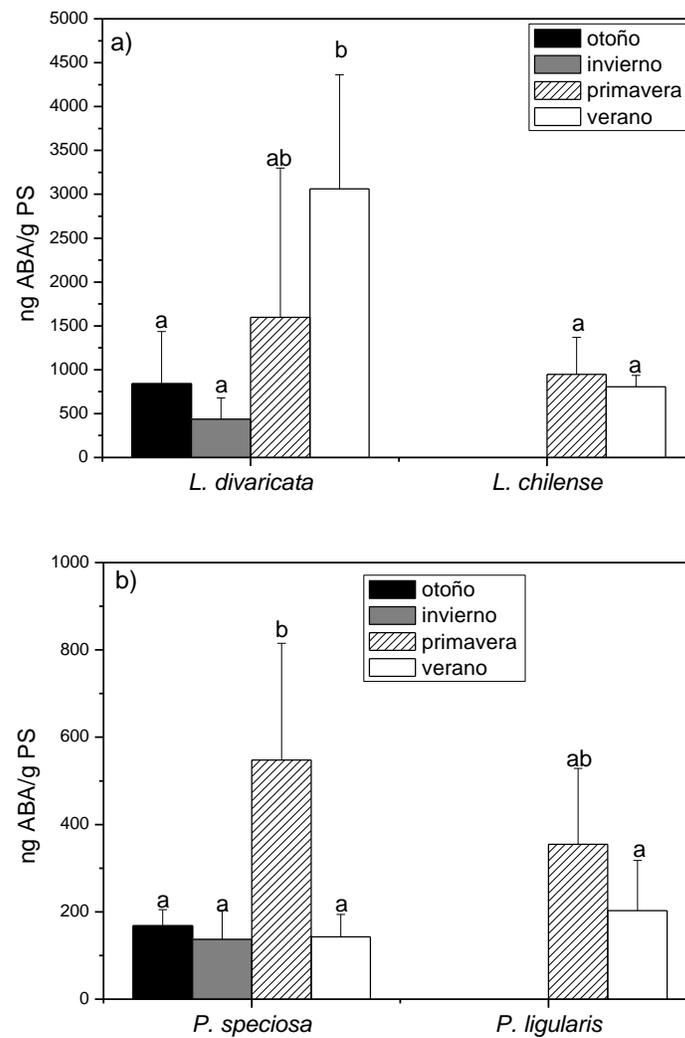


Fig. 49. Contenido endógeno de ABA en hojas de **a)** arbustos (*L. divaricata* y *L. chilense*) y **b)** pastos (*P. speciosa* y *P. ligularis*). Test no paramétrico Kruskal-Wallis para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre estaciones ($p < 0,05$).

Por otra parte, el contenido de ABA en las raíces de los arbustos fue mayor en primavera (Fig. 50a), mientras que en los pastos el contenido de ABA fue mayor en otoño (Fig. 50b). En ambos casos no se observaron diferencias significativas entre las estaciones, lo cual puede ser atribuido a los grandes desvíos en las medias.

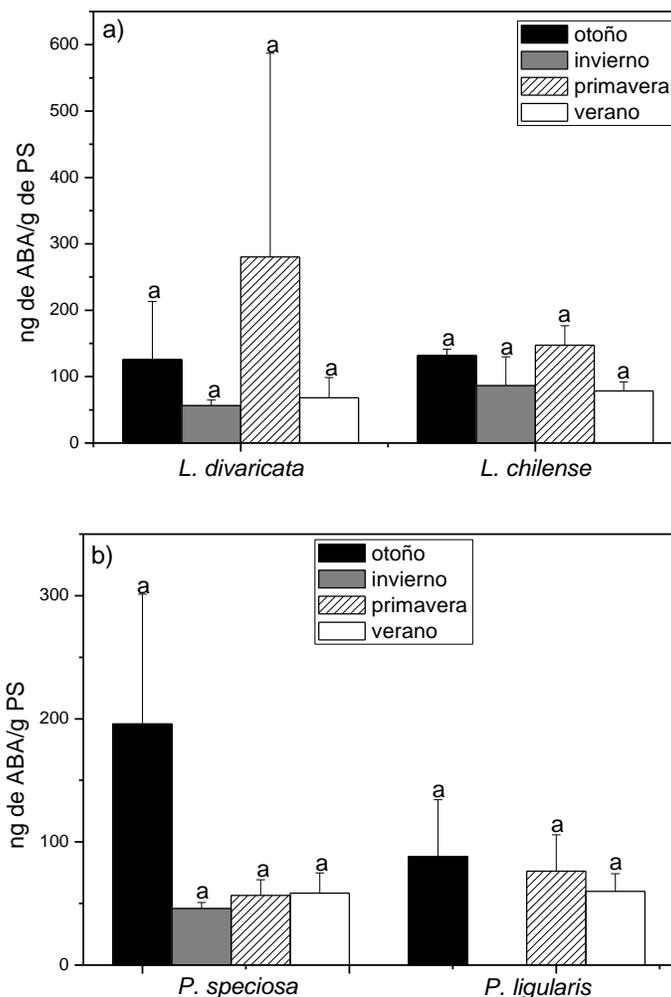


Fig. 50. Contenido endógeno de ABA en raíces de **a)** arbustos (*L. divaricata* y *L. chilense*) y **b)** pastos (*P. speciosa* y *P. ligularis*). Test no paramétrico Kruskal-Wallis para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre estaciones ($p < 0,05$).

4.10.2. Ácido abscísico glicosilado (ABA-GE)

No se observaron diferencias significativas en el contenido de ABA-GE en hojas entre las estaciones para ninguna de las especies en estudio (Figura 51). En el caso de las especies siempreverdes (*L. divaricata* y *P. speciosa*) se observó una tendencia a aumentar en invierno, disminuyendo en verano, mientras que en las especies deciduas se observó mayor contenido de ABA-GE en verano que en primavera (Fig. 51).

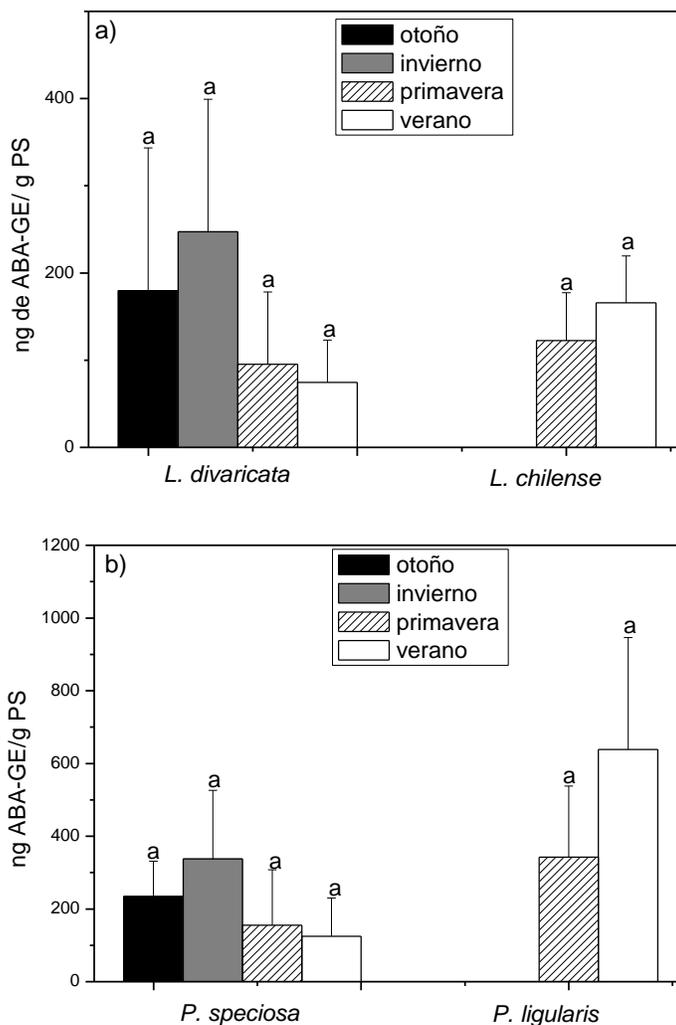


Fig. 51. Contenido endógeno de ABA-GE en hojas de **a)** arbustos (*L. divaricata* y *L. chilense*) y **b)** pastos (*P. speciosa* y *P. ligularis*). Test no paramétrico Kruskal-Wallis para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre estaciones ($p < 0,05$).

Por otra parte, en las raíces el contenido de ABA-GE tampoco se modificó entre las estaciones para ninguna de las especies (Fig. 52). *L. divaricata* tuvo mayor contenido de ABA-GE en invierno y menor en verano (Fig. 52a), mientras que en *L. chilense* y *P. speciosa* el menor contenido de ABA-GE se observó en invierno y el mayor en verano, al igual que *P. ligularis* (Fig. 52a, b).

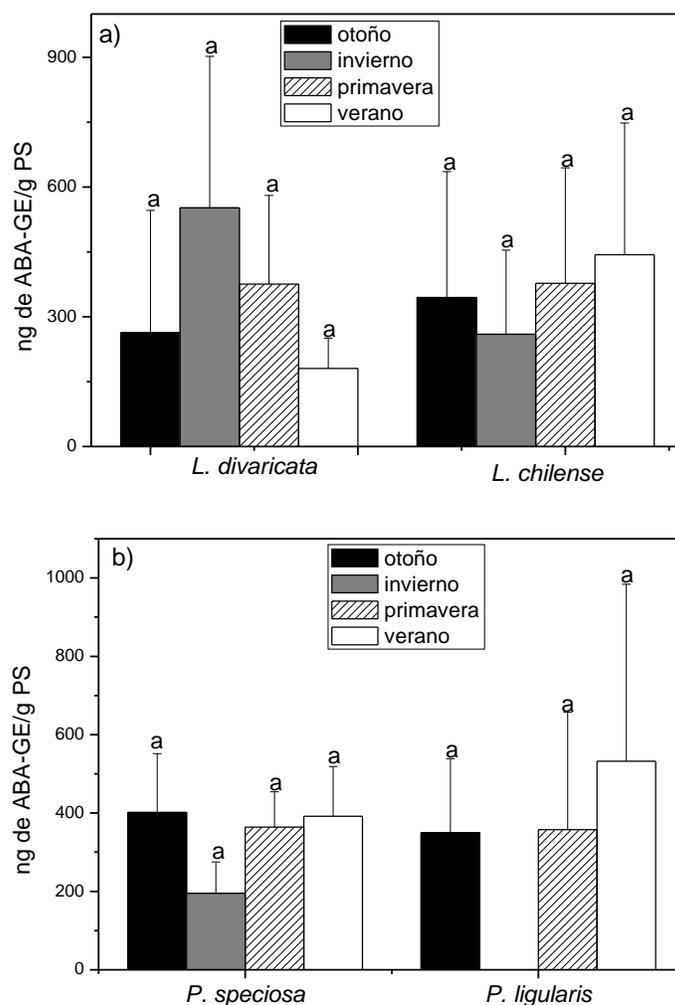


Fig. 52. Contenido endógeno de ABA-GE en raíces de **a)** arbustos (*L. divaricata* y *L. chilense*) y **b)** pastos (*P. speciosa* y *P. ligularis*). Test no paramétrico Kruskal-Wallis para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre estaciones ($p < 0,05$).

4.10.3. Ácido indol acético (AIA)

El contenido endógeno de AIA de las hojas de las cuatro especies en estudio no mostró diferencias entre estaciones (Fig. 53), aunque en el caso de *L. divaricata* se observó una tendencia a aumentar en verano (Fig. 53a).

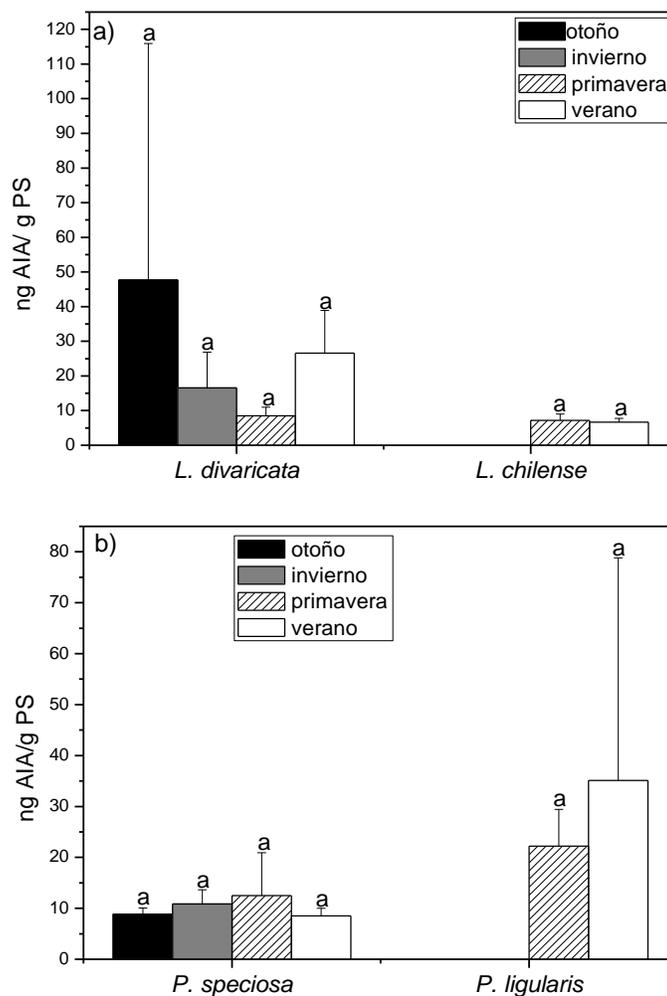


Fig. 53. Contenido endógeno de AIA en hojas de **a)** arbustos (*L. divaricata* y *L. chilense*) y **b)** pastos (*P. speciosa* y *P. ligularis*). Test no paramétrico Kruskal-Wallis para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre estaciones ($p < 0,05$).

Por otra parte, en las raíces de las cuatro especies en estudio se observó un aumento de AIA en otoño y verano (Fig. 54), aunque solo fue significativo en *L. divaricata* y *P. ligularis* (Fig. 54 a, b).

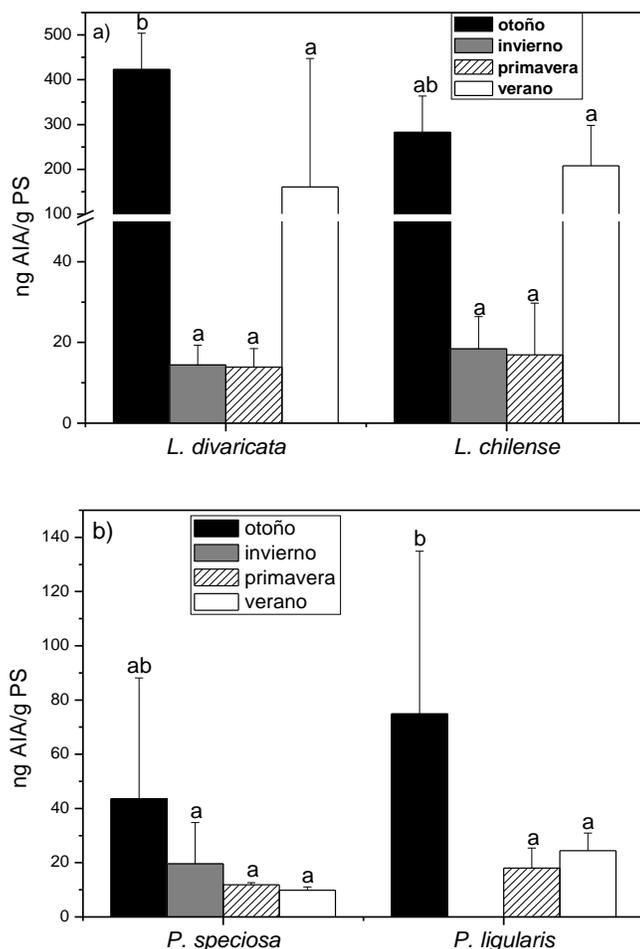


Fig. 54. Contenido endógeno de AIA en raíces de **a)** arbustos (*L. divaricata* y *L. chilense*) y **b)** pastos (*P. speciosa* y *P. ligularis*). Test no paramétrico Kruskal-Wallis para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre estaciones ($p < 0,05$).

4.10.4. Giberelinas

El contenido endógeno de GA_1 y GA_3 en hojas varió entre las especies (Fig. 55). En *L. divaricata* se observó un aumento de GA_1 en primavera con respecto a las demás estaciones (Fig. 55a), mientras que GA_3 disminuyó en primavera mostrando un patrón inverso comparado con GA_1 (Fig. 55c). En *L. chilense* ocurrió lo mismo que en *L. divaricata* encontrándose mayor contenido de GA_1 en primavera (Fig. 55a) y de GA_3 en verano (Fig. 55c). En hojas de *P. speciosa* se observó un aumento de GA_1 en invierno y disminución en las estaciones más húmedas (Fig. 55b), mientras que los valores de GA_3 se mantuvieron

más estables durante todas las estaciones (Fig. 55d). Por último, en hojas de *P. ligularis* GA_1 aumentó en verano (Fig. 55b) mientras que GA_3 aumentó en primavera (Fig. 55d). Comparando las escalas para ambas formas de GAs, los valores de GA_3 son mucho mayores que los valores de GA_1 .

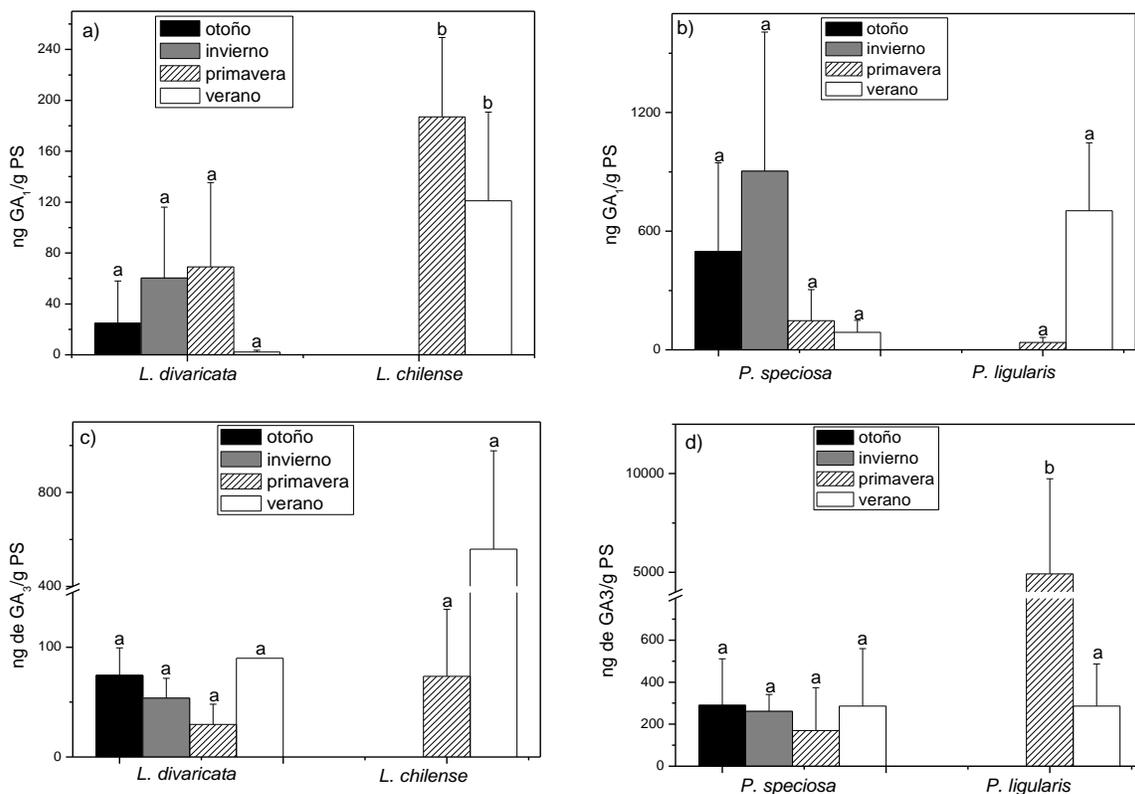


Fig. 55. Contenido endógeno de GAs en hojas. **a)** GA_1 en arbustos (*L. divaricata* y *L. chilense*), **b)** GA_1 en pastos (*P. speciosa* y *P. ligularis*), **c)** GA_3 en arbustos (*L. divaricata* y *L. chilense*) y **d)** GA_3 en pastos (*P. speciosa* y *P. ligularis*). Test no paramétrico Kruskal-Wallis para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre estaciones ($p < 0,05$).

El contenido endógeno de GA_1 y GA_3 en raíces no mostró diferencias significativas entre las especies (Fig. 56). En *L. divaricata* se observó un aumento de GA_1 y GA_3 en otoño con respecto a las demás estaciones (Fig. 57a y 57c). En *L. chilense* no se observaron variaciones entre las estaciones tanto para GA_1 como para GA_3 (Fig. 57a y 57c). En hojas de *P. speciosa* GA_1 se mantuvo constante (Fig. 57b), mientras que GA_3 aumentó en otoño, disminuyendo en verano (Fig. 57d). Por último, en hojas de *P. ligularis* GA_1 y GA_3 aumentó

en otoño (Fig. 57b y 57d). Comparando las escalas para ambas formas de GAs, los valores de GA₃ son mucho mayores que los valores de GA₁.

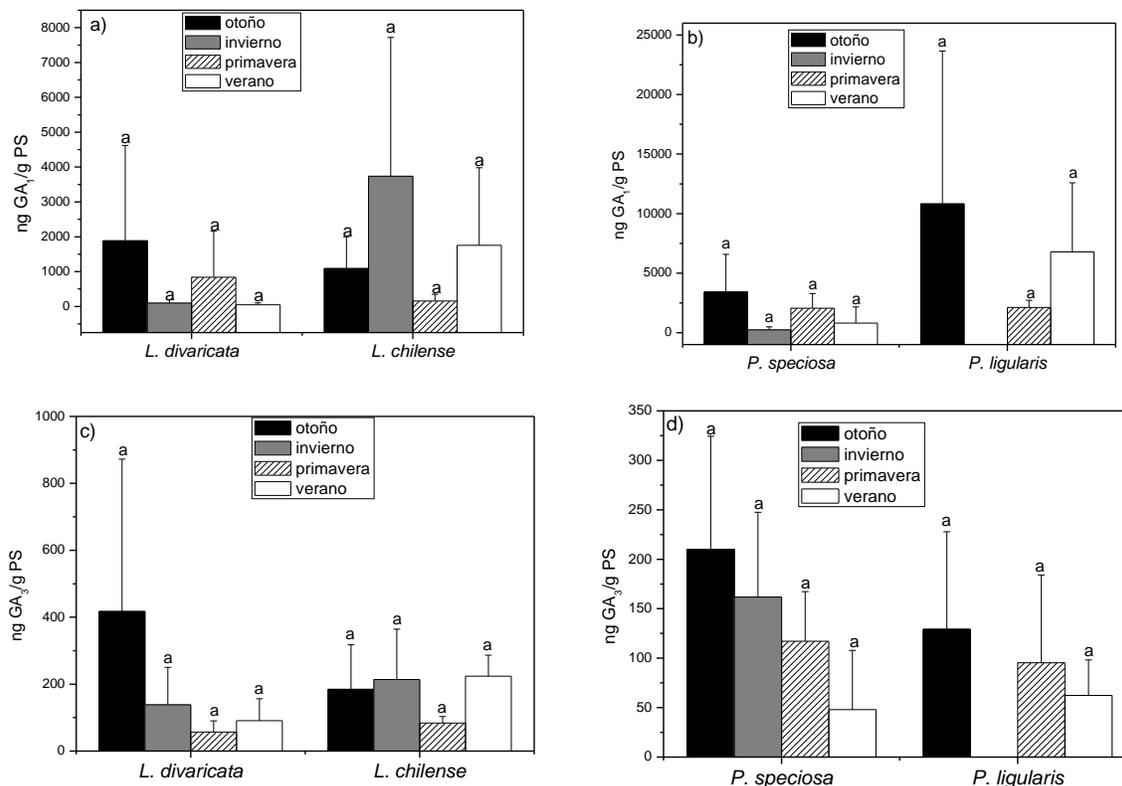


Fig. 56. Contenido endógeno de GAs en raíces. **a)** GA₁ en arbustos (*L. divaricata* y *L. chilense*), **b)** GA₁ en pastos (*P. speciosa* y *P. ligularis*), **c)** GA₃ en arbustos (*L. divaricata* y *L. chilense*) y **d)** GA₃ en pastos (*P. speciosa* y *P. ligularis*). Test no paramétrico Kruskal-Wallis para cada especie comparando entre estaciones. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre estaciones (p<0,05).

En la tabla 10 a continuación se resumen los principales resultados obtenidos de los diferentes parámetros medidos. A su vez, se agrupan las especies según el mecanismo de tolerancia que llevan a cabo para poder visualizar las diferencias entre las estrategias adaptativas a cada nivel (anatómico, fisiológico y bioquímico).

Tabla 10. Comparación entre las especies en estudio, según su mecanismos de resistencia a la sequía, considerando los diferentes parámetros analizados.

Estrategias Adaptativas	TOLERANTES		EVITADORAS		
	<i>L. divaricata</i>	<i>P. speciosa</i>	<i>L. chilense</i>	<i>P. ligularis</i>	
Nivel anatómico	Tamaño hojas	Aumenta en primavera-verano	No varía a lo largo del año	No varía a lo largo del año	Aumenta en otoño
	Tamaño raíces	Menor tamaño en verano	Aumenta en invierno	Aumenta en invierno	Aumenta en otoño
	Haces vasculares	No varía a lo largo del año	Mayor diámetro en primavera-verano	No varía a lo largo del año	Mayor diámetro en otoño
Nivel Fisiológico	Altura de la planta	No varía a lo largo del año	Aumenta en primavera (etapa reproductiva)	No varía a lo largo del año	Aumenta en otoño (final del ciclo de vida)
	Biomasa aérea	Aumenta en verano (comienzo de sequía)	No varía a lo largo del año	Aumenta en primavera (estación húmeda, floración)	No varía a lo largo del año
	Biomasa subterránea	No varía a lo largo del año	No varía a lo largo del año	No varía a lo largo del año	Aumenta en verano (inicio de sequía)
	CRA en hojas	No varía a lo largo del año	No varía a lo largo del año	Aumenta en verano (inicio de sequía)	Aumenta en primavera (estación húmeda, floración)
	CRA en raíces	No varía a lo largo del año	No varía a lo largo del año	No varía a lo largo del año	Aumenta en otoño (final del ciclo de vida)
Nivel Bioquímico	Pigmentos fotosintéticos	Aumentan en primavera	Aumentan en primavera	Aumentan en primavera	Aumentan en primavera
	Producción polifenoles	Aumentan en otoño	Aumentan en otoño-invierno	No varía a lo largo del año	Aumentan en verano-otoño
	Peroxidación lipídica	Mayor en otoño	Mayor en otoño	No varía a lo largo del año	Mayor en verano-otoño
	Contenido de fitohormonas	GAs: no varían a lo largo del año AIA: aumenta en otoño en raíz ABA: aumenta en primavera	GAs: no varían a lo largo del año AIA: aumenta en otoño en raíz ABA: aumenta en primavera-otoño	GAs: no varían a lo largo del año AIA: aumenta en otoño en raíz ABA: no varía a lo largo del año	GAs: no varían a lo largo del año AIA: aumenta en otoño en raíz ABA: no varía a lo largo del año

5. Correlación entre las diferentes variables analizadas

5.1. Análisis de correlación y regresión lineal

La Tabla 11 muestra los coeficientes de correlación y de determinación entre la actividad antioxidante del extracto y los distintos grupos de polifenoles. La actividad antioxidante de las hojas de *L. divaricata* tuvo una correlación positiva significativa con todos los grupos de polifenoles analizados, mientras que en las raíces solo tuvieron correlación con los fenoles totales y flavonoides totales. Las hojas de *L. chilense* no mostraron correlación entre la actividad antioxidante y los grupos de polifenoles, e inclusive se observó una correlación negativa con los fenoles totales y las proantocianidinas; y en el caso de las raíces la correlación solo fue significativa con los fenoles totales y los flavonoides totales. Las hojas de *P. speciosa* mostraron una correlación positiva con los fenoles totales y el ácido tartárico, y una elevada correlación negativa con las proantocianidinas; mientras que en las raíces hubo correlación con todos los grupos de polifenoles. Por último, las hojas de *P. ligularis* mostraron una correlación con los fenoles totales, los flavonoles y el ácido tartárico; mientras que en las raíces la correlación fue con los fenoles totales, los flavonoides y las proantocianidinas.

Tabla 11. Correlación (R y R²) entre la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles.

	<i>Larrea divaricata</i>		<i>Lycium chilense</i>		<i>Pappostipa speciosa</i>		<i>Poa ligularis</i>		
	(R/R ²)	Hojas	Raíces	Hojas	Raíces	Hojas	Raíces	Hojas	Raíces
Fenoles totales		0,95/0,91*	0,92/0,84*	-0,23/0,053	0,83/0,67*	0,85/0,73*	0,83/0,69*	0,91/0,84*	0,76/0,58*
Flavonoides		0,73/0,53*	0,89/0,78*	0,76/0,58	0,64/0,41*	0,45/0,20	0,67/0,45*	0,78/0,61	0,92/0,85*
Flavonoles		0,43/0,19*	0,27/0,07	0,03/0,001	0,24/0,06	0,52/0,27	0,82/0,66*	0,91/0,83*	0,08/0,01
Proantocianidinas		0,54/0,30*	-0,12/0,01	-0,43/0,18	0,23/0,05	-0,87/0,01	0,79/0,61*	-0,14/0,02	0,87/0,75*
Ácido tartárico		0,68/0,47*	0,53/0,28	0,30/0,09	0,15/0,02	0,84/0,71*	0,81/0,65*	0,91/0,84*	0,60/0,36

R: coeficiente de correlación. R²: coeficiente de determinación. *Nivel de significación (p<0.05)

La Tabla 12 muestra el análisis de regresión lineal entre el contenido de agua en el suelo y los distintos parámetros fisiológicos a fin de verificar si dichos parámetros dependen directamente de la disponibilidad hídrica del suelo. En las hojas de *L. divaricata* se observó correlación positiva sólo entre el contenido de agua en el suelo y los pigmentos fotosintéticos, mientras que el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante mostró

una correlación negativa. En hojas de *L. chilense* la correlación positiva se observó sólo entre el contenido de agua en el suelo y el contenido relativo de agua, mientras que en las raíces hubo correlación negativa con la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales, y positiva con el contenido endógeno de ABA.

En el caso de los pastos, las hojas de *P. speciosa* mostraron correlación positiva sólo entre el contenido de agua en el suelo y el contenido endógeno de ABA, mientras que las hojas de *P. ligularis* mostraron correlación negativa entre el contenido de agua del suelo y la capacidad antioxidante.

Tabla 12. Correlación (R y R²) entre el contenido de agua del suelo con diferentes variables: contenido relativo de agua (CRA), peroxidación de lípidos (MDA), actividad antioxidante (ABTS), contenido de fenoles totales (FT), contenido de clorofilas totales (CLOR), contenido de carotenos (CAR) y concentración de ácido abscísico (ABA).

(R/R ²)	<i>Larrea divaricata</i>		<i>Lycium chilense</i>		<i>P. speciosa</i>		<i>P. ligularis</i>	
	Hojas	Raíces	Hojas	Raíces	Hojas	Raíces	Hojas	Raíces
CRA	-0,08/0,006	-0,07/0,004	-0,6/0,36*	0,26/0,07	0,36/0,13	-0,14/0,02	0,14/0,02	-0,45/0,2
MDA	0,1/0,01	-0,22/0,05	0,04/0,002	-0,41/0,17	-0,39/0,15	-0,44/0,19	-0,12/0,02	0,41/0,17
ABTS	-0,65/0,43*	-0,46/0,21	0,42/0,18	-0,5/0,26*	-0,22/0,05	0,56/0,31	-0,78/0,61*	-0,49/0,25
FT	-0,61/0,38*	-0,42/0,13	-0,29/0,09	-0,6/0,36*	-0,17/0,03	0,42/0,18	-0,58/0,34	-0,5/0,25
CLOR	0,63/0,39*	-----	0,15/0,02	-----	-0,46/0,21	-----	-0,55/0,31	-----
CAR	0,5/0,25*	-----	0,24/0,06	-----	0,12/0,02	-----	-0,32/0,1	-----
ABA	-0,17/0,02	-0,06/0,004	0,4/0,16	0,49/0,24*	0,61/0,38*	0,31/0,09	0,3/0,09	-0,12/0,01

R: coeficiente de correlación. R²: coeficiente de determinación. *Nivel de significación (p<0.05)

5.2. Análisis de componentes principales (ACP)

El análisis de componentes principales (ACP) para cada órgano en estudio (hojas y raíces), de cada forma de vida (arbustos y pastos) se presenta en las Fig. 57 y 58, con el fin de identificar la/s variable/s mayormente afectadas por el cambio estacional independientemente del mecanismo de resistencia a la sequía (tolerancia/evitación) que cada especie presenta.

El análisis de componentes principales de las hojas de arbustos se muestra en la Fig. 57a. El primer componente (CP1) explica un 35,7% de la variabilidad total de los datos,

donde existe un aporte sobre la variabilidad total dada por todas las variables en estudio siendo la concentración de fenoles totales (FT) y la capacidad antioxidante (ABTS) por un lado, y los pigmentos (CLOR y CAR) por otro, las variables que más afectan dicho componente. El segundo componente (CP2) explica el 15,2% de la variabilidad total, donde las variables que mayormente afectan son concentración de ABA endógeno (ABA) por un lado, y concentración de ABA-GE endógeno (ABA-GE) por otro (Figura 58a). Un tercer componente (no graficado) explica el 11% de la variabilidad total, donde la concentración de GA₃ endógeno (GA₃) es la variable más fuerte en dicho componente. En este análisis no fue posible apreciar la presencia de clusters entre las dos especies y las estaciones.

Respecto a las raíces de arbustos (Fig. 57b), el CP1 explica un 37% de la variabilidad total, afectado por las variables ABTS y FT, mientras que el CP2 explica un 12,2%, afectado por las variables contenido relativo de agua (CRA) y contenido de agua en el suelo (SWC). El CP3 (dato no mostrado) explica un 12% afectado principalmente por ABA y ABA-GE. En este análisis se formaron dos cluster de datos sin poder identificar la correspondencia de los clusters con las variables de interés (diferentes especies y/o diferentes estaciones).

El análisis de componentes principales de las hojas y raíces de los pastos se muestra en la Fig. 58. En las hojas de los pastos (Fig. 58a), el CP1 explica un 38,9% de la variabilidad total, afectado principalmente por las variables ABTS y FT por un lado, y pigmentos por el otro, mientras que el CP2 explica un 14,3% de la variabilidad total, afectado por las variables CRA y ABA. El CP3 (dato no mostrado) explica un 11% de la variabilidad total, influenciado principalmente por las variables ABA-GE y peroxidación de lípidos (MDA). En este análisis no se puede apreciar visualmente la formación de clusters pero sí se observa una dispersión importante de los datos. En las raíces de los pastos (Fig. 58b), el CP1 explica el 28,3% de la variabilidad total, afectado principalmente por las variables FT y ABTS, mientras que el CP2 explica el 19,4%, influenciado principalmente por las variables MDA y AIA. El CP3 (dato no mostrado) explica el 12% y se encuentra afectado principalmente por las variables de contenido endógeno de GAs (GA₁ y GA₃). Este análisis no muestra la formación de clusters marcados pero sí la dispersión de algunos datos.

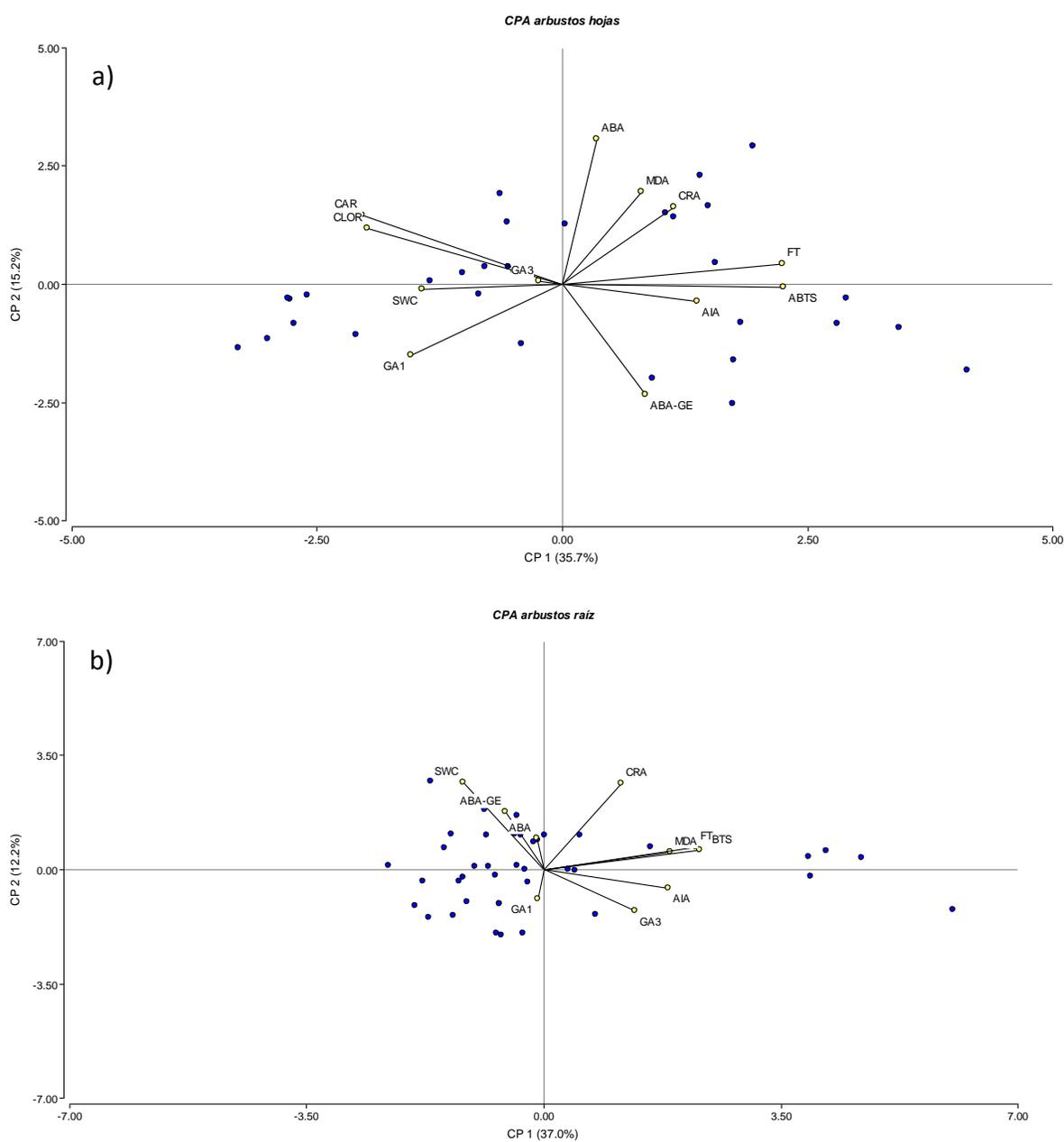


Fig. 57. Análisis de componentes principales. Contenido de malondialdehído (MDA), fenoles totales (FT), capacidad antioxidante (ABTS), contenido relativo de agua (CRA), contenido endógeno de ácido abscísico (ABA), contenido endógeno de ácido abscísico glicosilado (ABA-GE), contenido de agua en el suelo (SWC), contenido de clorofilas totales (CLOR), contenido de carotenos (CAR), contenido endógeno de Giberelina 1 (GA1), contenido endógeno de Giberelina 3 (GA3) y contenido endógeno de ácido indol acético (AIA). Este gráfico muestra la relación las variables con las a) hojas de arbustos y b) raíces de arbustos (*L. divaricata* y *L. chilense*).

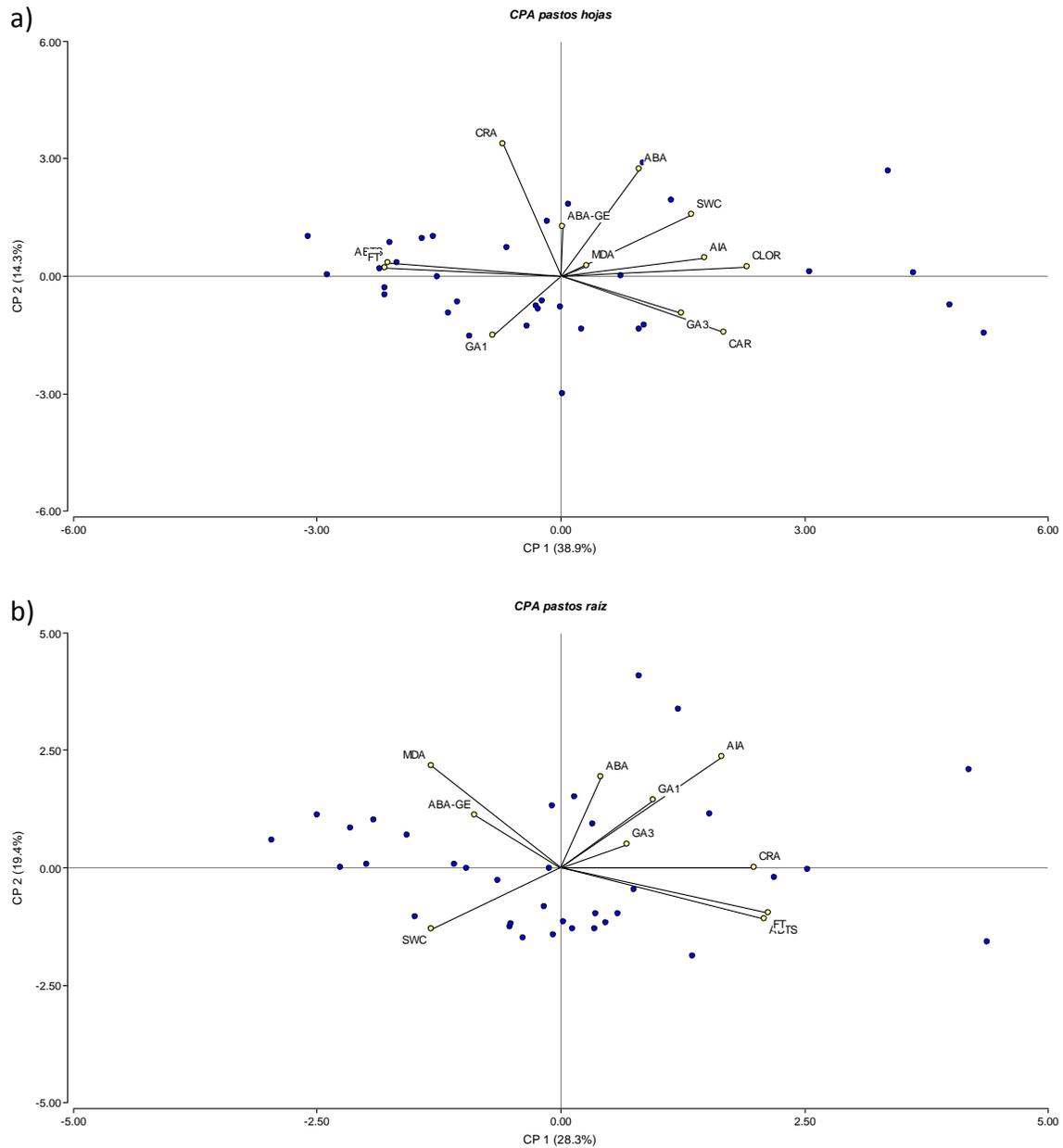


Fig. 58. Análisis de componentes principales. Contenido de malondialdehído (MDA), fenoles totales (FT), capacidad antioxidante (ABTS), contenido relativo de agua (CRA), contenido endógeno de ácido abscísico (ABA), contenido endógeno de ácido abscísico glicosilado (ABA-GE), contenido de agua en el suelo (SWC), contenido de clorofilas totales (CLOR), contenido de carotenos (CAR), contenido endógeno de Giberelina 1 (GA1), contenido endógeno de Giberelina 3 (GA3) y contenido endógeno de ácido indol acético (AIA). Este gráfico muestra la relación de las variables con las a) hojas de pastos y b) raíces de pastos (*P. speciosa* y *P. ligularis*).

5.3. Análisis discriminante lineal

El análisis discriminante lineal (ADL) se llevó a cabo con el fin de reducir la dimensionalidad y maximizar la variabilidad entre las categorías de interés (estación/especie). De esta manera se pueden observar agrupamientos que surgen de la combinación de las variables analizadas por especie en combinación con las estaciones del año.

En los arbustos (Fig. 59), existe una marcada diferenciación entre los clusters formados y sólo existe solapamiento entre las estaciones primavera y verano para la especie *L. chilense*, mientras que para *L. divaricata* el comportamiento en cada estación está bien diferenciado. El primer eje canónico (EC1) explica el 65,52% de variabilidad y separa a las especies *L. chilense* (primavera, P:Lc y verano, V:Lc) y *L. divaricata* (primavera, P:Ld) del resto., Fig. 59a). El segundo eje canónico (EC2) explica el 24,22% de variabilidad y separa invierno de primavera y verano para la especie *L. divaricata*.

El análisis AD para las raíces de arbustos (Fig. 59b) revela un solapamiento de clusters (en concordancia con el ACP), y una diferenciación de grupos sólo para *L. divaricata* en otoño marcado principalmente por el EC1 (78,88%).

Por otra parte, el análisis discriminante para las hojas de los pastos (Fig. 60a) muestra que el EC1 (86,59%) separa primavera de las demás estaciones en ambas especies, mientras que el EC2 (8,30%) separa entre las especies, colocando *P. ligularis* sobre el eje positivo y *P. speciosa* sobre el eje negativo. En las raíces de los pastos (Fig. 60b) existe un mayor solapamiento entre los clusters formados pero sin embargo el otoño se separa de las demás estaciones, independientemente de la especie.

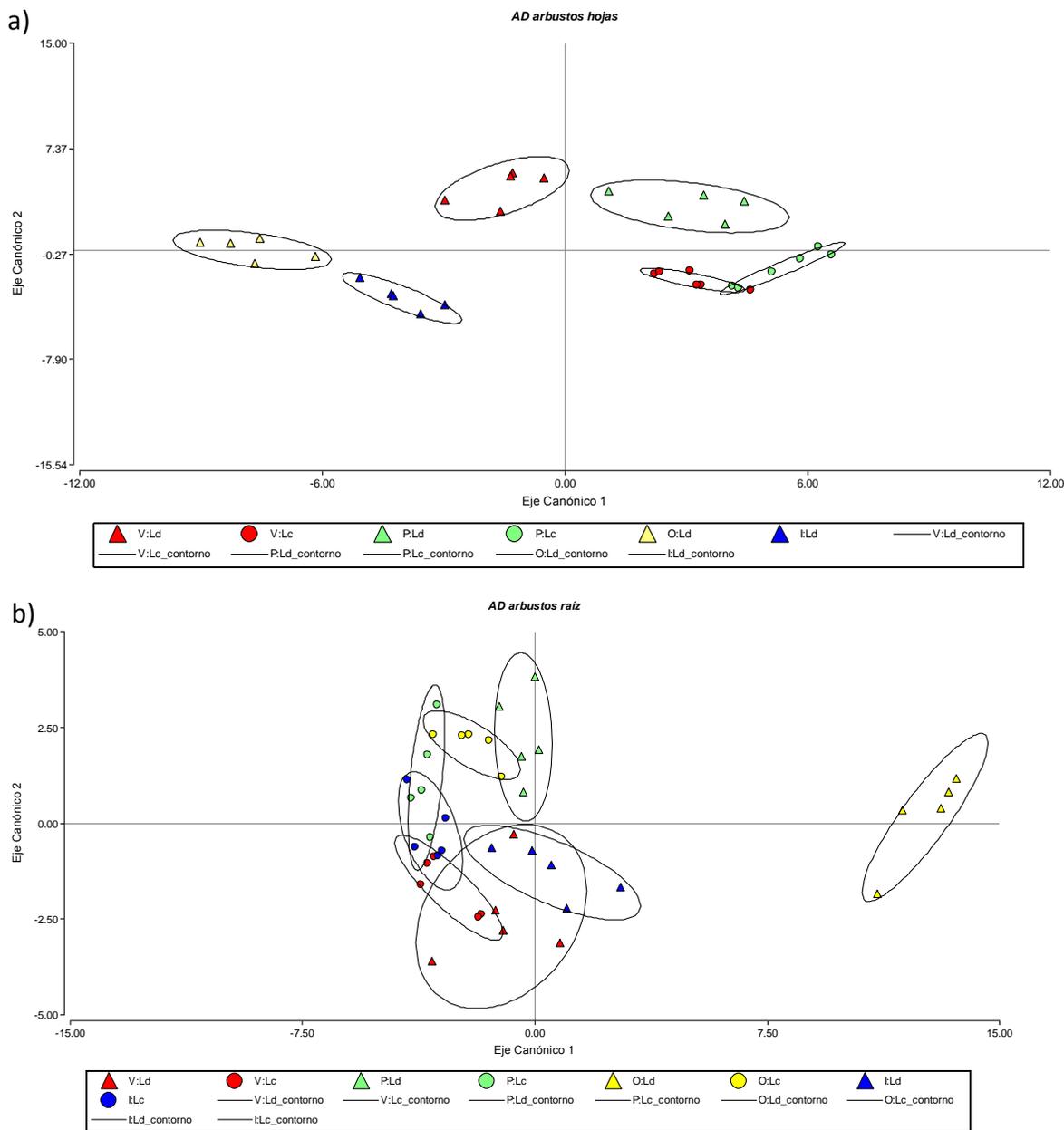


Fig. 59. Análisis discriminante lineal. Estaciones del año: O: otoño, I: invierno, P: primavera, V: verano. Especies en estudio: Ld: *L. divaricata*, Lc: *L. chilense*. Este gráfico muestra la variabilidad que existe entre las categorías de interés (combinación de estación del año con especie en estudio) en a) hojas de arbustos y b) raíces de arbustos.

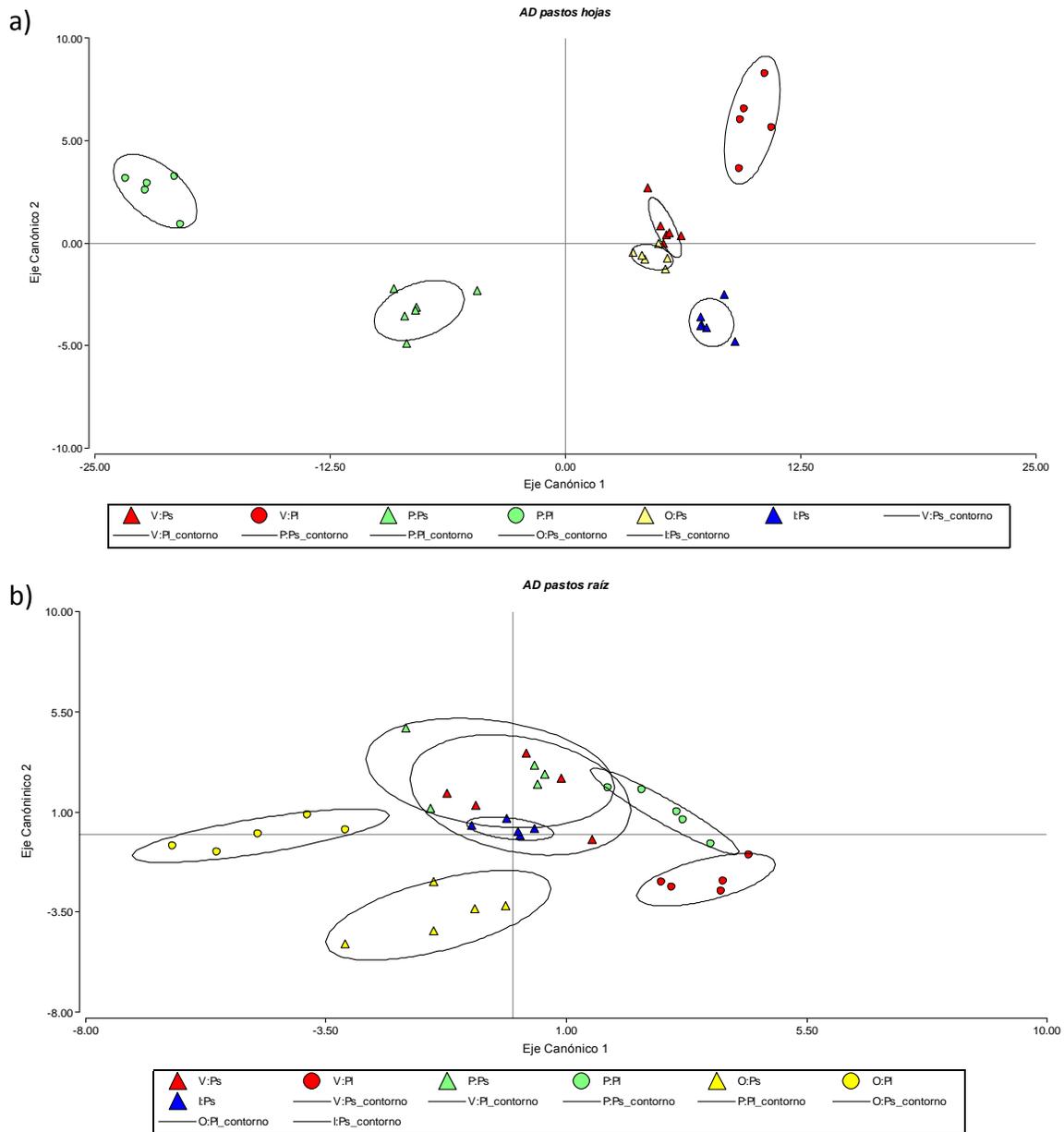


Fig. 60. Análisis discriminante lineal. Estaciones del año: O: otoño, I: invierno, P: primavera, V: verano. Especies en estudio: Ps: *P. speciosa*, Pl: *P. ligularis*. Este gráfico muestra la variabilidad que existe entre las categorías de interés (combinación de estación del año con especie en estudio) en a) hojas de pastos y b) raíces de pastos.

Discusión

DISCUSIÓN

1. El Monte Patagónico

El Monte Patagónico se caracteriza por ser una zona árida-semiárida con precipitaciones estacionales que no superan los 200 mm y marcada amplitud térmica en el día. Los resultados obtenidos durante los muestreos realizados en el año 2011 y verano 2012 muestran que la estación de máxima precipitación fue primavera, en concordancia con lo establecido por Cabrera (1976). Según los datos obtenidos, las estaciones denominadas secas fueron verano, otoño e invierno, en las que la disponibilidad hídrica para el desarrollo de distintas especies fue escasa, mientras que la estación húmeda fue primavera. La terminología “húmeda” y “seca” utilizada a lo largo de esta tesis se refiere a una región semi-árida donde las precipitaciones medias estacionales no superaron los 8 mm. Por otro lado, los valores de temperaturas medias estacionales mostraron un aumento gradual invierno-verano y una amplitud térmica anual que diferencia marcadamente cada estación. A pesar de haberse registrado lluvias en verano, el aumento de temperaturas en dicha estación afectaría la disponibilidad hídrica del suelo debido a la elevada tasa de evaporación y, en consecuencia, evitaría que el agua del suelo esté disponible para el desarrollo de las especies vegetales. Todos los datos obtenidos concuerdan con lo establecido por Cabrera (1976), quien define a la región semi-árida del Monte Patagónico como una zona de escasas lluvias concentradas en invierno y/o primavera, con amplitudes térmicas anuales donde las medias pueden variar entre 13°C y 35°C.

El contenido de agua en el suelo se observó que el contenido de agua no superó el 10% en ninguna de las estaciones, indicando que la zona en estudio se clasifica como zona árida-semiárida. También se observó que a las mayores profundidades del suelo (20 y 30 cm) hubo mayor porcentaje de agua, siendo más evidente en primavera que en las demás estaciones, en concordancia con los datos pluviométricos. Cabe destacar que el contenido hídrico del suelo próximo a la superficie (10 cm de profundidad) fue mayor en invierno que en las demás estaciones. Esta variación de datos en invierno se le atribuye a las precipitaciones que ocurrieron días previos al muestreo, por lo que la filtración de agua hacia profundidades mayores todavía no se había llevado a cabo.

2. Mecanismos de adaptación a la sequía de cada especie en estudio

Chapin y col. (1993) caracterizaron a las plantas de desierto según una serie de caracteres morfo-fisiológicos como tolerantes a la sequía o evitadoras. El objetivo de esta tesis es comparar diferentes caracteres morfo-histológicos, bioquímicos y fisiológicos entre especies de pastos y arbustos caracterizadas desde el punto de vista ecológico como especies tolerantes ó evitadoras a la sequía. En primer lugar, se discutirán las especies por separado a fin de proponer un mecanismo de resistencia a la sequía para cada una de ellas, luego se hará una comparación dentro de cada forma de vida (arbustos y pastos) y, por último, se establecerá un gradiente de xerofitismo-mesofitismo a partir de la correlación de todos los parámetros analizados.

2.1. *Larrea divaricata*

La especie *L. divaricata* fue descrita por Bertiller y col. (1991) como una especie siempreverde con comportamiento perenne. Los resultados obtenidos muestran que *L. divaricata* no varió su altura a lo largo de todo el año, no perdió sus hojas en ninguna de las estaciones del año y la biomasa radical se mantuvo constante en las cuatro estaciones aumentando la biomasa foliar en verano, estación posterior a las lluvias de primavera. Esto concuerda con lo descrito por Yan y col. (2000) para la especie *L. tridentata*, en la se observó que el peso seco de la misma aumentaba en primavera siendo la estación posterior al invierno donde se habían registrado mayores valores pluviométricos.

El análisis anatómico foliar de *L. divaricata* reveló que el tamaño de las hojas varía dependiendo de la estación, menor tamaño en otoño/invierno aumentando en primavera/verano, pero no hubo variación en la cantidad de haces vasculares a pesar de que se encontró variación en la distancia entre ellos dado por el aumento de tamaño de las hojas. En especies de comportamiento perenne la presencia de células del mesófilo más pequeñas y con menores espacios intercelulares sugiere la existencia de plasticidad a nivel foliar que les permite minimizar la pérdida de agua durante los períodos de sequía (Bongi y col., 1987; Mediavilla y col., 2001). Se observó la presencia de similar cantidad de estomas en ambas caras de la hoja, una característica de plantas xerofíticas (Bolhar-Nordenkampf, 1987) y un aumento en el número de estomas por unidad de área en las estaciones secas (otoño e invierno), considerado otro rasgo de adaptación típica del xerofitismo (Merkulov y col., 1997), que disminuyen en la estación húmeda (primavera), volviendo a aumentar en verano. También se observó la presencia de pubescencia foliar durante todas las estaciones del año, pero mayor número de tricomas durante otoño e invierno, rasgo de plantas sometidas a

estrés hídrico que ayuda a minimizar la pérdida de agua (Karabourniotis y Bornman, 1999; Liakoura y col., 1999).

Los preparados semipermanentes de raíz de *L. divaricata* mostraron que el tamaño de la raíz y el diámetro del cilindro central fueron menores en verano que en las demás estaciones y que el grosor del floema secundario y el parénquima se encontraba aumentado en invierno. Si tenemos en cuenta que durante la primavera comenzaron las lluvias, es lógico pensar que la planta sensa la mayor disponibilidad hídrica del suelo, realiza modificaciones anatómicas para un mayor aprovechamiento de la misma incrementando la diferenciación del tejido conductor (xilema). A su vez, durante estas estaciones (primavera-verano) se desarrolla nuevo follaje, hay mayor fotosíntesis, y se desarrolla más tejido conductor para transportar los azúcares al resto de la planta (floema); caracteres que nosotros observamos recién en los cortes de invierno. Joyce y col. (1983) demostraron que ante períodos de déficit hídrico la pared de las células del parénquima sufre un engrosamiento para evitar la pérdida de agua. También, diferentes autores han demostrado que ante déficit hídrico la permanencia de los tejidos viejos en la corteza externa permite una menor pérdida de agua (Stasvoski y Peterson, 1991; Taleisnik y col., 1999). Por ejemplo, especies leñosas expuestas a estrés hídrico presentan exodermis suberizadas y cortezas de gran tamaño para este fin (Rieger y Litvin, 1999). Nuestros resultados coinciden con estos estudios y sugieren que la presencia de cortezas de gran tamaño y exodermis con paredes gruesas durante todas las estaciones del año podría favorecer la retención de agua durante períodos de déficit hídrico.

El contenido relativo de agua (CRA) de toda la planta se mantuvo constante durante las cuatro estaciones sugiriendo que esta especie posee un mecanismo de tolerancia a la sequía que le permite comportarse como especie perenne y mantener sus parámetros fisiológicos normales a lo largo del año. Como este valor se mantuvo entre 60-70%, podemos decir que es una planta adaptada a las zonas adversas con capacidad de retener agua para su desarrollo (Babu y Rao, 1983). Se observaron mayores valores de CRA durante el verano, al inicio de la etapa de crecimiento de la hoja, y fueron decayendo a medida que la hoja fue madurando (Jain y col., 1997; Bacelar y col., 2004). Reddy y col (2003) postularon que las especies tolerantes a la sequía muestran pequeños cambios en CRA durante el año debido al ajuste osmótico que les permite mantener el potencial de turgencia durante los periodos de estrés.

La reducción de pigmentos ante estrés abiótico ha sido estudiada y documentada por varios autores (Chaves y col., 2003; Reynolds y col., 2005; Liu y col., 2011). La concentración

de clorofila *a*, *b* y carotenos fue significativamente menor durante las estaciones secas lo cual indicaría una disminución en la síntesis o un rápido catabolismo, que podría ser considerado como síntoma típico de senescencia y estrés oxidativo (Smirnoff, 1993) caracterizado por la presencia de moléculas antioxidantes.

Varios autores han informado que arbustos siempreverdes nativos de zonas semiáridas acumulan grandes cantidades de metabolitos secundarios, incluyendo polifenoles (Hättenschwiler y Vitousek, 2000; Campanella y Bertiller, 2011; Carrera y Bertiller, 2010), proponiendo que la síntesis de estos compuestos podría ser una estrategia para tolerar la sequía (Reddy y col., 2004; Westoby y col., 2002) ya que forman parte del sistema antioxidante no enzimático. Ello debido a su gran actividad antioxidante capaz de reducir los altos niveles de EROs, consecuencia del estrés hídrico (Hatier y Gould, 2008; Agati y Tattini, 2010). Los resultados del análisis espectrofotométrico mostraron en *L. divaricata* una alta producción de polifenoles durante todo el año, aumentando en las estaciones secas y con elevada capacidad antioxidante. La cantidad de fenoles totales, flavonoides y ácido tartárico fue mayor en hojas que en raíces y se observó un aumento significativo en el contenido de fenoles totales durante las estaciones secas con una correlación significativa con la capacidad antioxidante. Estos resultados concuerdan con lo señalado por Reddy y col. (2004) y Chapin y col. (1993) quienes establecen que la acumulación de metabolitos secundarios durante épocas de sequía podría ser una estrategia de especies siempreverdes para tolerar el estrés hídrico y mantener sus hojas durante todo el ciclo de vida. El contenido de proantocianidinas fue significativamente mayor en raíces que en hojas y no se observaron diferencias estacionales en concordancia con lo hallado por Hyder y col. (2002) y Holecheck y col. (1990) en *L. tridentata*. Se ha propuesto que las proantocianidinas en raíz podrían tener también un rol alelopático con otras especies vegetales, insectos y/o microorganismos presentes en el medio donde se desarrollan (Bais y col., 2002; 2003; Thelen y col., 2005; Li y col., 2010).

En *L. divaricata* se pudieron identificar compuestos del grupo no flavonoides y flavonoides conjugados con azúcar (galactosa y ramnosa) o formando parte de la estructura de taninos condensados. Existe poca bibliografía sobre los posibles compuestos fenólicos de esta especie, pero en concordancia con nuestros resultados, Palacio y col. (2012) demostraron la presencia de quercetina y kaempferol en hojas de *L. divaricata*, utilizando estándares externos para su identificación, aunque no determinaron si los mismos se encontraban conjugados con azúcares o formando polímeros. Por otro lado, diferentes autores (Andersen y col., 2006; Santos-Buelga y col., 2003) han demostrado que los

polifenoles en la naturaleza generalmente se encuentran formando polímeros (taninos condensados) o conjugados con azúcares (taninos hidrolizables) y es muy poco probable poder hallarlos sin conjugar. Comparando entre las diferentes condiciones establecidas (sequía y humedad) se observó la producción de taninos condensados, específicamente procianidina dímero B1, y un flavonoide no hallado en la estación húmeda, conjugado con azúcares (kaempferol). Se ha propuesto que los taninos condensados podrían tener un papel estructural, por ejemplo, en el reforzamiento de la pared celular bajo estas condiciones (Field y col., 2006; Saraví Cisneros y col., 2013). Otra posibilidad en cuanto a las funciones de este tipo de compuestos es que, debido a su polimerización, quedan expuestos mayor cantidad de grupos funcionales con capacidad antioxidante por lo que servirían para contrarrestar los efectos nocivos causados por el aumento de EROs (Kukavica y col., 2009). No obstante, llama la atención el hecho de que la capacidad antioxidante de los extractos realizados para la identificación de los compuestos no varió en las diferentes condiciones establecidas. Se podría pensar que al ser ésta una especie siempreverde, adaptada evolutivamente a vivir en estas condiciones climáticas, mantiene un equilibrio homeostático más o menos estable en su metabolismo secundario. Es decir, la mayor cantidad de polifenoles que sintetiza son derivados a funciones estructurales y bioquímicas manteniendo un estado redox bastante controlado a lo largo del año para protección del aparato fotosintético (Bolouri-Moghaddam y col., 2010; Karabourniotis y col., 2014). En coincidencia, el análisis de peroxidación lipídica como indicador de estrés oxidativo mostró que en *L. divaricata* el déficit hídrico es sentido en la raíz (en otoño y verano) mientras que en las hojas el contenido de MDA se mantiene constante, lo que reforzaría lo explicado anteriormente

Teniendo en cuenta que el estudio realizado es un trabajo a campo, donde la variabilidad de datos está muy influenciada por otras variables naturales que no pudieron ser controladas ni medidas, observamos en algunos resultados que las desviaciones de los datos impidieron establecer diferencias estadísticamente significativas, por ejemplo, en el contenido endógeno de fitohormonas. Esto nos llevó a analizar sus tendencias. *L. divaricata* mostró un aumento en la síntesis de ABA en primavera y luego en verano, independientemente de la disponibilidad hídrica del suelo. Estos resultados concuerdan con otros autores (Sharp y col., 2000; Spollen y col., 2000), quienes trabajaron con mutantes ABA deficientes de tomate, maíz y *Arabidopsis*, respectivamente ellos demostraron que niveles endógenos de ABA normales (equivalentes a los del fenotipo silvestre) son necesarios para mantener el crecimiento del tallo y la expansión foliar independientemente del balance hídrico, por lo cual propusieron un rol dual para esta hormona, actuando como

promotor del crecimiento en situaciones no estresantes. Por otro lado, ABA-GE mostró mayor contenido en invierno y menor en primavera sugiriendo que independientemente de la disponibilidad hídrica del suelo y del mecanismo de resistencia utilizado, esta especie se encuentra adaptada a las regiones semi-áridas, por lo que su homeostasis estaría controlada por su anabolismo y catabolismo, siendo ABA-GE la forma de transporte de ABA y almacenamiento (Sreenivasulu y col., 2012; Llanes y col., 2014).

Al analizar el contenido endógeno de AIA se observó un marcado aumento en otoño tanto en las hojas como en las raíces. López-Carbonell (1994) y Yurekli y col. (2001) observaron un aumento de AIA frente a estrés abiótico y, en concordancia con nuestros resultados, Yurekli y col. (2001) observó mayor contenido de AIA endógeno en especies de tomates tolerantes. Recientemente se ha demostrado que las auxinas pueden participar en la regulación positiva de la resistencia a estrés hídrico a través de varios mecanismos interrelacionados como la regulación de la arquitectura del sistema radical, regulación de la expresión de genes ABA-dependientes, metabolismo de las EROs y homeostasis metabólica general, al menos parcialmente (Shi y col., 2014).

Cuando se analizó el contenido de GAs, se observó que en las hojas de *L. divaricata* el aumento de GA₁ iba acompañado de una disminución en GA₃ y viceversa, por lo que el nivel de GAs activas se mantenía constante, mientras que en las raíces no se observaron diferencias en los valores hallados de GA₁ y GA₃ entre las estaciones. Estos resultados sugieren que la disponibilidad hídrica del suelo no afecta a la producción de GAs activas (GA₁ y GA₃).

2.2. *Lycium chilense*

La especie *L. chilense* fue descrita como una especie con comportamiento caducifolio (Bertiller y col., 1991). Nuestros resultados lo confirman, ya que pierde sus hojas en las estaciones secas, siendo éste un mecanismo de adaptación en plantas con comportamiento de evitación a la sequía (Sherrard y Maherali, 2006). La biomasa foliar fue mayor en primavera (estación húmeda) que en verano, y la biomasa radicular se mantuvo constante durante las cuatro estaciones, mostrando que esta especie mantiene su crecimiento basal durante todas las estaciones, sin embargo, posee un ciclo de vida corto, ya que la senescencia foliar comienza en verano (estación posterior a la estación de mayor disponibilidad hídrica y a su vez a la estación de floración) y, en consecuencia, en otoño e invierno no hay presencia de hojas hasta el próximo ciclo. Esta se reconoce como una característica de plantas evitadoras (Sherrard y Maherali, 2006).

El análisis anatómico no mostró diferencia en el tamaño de las hojas entre primavera y verano, y el diámetro de raíz y del cilindro central fue mayor en invierno sin diferencias en las células del parénquima y el floema entre las diferentes estaciones. Esto indica que *L. chilense* mantiene con vida las raíces de la planta en desmedro de la senescencia foliar para así poder mantener su metabolismo basal durante las estaciones de menor disponibilidad hídrica como mecanismo de evitación a la sequía. En cuanto al contenido relativo de agua (CRA) se pudo observar que en la raíz se mantuvo sin diferencias entre las estaciones del año pero en las hojas aumentó en verano. Bacelar y col. (2004) observaron que el CRA en hojas es mayor en las etapas iniciales de crecimiento y luego disminuye a medida que se acumula materia seca y la hoja madura. Por otra parte, Chapin y col. (1993) informaron valores de CRA cercanos al 85% y 90% en hojas de plantas mesofíticas no estresadas; mientras que en hojas estresadas no supera el 30%. *L. chilense* muestra un contenido de agua en hojas entre 45-65%, demostrando que es una planta adaptada a zonas áridas, con ciertos comportamientos xerófitos pero que posee caracteres de plantas que evitan el estrés (Bertiller y col., 1991).

En cuanto a la concentración de pigmentos fotosintéticos no se encontraron diferencias entre las estaciones húmedas y sus valores fueron similares a los hallados en *L. divaricata* en las mismas estaciones del año, considerándose un síntoma típico de senescencia acompañado de estrés oxidativo (Smirnoff, 1993) caracterizado por ciclos de vida cortos.

La concentración de polifenoles hallados en esta especie fue mucho menor a la encontrada en *L. divaricata*, sugiriendo que esta especie posee otros mecanismos de protección característicos de especies evitadoras, tales como la pérdida de hojas durante la estación seca. *L. chilense* presentó fenoles totales, baja concentración de flavonoides totales, taninos condensados, ácido tartárico y flavonoles, pero no se detectaron flavan-3-oles. La actividad antioxidante de polifenoles de hojas fue menor que en *L. divaricata* y no se observaron diferencias significativas entre las estaciones estudiadas. Esto se condice con la baja concentración de polifenoles hallados y con el hecho que la producción de grandes cantidades de metabolitos secundarios como antioxidantes no es un rasgo importante en plantas evitadoras (Reddy y col., 2004; Westoby y col., 2002). En *L. chilense* se determinó la presencia solamente de un no flavonide (oleuropeina) conjugado con azúcar bajo condiciones de humedad, mientras que frente a la sequía no sólo se incrementó la síntesis de polifenoles totales, sino que se pudieron identificar dos no-flavonoides libres (resveratrol y escopoletina) y la presencia de flavonoides (luteolina y quercetina) conjugados con azúcares.

Este resultado se puede correlacionar con el aumento de actividad antioxidante en el extracto realizado para la identificación de compuestos, indicando que ante una baja disponibilidad hídrica, existe un aumento en la producción de flavonoides que poseen en su estructura química grupos funcionales con capacidad antioxidante (Kukavica y col., 2009). La ausencia de taninos condensados y el incremento de compuestos antioxidantes libres y conjugados sugiere un rol específico de protección frente al estrés oxidativo (Bolouri-Moghaddam y col., 2010), no existiendo en esta especie la necesidad de reforzar estructuras anatómicas por ser caducifolia. *L. chilense* no mostró cambios en MDA en la raíz, pero sí un aumento en las hojas durante el verano. La baja disponibilidad hídrica ocasionaría una peroxidación lípica causada por un aumento de EROs, lo que llevaría a aumentar la producción de metabolitos secundarios con grupos funcionales libres para actuar como antioxidantes no enzimáticos y mantener la homeostasis celular.

Los resultados del contenido endógeno de ABA en *L. chilense* no mostraron diferencias significativas entre las dos estaciones analizadas para el caso de las hojas ni entre las cuatro estaciones para el caso de raíces. Hubo una tendencia a aumentar el contenido de ABA en primavera, al igual que *L. divaricata*, indicando que su función es mantener el crecimiento normal, fundamentalmente de la raíz, en búsqueda de agua (Sharp y col., 2000; Spollen y col., 2000). Esto sugiere que a pesar de *L. chilense* ser clasificada como especie evitadora, posee comportamientos de planta tolerante para poder sobrevivir en el ambiente donde habita. Los resultados del contenido endógeno de ABA-GE apoyan la idea anterior, sugiriendo que independientemente del mecanismo de resistencia utilizado, al ser una especie adaptada a las regiones semi-áridas su homeostasis estaría controlada en gran parte por síntesis y metabolismo de ABA (Sreenivasulu y col., 2012). El contenido endógeno de AIA fue mayor en otoño, especialmente en raíces, que en las demás estaciones. Al ser caducifolia se podría pensar que previo a la abscisión de hojas, las auxinas transportadas vía floema se acumulan en raíz ayudando a mantener el crecimiento primario de la misma en interacción con ABA. El contenido endógeno de GAs en hojas mostró un aumento en primavera y disminución en otoño de GA₁, mientras que GA₃ mostró el patrón inverso, sugiriendo que el contenido de GAs activas se mantiene constante.

2.3. *Pappostipa speciosa*

Esta especie es considerada una especie xerofítica debido a la presencia de tricomas en hojas, baja velocidad de crecimiento y comportamiento similar a una especie perennifolia (Pazos y col., 2007; Cenzano y col., 2013). Nuestros resultados muestran que tiene un

comportamiento perennifolio debido a que no hubo pérdida de hojas durante las estaciones secas, con un mayor crecimiento en altura durante el verano, luego del incremento en la disponibilidad hídrica. En cuanto a la biomasa foliar y radicular no se observaron diferencias entre las estaciones, comportamiento característico de planta tolerante al estrés (Westoby y col., 2002).

El análisis anatómico de hojas de *P. speciosa* mostró cualitativamente gran cantidad de tricomas sin poderse establecer diferencias entre estaciones, siendo la pubescencia foliar un rasgo xerofítico característico (Karabourniotis y Bornman, 1999; Liakoura y col., 1999). No se observó diferencia entre estaciones en el área de la lámina foliar ni el área del tejido de sostén y el radio de los haces vasculares se vio aumentado en primavera en comparación con las estaciones secas, como posible respuesta para aprovechar la mayor disponibilidad de agua.

En raíces se observó que el diámetro del cilindro central aumentó en otoño e invierno, el diámetro de los vasos xilemáticos aumentó en invierno pero el número de vasos xilemáticos fue mayor en primavera, probablemente por la reiniciación de la actividad del cambium luego de las lluvias. *P. speciosa* no mostró diferencias en el contenido relativo de agua entre las estaciones y sus valores se mantuvieron entre 60-80% en hojas y entre 50-70% en raíz, sugiriendo una adaptación a la deficiencia hídrica del suelo pudiendo acumular agua para llevar a cabo los diferentes procesos metabólicos inclusive en condiciones de sequía siendo esta capacidad de osmorregulación es característica de plantas tolerantes (Chapin y col., 1993).

Los resultados del análisis de pigmentos fotosintéticos mostraron coincidencia con lo descrito para los arbustos, observándose una disminución en las concentraciones de clorofila *a*, *b* y carotenoides durante las estaciones secas, indicando una disminución en la síntesis y/o un rápido catabolismo (Smirnoff, 1993).

El análisis de cuantificación de polifenoles por espectrofotometría mostró la presencia de fenoles totales, ácido tartárico y flavonoles y en concentraciones mínimas taninos condensados y flavonoides, mientras que no se detectaron flavan-3-oles. Existe poca bibliografía sobre el contenido de polifenoles en pastos de desierto, aunque la presencia de estos metabolitos secundarios se podría atribuir al papel antioxidante de los mismos, ya que *P. speciosa* mostró una alta actividad antioxidante en los extractos de polifenoles la cual se encontró aumentada durante las estaciones de menor disponibilidad hídrica. En el estudio realizado para la identificación de compuestos se analizaron hojas y raíces correspondientes a las campañas denominadas sequía (otoño) y humedad (primavera). En hojas se pudieron

identificar solo dos compuestos en la estación seca: un flavonoide libre (luteolina) y un no flavonoide libre (escopoletina), mientras que en primavera no se pudo identificar ningún compuesto. Luteolina y quercetina libres y glucosidadas han sido propuestas como fuertes antioxidantes en plantas, cuya síntesis es regulada corriente arriba por diferentes estreses abióticos (Tattini y col.2004; Agati y col.2011)

En raíz de *P. speciosa* se identificaron una gran cantidad de compuestos fenólicos, entre ellos flavonoides simples o conjugados con azúcares, y no flavonoides. En otoño se identificó la presencia, en su mayoría, de no flavonoides, mientras que solo se identificó quercetina como flavonoide. Cabe destacar que el compuesto ϵ -viniferina es un dímero del resveratrol, compuesto hallado en forma de monómero en la condición de humedad. En primavera la mayoría de los compuestos fueron flavonoides conjugados con azúcares y algunos no flavonoides. A su vez, la capacidad antioxidante de los mismos no mostró diferencias significativas. Debido a que no existía bibliografía sobre este tipo de estudios se dificultaba llegar a comprender la función específica de todos estos compuestos, las cuales pueden ser estructurales, de protección, adaptación al ambiente, alelopáticos, etc (Macheix y col., 2005; Franceschi y col., 2005).

Una posible explicación a la variedad de compuestos encontrados en raíz entre las distintas condiciones hídricas es la necesidad de moléculas con mayor cantidad de grupos funcionales libres con capacidad secuestrante de radicales libres en la condición de sequía que en la de humedad. Esto estaría mostrando que los compuestos hallados en sequía podrían tener su principal rol como antioxidantes, mientras que en primavera al estar conjugados con azúcares, los grupos reactivos estarían anulados y serían formas de transporte y señalización (Di Ferdinando y col., 2012).

Los valores de MDA obtenidos muestran un aumento de estrés oxidativo durante las estaciones de menor disponibilidad hídrica, por lo que podría llegar a explicar el aumento en la producción de metabolitos secundarios en las estaciones secas usando un mecanismo característico de plantas tolerantes (Reddy y col., 2004).

El contenido endógeno de fitohormonas de hojas de *P. speciosa* recolectadas en primavera presentó un pico de ABA libre acompañado de una marcada reducción de ABA-GE. Estos resultados tendrían relación directa con la necesidad de controlar la apertura estomática. En invierno se detectaron los mayores valores de ABA-GE (como forma inactivada de reserva y transporte) en concordancia con el menor contenido de ABA. A su vez los valores de ABA-GE hallados en las hojas de *P. speciosa* son inversos a los valores de ABA-GE hallados en las raíces, sugiriendo el transporte del mismo desde las raíces hacia

las hojas (Llanes y col., 2014) o inclusive, desde las hojas a las raíces (Manzi y col., 2015). Estos resultados sugieren que bajo prolongados periodos de estrés el elevado contenido de ABA inicial está ligado a un posterior aumento en el catabolismo a fin de mantener los valores de ABA constantes, ya sea por la producción de metabolitos como PA y DPA o por la conjugación para formar ABA-GE y luego ser transportado por la planta (Sreenivasulu y col., 2012). Al igual que en los arbustos el contenido endógeno de AIA en las raíces de *P. speciosa* aumentó en otoño, lo cual podría contribuir a mantener el crecimiento primario de raíz y el aumento de biomasa en la planta (Dobra y col., 2010). Los valores de GAs obtenidos no muestran grandes diferencias entre las estaciones, sugiriendo, al igual que en los arbustos, que la disponibilidad hídrica del suelo no afecta a la producción de GAs activas.

2.4. *Poa ligularis*

Es una especie de amplia distribución en el Monte Patagónico, considerada una planta mesofítica, con elevado recambio foliar y elevada velocidad de crecimiento en la estación húmeda con pérdida de hojas en las estaciones secas (Pazos y col., 2007; Cenzano y col., 2013). Nuestros resultados confirman esta descripción. Debido a su elevada velocidad de crecimiento, la mayor altura de las plantas se observó en la estación previa a la pérdida de hojas, con una corta estación de crecimiento y ciclo de vida corto.

En cuanto a biomasa foliar no se observó diferencia estadísticamente significativa entre las estaciones otoño, primavera y verano, pero hubo mayor biomasa radical en verano, que es la estación de crecimiento intenso posterior a las lluvias en coincidencia con lo propuesto por Yan y col. (2000).

El análisis anatómico mostró correlación con los resultados de crecimiento y biomasa. En otoño, las hojas tenían mayor área de la lámina, mayor área de tejido de sostén y mayor diámetro de haces vasculares. Las raíces tenían mayor diámetro de cilindro central y mayor diámetro de haces vasculares. Todo ello como consecuencia del crecimiento ocurrido en la estación anterior. En cuanto a los vasos xilemáticos se halló mayor diámetro en otoño pero mayor cantidad en primavera, siendo esto lógico debido a que se generan nuevos vasos en la etapa de mayor disponibilidad hídrica, como producto del crecimiento en sí, y para el transporte de mayor cantidad de agua hacia las hojas (Lovisolo y Schubert, 1998; Corcuera y col., 2004; Holste y col., 2006).

Como era lógico suponer, el CRA de hojas fue significativamente mayor en primavera, asociado al mayor número de vasos xilemáticos de la raíz y al hecho de que el ciclo de vida de esta especie se encuentra en sus inicios, por lo que es necesario mayor

contenido de agua para los diferentes procesos metabólicos y crecimiento. El CRA de raíz fue significativamente mayor en otoño (ya se han caído las hojas), lo que podría ser una forma de preservar el metabolismo radical como mecanismo de evitación de estrés antes del periodo de mayor sequía (invierno) (Sherrard y Maherali, 2006). Asociado a un elevado CRA en hojas se encontró una alta concentración de clorofilas *a* y *b* en primavera, resultado esperable debido a que el metabolismo activo requiere una gran actividad fotosintética.

En *P. ligularis* se pudo realizar un análisis de los grupos de compuestos fenólicos por espectrofotometría, pero no se pudo llevar a cabo la identificación de compuestos. En general, esta especie mostró menor concentración de compuestos en todos los grupos de polifenoles, en comparación con las demás especies. Se observó la presencia de bajas concentraciones de fenoles totales, ácido tartárico y flavonoles; las concentraciones de taninos condensados y flavonoides fueron mínimas y de flavan-3-oles nula. Consecuentemente, la actividad antioxidante de polifenoles fue muy baja en comparación con las demás especies. La mayor actividad antioxidante de polifenoles de hojas fue medida en verano en concordancia con mayor contenido de MDA en primavera y verano como signo de estrés oxidativo. A pesar de ser considerada la primavera como la estación de mayor disponibilidad hídrica se debe recordar que el lugar donde habitan es un ambiente semi-árido, por lo que la disponibilidad hídrica no es muy alta, sumado a que en esta estación se elevan notoriamente la temperatura diurna y la irradiación solar. Por lo tanto, al inicio de su ciclo de vida (primavera) la planta sensa el estrés hídrico del ambiente, produce una cierta cantidad de metabolitos secundarios protectores para afrontar el estrés oxidativo causado por la presencia de EROs, pero su principal mecanismo de resistencia a la sequía es la evitación teniendo un ciclo de vida corto (Sherrard y Maherali, 2006).

El contenido de ABA en hojas de *P. ligularis* fue mayor en primavera y menor en verano, mientras que ABA-GE tuvo el patrón inverso sugiriendo un equilibrio en su metabolismo durante la reanudación del crecimiento y para control de la transpiración (Sreenivasulu y col., 2012). El contenido endógeno de AIA en raíces fue elevado en otoño, quizás para mantener el crecimiento primario de raíz y el aumento de biomasa en la planta de manera similar a lo descrito para las otras especies. En hojas de *P. ligularis* los valores de GA₃ fueron significativamente mayores en primavera que en verano, mientras que GA₁ tuvo el patrón inverso. En raíces se observó una tendencia a aumentar ambas GAs a medida que se iba cumpliendo el ciclo de vida (primavera-verano-otoño) sugiriendo, que en esta especie, las GAs no están relacionadas con el estrés hídrico sino con el crecimiento y desarrollo de la planta (Hedden y Thomas, 2012).

3. Correspondencia de los parámetros en estudio con los mecanismos de resistencia a la sequía

Estadísticamente se realizaron comparaciones entre las dos especies pertenecientes a la misma forma de vida (arbustos y pastos) para analizar si los parámetros bioquímicos medidos establecían los mecanismos de resistencia a la sequía (tolerancia o evitación).

3.1 Arbustos

Los análisis multivariados que combinaron todos los parámetros medidos posibles, en las diferentes estaciones, indicaron la formación de marcados clusters en el caso de las hojas, mientras que para las raíces los valores fueron similares resultando difícil separar los clusters. El ACP tanto de hojas como raíces reveló que la mayor variabilidad está dada por los valores de fenoles totales y capacidad antioxidante. El primer y segundo componente principal de ambos análisis acumula el 51% y 49% del total de la variabilidad para hojas y raíces respectivamente, indicando que entre todos los parámetros estudiados no hay diferencias fuertemente marcadas entre ambas especies de arbustos. Sugiriendo que a pesar de tener diferentes mecanismos de resistencia a la sequía, las dos especies tiene comportamiento xerofítico en diferentes niveles.

El ADL mostró que los valores obtenidos para *L. chilense* fueron similares en las dos estaciones en estudio, mientras que en *L. divaricata* se pudieron separar bien los grupos entre las cuatro estaciones. Estos resultados apoyan la idea de que *L. divaricata* posee un mecanismo tolerante a la sequía, por lo que debe adaptar su metabolismo a las condiciones emergentes del ambiente (como producción de metabolitos secundarios), mientras que *L. chilense* posee un mecanismo evitador de la sequía, por lo que simplemente acorta su ciclo de vida evitando los periodos de déficit hídrico.

3.2. Pastos

Las especies de pastos en estudio han sido previamente clasificadas como conservativa/xerofítica para el caso de *P. speciosa* y adquisitiva/mesofítica para el caso de *P. ligularis* (Pazos y col., 2007; Cenzano y col., 2013). Debido a que son especies monocotiledóneas no sería correcto discutir las en conjuntos con los arbustos (especies dicotiledóneas), por lo que se discuten por separado a pesar de observarse similitudes de comportamientos con los arbustos debido a sus mecanismos de resistencia a la sequía que presentan.

Los análisis multivariados mostraron clusters más marcados en el caso de las hojas de los pastos, mientras que en las raíces fue más difícil separar los grupos y solo se diferenciaron los valores obtenidos en otoño para ambas especies, de los demás grupos. En el caso de las hojas, la mayor variabilidad estuvo dada por las variables capacidad antioxidante de fenoles totales y contenido de fenoles totales y separó a la primavera de las demás estaciones, indicando que estas especies de pastos sensan el déficit hídrico durante las estaciones secas, manteniendo su metabolismo basal, pero en momentos de disponibilidad hídrica su actividad metabólica aumenta.

En los análisis de ACP de las hojas y raíces de los pastos se observó que la mayor variabilidad está dada por el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante. Al igual que en los arbustos estos resultados apoyan la idea de que a pesar de ser especies con diferentes mecanismos de resistencia a la sequía, ambas poseen caracteres xerofíticos en diferentes gradientes por lo que se estableció un gradiente de xerofitismo-mesofitismo.

4. Modelo de integración de las cuatro especies

A continuación se propone un modelo (Fig. 61a) en el cual se observa un aumento en las precipitaciones en primavera, lo que estaría aumentando la disponibilidad hídrica del Monte Patagónico. A su vez, las temperaturas medias no son tan altas como en verano, por lo que la tasa de evapotranspiración no estaría afectando el aumento en la disponibilidad hídrica dado por las lluvias. El modelo propuesto también resume los estadios fenológicos de las cuatro especies en estudio.

En la Fig. 62b se integran las estrategias adaptativas analizadas a nivel anatómico, fisiológico y bioquímico que posibilitan establecer los mecanismos de resistencia a la sequía de las especies, en donde se observa que en estudios a campo se torna difícil clasificar a cada especie como perteneciente a un grupo eco-fisiológico específico, ya que todas poseen en menor o mayor grado caracteres xerofíticos, estableciéndose un gradiente de xerofitismo-mesofitismo: *L. divaricata* – *P. speciosa* – *L. chilense* – *P. ligularis*.

Conclusión

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las especies *L. divaricata* y *P. speciosa* utilizan mayormente un mecanismo de tolerancia al estrés por sequía, dado que retienen sus hojas a lo largo del año. Para ello, producen metabolitos secundarios específicos y fitohormonas que regulan su morfología y crecimiento, manteniéndolo sin grandes variaciones en las diferentes estaciones climáticas. En cambio, *L. chilense* y *P. ligularis* utilizan el mecanismo de evitación del estrés por sequía que consiste en un ciclo de vida corto y alta velocidad de crecimiento, pérdida de hojas durante las estaciones secas y variaciones en los parámetros fisiológicos y bioquímicos demostrando que tienen mayor sensibilidad para sentir el estrés.

Por otro lado, la producción de metabolitos secundarios, específicamente polifenoles, es un mecanismo utilizado por especies xerofíticas para evitar el daño oxidativo y como precursores de compuestos que refuerzan estructuras celulares, tales como la lignina, y podrían ser utilizados como indicadores de tolerancia al estrés. Por lo tanto, la identificación de los compuestos fenólicos responsables de estas respuestas es de suma importancia para determinar el patrón característico de cada especie e inferir su posible participación como intermediarios transitorios interconvertibles que juegan un rol activo en reacciones de óxido-reducción. Más aún, estudios de la última década han descrito una función adicional que los involucra en procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas y consiste en su capacidad de unirse de manera específica al sitio ATP de las proteínas transportadoras PIN que regulan el eflujo celular de auxinas en respuesta a señales ambientales. De esta manera, serían potentes inhibidores del transporte polar de auxinas con las consecuencias que ello ocasiona para la arquitectura de la planta. Esta actividad está restringida a aquellos compuestos con fuerte estructura antioxidante, en especial quercetina y luteolina, identificados en nuestro trabajo (Agati y Tattini, 2010). Adicionalmente, es conocido que la disminución en los niveles de AIA desreprime genes de biosíntesis de ABA, lo cual sucedería frente a un estrés, siendo este último quien retoma el comando del crecimiento de la raíz. Este argumento es coherente con los resultados descritos anteriormente y el perfil hormonal de las especies en estudio explica su patrón de respuesta y su nivel de adaptación a las condiciones analizadas.

Por último, la correlación entre todos los parámetros estudiados apoyaría la idea de considerar gradientes de xerofitismo-mesofitismo cuando se trata de discutir la capacidad adaptativa de las especies que coexisten en el Monte Patagónico, integrando los nuevos parámetros morfo-histológicos, bioquímicos y fisiológicos analizados en el presente estudio.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Abernethy G.A., McManus M.T. (1998). Biochemical responses to an imposed water deficit in mature leaf tissue of *Festuca arundinacea*. *Environmental and Experimental Botany*, 40:17-28.
- Agati G, Tattini M. (2010). Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytologist*, 186:786-93.
- Agati G., Biricolti S., Guidi L., Ferrini F., Fini A., Tattini M. (2011). The biosynthesis of flavonoids is enhanced similarly by UV radiation and root zone salinity in *L. vulgare* leaves. *Journal of Plant Physiology*, 168:204-212.
- Aguilar-Piedras J.J., Xiqui-Vásquez M.L., García-García S., Baca B.E. (2008). Producción de ácido Indol-3- acético en *Azospirillum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50:29-37.
- Alonso-Ramirez A., Rodriguez D., Reyes D., Jimenez J.A., Nicolas G., Lopez-Climent M., Gomez-Cadenas A., Nicolas C. (2009). Evidence for a role of gibberellins in salicylic acid-modulated early plant responses to abiotic stress in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology*, 150:1335-1344.
- Andersen O.M., Jordheim M. (2006). The anthocyanins. In *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*; Andersen, O. M., Markham, K. R., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL. pp 471-552.
- Ares J.O., Beeskow A.M., Bertiller M.B., Rostagno C.M., Irisarri M.P., Anchorena J., Defossé G.E., Merino C.A. (1990). Structural and dynamic characteristics of overgrazed grasslands of northern Patagonia. A. BREYMEYER (ed.). *Managed Grasslands. Regional Studies*, pp. 149-175. Elsevier, Amsterdam.
- Atkinson C.J., Taylor J.M. (1996). Effects of elevated CO₂ on stem growth, vessel area and hydraulic conductivity of oak and cherry seedlings. *New Phytologist*, 133:617-626.
- Babu V.R., Rao D.V.M. (1983). Water stress adaptations in the groundnut (*Arachis hypogaea* L.) foliar characteristics and adaptations to moisture stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 10(1):64-80.
- Bacelar E.A., Correia C.M., Moutinho-Pereira J.M., Gonçalves B.C., Lopes J.I., Torres-Pereira J.M.G. (2004). Sclerophylly and leaf anatomical traits of five field-grown olive cultivars growing under drought conditions. *Tree Physiology*, 24:233-239.
- Bais H.P., Walker T.S., Stermitz F.R., Hufbauer R.A., Vivanco J.M. (2002). Enantiomer-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (±)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. *Plant Physiology*, 128:1173-1179.

- Bais H.P., Vepachedu R., Gilroy S., Callaway R.M., Vivanco J.M. (2003). Allelopathy and exotic plant invasion: From molecules and genes to species interactions. *Science*, 301:1377-1380.
- Barbolan A.M.A., Zorro L., Guillen D.A., Barroso C.G. (2003). Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. *Journal of Chromatography A*, 1012:31-38.
- Beeskow, A.M., Del Valle H., Rostagno C.M. (1987). Los Sistemas fisiográficos de la Región Árida y Semiárida de la Provincia de Chubut. SECYT-Delegación Patagonia. Bariloche. Argentina. 168pp.
- Belhadj S., Derridj A., Aigouy T., Gers C., Gauquelin T., Mevy J.P. (2007). Comparative morphology of leaf epidermis in eight populations of atlas Pistachio (*Pistacia atlantica* Desf., *Anacardiaceae*). *Microscopy Research and Technologies*, 70:834-846.
- Bertiller M.B., Beeskow A.M., Coronato F. (1991). Seasonal environmental variation and plant phenology in arid Patagonia (Argentina). *Journal of Arid Environment*, 21:1-11.
- Bertiller M.B., Beeskow A.M., Irisarri M.P. (1981). Características florísticas y fisonómicas de la vegetación del Chubut. 2. Península Valdés e Istmo F. Ameghino. Contribución Nro. 41. Centro Nacional Patagónico. 20pp.
- Bertiller M.B., Elissalde N.O., Rostagno C.M., Defossé G.E. (1995) Environmental patterns and plant distribution along a precipitation gradient in western Patagonia. *Journal of Arid Environments*, 29:85-97.
- Bertiller M.B., Mazzarino M.J., Carrera A.L., Diehl P., Satti P., Gobbi M.J., Sain C.L. (2006). Leaf strategies and soil N across a regional humidity gradient in Patagonia. *Oecologia*, 148:612-624.
- Bertiller M.B., Sain C.L., Carrera A.L., Vargas D.N. (2005). Patterns of nitrogen and phosphorus conservation in dominant perennial grasses and shrubs across an aridity gradient in Patagonia, Argentina. *Journal of Arid Environments*, 62:209-223.
- Bertiller M.B., Bisigato A.J., Carrera A.L., Del Valle H.F. (2004). Estructura de la vegetación y funcionamiento de los ecosistemas del Monte Chubutense. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 39 (3-4):139-158.
- Boelcke O. (1957). Comunidades herbáceas del norte de la Patagonia y sus relaciones con la ganadería. *Revista de Investigaciones Agrícolas*, 11:5-98.
- Bolhar-Nordenkampf H. (1987). Shoot morphology and leaf anatomy in relation to photosynthesis. *In* *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis*. Eds. J. Coombs, D. Hall, S. Long and J. Scurlock. Pergamon Press, Oxford, pp 107–117.

- Bolouri-Moghaddam M.R., Le Roy K., Xiang L., Rolland F, Van den Ende W. (2010). Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells, *FEBS Journal*. 277:2022-2037.
- Bongi G., Mencuccini M., Fontanazza G. (1987). Photosynthesis of olive leaves: effect of light flux density, leaf age, temperature, peltates and H₂O vapor pressure deficit on gas exchange. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 112:143-148.
- Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Review*. 56:317-333.
- Bray E.A. (2002). Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the Arabidopsis genome. *Plant, Cell & Environment*, 25:153-161.
- Burkart R., Bárbaro N.O., Sánchez R.O., Gómez D.A. (1999). Ecorregiones de la Argentina, Buenos Aires, Administración de Parques Nacionales.
- Busotti 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.
- Cabrera A.L. (1976). Las regiones fitogeográficas Argentinas. *Enciclopedia Argentina de Agricultura, Jardinería y Horticultura*. ACME, Argentina, 85pp.
- Cameron K.D., Teece M.A., Bevilacqua E., Smart L.B. (2002). Diversity of cuticular wax among *Salix* species and *Populus* species hybrids. *Phytochemistry*, 60:715-725.
- Campanella M.V., Bertiller M.B. (2011). Is N-resorption efficiency related to secondary compounds and leaf longevity in coexisting plant species of the arid Patagonian Monte, Argentina? *Austral Ecology*,. 36:395-402.
- Carrera A.L., Bertiller M.B. (2010). Relationship among plant litter, fine roots, and soil organic C and N across an aridity gradient in northern Patagonia, Argentina. *Ecoscience*, 17:276-286.
- Castro-Díez P., Villar-Salvador C. Pérez-Rontomé M. Maestro-Martínez G., Monserrat-Martí. (1997). Leaf morphology and leaf chemical composition in three *Quercus* (Fagaceae) species along rainfall gradient in NE Spain. *Trees*, 11:127-134.
- Cenzano A.M., Masciarelli O., Luna M.V. (2014). Abscisic acid metabolite profiling as indicators of plastic responses to drought in grasses from arid Patagonian Monte (Argentina). *Plant Physiology and Biochemistry*, 83:200-206.
- Cenzano A.M., Varela C., Bertiller M.B., Luna M.V. (2013). Effect of drought on morphological and functional traits of *Poa ligularis* and *Pappostipa speciosa*, native perennial with wide distribution in Patagonia rangelands, Argentina. *Australian Journal of Botany*, <http://dx.doi.org/10.1071/BT12298>

- Cenzano A.M., Varela M.C., Luna M.V. (2016). Ecophysiology of native species from Patagonian Monte, Argentina. Volume V: The Americas (Tasks for Vegetation Science). In: Khan MA, Böer B, Clüsener-Godt M, Öztürk M and Gul B (Eds.), *Sabkha Ecosystems*. ISBN 978-3-319-27093-7. Springer. In press.
- Chakrabarti N., Mukherji S. (2003). Alleviation of NaCl stress by pretreatment with phytohormones in *Vigna radiata*. *Biologia Plantarum*, 46:589-594.
- Chang H.K., Mohseni P., Zylstra G.J. (2003). Characterization and regulation of the genes for a novel anthranilate 1,2-dioxygenase from *Burkholderia cepacia* DB01. *Journal of Bacteriology*, 185:5871-5881.
- Chapin F.S.III, Autumn K., Pugnaire F. (1993). Evolution of suites of traits in response to environmental stress. *The American Naturalist*, 142:S78-S92.
- Chartzoulakis K., Bosabalidis A., Patakas A., Vemmos S. (2000). Effects of water stress on water relations, gas exchange and leaf structure of olive tree. *Acta de Horticultura*, 537:241-247.
- Chaves M.M., Pereira J.S., Maroco J., Rodrigues M.L., Ricardo C.C.P., Osório M.L., Carvalho I., Faria T., Pinheiro C. (2002). How plants cope with water stress in the field. *Photosynthesis and growth*. *Annals of Botany*, 89:907-916.
- Christmann A., Weiler E.W., Steudle E., Grill E. (2007). A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *The Plant Journal*, 52:167-174.
- Corcuera L., Camarero J.J., Gil-Pelegriñ E. (2004). Effects of a severe drought on *Quercus ilex* growth and xylem anatomy. *Trees e Structure and Function* 18:83-92.
- Correa M.N. (1978). *Flora patagónica*. Colección Científica I.N.T.A., Buenos Aires. Feeny P., 1976. Plant apparency and chemical defenses. *Recent Advances in Phytochemistry* 10:1-41.
- Coupe S.A., Palmer B.G., Lake J.A., Overy S.A., Oxborough K., Woodward F.I. (2006). Systemic signalling of environmental cues in *Arabidopsis* leaves. *Journal of Experimental Botany*, 57:329-41.
- Crozier A, Jaganath I.B., Clifford M.N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Products Report.*, 8:1001-10043.
- Cutler A.J., Krochko J.E. (1999). Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science*, 4:472-478.
- Davies P.J. (2010). *The plant hormones: their nature, occurrence, and functions*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Di Ferdinando M., Brunetti C., Fini A., Tattini M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants under abiotic stresses. In: *Abiotic stress responses in plants: Metabolism, Productivity and*

- Sustainability. P. Ahmad and M.N.V. Prasad (eds.)
http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4614-0634-1_9#page-1.
- Dietz K.J., Sauter A., Wichert K., Messdaghi D., Hartung W. (2000). Extracellular β -glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *Journal of Experimental Botany*, 51:937-944.
- Dobra J., Motyka V., Dobrev P., Malbeck J., Prasil I. Haisel T., Vankova R. (2010). Comparison of hormonal responses to heat, drought and combined stress in tobacco plants with elevated proline content. *Journal of Plant Physiology*, 167(16):1360-70.
- Eyidogan F., Oz M.T., Yucel M., Oktem H.A. (2012). Signal transduction of phytohormones under abiotic stresses. In: Khan NA, Nazar R, Iqbal N, Anjum NA (eds) *Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants*. Springer, Berlin, pp 1-48.
- Fahad S., Hussain S., Matloob A., Khan F.A., Khaliq A., Saud S., Hassan S., Shan D., Khan F., Ullah N., Faiq M., Khan M.R., Tareen A.K., Khan A., Ullah A., Ullah N., Huang J. (2015). Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant growth regulation*, 75:391-404.
- Farnsworth E. (2004). Hormones and shifting ecology throughout plant development. *Ecology*. 85:5-15.
- Feurtado J.A., Yang J., Ambrose S., Cutler A.J., Abrams S.R., Kermode A.R. (2007). Disrupting abscisic acid homeostasis in Western White Pine (*Pinus monticola* Dougl. Ex D. Don) seeds induces dormancy termination and changes in abscisic acid catabolites. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26:46-54.
- Field B., Jordan F., Osbourn A. (2006). First encounters deployment of defence related natural product by plants. *New Phytologist*, 172:193-207.
- Franceschi V.R., Krokene P., Christiansen E., Kekling T. (2005). Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pest. *New Phytologist*, 167:353-375.
- Gordon W.S. and Jackson R.B. (2000). Nutrient concentrations in fine roots. *Ecology*, 81:1:275-280.
- Hacke U.G., Sperry J.S., Pockman W.T., Davis S.D., McCulloh K.A. (2001). Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia*, 126:457-461.
- Hamerlynck, E.P., Huxman, T.E. (2009). Ecophysiology of two Sonoran Desert evergreen shrubs during extreme drought. *Journal of Arid Environments*. 73:582-585.

- Harrison M.A. (2012). Cross-talk between phytohormone signaling pathways under both optimal and stressful environmental conditions. In: Khan NA, Nazar R, Iqbal N, Anjum NA (eds) *Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants*. Springer, Berlin, pp 49–76.
- Hatier JHB, Gould KS. (2008). Foliar anthocyanins as modulators of stress signals. *Journal of Theoretical Biology*, 253:625–627.
- Hättenschwiler S., Vitousek P.M. (2000). The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends in Ecology & Evolution*, 15:238-243.
- Havlova M., Dobrev P.I., Motyka V., Storchova H., Libus J., Dobra J. (2008). The role of cytokinins in responses to water deficit in tobacco plants over-expressing trans-zeatin O-glucosyltransferase gene under 35S or SAG12 promoters. *Plant Cell Environment*, 31:341–53.
- Headth R.L., Packer L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, 125:189-198.
- Hedden P. (2012). Gibberellin Biosynthesis. *Encyclopedia of Life Sciences*, (August). doi:10.1002/9780470015902.a0023720.
- Hedden P., Thomas S.G. (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. Review. *Biochemical Journal*. 444(1):11-25.
- Hey S., Byrne E., Halford N.G. (2009). The interface between metabolic and stress signaling. *Annals of Botany*, 105(2):197-203.
- Higdon J. V., Frei B. (2003). Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43:89–143.
- Higgs K.H., Wood V. (1995). Drought susceptibility and xylem dysfunction in seedlings of 4 European oak species. *Annales des Sciences Forestieres*. 52:507-513.
- Holechek, J.L., Munshikpu, A.V., Saiwana, L., Nunez-Hernandez, G., Valdez, R., Wallace, J.D., CardenasM., (1990). Influences of six shrub diets varying in phenol content on nitrogen retention by goats. *Tropical Grasslands*, 24:93-98.
- Holste E.K., Jerke M.J., Matzner S.L. (2006). Long term acclimatization of hydraulic properties, xylem conduit size, wall strength and cavitation resistance in *Phaseolus vulgaris* in response to different environmental effects. *Plant, Cell and Environment*, 29:836-843.
- Hura T., Hura K., Grzesiak S. (2009). Possible contribution of cell-wall-bound ferulic acid in drought resistance and recovery in triticale seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 166:1720- 1733.
- Hümmer W., Schreier P. (2008). Analysis of proanthocyanidins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52:1381-1398.

- Hyder P.W., Fredrickson E.L., Estell R.E., Tellez M., Gibbens R.P. (2002). Distribution and concentration of total phenolics, condensed tannins, and nordihydroguaiaretic acid (NDGA) in creosotebush (*Larrea tridentata*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 30:905-912.
- Ikegami K., Masanori O., Mitsunori S., Tomokazu K. (2009). Activation of abscisic acid biosynthesis in the leaves of *Arabidopsis thaliana* in response to water deficit. *Journal of Plant Research*, 122:235-243.
- Iqbal N., Nazar R., Iqbal M., Khan R., Masood A., Khan N.A. (2011). Role of gibberellins in regulation of source–sink relations under optimal and limiting environmental conditions. *Current science*, 100(7):998-1007.
- Iqbal N., Umar S., Khan N.A., Khan M.I.R. (2014). A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism. *Environmental and Experimental Botany*, 100:34-42.
- Isabelle M., Lee B.L., Lim M.T., Koh W.P., Huang D., Ong Ch N. (2010). Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore. *Food Chemistry*, 120:993–1003.
- Jain L.L., Panda R.K. and Sharma C.P. (1997). Water stress response function for groundnut (*Arachis Hypogaea* L.). *Agricultural Water Management*, 32:197-209.
- Jiang F., Hartung W. (2007). Long distance signaling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *Journal of Experimental Botany*, 59:37-43.
- Jiang M., Zhang J. (2002). Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*, 53:2401-2410.
- Jones, H.G. (1992). *Plants and Microclimate. A quantitative approach to environmental plant physiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jong Kuk Na B.S. (2005). *Genetic Approaches to Improve Drought Tolerance of Tomato and Tobacco*. Ph.D. Thesis. The Ohio State University, 93.
- Joyce D.C., Aspinall D., Edwards G.R. (1983). Water deficit and the growth and anatomy of the radish fleshy axis. *New Phytologist*, 93:439-446.
- Jung J., Park C. (2011). Auxin modulation of salt stress signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Signaling & Behavior*, 6:1198-1200.
- Jupp A.P., Newman E.I. (1987). Morphological and anatomical effects of severe drought on the roots of *Lolium perenne* L. *New Phytologist*, 105:393-402.
- Karabourniotis G., Bornman J. (1999). Penetration of UV-A, UV-B and blue light through the leaf trichome layers of two xeromorphic plants, olive and oak, measured by optical fibre microprobes. *Physiologia Plantarum*, 105:655–661.

- Karabourniotis G., Liakopoulos G., Nikolopoulos D., Bresta P., Stavroulaki V., Sumbele S. (2014). "Carbon gain vs. water saving, growth vs. defence": Two dilemmas with soluble phenolics as a joker. *Plant Science*, 227: 21–27.
- Khanbabaee K., Van Ree T. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural Product Reports Articles*, 18(6):641-649.
- Kim D., Chun O.K., Kim Y.J., Moon H.Y., Lee C.Y. (2003). Quantification of phenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51:6509-6515.
- Kozlowski, T. T., Kramer P. J., Pallardy S. G. (1991). *The physiological ecology of woody plants*. Academic Press., Toronto.
- Krishnaiah D., Sarbatly R., Nithyanandam R. (2011). A review on the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioproducts Processing*, 89:217-233.
- Kukavica B., Mojovic M., Vuccinic Z., Maksimovic V., Takahama U., Veljovic Jovanovic S. (2009). Generation of hydroxyl radical in isolated pea root cell wall, and the role of cell wall-bound peroxidase, Mn-SOD and phenolics in their production. *Plant & Cell Physiology*, 50:304-317.
- Larcher, W. (1995). *Physiological plant ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Lee K.H., Piao H.L., Kim H.Y., Choi S.M., Jiang F., Hartung W., Hwang I., Kwak J.M., Lee I.J., Hwang I. (2006). Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell*, 126:1109-1120.
- Leon J., Bukovac M. (1978). Cuticle development and surface morphology of olive leaves with reference to penetration of foliarapplied chemicals. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 103:465-472.
- León, J. J. C., Bran D., Collantes M., Paruelo J. M., Soriano A. (1998). Grandes unidades de la Patagonia extra andina. *Ecología Austral*, 8:125-144.
- Levitt J. (1980). Responses of plants to environmental stresses. Water, radiation, salt and other stresses. Vol. II'. pp. 93–128. Academic Press: New York.
- Li Z. H., Qiang W., Xiao R., Cun-De P., De-An J. (2010). Phenolics and Plant Allelopathy. Review. *Molecules*. 15:8933-8952.
- Liakoura V., Stavrianakou S., Liakopoulos G., Karabourniotis G., Manetas Y. (1999). Effects of UV-B radiation on *Olea europaea*: comparisons between a greenhouse and a field experiment. *Tree Physiology*, 19:905-908.

- Liu C., Liu Y., Guo K., Fan D., Li G., Zheng Y., Yu L., Yang R. (2011). Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. *Environmental and Experimental Botany*, 71:174-183.
- Ljung K. (2012). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140:943–950.
- Llanes A., Masciarelli O., Ordoñez R., Isla M., Luna V. (2014). Differential growth responses to sodium salts involve different ABA catabolism and transport in the halophyte *Prosopis strombulifera*” *Biologia Plantarum*, 58(1):80-88.
- Lopez-Carbonell M., Alegre L., van Onckelen H. (1994). Effects of water stress on cellular ultrastructure and on concentrations of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid in *Fatsia japonica* leaves. *Plant Growth Regulation*, 14(1):29-35.
- Lovisolo C., Schubert A. (1998). Effects of water stress on vessel size and xylem hydraulic conductivity in *Vitis vinifera* L. *Journal of Experimental Botany*, 49:693-700.
- Macheix J. J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Lausanne, Suisse: Presses Polytechniques et Universitaires Romandes.
- Mano Y., Nemoto K. (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63:2853-2872.
- Manzi M., Lado J., Rodrigo M.J., Zacarías L., Arbona V., Gómez-Cadenas A. (2015). Root ABA Accumulation in Long-Term Water-Stressed Plants is Sustained by Hormone Transport from Aerial Organs. *Plant Cell Physiology*, 56(12):2457-2466.
- Margaris N.S. (1981). Adaptative strategies in plants dominating Mediterranean-type ecosystems. *In* Mediterranean-type shrublands. Ecosystem of the World 11. Eds. F. Di Castri, D.W. Goodall and R.L. Specht. Elsevier, Amsterdam, pp 309–315.
- Martins M.B.G., Zieri R. (2003). Leaf anatomy of rubber-tree clones. *Scientia Agricola*, 60:709-713.
- Martins S., Aguilar C.N., Rodriguez I. G., Mussatto S.I., Teixeira J.A. (2010). Kinetic study of nordihydroguaiaretic acid recovery from *Larrea tridentata* by microwave-assisted extraction. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(8):1142-1147.
- McElrone A.J., Pockman W.T., Martínez-Vilalta J., Jackson R.B. (2004). Variation in xylem structure and function in stems and roots of trees to 20 m depth. *New Phytologist*, 163:507-517.
- Mc Kinney G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal Biology Chemistry* 140:315-322.

- Mediavilla S., Escudero A., Heilmeier H. (2001). Internal leaf anatomy and photosynthetic resource-use efficiency: interspecific and intraspecific comparisons. *Tree Physiology*. 21:251–259.
- Medri M.E., Lleras E. (1983). Quantificação e uso de caracteres anatómicos e fisiológicos de folhas na determinação de eficiência hídrica em clones de *Hevea* spp. *Acta Amazônica*, 13:261-288.
- Meigs P. (1953). *World Distribution of Arid and Semi-arid Homoclimates*. UNESCO, *Reviews of Research on Arid Zone Hydrology*. Paris: United Nations.
- Menutti A, Menutti M.M. (1983). *Geografía Argentina y Universal Edil*. University of Texas. Edil.
- Merkulov L.J., Ivezi C., Krsti C., Kovacev L., Pajevi C.S. (1997). Structural characteristics of leaf blade of differentially drought-tolerant sugar beet genotypes. *Proceedings: Drought and Plant Production, Agricultural Research Institute "Serbia"*. pp. 487–492.
- Moore JP, Westall KL, Ravenscroft N, Farrant JM, Lindsey GG, Brandt WF. (2005). The predominant polyphenol in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*, 3,4,5 tri-O-galloylquinic acid, protects membranes against desiccation and free radical-induced oxidation. *Biochemistry Journal*, 385:301-308.
- Motilva M.J, Serra A, Macià A. (2013). Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *Journal of Chromatography A*, 1292:66-82.
- Murase K., Hirano Y., Sun T.P., Hakoshima T. (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature*, 456:459-463.
- Naczki M., Shahidi F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054:95-111.
- Nambara E., Marion-Poll A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 56:165-185.
- Nicotra A.B., Atkin O.K., Bonser S.P., Davidson A.M., Finnegan E.J., Mathesius U., Poot P., Purugganan M.D., Richards C.L., Valladares F., van Kleunen M. (2010). Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in Plant Sciences*, 15:684-692.
- Nigam P.S. (2009). Production of bioactive secondary metabolites. In: Nigam PS, Pandey A, editors. *Biotechnology for agro-industrial residues utilization*. first ed. Netherlands: Springer. p. 129–45.
- Nigel C.W. Glories Y. (1991). Use of a modified dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42:364-366.

- North G.B., Nobel P.S. (1991). Changes in hydraulic conductivity and anatomy caused by drying and rewetting roots of *Agave desertii* (Agavaceae). *American Journal of Botany*, 78:906-915.
- Noy-Meir E. (1973). Desert ecosystems: environment and producers. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 4:3-51.
- Okuda T., Ito H. (2011). Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. Review. *Molecules*, 16:2191-2217.
- Palacio L., Cantero J.J., Cusidó R.M., Goleniowski M.E. (2012). Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). *Plant science*, 193-194:1-7.
- Pallioti A., Bongi G., Rocchi P. (1994). Peltate trichomes effects on photosynthetic gas exchange of *Olea europaea* L. leaves. *Plant Physiology*, 13:35-44.
- Pan X., Wang X. (2009). Profiling of plant hormones by mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877:2806-2813.
- Pazos G.E., Bisigato A.J., Bertiller M.B. (2007). Abundance and spatial patterning of coexisting perennial grasses in grazed shrublands of the Patagonian Monte. *Journal of Arid Environments*, 70:316-328.
- Peleg Z., Blumwald E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14:290-295.
- Peters D.B. (1965). Water availability. In: Black CA, Clark FE, Dinauer RC, Ensminger LE, White JL (Eds) *Methods of soil analysis. Part I. Physical and mineralogical properties, including statistics of measurement and sampling*. American Society of Agronomy, Inc., Publisher, USA, pp 279-285.
- Peyrano G., Taleisnik E., Quiroga M., de Forchettu S.M., Tigier H. (1997). Salinity effects on hydraulic conductance, lignin content and peroxidase activity in tomato roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 35:387-393.
- Pockman W.T., Sperry J.S. (2000). Vulnerability to xylem cavitation and the distribution of Sonoran desert vegetation. *American Journal of Botany*, 87:1287-1299.
- Qin X., Zeevaart J.A.D. (2002). Overexpression of a 9-cis-epoxycarot- inoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiology*, 128:544-551.
- Quiñones M, Miguel M., Aleixandre A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1):76-89.

- Reddy A.R., Chaitanyaa K.V., Vivekanandan M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants *Journal of Plant Physiology*, 161:1189-1202.
- Reinoso H., Sosa L., Ramírez L., Luna V. (2004). Salt induced changes in the vegetative anatomy of *Prosopis strombulifera* (Leguminosae). *Canadian Journal of Botany*, 82:618-628.
- Reinoso H., Sosa L., Reginato M., Luna V. (2005). Histological changes induced by sodium sulphate in the vegetative anatomy of *Prosopis strombulifera* (Lam.) Benth. *World Journal of Agricultural Sciences*, 1(2): 109-119.
- Ren H., Wei K., Jia W., Davies W.J., Zhang J. (2007). Modulation of root signals in relation to stomatal sensitivity to root-sourced abscisic acid in drought-affected plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49:1410-1420.
- Reynolds M.P., Rebetzke G.J., Pellegrineschi A., Trethowan R. (2005). Genetic, physiological and breeding approaches to wheat improvement under drought. In: *Drought Tolerance in Cereals*. Ed Ribaut, J M, New York, Howorth's Food Products Press.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20:933-56.
- Rice-Evans C.A.; Miller N.J.; Paganga G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sciences*, 2:152-159.
- Richardson A., Berlyn G. (2002). Changes in foliar spectral reflectance and chlorophyll fluorescence of four temperate species following branch cutting. *Tree Physiology*, 22:499-506.
- Rieger M., Litvin P. (1999). Root system hydraulic conductivity in species with contrasting root anatomy. *Journal of Experimental Botany*, 50:201-209.
- Ristic Z., Cass D.D. (1991). Leaf anatomy of *Zea mays* L. in response to water shortage and high temperature: a comparison of drought-resistant and drought sensitive lines. *Botanical Gazette*, 152:73-185.
- Romani A., Mancini P., Tatti S., Vincieri F.F. (1996). Polyphenols and polysaccharides in Tuscan grapes and wines. *Italian Journal of Food Science*, 1:13-24.
- Santos-Buelga C., García-Viguera C., Tomás-Barberán F. (2003). On-line identification of flavonoids by HPLC coupled to diodearray detection. In *Methods in Polyphenol Analysis*; Santos Buelga, C., Williamson, G., Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K. pp 92-127.
- Saraví Cisneros H., Bertiller M.B., Carrera A.L., Larreguy C. (2013). Diversity of phenolic compounds and plant traits in coexisting Patagonian desert shrub species of Argentina. *Plant ecology*, 214(11):1335-1343.

- Sauter A., Hartung W., (2002). The contribution of internode and mesocotyl tissues to root-to-shoot signalling of abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*, 53(367):297-302.
- Scandalios J.G., Guan L., Polidoros A.N. (1997). Catalases in plants: gene structure, properties, regulation and expression. In: Scandalios JG, ed. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidants defenses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 343-406.
- Schachtman D.P., Goodger J.Q.D. (2008). Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Sciences*, 13:281-287.
- Schreiber L., Hartmann K., Skrabs M., Zeier J. (1999). Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of Experimental Botany*, 50:1267-1280.
- Schroeder J.I., Nambara E. (2006). A quick release mechanism for abscisic acid. *Cell*, 126:1023-1025.
- Schwabe W., S. Lionakis. (1996). Leaf attitude in olive in relation to drought resistance. *Journal of Horticultural Sciences*, 71:157-166.
- Schwartz S.H., Qin X., Zeevaart J.A.D. (2003.) Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiology*, 131:1591-1601.
- Shahidi F., Zhong Y. (2010). Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112:930-940.
- Sharifi M.R., Meinzer F.C., Nilsen E.T., Rundel P.W., Virginia R.A., Jarrell W.M., Herman D.J., Clark P.C. (1988). Effect of Manipulation of Water and Nitrogen Supplies on the Quantitative Phenology of *Larrea tridentata* (Creosote Bush) in the Sonoran Desert of California. *American Journal of Botany*, 75(8):1163-1174.
- Sharp R., Davies W. (2009). Variability among species in the apoplastic pH signaling response to drying soils. *Journal of Experimental Botany*. 60:4363-4370.
- Sharp R., Le Noble M., Else M., Thorne E., Gherardi F. (2000). Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany*, 51:1575-1584.
- Sharp R.E., Davies W.J. (1985). Root growth and water uptake by maize plants in drying soil. *Journal of Experimental Botany*, 36:1441-1456.
- Sherrard M, Maherali H. (2006). The adaptive significance of drought escape in *Avena barbata*, an annual grass. *Evolution*, 60: 2478-2489.
- Shi H., Chen L., Ye T., Liu X., Ding K., Chan Z. (2014). Modulation of auxin content in *Arabidopsis* confers improved drought stress resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82: 209-217.

- Shields L.M. (1950). Leaf xeromorphy as related to physiological and structural influences. *Botanical Review*, 16:399-477.
- Sies H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 215:213-219.
- Silva E.M., Souza J.N.S., Rogez H., Rees J.-F., Larondelle Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazon region. *Food Chemistry*, 101:1012-1018.
- Skirycz A., Inze D. (2010). More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology*, 21:197-203.
- Smirnov N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125:27-58.
- Soriano A. (1950). La vegetación del Chubut. *Revista Argentina de Agronomía*, 17:30-66.
- Spollen W.G., LeNoble M.E., Sanmels T.D., Bernstein N., and Sharp R.E. (2000). Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiology*, 122:967-976.
- Sreenivasulu N., Grimm B., Wobus U., Weschke W. (2000). Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). *Physiologia Plantarum*, 109: 435-442.
- Sreenivasulu N., Harshavardhan V.T., Govind G., Seiler C., Kohli A. (2012). Contrapuntal role of ABA: Does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress ? *Gene*. 506(2):265–273.
- Srivastava L.M. (2002). *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*. Academic Press. Pp. 772.
- Stasovski E., Peterson C.A. (1991). The effects of drought and subsequent rehydration on the structure and vitality of *Zea mays* seedling roots. *Canadian Journal of Botany*, 69:1170-1178.
- Sultan S.E. (2000). Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. review. *Trends in plant sciences*, 5(12):537-542.
- Surweswaran S., Cai Y.Z., Corke H., Sun M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102:938–953.
- Taleisnik E., Peyrano G., Córdoba A., Arias C. (1999). Water retention capacity in root segments differing in the degree of exodermis development. *Annals of Botany*, 83:9-27.
- Tattini M., Galardi C., Pinelli P., Massai R., Remorini D., Agati G. (2004). Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist*, 163:547-561.

- Teale W.D., Paponov I.A., Palme K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7:847-859.
- Thelen, G.C.; Vivanco, J.M.; Newingham, B.; Good, W.; Bais, H.P.; Landers, P.; Caesar, A.; Callaway, R.M. (2005). Insect herbivory stimulates allelopathic exudation by an invasive plant and the suppression of natives. *Ecology Letters*, 8:209-217.
- Turner N.C. (1986). Adaptation to water deficits: a changing perspective. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13:175-190.
- Tyree M.T., Sperry J.S. (1989). Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40:19-38.
- Valladares F., Vilagrosa A., Peñuelas J., Ogaya R., Camarero J. J., Corcuera L., Sisó S., Gil-Pelegrin E. (2004). Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante. Capítulo 6. Estrés hídrico: ecofisiología y escala de la sequía. Páginas: 163-190. Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S. A., Madrid. ISBN: 84-8014-552-8.
- Vernon L.P. (1960). Spectrophotometric determination of chlorophylls and phaeophytins in plant extracts. *Annals Chemistry*, 32:1144-1150.
- Wang Y., Mopper S., Hasentein K.H. (2001). Effects of salinity on endogenous ABA, IAA, JA, and SA in *Iris hexagona*. *Journal of Chemical Ecology*, 27:327-342.
- Wasilewska A., Vlad F., Sirichandra C., Redko Y., Jammes F., Valon C., Frei dit Frey N., Leung J. (2008). An update on abscisic acid signaling in plants and more... *Molecular Plant*, 1:198-217.
- Waterman P.G., Mole S. (1994). Analysis of phenolics plant metabolites. In: Lawton JH, Likens GE. (Eds) *Methods in Ecology*. Blackwell Scientific Publications Oxford. pp 238.
- Westoby M., Falster D.S., Moles A.T., Vesik P.A., Wright I.J. (2002). Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33:125-159.
- Weyers J.D.B., Paterson N.W. (2001). Plant hormones and the control of physiological processes. *New phytologist*, 152:375-407.
- Woodward A.W., Bartel B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*. 95:707-735.
- Xu Z.J., Nakajima M., Suzuki Y., Yamaguchi I. (2002). Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings. *Plant Physiology*, 129:1285-1295.
- Xu Z.Z., Zhou G.S. (2007) Photosynthetic recovery of a perennial grass *Leymus chinensis* after different periods of soil drought. *Plant Production Science*, 10:277-285.

- Yan S., Wan C., Sosebee R.E., Wester D.B., Fish E.B., Zartman R.E. (2000). Responses of photosynthesis and water relations to rainfall in the desert shrub creosote bush (*Larrea tridentata*) as influenced by municipal biosolids. *Journal of Arid Environment*, 46:397-412.
- Yurekli F., Turkan I., Banu Porgali Z., y Topcuoglu S.F. (2001). Indoleacetic acid, gibberellic acid, zeatin, and abscisic acid levels in NaCl-treated tomato species differing in salt tolerance. *Israel Journal of Plant Sciences*, 49:269-277.
- Zawaski C., Busov V.B. (2014). Roles of gibberellin catabolism and signaling in growth and physiological response to drought and short-day photoperiods in populus trees. *PloS One*. 9(1):e86217.
- Zhang Z.L., Xie, Z., Zou X., Casaretto J., Ho T.H., Shen Q.J. (2004). A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. *Plant Physiology*, 134:1500-1513.
- Zhang J., Jia W., Yang J., Ismail A.M. (2006). Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crop Research*, 97:111-119.
- Zhou R., Squires T.M., Ambrose S.J., Abrams R., Ross A.R., Cutler A.J. (2003). Rapid extraction of abscisic acid and its metabolites for liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1010:75-85.
- Zimmermann H.M., Steudle E. (1998). Apoplastic transport across young maize roots: effects of the exodermis. *Planta*, 206:7-19.



Research article

Phenolic compounds as indicators of drought resistance in shrubs from Patagonian shrublands (Argentina)



M. Celeste Varela^a, Idris Arslan^b, Mariana A. Reginato^a, Ana M. Cenzano^c,
M. Virginia Luna^{a,*}

^a Laboratorio de Fisiología Vegetal, Fac. de Cs. Exactas, Físico Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina

^b Pamukkale University, Faculty of Technology, Biomedical Eng., 20200, Denizli, Turkey

^c Laboratorio de Ecofisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto para el Estudio de los Ecosistemas Continentales Patagónicos-Centro Nacional Patagónico-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Boulevard Brown 2915, 9120, Puerto Madryn, Chubut, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 January 2016
Received in revised form
8 March 2016
Accepted 10 March 2016
Available online 18 March 2016

Keywords:

Plant development and life-history traits
Ecophysiology
Polyphenols
Antioxidant capacity
Lipid peroxidation
Drought stress

ABSTRACT

Summary: Plants exposed to drought stress, as usually occurs in Patagonian shrublands, have developed different strategies to avoid or tolerate the lack of water during their development. Production of phenolic compounds (or polyphenols) is one of the strategies used by some native species of adverse environments to avoid the oxidative damage caused by drought. In the present study the relationship between phenolic compounds content, water availability and oxidative damage were evaluated in two native shrubs: *Larrea divaricata* (evergreen) and *Lycium chilense* (deciduous) of Patagonian shrublands by their means and/or by multivariate analysis. Samples of both species were collected during the 4 seasons for the term of 1 year. Soil water content, relative water content, total phenols, flavonoids, flavonols, tartaric acid esters, flavan-3-ols, proanthocyanidins, antioxidant capacity and lipid peroxidation were measured. According to statistical univariate analysis, *L. divaricata* showed high production of polyphenols along the year, with a phenolic compound synthesis enhanced during autumn (season of greatest drought), while *L. chilense* has lower production of these compounds without variation between seasons. The variation in total phenols along the seasons is proportional to the antioxidant capacity and inversely proportional to lipid peroxidation. Multivariate analysis showed that, regardless their mechanism to face drought (avoidance or tolerance), both shrubs are well adapted to semi-arid regions and the phenolic compounds production is a strategy used by these species living in extreme environments. The identification of polyphenol compounds showed that *L. divaricata* produces different types of flavonoids, particularly bond with sugars, while *L. chilense* produces high amount of non-flavonoids compounds.

Synthesis: These results suggest that flavonoid production and accumulation could be a useful indicator of drought tolerance in native species.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Water deficit is the dominant environmental factor that shapes the pattern of vegetation in semi-arid ecosystems. Because of this, vegetation is heterogeneously distributed forming isodiametric patches with shrubs acting as colonizers or initiators and grasses surrounding the patches, alternating with areas of bare soil (Noy-

Meir, 1973). The coexisting species of these ecosystems have different strategies to survive to the different environmental factors. Under field conditions, the response to one factor, such as water stress, is complex and difficult to study in isolation because an overlapping with others environmental factors (intensity of winds, solar radiation, temperature fluctuation, etc.) occur; however, this kind of research can provide an approach about the behavior and the adaptation of the species in study.

Native plants of semi-arid ecosystems have developed different mechanisms to face drought, which involve different strategies and adaptive changes depending on the genotype (Chaves et al., 2003). Plants were classified in two main ecophysiological groups

* Corresponding author.

E-mail addresses: cvarela@exa.unrc.edu.ar (M.C. Varela), iarslan@pau.edu.tr (I. Arslan), mreginato@exa.unrc.edu.ar (M.A. Reginato), cenzano@cenpat-conicet.gob.ar (A.M. Cenzano), vluna@exa.unrc.edu.ar (M.V. Luna).

according to the strategy used: drought avoidant plants and drought tolerant plants (Levitt, 1980). Drought avoidant species are characterized by high relative growth rate, deciduous phenology, high-faster metabolism, high potential for resource capture, and low investment in secondary metabolites. Thus, in water-limited environments, avoidant plants with high stomatal conductance and good photosynthetic capacity demonstrate opportunistic and rapid growth during short periods of water availability (Hetherington and Woodward, 2003). Drought tolerant plants have the ability to maintain their normal physiological parameters even during long periods of drought by employing different strategies like osmotic adjustment, changes in cellular/tissue elasticity (elastic properties of cell walls), different antioxidant mechanisms and high production of secondary metabolites (Reddy et al., 2004; Westoby et al., 2002). Regardless the strategies used to face drought, plants exposed to long periods of abiotic stress enhance the secondary metabolites production as part of the non-enzymatic mechanisms. These compounds generally have a strong antioxidant capacity to protect cellular structures from the oxidative damage caused by the increase of reactive oxygen species (ROS) production in cells (Sies, 1993; Naczk and Shahidi, 2004; Reginato et al., 2014).

In recent years, the research about non-enzymatic components with antioxidant capacity has focused on phenolic compounds (Surweswaran et al., 2007; Krishnaiah et al., 2011). Phenolic compounds, also known as polyphenols, include a large variety of molecules and could be classified in 3 different groups: 1) Non-flavonoids, molecules that have at least one phenolic ring with different reactive groups (hydroxyl, nitrosyl, SH, etc), including simple phenolic acids, phenyl alcohols, stilbenes, chalcones and lignans; 2) flavonoids, molecules with a phenyl chromane structure of C15 formed by 2 aromatic rings bind with a carbon chain (C6–C3–C6), sub-classified into anthocyanidins, flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, flavan-ols (n refers to the carbon number of the phenyl chromane structure where the hydroxyl group is bonded. Ex: flavan-3-ols, flavan-4-ols, flavan-3,4-ols), etc, depending on the amount, position and type of reactive group (Crozier et al., 2009; Motilva et al., 2013); and 3) tannins, subdivided in a) condensed tannins: flavonoids polymers type A (C7–C2 and an ether bind) and type B (C4–C8 or C4–C6) and b) hydrolyzable tannins: phenolic acids polymers bind to a 5 or 6 carbons ring (Khanbabaee and Van Tee, 2001). Phenolic compounds have antioxidant functions in response to severe abiotic stress, complementing the roles played by the enzymatic antioxidant system, with great potential to reduce ROS and to avoid cell damage (Hatier and Gould, 2008; Agati and Tattini, 2010). Fast growing plants generally have a low investment in defense and protection. Therefore, this species tend to have low phenolic compounds concentrations. Conversely, slow growing species have high phenolic compounds concentrations. This could be attributed to a long-term probability that these long-lived plant species evolved to confront both biotic and abiotic (primarily water shortage) stress factors (Karabourniotis et al., 2014).

Patagonian shrub lands are located in the North-East of Patagonian Monte, Argentina, specifically between 42 and 44° 20'S and 64–68° W, with a surface of 4200 km² approximately (Soriano, 1950). This region is characterized by a semi-arid climate with large daily and seasonal temperature variations and with annual rainfalls below 200 mm, generally concentrated in winter and/or spring (Cabrera, 1976). The landforms and soils of Patagonian shrub lands enable heterogeneity in vegetation distribution (from dense scrub to steppes) with large variety of species, dominated by grasses and shrubs alternating with bare soil (Bertiller et al., 2004). The most common shrub species are *Larrea divaricata*, *Chuquiraga hystris*, *Lycium chilense*, *Junellia alatocarpa*, *Condalia microphylla*, *Prosopidastrum globosum*, *Schinus johnstonii* and *Monttea aphylla*

(Cabrera, 1976; León et al., 1998); all of these species have a variety of adaptive strategies related with water and nutrient conservation (Bertiller et al., 2005, 2006). Two of the dominant shrubs in this region are *L. divaricata* and *L. chilense*, both being considered as colonizers or initiators of the patches. The contrasting functional traits and phenologic behavior of both species were previously described (Bertiller et al., 2004; Soriano et al., 1995). *L. divaricata* is an evergreen shrub, with a perennial behavior and low leaf shedding during the whole year (Soriano and Sala, 1983; Campanella and Bertiller, 2008). *L. chilense* is a deciduous shrub with phenological activity occurring during winter–spring and sometimes until early summer when water availability in soil is greater (Soriano et al., 1995; Campanella and Bertiller, 2008).

The aim of this work was to perform a field study along the different seasons in two native species of Patagonian shrub lands with contrasting mechanisms of drought resistance, *L. divaricata* and *L. chilense*, to evaluate the oxidative damage in tissues, the levels of different groups and types of polyphenols and their antioxidant capacity. In theory, plants from semi-arid regions are classified according to their ecological niches, but in practice it becomes very difficult to catalog a plant species in one of the main ecophysiological groups because of the overlapping of different environmental factors and plant responses. It has been proposed that, independently of the ecophysiological strategies used, coexisting species in semi-arid regions have a gradient of mesophytism to xerophytism that allows them to coexist and survive in the same habitat (Cenzano et al., 2013).

Species from semi-arid ecosystems like Patagonian shrub lands, with different behavior and phenological activity to face drought, are supposed to have powerful antioxidant enzymatic and non-enzymatic mechanisms. Considering the severe stress that these species have to face during long periods, we hypothesize that polyphenols may be an important component of their antioxidant system. However, the role of polyphenols as a mechanism of drought response and their suitability as indicators of drought tolerance in native species of the Patagonian shrub lands has not been explored yet.

2. Materials and methods

2.1. Study site and plant material

This study was carried out in the wildlife refuge “La Esperanza” of Natural Patagonia Foundation, located in the northeast of Chubut province (67 km² surface, 42°7' 43.92"S and 64°57' 40.99" W). Leaves and roots of *L. divaricata* and *L. chilense*, (five plants per species), were randomly collected in autumn (May), winter (August), spring (November) and summer (February). Plant material was frozen immediately after collection and kept at –80 °C until biochemical analyses were performed. Samples were lyophilized previously to the extraction procedure.

2.2. Weather data

To determine seasonal changes in water availability, rainfall and temperature averages were recorded using an automatic data recorder (21× Micrologger, Campbell Scientific) located in the study site. Data were compared between the four seasons to establish the dry and wet seasons.

2.3. Soil water content (SWC)

Soil water content was measured by the gravimetric method (Peters, 1965). During each season sampling, five soil samples were taken at three different depths (10, 20 and 30 cm) from the

surrounding soil below the species under study, and placed immediately in plastic bags to prevent moisture loss. Wet weight (WW) was measured, and then samples were dried at 105 °C for 48 h to determine the dry weight (DW). The soil moisture content was calculated according the equation:

$$\text{Soil moisture content (\%)} = (\text{WW} - \text{DW})/\text{DW} \times 100$$

2.4. Relative water content (RWC)

Relative water content was measured following the method reported by Xu and Zhou (2007). Leaves and roots samples of each species (for the four seasons) were placed into hermetic vials to avoid dehydration. RWC was calculated based on tissue fresh weight (FW), weight at full turgor (TW) after soaking the samples in distilled water for 48 h, and DW after drying the samples in oven at 80 °C for 24 h. RWC was calculated according the equation:

$$\text{RWC} = (\text{FW} - \text{DW})/(\text{TW} - \text{DW}) \times 100$$

2.5. Oxidative damage in tissues

The level of lipid peroxidation was determined in terms of malondialdehyde (MDA) content according to Heath and Packer (1968) modified for this samples. Freeze-dried samples (0.15 g) were ground in liquid nitrogen and mixed with 1.5 ml 20% TCA (trichloroacetic acid). The homogenate was centrifuged at 10,000g for 10 min at 4 °C. The supernatant was used for MDA determination. A mixture of 0.5 ml of extract + 0.5 ml of 0.5% TBA (thio-barbituric acid) in TCA 20% was produced, heated at 95 °C for 25 min, cooled and centrifuged for 10 min. The sample was measured at 532 nm and corrected by non-specific absorption at 600 nm. The concentration of MDA was calculated using an extinction coefficient of 155 mM⁻¹ cm⁻¹ and taking into account the water content of the samples before their lyophilization.

2.6. Phenolic compounds extraction

0.5 g of freeze-dried samples was ground in liquid nitrogen. The material was extracted three times with 10 ml of extraction solvent (methanol/water (80:20, v/v)) on a magnetic stirrer during 30 min. After each extraction, the liquid was separated from solids by centrifugation (14,000g, 15 min) at 4 °C. The final volume was quantified and the final extract was reduced to 8–16 ml by rotary evaporator. The extract was then filtered with 0.45 µm filters, divided into aliquots of 4 ml and stored at –80 °C for chemical analyses. The spectrophotometric assays were performed by using a Thermo Spectronic Helios UV–visible spectrophotometer (Cambridge, UK). Concentrations of different phenolic compounds and antioxidant activity were calculated from calibration curves and expressed as mg equivalent to the corresponding standard. All tests were carried out five times.

2.6.1. Total phenols

Total phenols were determined with Folin-Ciocalteu method adapted to our samples according with Borbalán et al. (2003). 25 µl of sample, 1.25 ml of distilled water, 125 µl of Folin-Ciocalteu reagent, 0.5 ml of a solution of sodium carbonate at 20%, and 0.6 ml of distilled water, were introduced into a test tube. The solution was homogenized and after incubation at room temperature for 30 min, the absorbance of the reaction mixture was measured at 750 nm.

The total phenols amount was calculated as mg of gallic acid equivalents.

2.6.2. Total flavonoids

Total flavonoids were measured according to Kim et al. (2003). 100 µl of extracted sample and 60 µl of 5% NaNO₂ were mixed. After 5 min 40 µl of 10% AlCl₃ were added, and after other 5 min 400 µl of 1 M NaOH were added to the mixture. The reaction mixture was diluted with 200 µl of distilled water, mixed, and the absorbance determined at 510 nm. The total flavonoids were calculated as mg of catechin equivalents.

2.6.3. Proanthocyanidins

Proanthocyanidins were measured according to Waterman and Mole (1994). Butanol reagent was prepared by mixing 128 mg FeSO₄·7H₂O with 5 ml of HCl and completed to 100 ml with n-butanol. 50 µl of extracted sample were mixed with 700 µl butanol reagent and heated at 95 °C in a water bath for 45 min. The sample was cooled and 250 µl of n-butanol were added. The absorbance was measured at 550 nm. Total proanthocyanidins were calculated as mg of cyanidin equivalents.

2.6.4. Tartaric acid esters and flavonols

Tartaric acid esters and flavonol contents were determined using the method described by Romani et al. (1996). An aliquot of 25 µl of extract was diluted with 225 µl of 10% ethanol and 250 µl of 0.1% HCl in 95% ethanol, and 1 ml of 2% HCl was then added. The solution was mixed, and the absorbances were determined at 320 nm for tartaric acid esters and 360 nm for flavonols. Tartaric acid esters and flavonols amounts were calculated as mg of caffeic acid and quercetin, respectively.

2.6.5. Flavan-3-ols

Total flavan-3-ols were determined with p-(dimethylamino) cinnamaldehyde (DMACA) reagent, as described by Nigel and Glories (1991). An amount of 10 µl of the sample extract was diluted with 90 µl of methanol. Next, 250 µl of HCl (0.24 N in MeOH), 250 µl of DMACA solution (0.2% in MeOH), and 250 µl of methanol were added. The absorbance was determined at 640 nm, and the total amount of flavan-3-ols was calculated as mg of catechin equivalents.

2.6.6. Antioxidant activity of phenolic extracts for spectrophotometric analysis

ABTS* (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) scavenging ability of polyphenolic extracts was determined according to the method described by Re et al. (1999). The ABTS⁺ radical was generated by reacting an ABTS aqueous solution (7 mM L⁻¹) with K₂S₂O₈ (2.45 mM L⁻¹, final concentration) in the dark for 16 h and diluting with ethanol to obtain Abs = 0.700 ± 0.020 at 734 nm. 100 µl of extracted sample was mixed with 1 ml of ABTS⁺ solution. After 4 min of reaction the absorbance was measured at 734 nm. 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) 2.5 mM solution was used to obtain the calibration curve. The antioxidant capacity was expressed as µmol of Trolox equivalents.

2.7. Extraction and isolation of polyphenols

Leaves of *L. divaricata* and *L. chilense* (100 g) corresponding to two treatments (dry season: autumn and wet season: spring) were crushed and powdered. The polyphenols were extracted by stirring the suspension in 70% methanol (1 L) at 40 °C for 24 h. The methanol solution was filtered with filter paper (Whatman N° 1) to remove the remaining plant material and kept in freezer. Afterward

the solution was evaporated at 100 mbar, 40 °C and the concentrate obtained was kept at 4 °C for 24 h. To remove the low molecular compounds the solution was dialyzed (Cellu-SEP H1) against distilled water for 10 h and filter again through a Nalgene™ Disposable Filterware (0.45 µm) to obtain a pre-purified polyphenols mixture.

Analytical HPLC was performed using a Waters system, controlled by Waters millennium software, consisting of a 717 plus auto sampler, Waters 600 E pump in combination with a Waters 600 Controller with in-line degasser and Waters 996 photo diodearray detector. Waters Atlantis C18, 250 × 4.6 mm, 5 µm and Phenomenex C18 Luna-100, 250 × 10 mm, 5 µm were the HPLC-columns used for separation of pure compounds. An LC-module 1 Waters HPLC machine (Mildford, MS) was used. The binary solvent system used for elution gradient consisted of 0.01% trifluoroacetic acid in water (solvent B) and Methanol (solvent A) at a constant flow-rate of 1.5 mL min⁻¹. A linear gradient profile was applied, starting with 20% A to 70% A over 60 min. The separated polyphenols mixture, were collected and analyzed by HPLC-ESI-TOF-MS, in negative ion mode [M-H]⁻. Each phenolic compound was detected with *m/z* values.

2.7.1. Antioxidant activity of phenolic extracts for HPLC-MS analysis

The antioxidant activity of the phenolic extracts was measured in terms of hydrogen donating or radical scavenging ability, using the stable radical, 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) (Brand-Williams et al., 1995). Methanolic stock dilutions (50 ml) of each extract were prepared (1, 1:2 and 1:4 v/v). 2 ml of each stock dilution were placed in a cuvette and 0.05 ml of 100 mM methanolic DPPH solution were added. The decrease in absorbance at 517 nm was determined after 30 min. A DPPH methanolic solution (100 mM) was used as blank, and Butylated hydroxytoluene (BHT) solution (100 mM) was used as positive control. All determinations were performed in triplicate. The inhibition percentage of the DPPH radical by the samples was calculated according to the following equation:

$$\% \text{ DPPH inhibition} = \frac{(\text{Abs}_B - \text{Abs}_E)}{\text{Abs}_B} * 100$$

where Abs_B is the absorbance of the blank at *t* = 0 min and Abs_E is the absorbance of the stock dilution of the extracts at *t* = 30 min.

2.8. Statistical analysis

Infostat (2011 v.) software was used for statistical analysis. Origin Pro. 8 software was used for plots. Models were: *two-way* ANOVA (comparing between species and seasons) and *one-way* ANOVA (comparing only between seasons). *Bonferroni* test was used for comparisons and means were considered to be significant when *P* < 0.05. To test the assumptions of ANOVA *Shapiro–Wilk* test for normality and *Levene's* test for homoscedasticity were used. When the assumptions of ANOVA were not right, *Kruskal Wallis* non-parametric test was applied. The measurements were taken in 5 plants per season, and at triplicate for each plant.

Linear regressions between different variables were applied. Correlation (*R*) and determination (*R*²) coefficients were calculated. The means were considered to be significant when *P* < 0.05.

Multivariate analysis was performed using all the data obtained from the two species, the two organs (leaves and roots) and the four seasons. Principal Component analysis was performed to visualize the distribution of the values obtained. Linear Discriminant analysis (LDA) was performed to reduce dimensionality, maximizing the variance between the categories (season/species with all the data together and season/tissue in each species) and minimizing the variance within categories, to identify differences in the phenolic

compounds production between the species and their behavior.

3. Results

3.1. Weather data

Rainfall data during the sampling period did not exceed 8 mm per season along the year (Fig. 1a). Spring was considered the season with the highest water availability due to a significant increase in precipitations compared with the other seasons, and with the data obtained about the soil water content (Fig. 1b). Large seasonal and annual temperature variations were observed. The average temperatures of the different seasons were: 8.6 °C in winter, 10.8 °C in autumn, 15.9 °C in spring and 20.8 °C in summer. The seasonal variations were between 13 and 16 °C comparing between all the seasons, and the annual variation was 12.2 °C (Fig. 1a).

3.2. Soil water content (SWC)

The higher percentage of SWC was found in spring (specifically

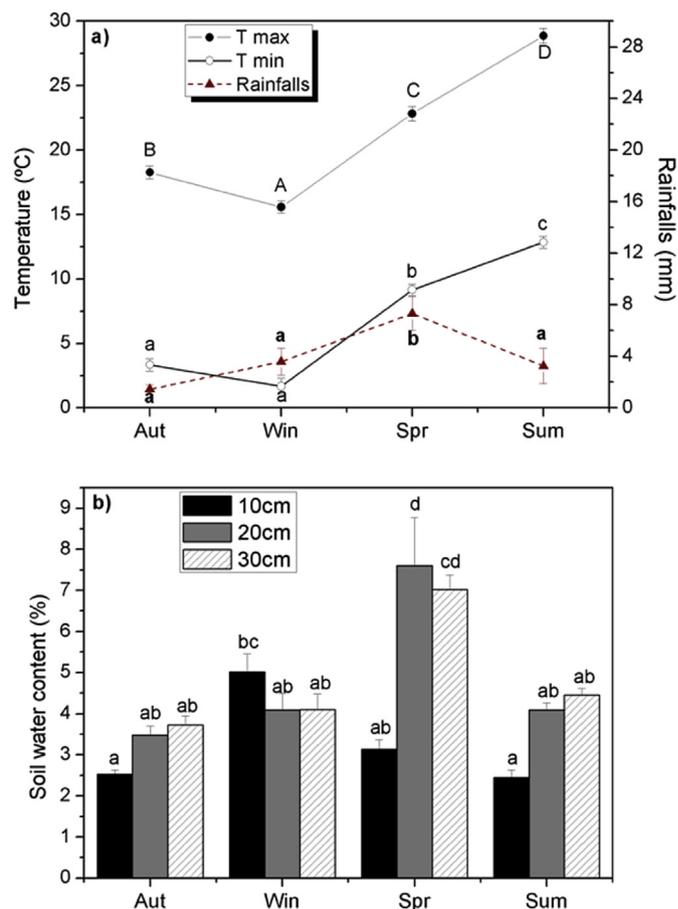


Fig. 1. a) Average values of minimum temperature, maximum temperature and rainfalls of each season. Autumn (Aut), winter (Win), spring (Spr) and summer (Sum). Different bold letters indicate significant differences between seasons in rainfalls dates according to Kruskal Wallis test (*P* < 0.05). Different uppercase letters indicate significant differences between seasons in dates with maximum temperature, and different lowercase letters indicate significant differences between seasons in dates with minimum temperature, according to Bonferroni test (*P* < 0.05) b) Soil water content at 3 different depths (10 cm, 20 cm and 30 cm) in the four seasons: Autumn (Aut), winter (Win), spring (Spr) and summer (Sum). Different letters indicate significant differences between seasons and depth according to Bonferroni test (*P* < 0.05).

at 20 and 30 cm depth (Fig. 1b) in correlation with the rainfall values obtained (Fig. 1a). In winter, the highest SWC value was at 10 cm depth (Fig. 1b). However, in summer and autumn the highest SWC values were observed at 20 and 30 cm depth.

3.3. Relative water content (RWC)

L. divaricata leaves had the highest RWC in summer, while roots showed no significant differences between seasons, although the RWC of roots was slightly higher in autumn and winter (Fig. 2a). *L. chilense* lost their leaves in autumn and winter, so RWC was only measured in spring and summer, showing the highest values in the latter. There were no significant differences in RWC of *L. chilense* roots during the four seasons (Fig. 2a). In both species, RWC of roots tended to decrease from spring to summer, inversely to leaves (Fig. 2a).

3.4. Oxidative damage in tissues

Damage in cellular membranes was estimated by MDA concentrations (Fig. 2b). In *L. divaricata* leaves there were no significant differences between seasons in MDA concentrations with values between 30 and 34 nmol g⁻¹ DW, while in roots MDA

concentrations were high in autumn (43.68 nmol MDA. g⁻¹ DW), decreased abruptly in winter (15.32 nmol MDA. g⁻¹ DW) and started to increase again towards summer (Fig. 2b). *L. chilense* had lower MDA concentrations than *L. divaricata* being higher in leaves (25 and 32 nmol MDA. g⁻¹ DW) than in roots (8 and 15 nmol MDA. g⁻¹ DW) with no significant differences within seasons in each organ (Fig. 2b).

3.5. Quantification of phenolic compounds by spectrophotometric assay

As mentioned above, *L. chilense* has a deciduous behavior and phenolic compounds in leaves were measured only in spring and summer; lower contents were found in comparison with *L. divaricata*. In both species the presence of flavan-3-ols was not detected with the technique employed (Figs. 3 and 4).

3.5.1. Total phenols

Total phenols concentration was higher in leaves than in roots in both species. *L. divaricata* leaves showed high concentration of total phenols, in a range of 48–78 mg g⁻¹ DW, while values in roots were between 10 and 43 mg g⁻¹ DW (Fig. 3). *L. chilense* leaves had a total phenol concentration in a range of 15–30 mg g⁻¹ DW while in roots it was between 3.5 and 7 mg g⁻¹ DW. The statistical analysis in leaves of both species did not show interaction between the two variables analyzed (specie and season), then they were analyzed separately. Total phenols concentration in *L. divaricata* leaves was significantly higher than in *L. chilense* leaves only in autumn. The statistical analysis in roots showed interaction between the two variables analyzed. Roots of *L. divaricata* had the highest total phenols concentration in autumn (Fig. 3).

3.5.2. Total flavonoids

Total flavonoids concentration was higher in leaves than in roots, in both species. Flavonoids in *L. divaricata* were in a range of 11–24 mg g⁻¹ DW in leaves and between 1 and 4 mg g⁻¹ DW in roots. Flavonoids in *L. chilense* did not exceed 4 mg g⁻¹ DW. The statistical analysis in leaves did not show interaction between the

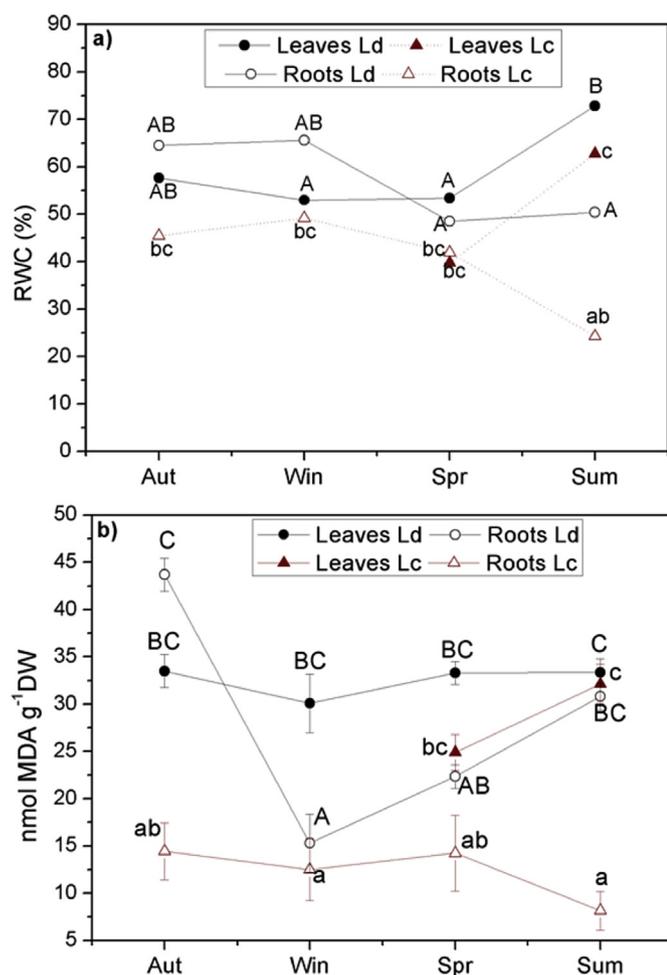


Fig. 2. a) Relative water content (RWC) in leaves and roots of *L. divaricata* (Ld) and *L. chilense* (Lc) in autumn (Aut), winter (Win), spring (Spr) and summer (Sum). b) Lipid peroxidation in leaves and roots of *L. divaricata* and *L. chilense* in autumn (Aut), winter (Win), spring (Spr) and summer (Sum). Different letters indicate significant differences between seasons and organs according to Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$).

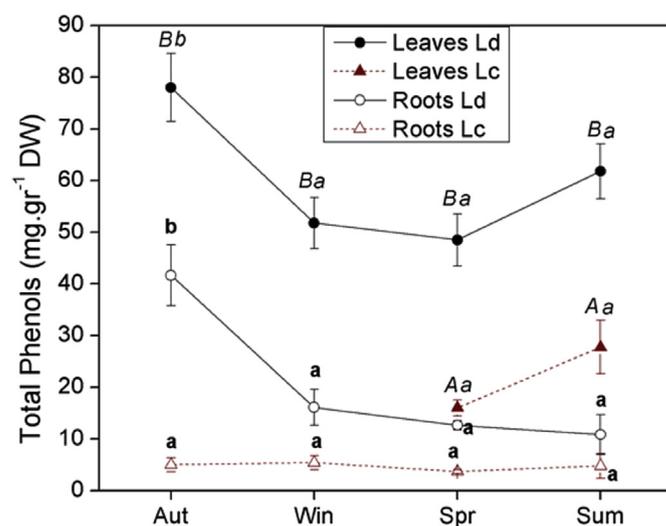


Fig. 3. a) Total Phenols in leaves and roots of *L. divaricata* (Ld) and *L. chilense* (Lc) in autumn (Aut), winter (Win), spring (Spr) and summer (Sum). Seasons and species were compared by Two-way ANOVA. Different bold letters indicate interaction and significant differences. Without interaction, different uppercase letters indicate significant differences between species and different lowercase letters indicate significant differences between seasons according to Bonferroni test ($P < 0.05$).

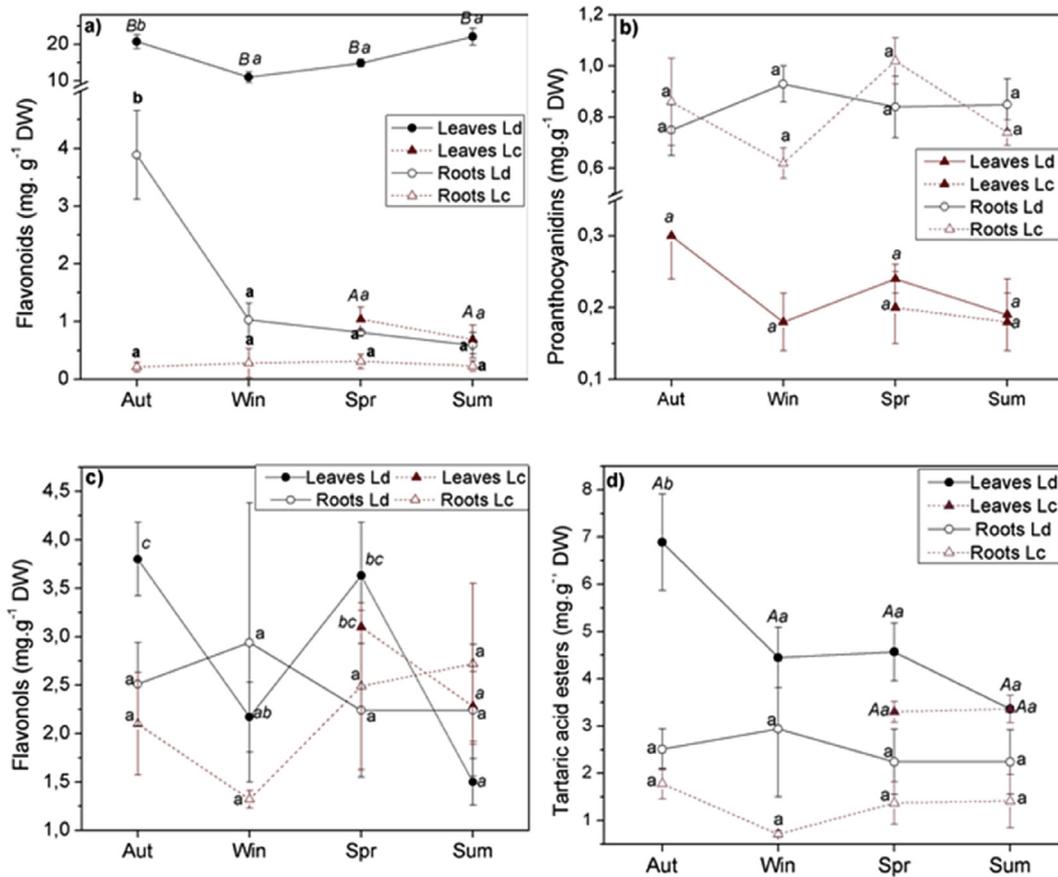


Fig. 4. a) Flavonoids, b) Proanthocyanidins, c) Flavonols and d) Tartaric acid esters content in leaves and roots of *L. divaricata* (Ld) and *L. chilense* (Lc) in autumn (Aut), winter (Win), spring (Spr) and summer (Sum). Seasons and species were compared by Two-way ANOVA. Different bold letters indicate interaction and significant differences. Without interaction, different uppercase letters indicate significant differences between species and different lowercase letters indicate significant differences between seasons according to Bonferroni test ($P < 0.05$).

two variables analyzed (specie and season). Flavonoids in leaves were higher in *L. divaricata* than in *L. chilense*, and only in autumn the flavonoids concentration was significantly higher than in the other seasons. In roots, the statistical analysis showed interaction between the two variables and the flavonoids concentration was only significantly higher in autumn for *L. divaricata* (Fig. 4a).

3.5.3. Proanthocyanidins

The results obtained for proanthocyanidins showed that the values did not exceed 2 mg g⁻¹ DW in both species analyzed. The highest proanthocyanidin concentrations were found in roots. The statistical analysis did not showed significant differences between the species and seasons. Proanthocyanidins values in *L. divaricata* roots showed a similar tendency to that observed for total phenols and flavonoids (Fig. 4b).

3.5.4. Flavonols and tartaric acid esters

Total flavonols did not exceed 4.5 mg g⁻¹ DW in all samples. The statistical analysis in leaves did not show interaction between the variables, and the data obtained presented great variability between individuals. Flavonols concentration in leaves was increased in spring for both species and in autumn only for *L. divaricata*, while in roots there were not differences between seasons. No differences were found in leaves and roots between both species (Fig. 4c).

Tartaric acid esters concentration showed values between 6.8 and 3.3 mg g⁻¹ DW in leaves and lower values in roots (between 2.9 and 0.7 mg g⁻¹ DW). There was no interaction between the

variables and no significant differences between species. Only leaves had significant differences between the seasons, showing an increase in tartaric acid esters concentration for *L. divaricata* in autumn (Fig. 4c).

3.5.5. Antioxidant capacity of phenolic extracts

L. divaricata has a greater antioxidant capacity than *L. chilense* as shown in Fig. 6. The values obtained for *L. divaricata* were in a range between 400 and 1800 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW, while in *L. chilense* the range was between 90 and 270 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW. The statistical analysis in leaves did not showed interaction between the variables. The antioxidant capacity of *L. divaricata* leaves was higher than *L. chilense* leaves. When values were compared between seasons, in *L. divaricata* the lower activity was found in spring, increased in summer and winter, and was highest in autumn. The antioxidant capacity in roots showed interaction between the variables, and a significant difference was only found in autumn for *L. divaricata* roots (Fig. 5).

3.6. Relationship between different variables

3.6.1. Simple lineal regression analysis

Simple linear regression was applied in order to establish different correlations between variables. In *L. divaricata* leaves a strong direct correlation between antioxidant capacity (ABTS) and total phenols (TPh) was detected ($R = 0.85$ and $R^2 = 0.91$). Comparing antioxidant capacity vs. soil water content (SWC) a

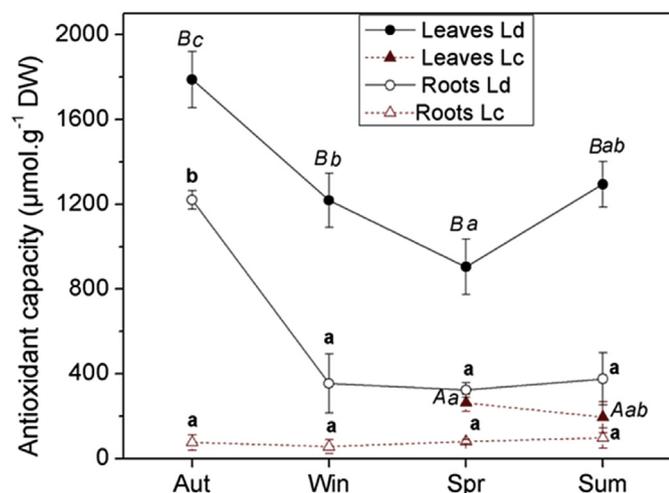


Fig. 5. Antioxidant capacity of the phenolic extract in leaves and roots of *L. divaricata* (Ld) and *L. chilense* (Lc) in autumn (Aut), winter (Win), spring (Spr) and summer (Sum). Seasons and species were compared by Two-way ANOVA. Different bold letters indicate interaction and significant differences. Without interaction, different uppercase letters indicate significant differences between species and different lowercase letters indicate significant differences between seasons according to Bonferroni test ($P < 0.05$). Italic letters indicate comparison between leaves and non-italic letters indicate comparison between roots.

significant inverse correlation was detected, assuming that when SWC increases, antioxidant capacity decreases ($R = -0.45$ and $R^2 = 0.2$). There was no significant correlation comparing antioxidant capacity vs. RWC ($R = 0.12$ and $R^2 = 0.014$) and vs. MDA concentration ($R = 0.11$ and $R^2 = 0.013$), assuming that RWC and lipid peroxidation did not affect antioxidant activity directly. The influence of TPh, SWC and RWC over MDA concentration was also analyzed. There were no significant relationships between MDA and SWC ($R = 0.26$ and $R^2 = 0.068$), MDA and RWC ($R = 0.01$ and $R^2 < 0.01$) and MDA and TPh ($R = 0.07$ and $R^2 = 0.06$).

In *L. divaricata* roots there were correlations between ABTS and TPh ($R = 0.94$ and $R^2 = 0.88$), ABTS and MDA content ($R = 0.65$ and $R^2 = 0.42$) and MDA vs. TPh ($R = 0.53$ and $R^2 = 0.28$), but there were no correlations between antioxidant capacity with SWC ($R = -0.36$ and $R^2 = 0.13$) and RWC ($R = 0.33$ and $R^2 = 0.11$) and between MDA content with SWC ($R = -0.41$ and $R^2 = 0.17$) and RWC ($R = 0.33$ and $R^2 < 0.01$).

In *L. chilense* leaves there were no correlation between any of the variables measured: ABTS vs. TPh ($R = 0.38$ and $R^2 = 0.14$), antioxidant capacity vs. SWC ($R = 0.29$ and $R^2 = 0.18$), antioxidant capacity vs. RWC ($R = 0.29$ and $R^2 = 0.086$), antioxidant capacity vs. MDA ($R = 0.04$ and $R^2 < 0.01$), MDA vs. SWC ($R = 0.48$ and $R^2 = 0.23$), MDA vs. RWC ($R = 0.11$ and $R^2 = 0.12$) and MDA vs. TPh ($R = 0.53$ and $R^2 = 0.28$).

There was no correlation between the variables analyzed in *L. chilense* roots: antioxidant capacity vs. total phenols ($R = 0.38$ and $R^2 = 0.14$), antioxidant capacity vs. MDA ($R = 0.33$ and $R^2 = 0.11$), antioxidant capacity vs. SWC ($R = 0.13$ and $R^2 = 0.018$), antioxidant capacity vs. RWC ($R = 0.29$ and $R^2 = 0.08$), MDA vs. SWC ($R = -0.41$ and $R^2 = 0.17$) and MDA vs. RWC ($R = 0.05$ and $R^2 < 0.01$).

3.6.2. Multivariate analysis

A PCA analysis was performed to identify which variable was the most affected by seasonal changes (Fig. 6a). The first principal component (PC1) explained 45.7% of the variation in the data set. This variation is strongly influenced by the following variables: antioxidant capacity (ABTS), total phenols (TPh) and flavonoids (Fla). The second principal component (PC2) explained 17.5% of the

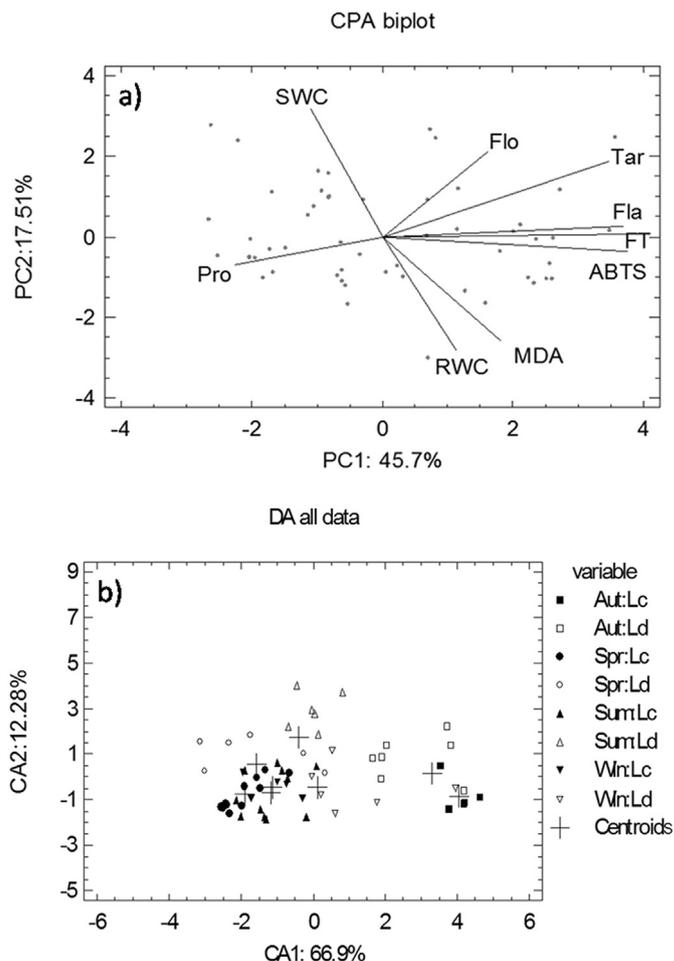


Fig. 6. a) Principal component analysis (PCA) of the values obtained from the different variables analyzed (Antioxidant capacity (ABTS), Lipid peroxidation (MDA), Total Phenols (FT), Flavonoids (Fla), Flavonols (Flo), Proanthocyanidins (Pro), tartaric acid (Tar), soil water content (SWC) and, relative water content (RWC)). b) Linear Discriminant analysis (LDA) of all data. The combination of categories is season and species. *L. divaricata* (Ld) and *L. chilense* (Lc) in autumn (Aut), winter (Win), spring (Spr) and summer (Sum).

total variance and it is influenced by the variables related to water availability. Soil water content (SWC) influenced positively while relative water content (RWC) negatively. The third principal component which contributes 12.8% of the total variance (data not shown) is influenced by the variables: proanthocyanidins (Pro) and flavonols (Flo). The individuals with high concentration of total phenols and flavonoids and consequently, antioxidant capacity, were located towards the positive end of the PC1 axis, and the individuals with high values of RWC were located towards the negative end of the PC2 axis. The higher values of SWC were located towards the positive end of the PC2 axis. It was not possible to appreciate clusters between seasons and/or organs analyzed.

The first Linear Discriminant Analysis (LDA) was carried out considering the combination between seasons and species as a category (Fig. 6b). The LDA shows that the different clusters of both species overlap in each season (which was expected in view of the CPA), with higher values in *L. divaricata* than *L. chilense*, but both species have similar behavior in each season. The canonical axis 1 (CA1) (66.9%) separates autumn (in the positive axis) from the other seasons assuming differences in each variable analyzed for this seasons (described above), while the canonical axis 2 (CA2) (12.28%) separates both species, locating *L. divaricata* in the positive

axis and *L. chilense* in the negative axis. The second and third LDA were carried out considering the combination between seasons and organ of each species as a category (Fig. 7). For *L. divaricata* the CA1 (79.92%) separates between organs, locating roots in the positive axis and leaves in the negative axis, while CA2 (13.90%) separates autumn (negative axis) from the other seasons, with the exception of winter: leaf that have similar values than that of autumn: leaf (Fig. 7a). For *L. chilense* the CA1 (71.89%) separates between the organs while CA2 (23.90%) separates autumn roots from all the other groups (Fig. 7b).

3.6.3. Extraction and isolation of polyphenols by HPLC-MS

Leaf samples of two contrasting seasons were selected for each species: autumn (dry season) and spring (wet season). Table 1 summarize the different molecules identify in these samples. In *L. divaricata* were found, as different molecules from the extract of the wet season, procyanidin dimer B1, kaempferol conjugated with sugar (see Fig. S1 in Supporting Information) and dihydrobenzoic acid under the dry season. Non-flavonoids were gallic acid and oleuropein, while the flavonoids were nobiletin, quercetin, kaempferol, epicatechin and catechin (the last two being part of the procyanidin dimer B1 structure). In *L. chilense* were found different flavonoids (quercetin and luteolin) and non-flavonoids (scopoletin, resveratrol and oleuropein), some of them conjugated with sugars, under the dry season. During the wet season only oleuropein was detected (see Fig. S2 in Supporting Information).

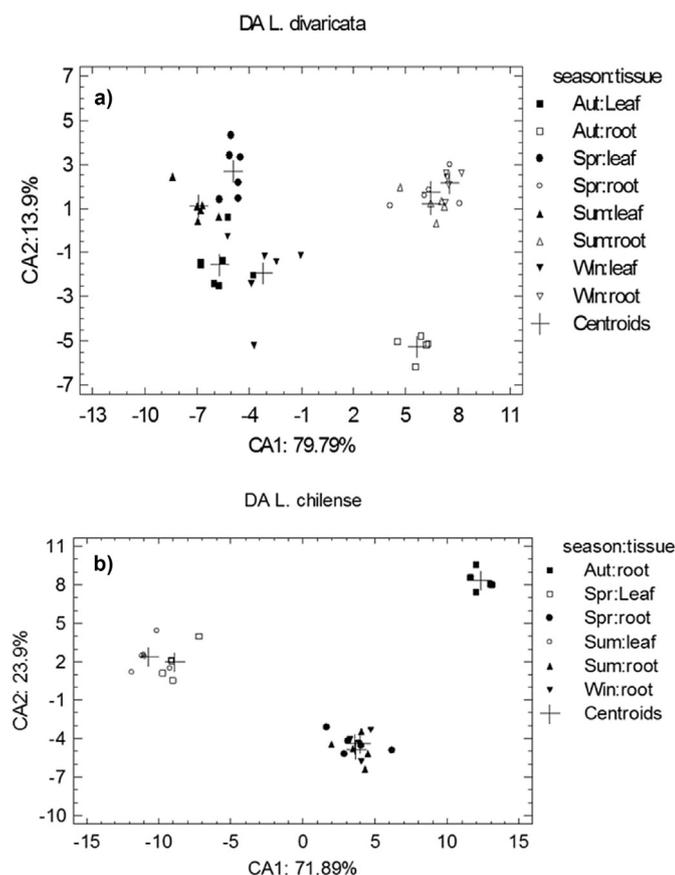


Fig. 7. Linear Discriminant analysis (LDA) of a) *L. divaricata* and b) *L. chilense*. The combination of categories is season and tissue. Leaf and root in autumn (Aut), winter (Win), spring (Spr) and summer (Sum). Canonic axis 1 (CA1) vs. canonic axis 2 (CA2).

3.6.4. Antioxidant capacity of phenolic extract for HPLC-MS and relationship between antioxidant capacity and reactive groups of polyphenols

The antioxidant capacity of the H₂O/MeOH extract study by HPLC-MS is showed in Fig. 8. In *L. divaricata* extract were not found differences between the two seasons analyzed. Comparing the different compounds (Table 1a) and their chemical structure (supplementary data), the presence of dihydrobenzoic acid, procyanidin dimer B1 and kaempferol-3-o-glucosyl-rhamnosyl-glucoside enhance the amount of reactive groups (OH⁻), which posses high antioxidant capacity, however, these differences were not detected by the DPPH assay.

L. chilense had a higher antioxidant capacity under the dry seasons. Comparing the phenolic compounds (Table 1b) a higher amount of flavonoids under drought conditions was found, with a 5-fold increase in the amount of hydroxyl groups (supplementary data).

4. Discussion

The Patagonian shrub lands are semi-arid regions with daily and seasonal temperature variations and with seasonal rainfalls not exceeding 200 mm per year, generally concentrated in winter and/or spring (Cabrera, 1976). The results obtained in this study indicate that during the sampling period along the year, rainfalls were concentrated in spring, and the highest average temperatures occurred in spring and summer. This could affect the soil water availability producing high rates of evapotranspiration. Spring was the season with the highest water availability as shown by the SWC values. These results could be interpreted according to Grayson et al. (1997) who determined different states in spatial soil moisture patterns. The state taken as local control (predominant in semi-arid region) establishes that in periods when evapotranspiration continually exceeds precipitation, the soil moisture pattern is influenced by temporary elevation of soil water content following rainfalls. This establishment could also explain the results obtained in SWC in winter, due to rainfall occurrence in the days before to sample collection, indicating that water infiltration into greater depth had not yet occurred.

Reddy et al. (2003) proposed that drought resistant species typically show small decreases in RWC due to osmotic adjustment as a tolerance mechanism that allows the maintenance of a positive turgor potential during the stress period. Our results showed that RWC in leaves and roots of *L. divaricata* had no significant differences between seasons, being in a range of 52 and 75%. These results support the idea proposed by Reddy et al. (2003) suggesting that this species would be well adapted to extreme environments and display a tolerance mechanism which helps to maintain normal physiological parameters even during long period of stress. On the contrary, due to the avoidance mechanism described for *L. chilense*, the RWC in leaves were higher in summer (when leaves were mature) than in spring. Otherwise, the RWC in roots did not change along seasons, supporting the idea that *L. chilense* leaf loss is the main avoidance mechanism, while roots maintain their physiological activity during the whole year. RWC values were between 40 and 60% for leaves and 20–40% for roots, showing that *L. chilense* is a species with a partial xerophytic behavior adapted to a semi-arid environment that uses an avoidance mechanism to survive.

Several experiments have shown that plants exposed to drought stress produce higher concentration of phenolic compounds such as total phenols (de Abreu and Mazzafera, 2005; Jaafar et al., 2012), flavonoids (de Abreu and Mazzafera, 2005; Hernández et al., 2006) and proanthocyanidins (Arteaga et al., 2005; Jaafar et al., 2012). Specifically, evergreen desert shrubs may accumulate large amounts of secondary compounds, including polyphenols (Carrera

Table 1

Phenolic compounds found by HPLC-MS in leaves of a) *L. divaricata* and b) *L. chilense* during autumn (dry season) and spring (wet season). ESI Scan (negative mode) molecules from H₂O/MeOH extract.

		Molecule	m/z value (negative mode)	
a)	<i>L. divaricata</i> leaves	Autumn		
		(dry season)	Dihydrobenzoic acid	154
			Gallyc Acid (Galloyl ester)	170
			Gallyc acid-3-O-Gallate	323
			Nobiletin (3-methoxysinensetin)	401
			Oleuropein	540
		Quercetin-O-3-O-(6''-acetyl-galactoside-7-O-rhamnoside)	650	
		Procyanidin dimer B1	577	
		Kaempferol 3-O-glucosyl-rhamnosyl-glucoside	751	
		Spring		
	(wet season)	Gallyc Acid (Galloyl ester)	170	
		Gallyc acid-3-O-Gallate	323	
	Nobiletin (3-methoxysinensetin)	401		
	Oleuropein	540		
	Quercetin-O-3-O-(6''-acetyl-galactoside-7-O-rhamnoside)	650		
b)	<i>L. chilense</i> leaves	Autumn		
		(dry season)	Phenol group	96
			Scopoletin	190
			Resveratrol	227
			Oleuropein-aglycone	378
		Quercetin-3-O-acetyl rhamnoside	489	
		Luteolin-7-O-diglucuronide	637	
		Spring		
	(wet season)	Phenol group	96	
		Oleuropein-aglycone	378	

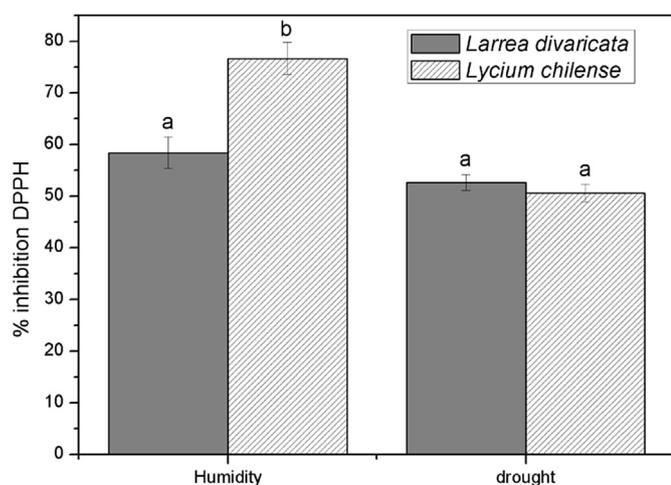


Fig. 8. Antioxidant capacity of the phenolic extract for HPLC-MS assay in *L. divaricata* leaves and *L. chilense* leaves in Humidity (spring) and drought (autumn). Seasons were compared by one-way ANOVA for each species. Different letters indicate significant differences between seasons according to Bonferroni test ($P < 0.05$).

and Bertiller, 2010; Campanella and Bertiller, 2011), which could be used as a strategy to tolerate drought (Westoby et al., 2002; Reddy et al., 2004) due to their powerful antioxidant activity able to control excessive ROS formation in tissues (Hatier and Gould, 2008; Agati and Tattini, 2010). Hyder et al. (2002) showed that *Larrea tridentata* (a native species of the semi-arid regions in North America closely related to *L. divaricata*) contains several lignans, flavonoids, condensed tannins, triterpenes, saponins and waxes. In this study we found that *L. divaricata* had a higher production of total phenols and flavonoids compared with *L. chilense*; the production of these compounds was higher in leaves than in roots, and their concentration was enhanced in autumn. The antioxidant capacity of the phenolic extracts (spectrophotometric assay) was also higher in *L. divaricata* than in *L. chilense*, and increased approximately 95% from spring to autumn. The relationship between variables was analyzed by univariate way; SLR (Simple Linear

Regression) and multivariate way PCA and LDA (Principal Component Analysis and Linear Discriminant Analysis). As we expected the SLR shows that *L. divaricata* had significant relationship between total phenols and antioxidant capacity, supporting the idea that this evergreen shrub produces secondary metabolites that function as non-enzymatic antioxidants in a mechanism to tolerate drought stress naturally imposed by the arid environment (Quideau et al., 2011; Gill and Tuteja, 2010). Only *L. divaricata* roots had a significant relationship between MDA content and antioxidant capacity and between MDA content and total phenols. When roots sense drought-induced risk of oxidative stress, secondary metabolites production increases in order to reinforce the enzymatic antioxidant mechanism to avoid cellular damage. On the other hand, SLR of the variables measured in *L. chilense* had no significant relationship between them; the differences between this two species could be explained by the classification proposed by Karabourniotis et al. (2014) in slow growing species like the evergreen *L. divaricata*, and fast growing plants like the deciduous *L. chilense*.

Palacio et al. (2012) reported the presence of two compounds in *L. divaricata* leaves, quercetin and kaempferol (flavonols). Our analysis showed that flavonols accumulation in *L. divaricata* was higher in leaves than in roots, and that their production increased in autumn (dry season) and spring. Flavonols may not only play an antioxidant role in drought stress, but are also important compounds for leaf tissues protection from UV absorption, thermal damage and defense against herbivores and/or pathogens (Aerts and Chapin, 2000; Souto et al., 2000; González-Rodríguez, 2004).

The lower polyphenol concentration in *L. chilense* and the lack of correlation with the antioxidant capacity in leaves, suggest that the production of secondary metabolites in this species is not a very important trait in drought avoidance (Westoby et al., 2002; Reddy et al., 2004). However, total phenols and flavonoids in roots had positive correlation with the antioxidant capacity, which suggests their importance for cellular structure protection from the damage caused by ROS during long periods of drought (Surweswaran et al., 2007; Krishnaiah et al., 2011).

Proanthocyanidins concentration was higher in roots than in leaves in both species; however, a positive correlation with the

antioxidant capacity was only found in *L. divaricata* leaves. Similarly, Hyder et al. (2002) and Holeček et al. (1990) found higher levels of proanthocyanidins in roots than in leaves of *L. tridentata*. Taken together, these results suggest the possibility that high levels of proanthocyanidins in roots could play an allelopathic role against other plants species (Bais et al., 2002, 2003), insects (Thelen et al., 2005) and/or microorganism (Li et al., 2010) instead of an antioxidant role. Additionally, it has been proposed that these compounds may play a role in strengthening the cell walls under stressing conditions (Field et al., 2006).

The isolation of specific polyphenols showed different patterns among both species and even among the two seasons contrasted. *L. divaricata* presented several flavonols, mostly bonded with sugars. The bond between sugar and phenolic compounds increase their solubility in the sap vacuole (Peshev et al., 2013), may be part of the redox system (Bolouri-Moghaddam et al., 2010) and/or could be involved as intermediaries of different biosynthetic pathways (Karabourniotis et al., 2014).

As mentioned above, Palacio et al. (2012) identified two flavonoids in *L. divaricata*, quercetin and kaempferol. According to our analysis, the flavonoids identified were also quercetin, kaempferol and a novel compound, nobiletin, in its free form. The structure of this molecule suggests a potential antioxidant capacity due to the presence of several reactive groups (Kaur and Kapoor, 2001). The presence of condensed tannins in *L. divaricata* during the dry season, specifically procyanidin dimer B1, could be related to the structural role proposed for these compounds by giving structural support by increasing cell wall rigidity and helping to this species to deal with the drought season (Saraví Cisneros et al., 2013). The levels of flavonoids identified in *L. chilense* were lower than in *L. divaricata*, supporting the idea that *L. chilense* has an avoidance mechanism to tolerate drought, with a deciduous behavior instead of investing high amount of energy in these complex antioxidant molecules. Independently of the season analyzed, a greater production and accumulation of flavonoids in the evergreen species than in the deciduous species contributes to the concept that flavonoids have an important antioxidant role in native perennial plants to cope with these adverse environments, mainly for protection of the photosynthetic apparatus (Tattini et al., 2005; Heruiyot et al., 2007).

5. Conclusion

Native species of Patagonian shrublands can use different mechanism to resist long periods of drought stress in order to survive and coexist in the same habitat. In this study we showed that accumulation of secondary metabolites, specifically flavonoids, is an important feature within the mechanisms employed by xerophytic species to avoid oxidative damage, and could be used as an indicator of drought tolerance.

Acknowledgments

This research was funded by the National Research Council of Argentina (Projects D3148-CONICET and PIP-191-CONICET) to A.C. and CONICET PIP 5628 and PICT-ANPCYT 02232/07 to V.L. CONICET also founded the Doctoral Fellowship to C.V. We thank to Fundación Patagonia Natural who allowed us to harvest plant material on his Wildlife Reserve “La Esperanza”, to Dr. Analía Carrera (Centro Nacional Patagónico: CENPAT-CONICET) for providing the weather data for this study and to Şefika Emine Arslan and Fatma Gül Akar for helping in polyphenols determinations at the Dr. Arslan's laboratory at Pamukkale University.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.03.014>.

Contributors

Sample collection was carried out by C.V. and A.C. Polyphenols quantification by spectrophotometry and their antioxidant activity were conducted by C.V., aided by M.R. Extraction and isolation of polyphenols by HPLC-MS and their antioxidant activity were conducted by C.V. and I. A. Statistical analyses were conducted by C.V.

C.V. wrote the manuscript; A.C., I.A., M.R., and V.L. edited the manuscript.

I.A. was the tutor of C.V. in an Internship in Turkey.

V.L. is the Head of the Plant Physiology Laboratory where the project is currently being carried on.

All authors approved the final version of this article.

Conflicts of interest

No conflicts of interest.

Authors contributions

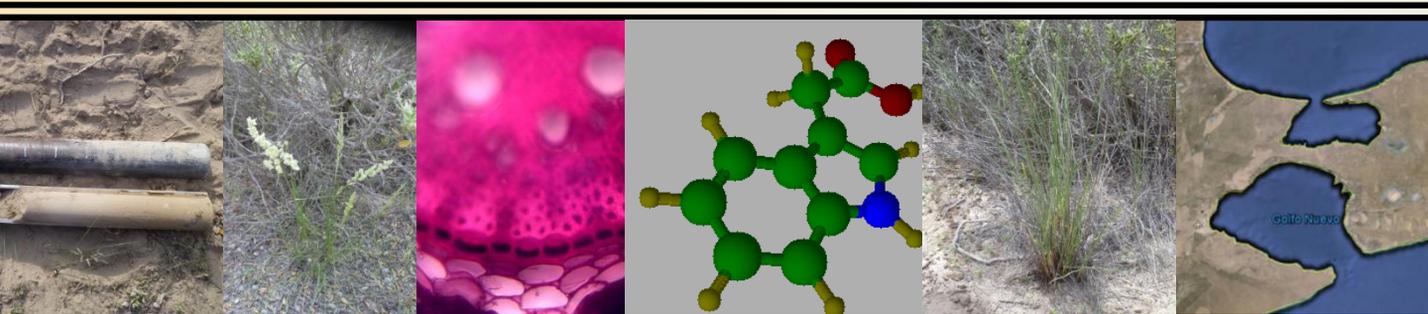
- María Celeste Varela and Ana María Cenzano carried out sample collection in the study site.
- María Celeste Varela conducted polyphenols quantification by spectrophotometry and their antioxidant activity, aided by Mariana Andrea Reginato.
- María Celeste Varela and Idris Arslan conducted together Extraction and isolation of polyphenols by HPLC-MS and their antioxidant activity.
- María Celeste Varela conducted statistical analyses
- María Celeste Varela wrote the manuscript. Idris Arslan, Mariana Andrea Reginato, Ana María Cenzano and María Virginia Luna edited the manuscript.
- Idris Arslan was the tutor of María Celeste Varela in an Internship in Turkey.
- María Virginia Luna is the Head of the Plant Physiology Laboratory where the project is currently being carried on.

All authors approved the final version of this article.

References

- Aerts, R., Chapin III, F.S., 2000. The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Adv. Ecol. Res.* 30, 1–67.
- Agati, G., Tattini, M., 2010. Multiple functional roles of flavonoids in photo-protection. *New Phytol.* 186, 786–793.
- Arteaga, S., Andrade-Cetto, A., Cárdenas, R., 2005. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *Review J. Ethnopharmacol.* 98, 231–239.
- Bais, H.P., Vepachedu, R., Gilroy, S., Callaway, R.M., Vivanco, J.M., 2003. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science* 301, 1377–1380.
- Bais, H.P., Walker, T.S., Stermitz, F.R., Hufbauer, R.A., Vivanco, J.M., 2002. Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (±)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. *Plant Physiol.* 128, 1173–1179.
- Bertiller, M.B., Mazzarino, M.J., Carrera, A.L., Diehl, P., Satti, P., Gobbi, M.J., Sain, C.L., 2006. Leaf strategies and soil N across a regional humidity gradient in Patagonia. *Oecologia* 148, 612–624.
- Bertiller, M.B., Sain, C.L., Carrera, A.L., Vargas, D.N., 2005. Patterns of nitrogen and phosphorus conservation in dominant perennial grasses and shrubs across an aridity gradient in Patagonia, Argentina. *J. Arid Environ.* 62, 209–223.
- Bertiller, M.B., Bisigato, A.J., Carrera, A.L., Del Valle, H.F., 2004. Estructura de la vegetación y funcionamiento de los ecosistemas del Monte Chubutense. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 39 (3–4), 139–158.
- Bolouri-Moghaddam, M.R., Le Roy, K., Xiang, L., Rolland, F., Van den Ende, W., 2010.

- Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS J.* 277, 2022–2037.
- Borbalán, A.M.A., Zorro, L., Guillen, D.A., Barroso, C.G., 2003. Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. *J. Chromatogr.* 1012, 31–38.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28, 25–30.
- Cabrera, A.L., 1976. Las regiones fitogeográficas Argentinas. (Enciclopedia Argentina de Agricultura, Jardinería y Horticultura. ACME). Argentina, pp.85.
- Campanella, M.V., Bertiller, M.B., 2008. Plant phenology, leaf traits and leaf litterfall of contrasting life forms in the arid Patagonian Monte, Argentina. *J. Veg. Sci.* 19, 75–85.
- Campanella, M.V., Bertiller, M.B., 2011. Is N-resorption efficiency related to secondary compounds and leaf longevity in coexisting plant species of the arid Patagonian Monte, Argentina? *Austral Ecol.* 36, 395–402.
- Carrera, A.L., Bertiller, M.B., 2010. Relationship among plant litter, fine roots, and soil organic C and N across an aridity gradient in northern Patagonia, Argentina. *Ecoscience* 17, 276–286.
- Cenzano, A., Varela, M.C., Bertiller, M., Luna, V., 2013. Effect of drought on morphological and functional traits of *Poa ligularis* and *Pappostipa speciosa*, native perennial grasses with wide distribution in Patagonian rangelands, Argentina. *Austral J. Bot.* 61, 383–393.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S., 2003. Understanding plant response to drought: from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* 30, 239–264.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N., 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Product Rep.* 8, 1001–10043.
- de Abreu, I.N., Mazzafera, P., 2005. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 241–248.
- Field, B., Jordan, F., Osbourn, A., 2006. First encounters-deployment of defence-related natural product by plants. *New Phytol.* 172, 193–207.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.
- González-Rodríguez, L., 2004. Relaciones alelopáticas. In: Reigosa, M.J., Pedro, I.N., Sánchez, A. (Eds.), *La Ecosociología Vegetal. Una Ciencia de Síntesis*. Thomson, Madrid, pp. 527–576.
- Grayson, R.B., Western, A.W., Chiew, F.H.S., 1997. Preferred states in spatial soil moisture patterns: local and nonlocal controls. *Water Resour. Res.* 22, 1786–1897.
- Hattier, J.H.B., Gould, K.S., 2008. Foliar anthocyanins as modulators of stress signals. *J. Theor. Biol.* 253, 625–627.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189–198.
- Hernández, I., Alegre, L., Munné-Bosch, S., 2006. Enhanced oxidation of flavan-3-ols and proanthocyanidin accumulation in water-stressed tea plants. *Phytochemistry* 67, 1120–1126.
- Heruiyot, Erick K.C., Umera Louis, M.M., Etich Wilson, K.N.G., Assanali Ahmed, H., Achira Francis, W., 2007. Polyphenols as potential indicators for drought tolerance in tea (*Camellia sinensis* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (9), 2190–2197.
- Hetherington, A.M., Woodward, F.I., 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424, 901–908.
- Holeczek, J.L., Munshikpu, A.V., Saiwana, L., Nunez-Hernandez, G., Valdez, R., Wallace, J.D., Cardenas, M., 1990. Influences of six shrub diets varying in phenol content on nitrogen retention by goats. *Trop. Grassl.* 24, 93–98.
- Hyder, P.W., Fredrickson, E.L., Estell, R.E., Tellez, M., Gibbens, R.P., 2002. Distribution and concentration of total phenolics, condensed tannins, and nordihydroguaiaretic acid (NDGA) in creosote bush (*Larrea tridentata*). *Biochem. Syst. Ecol.* 30, 905–912.
- Jaafar, H.Z., Ibrahim, M.H., Fakri, N.F.M., 2012. Impact of soil field water capacity on secondary metabolites, phenylalanine ammonia-lyase (PAL), malondialdehyde (MDA) and photosynthetic responses of Malaysian Kacip Fatimah (*Labisia pumila* Benth). *Molecules* 17, 7305–7322.
- Karabourniotis, G., Liakopoulos, G., Nikolopoulos, D., Bresta, P., Stavroulaki, V., Sumbele, S., 2014. “Carbon gain vs. water saving, growth vs. defence”: two dilemmas with soluble phenolics as a joker. *Plant Sci.* 227, 21–27.
- Kaur, C., Kapoor, H.C., 2001. Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. *Int. J. Food Sci. Technol.* 36, 703–725.
- Khanbabaee, K., Van Tee, T., 2001. Tannins: classification and definition. *Nat. Product Rep.* 18, 641–649.
- Kim, D., Chun, O.K., Kim, Y.J., Moon, H.-Y., Lee, C.Y., 2003. Quantification of phenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6509–6515.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., 2011. A review on the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Process.* 89, 217–233.
- León, J.J.C., Bran, D., Collantes, M., Paruelo, J.M., Soriano, A., 1998. Grandes unidades de la Patagonia extra andina. *Ecol. Austral* 8, 125–144.
- Levitt, J., 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses. Water, Radiation, Salt and Other Stresses, vol. II. Academic Press, New York, pp. 93–128.
- Li, Z.-H., Qiang, W., Xiao, R., Cun-De, P., De-An, J., 2010. Phenolics and plant allelopathy. *Review Molecules* 15, 8933–8952.
- Motilva, M.J., Serra, A., Macià, A., 2013. Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: an overview. *J. Chromatogr. A* 1292, 66–82.
- Naczk, M., Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A* 1054, 95–111.
- Nigel, C.W., Glories, Y., 1991. Use of a modified dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 364–366.
- Noy-Meir, E., 1973. Desert ecosystems: environment and producers. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 4, 3–51.
- Palacio, L., Cantero, J.J., Cusidó, R.M., Goleniowski, M.E., 2012. Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* 193–194, 1–7.
- Peshev, D., Vergauwen, R., Moglia, A., Hideg, E., Van den Ende, W., 2013. Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? *J. Exp. Bot.* <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ers377>.
- Peters, D.B., 1965. Water availability. In: Black, C.A., Clark, F.E., Dinauer, R.C., Ensminger, L.E., White, J.L. (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part I. Physical and Mineralogical Properties, Including Statistics of Measurement and Sampling*. American Society of Agronomy, Inc., Publisher, USA, pp. 279–285.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységou, L., 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 586–621.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V., Vivekanandan, M., 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* 161, 1189–1202.
- Reddy, T.Y., Reddy, V.R., Anbumozhi, V., 2003. Physiological responses of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) to drought stress and its amelioration: a critical review. *Plant Growth Regul.* 41, 75–88.
- Reginato, M.A., Castagna, A., Furlán, A., Castro, S., Ranieri, A., Luna, V., 2014. Physiological responses of a halophytic shrub to salt stress by Na₂SO₄ and NaCl: oxidative damage and the role of polyphenols in antioxidant protection. *AoB Plants* 6. <http://dx.doi.org/10.1093/aobpla/plu042>.
- Romani, A., Mancini, P., Tatti, S., Vincieri, F., 1996. Polyphenols and polysaccharides in Tuscan grapes and wines. *Ital. J. Food Sci.* 1, 13–24.
- Saraví Cisneros, H., Bertiller, M.B., Carrera, A.L., Larreguy, C., 2013. Diversity of phenolic compounds and plant traits in coexisting Patagonian desert shrub species of Argentina. *Plant Ecol.* 214 (11), 1335–1343.
- Sies, H., 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215, 213–219.
- Soriano, A., 1950. La vegetación del Chubut. *Rev. Argent. Agron.* 17, 30–66.
- Soriano, A., Nogués-Loza, M., Burkart, S., 1995. Plant biodiversity in the extraandean Patagonia: comparisons with neighbouring and related vegetation units. In: Montes, L., Oliva, G.E. (Eds.), *Actas del taller internacional sobre recursos fitogenéticos, desertificación y uso sustentable*. CRPS INTA, Río Gallegos, Argentina, pp. 36–45.
- Soriano, A., Sala, O.E., 1983. Ecological strategies in a Patagonian arid steppe. *Vegetation* 56, 9–15. UNESCO, 1979. *Carte de la répartition mondiale des régions arides*. 1/25.000.000. Notice explicative. UNESCO, Paris, 55pp.
- Souto, X.C., Chiapusio, G., Pellissie, F., 2000. Relationships between phenolics and soil microorganisms in spruce forests: significance for natural regeneration. *J. Chem. Ecol.* 26, 2025–2034.
- Surweswaran, S., Cai, Y.Z., Corke, H., Sun, M., 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem.* 102, 938–953.
- Tattini, M., Guidi, L., Morassi-Bonzi, L., Pinelli, P., Remorini, D., Degl'Innocenti, E., Giordano, C., Massai, R., Agati, G., 2005. On the role of flavonoids in the integrated mechanisms of response of *Ligustrum vulgare* and *Phillyrea latifolia* to high solar radiation. *New Phytol.* 167, 457–470.
- Thelen, G.C., Vivanco, J.M., Newingham, B., Good, W., Bais, H.P., Landers, P., Caesar, A., Callaway, R.M., 2005. Insect herbivory stimulates allelopathic exudation by an invasive plant and the suppression of natives. *Ecol. Lett.* 8, 209–217.
- Waterman, P.G., Mole, S., 1994. Analysis of phenolics plant metabolites. In: Lawton, J.H., Likens, G.E. (Eds.), *Methods in Ecology*. Blackwell Scientific Publications Oxford pp.238.
- Westoby, M., Falster, D.S., Moles, A.T., Vesk, P.A., Wright, I.J., 2002. Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33, 125–159.
- Xu, Z.Z., Zhou, G.S., 2007. Photosynthetic recovery of a perennial grass *Leymus chinensis* after different periods of soil drought. *Plant Production Sci.* 10, 277–285.



Laboratorio de Fisiología Vegetal,
Departamento de Ciencias Naturales
Facultades de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Universidad Nacional de Río Cuarto

2016