

Cambios en la anatomía epidérmica foliar de cereales de clima templado en respuesta al frío

Ganem, Darío G.¹; María A. Equiza²; Máximo Lorenzo³; Jorge A. Tognetti^{1,4,5}

¹Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Ruta 226 km 73,5, 7620 Balcarce, Argentina; ²Department of Renewable Resources, University of Alberta, 4-39 Earth Sciences Building, Edmonton, T6G 2E3, Alberta, Canada; ³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Balcarce, Ruta 226 Km 73,5, 7620 Balcarce, Argentina; ⁴Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Argentina; ⁵jtognetti2001@yahoo.com.ar

Ganem, Darío G.; María A. Equiza; Máximo Lorenzo; Jorge A. Tognetti (2014) Cambios en la anatomía epidérmica foliar de cereales de clima templado en respuesta al frío. Rev. Fac. Agron. Vol 113 (2): 157-164

Entre las numerosas respuestas morfo-anatómicas inducidas por el frío en gramíneas de ciclo otoño-inverno-primaveral, los cambios en la anatomía epidérmica han recibido muy poca atención pese a su importancia adaptativa. En este trabajo se estudiaron los cambios inducidos por baja temperatura (5°C, en comparación con los controles a 25°C) en la anatomía epidérmica foliar de trigo, cebada, centeno y avena, incluyendo, para cada especie, un genotipo primaveral y uno invernal, con el propósito de evaluar si la baja temperatura modifica la densidad estomática, el índice estomático y variables relacionadas, así como si existe relación entre la magnitud de estas respuestas y el carácter invernal o primaveral de los genotipos. Se observó una disminución generalizada de la densidad estomática en todos los genotipos a 5°C, en comparación con los controles a 25°C, mostrando los cultivares de tipo invernal la mayor disminución. La caída en densidad estomática estuvo principalmente explicada por un alargamiento de las células epidérmicas entre estomas, y adicionalmente por una menor proporción de filas con estomas, lo que a su vez explica la reducción en el índice estomático a 5°C, observada en varios casos. La longitud de las células estomáticas no fue afectada por la temperatura, difiriendo de reportes previos. Nuestros resultados sugieren que la disminución en densidad estomática a baja temperatura es una respuesta general en gramíneas de ciclo otoño-inverno-primaveral, que es particularmente notable en los genotipos invernales de cada especie. Se discuten posibles mecanismos involucrados e implicancias ecofisiológicas de estas respuestas.

Palabras clave: densidad estomática, índice estomático, baja temperatura, aclimatación, gramíneas

Ganem, Darío G.; María A. Equiza; Máximo Lorenzo; Jorge A. Tognetti (2014) Leaf anatomical changes in temperate cereals in response to low temperature. Rev. Fac. Agron. Vol 113 (2): 157-164

Among the numerous morfo-anatomical responses induced by low temperature in temperate grasses, those related to changes in epidermal anatomy have received little attention despite their adaptive significance. In this work we studied leaf anatomical changes induced by low temperature (5°C, as compared to controls at 25°C) in wheat, barley, rye and oats including, for each species, two genotypes with contrasting cold adaptation responses (one spring and one winter genotype), with the aim of evaluating if low temperature modifies stomatal density, stomatal index and related variables, and whether the magnitude of these responses is linked to genotype characteristics (either spring or winter). A generalized decrease in stomatal density was observed in all genotypes as a consequence of low temperature, but this response was most remarkable in winter cultivars within each species. The decrease in stomatal density was mainly explained by an increased length of inter-stomatal epidermal cells, and additionally by a lower proportion of rows with stomata. This, in turn, would explain the reduction in stomatal index that was observed in several cases. Length of stomatal cells was not affected by temperature, unlike previous reports. Our results suggest that the decrease in stomatal density at low temperature is a general response in temperate grasses, especially in winter genotypes within each species. Possible mechanisms involved and ecophysiological significance of these responses, are discussed.

Key words: stomatal density, stomatal index, low temperature, acclimation, grasses

Recibido: 25/04/2014

Aceptado: 26/01/2015

Disponible on line: 01/03/2015

ISSN 0041-8676 - ISSN (on line) 1669-9513, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina

INTRODUCCIÓN

En plantas de clima templado como las gramíneas de ciclo otoño-inverno-primaveral (O-I-P), la exposición a temperaturas bajas positivas provoca, además de muchas respuestas bioquímicas y fisiológicas (Theocharis et al., 2012; Hüner et al., 2013), diversos cambios morfo-anatómicos tales como el acortamiento de vainas y láminas (Hüner et al., 1998), el incremento en la relación raíz:parte aérea (Equiza et al., 1997; 2001), el incremento en el grosor foliar (con la concomitante disminución del área foliar específica; Hüner et al., 1981; Equiza et al., 2001) y el desarrollo de paredes celulares más gruesas en las células epidérmicas y en la vaina mestomática (Griffith & Brown, 1982; Equiza et al., 2001). Este conjunto de cambios es parte del proceso de aclimatación de las plantas a esta nueva condición térmica, y del desarrollo de un incremento en la capacidad de tolerar posteriormente temperaturas de congelamiento (Levitt, 1980; Guy, 1990; Equiza & Tognetti, 2002).

Los cambios en la anatomía epidérmica han recibido, en contraste, poca atención. Se ha reportado una disminución en la densidad estomática en hojas desarrolladas a bajas temperaturas en centeno (Hüner et al., 1981; Hüner, 1985) y trigo (Equiza et al., 2001), pero en general, se carece de estudios enfocados en evaluar cuáles podrían ser los mecanismos que llevan a esa respuesta. Los cambios en la densidad estomática podrían tener influencia sobre la aclimatación de la planta a bajas temperaturas positivas y también sobre la tolerancia al congelamiento. Las temperaturas de suelo en el rango de 0 a 10°C afectan negativamente la absorción de agua por las raíces debido a aumentos en la viscosidad del agua y en la resistencia radical a la absorción, por lo que una menor proporción de área cubierta por estomas podría contribuir al mantenimiento del estado hídrico de las plantas, particularmente en días con relativamente alta demanda transpiratoria (Equiza et al., 2001). Asimismo, se ha propuesto que los estomas podrían ser puntos de propagación de cristales de hielo en temperaturas de congelamiento (Pearce, 2001), por lo que una disminución en el número de estomas en plantas desarrolladas a baja temperatura podría contribuir a una mayor tolerancia a heladas. Además de la cantidad, el tamaño de los estomas podría jugar un rol importante. Limin & Fowler (1994; 2000) encontraron una moderada correlación inversa entre el tamaño de las células guardianas y la tolerancia al congelamiento en numerosos cultivares de trigo, por lo que propusieron el empleo de ese criterio anatómico en los programas de mejoramiento para resistencia al frío (Limin & Fowler, 1994; 2000). De esta manera, sería importante analizar en un mayor número de gramíneas O-I-P en qué medida tanto la densidad estomática como el tamaño de células guardianas se modifican en respuesta al frío.

Si la disminución en la densidad estomática es una respuesta de aclimatación de las plantas a las bajas temperaturas, cabría esperar que se manifestara en un amplio abanico de especies de tipo similar y que dentro de una especie la magnitud del cambio se encontrara relacionada con la capacidad de tolerancia a las bajas temperaturas de los cultivares. En los cereales de clima

templado existen dentro de una misma especie cultivares primaverales e invernales; estos últimos son los que pueden adquirir mayor tolerancia a heladas cuando las plantas se exponen a temperaturas bajas (Cloutier & Siminovitch, 1982; Fowler et al., 1996; Páldi et al., 2001). De esta manera, también podría esperarse que la disminución en la densidad estomática inducida por bajas temperaturas fuera mayor en los cultivares invernales que en los primaverales dentro de cada especie. Por otra parte, las bases citológicas asociadas a los cambios en la densidad estomática inducidos por las bajas temperaturas han sido escasamente estudiadas (Hüner et al., 1981; Equiza et al., 2001). En las hojas de gramíneas los estomas se disponen en filas de células epidérmicas que contienen, además de las células oclusivas, células inter-estomáticas. Estas filas se encuentran, a su vez, intercaladas con filas de células epidérmicas sin estomas. De esta manera, la disminución de la densidad estomática en hojas desarrolladas a bajas temperaturas podría ser el resultado de: i- una mayor separación espacial entre los estomas, debida a un alargamiento de las células epidérmicas inter-estomáticas, o ii- un cambio en la proporción de células epidérmicas que se diferencian en estomas (i.e. el índice estomático).

En el presente trabajo se estudian los cambios inducidos por baja temperatura (5°C, en comparación con 25°C) en la anatomía foliar de 4 especies de cereales de ciclo O-I-P (trigo, cebada, centeno y avena) incluyendo, para cada especie, un genotipo primaveral, y uno invernal, con el propósito de evaluar i- si la temperatura provoca un descenso generalizado en la densidad y el índice estomáticos, ii- la posibilidad de que los cambios en densidad estomática sean consecuencia de variaciones en el largo de las células interestomáticas, iii- si la temperatura produce una disminución generalizada del tamaño de los estomas, y iv- si existe una relación entre la magnitud de estas respuestas y el carácter, primaveral o invernal, de los cultivares dentro de cada especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de cultivo

Se utilizaron las siguientes especies y cultivares: trigo pan (*Triticum aestivum* L.) cvs. Buck Patacón (tipo primaveral, P) y PROINTA Pincén (tipo invernal, I); cebada forrajera (*Hordeum vulgare* L.) cvs. Mariana INTA (P) y Alicia INTA (I), centeno (*Secale cereale* L.) cvs. Lisandro INTA (P), y Fausto INTA (I); y avena (*Avena sativa* L.) cvs. Máxima INTA (P) y Aurora INTA (I). Debe notarse que en avena las diferencias entre los cultivares empleados en cuanto a adaptación al frío son menores que en las restantes especies, ya que no se cuenta con genotipos contrastantes.

Las semillas se embebieron por 24 h a temperatura ambiente, en cajas de Petri con papel de filtro saturado en agua destilada. Las semillas embebidas se sembraron en macetas plásticas de 12 cm de diámetro y 30 cm de profundidad conteniendo vermiculita de granulometría intermedia, saturada con solución Hoagland diluida (½) (Hoagland & Arnon, 1950). Se sembraron 20 semillas por maceta y se raleó a 10

plantas por maceta luego de la emergencia para lograr mayor uniformidad. El sustrato se mantuvo en condiciones de capacidad de campo durante todo el ensayo. Las macetas fueron colocadas en una cámara de cultivo a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, bajo 250 μmoles de fotones (PAR) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ al tope de las macetas, suministrados por una batería de tubos fluorescentes (Osram Lumilux 820) con un fotoperíodo de 12 horas. A los 8 días, cuando las plantas se encontraban en el estado de la primera hoja verdadera plenamente expandida (lígula visible), la mitad de las macetas fueron transferidas a una cámara de crecimiento a $5 \pm 1^\circ\text{C}$, por lo demás bajo similares condiciones de cultivo, incluyendo irradiancia y fotoperíodo. La temperatura del medio radical en las macetas de las plantas transferidas de 25 a 5°C (medida cada 15 min con termocuplas conectadas a un *datalogger*) disminuyó a una tasa de aproximadamente 2°C h^{-1} , alcanzando una temperatura similar a la de la cámara fría al cabo de 10 h. Las plantas se cultivaron en ambas condiciones de temperatura hasta el estado de 4 hojas plenamente expandidas. En todas las especies y cultivares los análisis anatómicos se realizaron en la cuarta hoja, la cual emergió y se expandió a 25°C o 5°C . Los tratamientos de temperatura no afectaron el contenido relativo de agua (CRA) de la lámina de la hoja más joven totalmente expandida, medido al inicio del período lumínico en plantas al estadio de cuarta hoja, o bien a intervalos de 2h durante las primeras 10h en plantas transferidas de 25 a 5°C , obteniéndose en todos los casos valores de CRA superiores a 96% (no mostrado).

Preparación de las muestras y determinaciones

Sobre la cara abaxial de la cuarta hoja plenamente expandida se aplicó esmalte acrílico incoloro. Una vez seco, se retiró la capa de esmalte empleando una cinta transparente adhesiva. La impronta de las células epidérmicas (que incluyen a los estomas) se fotografió bajo un microscopio binocular Olympus modelo BX51

con una cámara digital Olympus modelo Q-Color 5TM. Las imágenes obtenidas fueron procesadas empleando el software Image-Pro Express 6.0 (Media Cybernetics, Inc. Silver Spring, MD 20910). De cada imagen se seleccionaron al azar 12 sectores de 1 mm^2 , en los cuales se realizaron los recuentos de número total de estomas y de células epidérmicas no estomáticas en la cuadrícula; longitud de células epidérmicas entre estomas; longitud de células estomáticas; número de filas de células con estomas por milímetro de ancho de hoja y número de filas con células epidérmicas no estomáticas entre filas de células con estomas. A partir del número total de estomas y de células epidérmicas no estomáticas en la cuadrícula, se calcularon la densidad estomática (estomas mm^{-2}) y el índice estomático (estomas \times n° total de células $^{-1}$). Es importante notar que, en las filas con estomas, estos se dispusieron en forma alternada con células epidérmicas no estomáticas, en relación 1:1 en todos los preparados observados.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para cada genotipo y condición de temperatura se emplearon 5 macetas, de cada una de las cuales se seleccionaron dos plantas representativas de las que se tomaron las hojas con las que se prepararon las improntas. De cada una de las improntas se seleccionaron los 12 sectores para obtener los recuentos de células enumerados en el punto anterior. Los datos se analizaron por ANOVA utilizando el software Statistica (v. 7.0); las medias se separaron empleando la prueba de Tukey ($P = 0,05$).

RESULTADOS

Densidad e índice estomáticos

En las cuatro especies investigadas las hojas desarrolladas a 5°C presentaron una reducción significativa de la densidad estomática en relación a sus

Tabla 1. Densidad e índice estomáticos en la cara abaxial de la 4ª hoja plenamente expandida de plantas de cultivares primaverales (P) o invernales (I) de trigo, cebada, centeno y avena desarrolladas bajo condiciones controladas a 25°C o a 5°C . Los datos corresponden a la media de 10 plantas (\pm EE). Dentro de cada especie, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Especie	Cultivar	Temperatura	Densidad estomática (estomas mm^{-2})	Índice estomático (%)
Trigo	Patacón (P)	25°C	$27,1 \pm 1,4$ d	$12,8 \pm 0,3$ bc
		5°C	$24,7 \pm 0,8$ c	$13,2 \pm 0,3$ c
	Pincén (I)	25°C	$22,8 \pm 1,5$ b	$11,5 \pm 0,4$ b
		5°C	$11,5 \pm 0,3$ a	$8,6 \pm 0,1$ a
Cebada	Mariana (P)	25°C	$36,4 \pm 0,1$ c	$13,6 \pm 0,1$ c
		5°C	$27,1 \pm 0,2$ b	$11,5 \pm 0,1$ a
	Alicia (I)	25°C	$38,9 \pm 1,5$ d	$13,4 \pm 0,3$ bc
		5°C	$22,9 \pm 1,0$ a	$12,2 \pm 0,3$ b
Centeno	Lisandro (P)	25°C	$36,1 \pm 1,2$ d	$12,5 \pm 0,7$ c
		5°C	$22,6 \pm 0,5$ b	$10,5 \pm 0,2$ a
	Fausto (I)	25°C	$33,7 \pm 0,3$ c	$12,0 \pm 0,1$ bc
		5°C	$20,6 \pm 0,2$ a	$10,9 \pm 0,1$ ab
Avena	Máxima (P)	25°C	$25,4 \pm 1,0$ c	$16,2 \pm 0,6$ b
		5°C	$24,2 \pm 0,1$ b	$12,8 \pm 0,1$ a
	Aurora (I)	25°C	$27,8 \pm 0,4$ d	$16,2 \pm 0,3$ b
		5°C	$21,5 \pm 0,1$ a	$12,8 \pm 0,1$ a

correspondientes controles a 25°C, la cual varió entre 4,7% y 49,7% dependiendo de la especie y del cultivar (Tabla 1). Excepto en centeno, en el que tanto el cultivar primaveral como el invernal mostraron una caída similar en la densidad estomática a 5°C (37,3% y 38,9% para cv. Lisandro y cv. Fausto, respectivamente), en el resto de las especies la caída en la densidad estomática fue mayor en los cultivares invernales que en los respectivos primaverales. Así, en trigo, la densidad estomática de las hojas desarrolladas a 5°C del cultivar primaveral (Patacón) se redujo un 8,7%, y en el invernal (Pincén) un 49,7%. En cebada, la reducción fue del 25,6% en el cultivar primaveral (Mariana) y del 41% en el invernal (Alicia), mientras que en avena la reducción fue del 4,7% en el cultivar primaveral (Máxima) y de 22,6% en el invernal (Aurora). La temperatura tuvo también un efecto significativo en el índice estomático en varios de los cultivares analizados, pero estos cambios no fueron tan marcados como los observados en densidad estomática (Tabla 1). En trigo no hubo diferencias significativas entre tratamientos de temperatura en el cultivar primaveral (Patacón), mientras que en el cultivar invernal (Pincén), el índice estomático fue significativamente menor (25,2%) en las hojas desarrolladas a 5°C. En los cultivares primaverales de cebada y centeno se observó una disminución significativa a 5°C, del 15,4% y 16,0%, respectivamente, mientras que en los cultivares invernales de ambas especies se observó una tendencia a la disminución, que no llegó a ser significativa. En avena el frío causó una reducción significativa en el índice estomático en ambos cultivares (26,3% y 26,4% para Máxima y Aurora, respectivamente).

Longitud de células epidérmicas inter-estomáticas y longitud de células guardianas

El desarrollo de las hojas a 5°C resultó en un incremento significativo en la longitud de las células epidérmicas en todas las especies analizadas (Tabla 2). Asimismo, en trigo, cebada y centeno el incremento en la longitud de las células epidérmicas observado a 5°C fue de mayor magnitud en los cultivares invernales que en los correspondientes cultivares primaverales (103,6% vs 17,9% en trigo, 44,0% vs 19,7% en cebada, y 30,1% vs 18,0% en centeno, cultivar invernal versus primaveral, respectivamente). En avena, el cultivar primaveral (Máxima) fue el único caso en el que la longitud de las células epidérmicas inter-estomáticas no aumentó significativamente a baja temperatura, mientras que en el cultivar invernal se observó un incremento del 25,4% en las hojas desarrolladas a 5°C. Por otra parte, la longitud de las células guardianas no fue afectada por la temperatura excepto en el cultivar invernal de cebada (Alicia), en el que las células guardianas de hojas desarrolladas a 5°C fueron ligera pero significativamente más largas (7,0%) que las correspondientes a 25°C (Tabla 2).

Número de filas de células por unidad de ancho de hoja

El número de filas con estomas por milímetro de ancho de hoja disminuyó significativamente en las hojas desarrolladas a 5°C de ambos cultivares de cebada, centeno y avena, así como en el cultivar invernal de trigo. Los cambios oscilaron entre -12,2% y -33,0%.

Tabla 2. Longitud de células epidérmicas inter-estomáticas (LEpi) y longitud de células guardianas en la cara abaxial de la 4ª hoja plenamente expandida de plantas de cultivares primaverales e invernales de trigo, cebada, centeno y avena desarrolladas bajo condiciones controladas a 25°C o a 5°C. Los datos corresponden a la media de 10 plantas (\pm EE). Dentro de cada especie, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Especie	Cultivar	Temperatura	LEpi (μ m)	Longitud de células guardianas (μ m)
Trigo	Patacón (P)	25°C	138,3 \pm 2,0 b	60,2 \pm 0,2 a
		5°C	162,7 \pm 3,1 c	60,5 \pm 0,1 a
	Pincén (I)	25°C	127,0 \pm 1,5 a	61,2 \pm 0,2 b
		5°C	258,2 \pm 2,0 d	60,6 \pm 0,1 ab
Cebada	Mariana (P)	25°C	96,7 \pm 0,7 b	39,0 \pm 0,2 ab
		5°C	115,9 \pm 1,5 c	37,9 \pm 0,1 a
	Alicia (I)	25°C	88,9 \pm 1,5 a	40,1 \pm 0,4 b
		5°C	127,4 \pm 0,6 d	43,1 \pm 0,3 c
Centeno	Lisandro (P)	25°C	126,1 \pm 1,7 b	43,0 \pm 0,4 b
		5°C	145,9 \pm 1,8 c	42,2 \pm 0,4 b
	Fausto (I)	25°C	101,2 \pm 0,5 a	35,1 \pm 0,4 a
		5°C	128,3 \pm 1,2 b	34,7 \pm 0,1 a
Avena	Máxima (P)	25°C	288,1 \pm 4,6 b	40,4 \pm 0,3 a
		5°C	301,5 \pm 8,2 b	40,3 \pm 0,1 a
	Aurora (I)	25°C	256,7 \pm 2,0 a	47,4 \pm 0,5 b
		5°C	322,2 \pm 3,2 c	47,1 \pm 0,3 b

Solamente en el cultivar primaveral de trigo (Patacón) no se observaron diferencias significativas entre temperaturas. En cebada y en avena, la reducción observada a 5°C fue de similar magnitud en ambos tipos de cultivares, en tanto que en centeno, la caída fue mayor en el cultivar primaveral que en el invernol (Tabla 3).

En todos los casos, los estomas se dispusieron alternados con células epidérmicas normales, en relación 1:1. Debe mencionarse además que en cebada se presentó un patrón de distribución de filas de células con estomas diferente del observado en las otras especies estudiadas, ya que en ambos cultivares a 25°C se encontraron algunas "filas dobles" de células

con estomas, las que no se observaron en plantas a 5°C (Fig. 1).

El número de filas con células epidérmicas no estomáticas entre filas de células con estomas se incrementó significativamente en las hojas desarrolladas a 5°C en todos los cultivares invernales de las cuatro especies analizadas, así como en los cultivares primaverales de centeno y avena. Los incrementos variaron entre 10,7 y 70,5 % (cebada Mariana y trigo Pincén, respectivamente). No se observaron diferencias significativas entre temperaturas en los cultivares primaverales de trigo y cebada (Tabla 3).

Tabla 3. Número de filas de células con estomas por milímetro de ancho de hoja (NFE) y número de filas de células epidérmicas sin estomas entre filas con estomas (NFEpi) en la cara abaxial de la 4ª hoja plenamente expandida de plantas de cultivares primaverales e invernales de trigo, cebada, centeno y avena desarrolladas bajo condiciones controladas a 25°C o a 5°C. Los datos corresponden a la media de 10 plantas (\pm EE). Dentro de cada especie, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Especie	Cultivar	Temperatura	NFE (mm^{-1})	NFEpi
Trigo	Patacón (P)	25°C	5,71 \pm 0,17 b	5,54 \pm 0,04 ab
		5°C	5,60 \pm 0,21 b	5,70 \pm 0,04 b
	Pincén (I)	25°C	5,14 \pm 0,19 b	4,81 \pm 0,07 a
		5°C	3,85 \pm 0,02 a	8,21 \pm 0,09 c
Cebada	Mariana (P)	25°C	5,63 \pm 0,04 b	5,57 \pm 0,04 a
		5°C	4,85 \pm 0,06 a	5,82 \pm 0,05 a
	Alicia (I)	25°C	5,57 \pm 0,23 b	5,45 \pm 0,06 a
		5°C	4,57 \pm 0,17 a	6,31 \pm 0,05 b
Centeno	Lisandro (P)	25°C	6,67 \pm 0,30 c	5,66 \pm 0,03 c
		5°C	4,47 \pm 0,09 a	6,35 \pm 0,06 d
	Fausto (I)	25°C	5,54 \pm 0,05 b	4,28 \pm 0,02 a
		5°C	4,87 \pm 0,03 a	5,05 \pm 0,05 b
Avena	Máxima (P)	25°C	7,74 \pm 0,35 b	5,50 \pm 0,07 a
		5°C	5,87 \pm 0,04 a	6,09 \pm 0,04 b
	Aurora (I)	25°C	7,79 \pm 0,20 b	5,25 \pm 0,07 a
		5°C	5,87 \pm 0,04 a	5,96 \pm 0,04 b

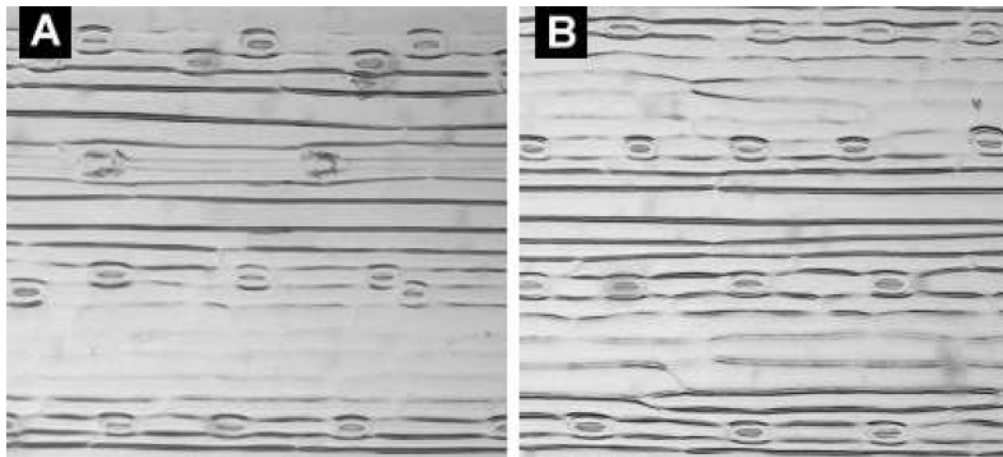


Figura 1. Fotografías de improntas de epidermis de la cara abaxial de la 4ª hoja plenamente expandida de cebada cv Alicia a 25°C (A) o a 5°C (B), apreciándose filas dobles de estomas en las hojas desarrolladas a la temperatura más alta.

El número total de filas de células por milímetro de ancho de hoja no fue afectado por la temperatura en 6 de los 8 genotipos estudiados (no mostrado). Solamente se observó una disminución significativa a 5°C en el cultivar primaveral de centeno, Lisandro, y en el cultivar invernal de cebada, Alicia, en los que los cambios fueron de -18,0% y -15,7%, respectivamente.

Relaciones entre la densidad estomática y variables relacionadas con la anatomía epidérmica

Para evaluar en qué medida la disminución en la densidad estomática como consecuencia del frío puede ser explicada por el incremento en la longitud de las células epidérmicas inter-estomáticas, o bien por el incremento del número de filas no estomáticas entre filas con estomas, se realizó un análisis de regresión tomando los datos de los 8 genotipos estudiados (Fig. 2). Las regresiones fueron significativas para ambas variables, pero la caída en densidad estomática se mostró más correlacionada con el incremento en la longitud de las células epidérmicas inter-estomáticas que con el incremento del número de filas no estomáticas entre filas con estomas ($r^2 = 0,72$; $P = 0,008$ y $r^2 = 0,54$; $P = 0,038$, respectivamente).

DISCUSIÓN

En las cuatro especies de gramíneas estudiadas la densidad estomática de las láminas foliares se redujo en las plantas cultivadas a 5°C con respecto a las mantenidas a 25°C. Esto coincide con lo observado por Hüner et al. (1981) y Hüner (1985) en un cultivar de centeno y por Equiza et al. (2001) y Equiza & Tognetti (2002) en varios genotipos de trigo. En el presente

trabajo, las mayores diferencias se observaron generalmente en los cultivares invernales de cada especie, excepto en centeno, en que se registraron porcentajes similares de disminución en ambos cultivares. Para el conjunto de genotipos evaluados, la disminución de la densidad estomática inducida por el frío se encontró explicada principalmente por el incremento en el largo de células epidérmicas inter-estomáticas y en menor medida por una menor proporción de filas con estomas (Fig. 2). Tanto el alargamiento de las células epidérmicas como la reducción en el número de filas con estomas a 5°C fueron significativos en 7 de los 8 genotipos estudiados, siendo las excepciones los cultivares primaverales de avena y trigo, respectivamente. El alargamiento de las células inter-estomáticas observado en frío podría asociarse a una disminución de la actividad de peroxidasas extracelulares (enzimas claves en la rigidificación de las paredes) en la zona en expansión foliar, que fue observada previamente en el cultivar invernal Pincén, pero no en el cultivar primaveral Patacón (Lorenzo et al., 2009). Por otra parte, la diferenciación de un menor número de filas de células con estomas en frío estuvo fuertemente asociada con un aumento del número de filas epidérmicas entre estomas en las plantas cultivadas a 5°C (Tabla 3). Esta respuesta, que implica cambios en la diferenciación celular en los ápices, podría relacionarse con la mayor acumulación de azúcares a bajas temperaturas en trigos invernales que en primaverales (Equiza et al., 1997; Equiza & Tognetti, 2002), ya que se ha propuesto que los azúcares (posiblemente sacarosa) constituirían una señal traslocada desde las hojas maduras al ápice que inhibiría la diferenciación de estomas en los meristemas (Coupe et al., 2006). Por otra parte, la

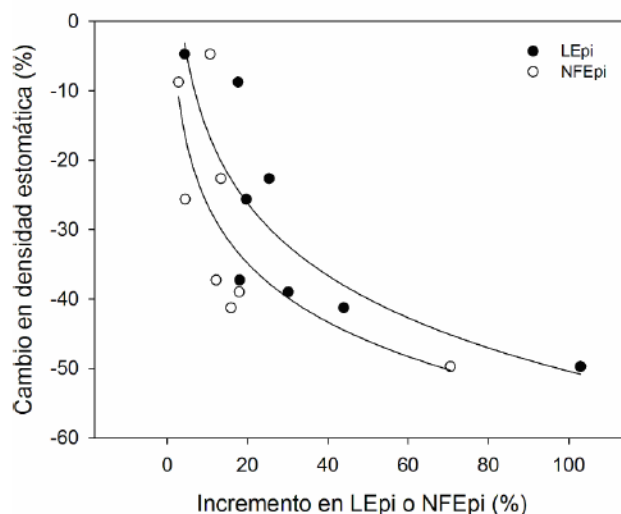


Figura 2. Reducción porcentual de la densidad estomática a 5°C (respecto de 25°C) en función del incremento porcentual de la longitud de células epidérmicas (LEpi) y del incremento porcentual en el número de filas de células epidérmicas entre filas con estomas (NFEpi). Para cada variable, los puntos corresponden a los 8 genotipos estudiados. Las ecuaciones ajustadas fueron: $y = 18,9 - 15,0 \ln x$ ($r^2 = 0,72$) para el incremento en LEpi, y $y = 1,8 - 12,2 \ln x$ ($r^2 = 0,54$) para el incremento en NFEpi.

ausencia de cambios en el número de filas de células por milímetro de ancho de hoja en 6 de los genotipos estudiados sugiere que el ensanchamiento celular tiene una contribución menor en la disminución de la densidad estomática a baja temperatura. No obstante, en el cultivar de cebada Alicia (invernal) y en el cultivar de centeno Lisandro (primaveral) el número de filas totales disminuyó significativamente a 5°C, sugiriendo un incremento en el ancho de las células.

El índice estomático fue menos afectado por la temperatura que la densidad estomática. Si bien se observó una tendencia a la disminución por frío en la mayoría de los casos, sólo en 5 de los 8 genotipos estudiados las diferencias fueron significativas, y aún en estos casos, las magnitudes de los cambios entre tratamientos de temperatura fueron generalmente menores que las observadas en la densidad estomática. En todos los casos en que el índice estomático disminuyó, se observó asimismo una reducción en el número de filas con estomas por unidad de ancho de hoja (Tablas 1 y 3). En cambio, la proporción de estomas dentro de cada fila fue constante. El índice estomático es comúnmente usado en estudios paleo-climáticos para estimar la concentración de CO₂ atmosférico, a través de mediciones en hojas fósiles de diversas especies arbóreas (Beerling et al., 1999; Royer, 2001; Li-Qun et al., 2001; Beerling & Royer, 2002; Retallack, 2002). No obstante, existen evidencias de que la temperatura podría también afectarlo, como reportaron Beerling & Chaloner (1993) para *Quercus robur*. El efecto de la temperatura sobre el índice estomático evidenciado en el presente trabajo también cuestiona la rigurosidad del empleo de esta variable para la estimación de las concentraciones atmosféricas de CO₂.

En general, no se encontró una asociación clara entre la longitud de las células guardianas y el carácter invernal o primaveral del genotipo (Tabla 2). Por ejemplo, el cultivar invernal de centeno tuvo células guardianas más largas que el primaveral, pero lo opuesto ocurrió en avena, independientemente de la temperatura, mientras que no hubo diferencias entre cultivares en trigo y cebada. Si bien estudios previos en diversos cultivares de trigo han sugerido que el tamaño de estomas puede ser un parámetro útil en los programas de mejoramiento para tolerancia a heladas (Limin & Fowler 1994; 2000), nuestros datos cuestionan su posible empleo en gramíneas de ciclo O-I-P.

La generalidad de la disminución en la densidad estomática en frío, especialmente en los cultivares invernales de cada especie, es consistente con un posible rol de esta respuesta en la aclimatación de las plantas a las bajas temperaturas. Por una parte, una disminución en la superficie cubierta con estomas podría contribuir al mantenimiento del estado hídrico a bajas temperaturas, particularmente durante períodos en que la demanda transpiratoria es relativamente alta (Equiza et al., 2001 y Equiza & Tognetti, 2002). La densidad estomática se encuentra asociada con la tasa transpiratoria, como mostraron Doheny-Adams et al. (2012) empleando mutantes de *Arabidopsis*, y existen evidencias de una disminución de la conductancia estomática y de la tasa transpiratoria en trigo y centeno como consecuencia de la aclimatación al frío (Dahal et al., 2012). Sería importante establecer el posible

impacto de estas respuestas sobre la eficiencia de uso del agua a bajas temperaturas, teniendo en cuenta que disminuciones en la conductancia estomática afectan generalmente más al intercambio de vapor de agua que al de CO₂ (Jones, 1993; Abbate et al., 2004). Por otra parte, la reducción en la densidad estomática sería también consistente con el posible rol de los estomas en la propagación del hielo en los tejidos (Pearce, 2001). En las láminas de las gramíneas los cristales de hielo que se forman sobre la superficie ingresan a los tejidos a través de estomas o de sectores dañados de la cutícula (Gusta & Wisniewski 2007) y posteriormente se propagan muy rápidamente en el interior de las láminas (entre 1 y 4 cm s⁻¹; Pearce & Fuller, 2001). La posibilidad de que la menor densidad estomática de las plantas aclimatadas al frío pueda reducir la propagación de hielo en el interior de las láminas merece ser estudiada en profundidad. Si bien no fue el objetivo de nuestro trabajo, nuestros resultados indican que las especies y cultivares seleccionados pueden ser de gran utilidad en estudios futuros enfocados a esta hipótesis.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que la disminución en la densidad estomática a baja temperatura es una respuesta general en gramíneas de ciclo otoño-inverno-primaveral, y que la magnitud de la respuesta se encuentra asociada con la capacidad de adaptación al frío de los genotipos dentro de cada especie. La disminución en la densidad estomática sería la consecuencia del alargamiento de las células interestomáticas y, en menor medida, del desarrollo de una menor proporción de filas con estomas, que a su vez llevaría a una disminución en el índice estomático en plantas desarrolladas a baja temperatura. Los resultados obtenidos en este trabajo no sustentan el empleo del largo estomático como criterio de mejoramiento para tolerancia al frío, como había sido propuesto previamente. La elucidación de los mecanismos fisiológicos involucrados en estas respuestas, así como el impacto de las mismas sobre el funcionamiento de la planta en períodos de bajas temperaturas positivas y de congelamiento requiere estudios específicos.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a los Ings. H. Bariffi, (INTA Balcarce) y J.C. Tomaso (INTA Bordenave) por el generoso aporte de las semillas empleadas en este estudio. Este trabajo fue financiado mediante subsidios otorgados por la Universidad Nacional de Mar del Plata (AGR 427/13) y por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

BIBLIOGRAFÍA

Abbate, P.E., J.L. Dardanelli, M.G. Cantarero, M. Maturano, R.J.M. Melchiori & E.E. Suero. 2004. Climatic and water availability effects on water-use efficiency in wheat. *Crop Science*. 44: 474-483.

- Beerling, D.J. & W.G. Chaloner.** 1993. The impact of atmospheric CO₂ and temperature changes on stomatal density: observation from *Quercus robur* lammas leaves. *Annals of Botany*. 71: 231-235.
- Beerling, D.J. & D.L. Royer.** 2002. Reading a CO₂ signal from fossil stomata. *New Phytologist*. 153: 387-397.
- Beerling, D.J., J.C. McElwain & C.P. Osborne.** 1999. Stomatal responses of the 'living fossil' *Ginkgo biloba* L. to changes in atmospheric CO₂ concentrations. *Journal of Experimental Botany*. 49: 1603-1607.
- Cloutier, Y. & D. Siminovitch.** 1982. Correlation between cold-and drought-induced frost hardiness in winter wheat and rye varieties. *Plant Physiology*. 69: 256-258
- Coupe, S.A., B.G. Palmer, J.A. Lake, S.A. Overy, K. Oxborough, F.I. Woodward, J.E. Gray & W.P. Quick.** 2006. Systemic signalling of environmental cues in *Arabidopsis* leaves. *Journal of Experimental Botany*. 57: 329-341.
- Dahal, K., K. Kane, F. Sarhan, B. Grodzinski & N.P.A. Hüner.** 2012. Cold acclimation inhibits CO₂-dependent stimulation of photosynthesis in spring wheat and spring rye. *Botany*. 90: 433-444.
- Doheny-Adams, T., L. Hunt, P.J. Franks, D.J. Beerling & J.E. Gray.** 2012. Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 367: 547-555.
- Equiza, M.A. & J.A. Tognetti.** 2002. Morphological plasticity of spring and winter wheats in response to changing temperatures. *Functional Plant Biology*. 29: 1427-1436.
- Equiza, M.A., J.P. Miravé & J.A. Tognetti.** 1997. Differential root vs. shoot growth inhibition and its relationship with carbohydrate accumulation at low temperature in different wheat cultivars. *Annals of Botany*. 80: 657-663.
- Equiza, M.A., J.P. Miravé & J.A. Tognetti.** 2001. Morphological, anatomical and physiological responses related to differential shoot vs. root growth inhibition at low temperature in spring and winter wheat. *Annals of Botany*. 87: 67-76.
- Fowler, D.B., A.E. Limin, S.Y. Wang & R.W. Ward.** 1996. Relationship between low-temperature tolerance and vernalization response in wheat and rye. *Canadian Journal of Plant Science*. 76: 37-42.
- Griffith, M. & G.N. Brown.** 1982. Cell wall deposits in winter rye *Secale cereal* 'Puma' during cold acclimation. *Botanical Gazette*. 143: 486-490.
- Gusta, L.V. & M. Wisniewski.** 2007. Frost tolerance in plants. En: *Plant Stress Physiology*. Shabala, S., Ed. CAB Internacional, Oxfordshire - Cambridge, pp. 132-147.
- Guy, C.L.** 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 41:187-223
- Hoagland, D.R. & D.I. Arnon.** 1950. The water culture method for growing plants without soil. University of California Agricultural Experimental Station Circular N° 347.
- Hüner, N.P.A.** 1985. Morphological, anatomical and molecular consequences of growth and development at low temperature in *Secale cereale* L. cv. Puma. *American Journal of Botany* 72: 1290-1306.
- Hüner, N.P.A., G. Oquist & F. Sarhan.** 1998. Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science*. 3: 224-230.
- Hüner, N.P.A., J.P. Palta, P-H. Li & J.V. Carter.** 1981. Anatomical changes in leaves of Puma rye in response to growth at cold-hardening temperatures. *Botanical Gazette*. 142: 55-62.
- Hüner, N.P.A., R. Bode, K. Dahal, F.A. Busch, M. Possmayer, B. Szyszka, D. Rosso, I. Ensminger, M. Krol, A.G. Ivanov & D.P. Maxwell.** 2013. Shedding some light on cold acclimation, cold adaptation, and phenotypic plasticity. *Botany*. 91: 127-136.
- Jones, H.G.** 1993. Drought tolerance and water-use efficiency. En: *Plant responses from cell to community*. Smith, J.A.C. & H. Griffillis, Eds. Bios Scientific Publishers, Oxford, pp. 193-202.
- Levitt, J.** 1980. Responses of plants to environmental stresses, vol 1: Chilling, freezing and high temperature stress. Academic Press, New York.
- Li-Qun, C., C.-S. Li, W.G. Chaloner, D.J. Beerling & Q.-G. Sun.** 2001. Assessing the potential for the stomatal characters of extant and fossil *Ginkgo* leaves to signal atmospheric CO₂ change. *American Journal of Botany*. 88: 1309-1315
- Limin, A.E., & D.B. Fowler.** 1994. Relationship between guard cell length and cold hardiness in wheat. *Canadian Journal of Plant Science* 74: 59-62.
- Limin, A.E. & D.B. Fowler.** 2000. Morphological and cytological characters associated with low-temperature tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Canadian Journal of Plant Science*. 80: 687-692.
- Lorenzo, M., M.L. Pinedo, A. Cerrudo & J.A. Tognetti.** 2009. Apoplastic peroxidase activity in wheat leaves are involved with the low temperature response. *Biocell* 33 (supl.):126.
- Páldi E., G. Szalai, T. Janda, E. Horváth, I. Rácz & D. Lásztity.** 2001. Determination of frost tolerance in winter wheat and barley at the seedling stage. *Biologia Plantarum*. 44: 145-147
- Pearce, R.S.** 2001. Plant freezing and damage. *Annals of Botany*. 87: 417-424.
- Pearce, R.S. & M.P. Fuller.** 2001. Freezing of barley studied by infrared video thermography. *Plant Physiology*. 125: 227-240.
- Retallack, G.J.** 2002. Carbon dioxide and climate over the past 300Myr. *Philosophical Transactions of the Royal Society London A* 360: 659-673
- Royer, D L.** 2001. Stomatal density and stomatal index as indicators of paleoatmospheric CO₂ concentration. *Review of Palaeobotany and Palynology*. 114: 1-28.
- Theocharis, A., C. Clément & E.A. Barka.** 2012. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta* 235: 1091-1105.