

**“ACUMULACIÓN DIFERENCIAL DE NUTRIENTES MINERALES Y  
ELEMENTOS TRAZA EN *PANICUM VIRGATUM* EN RESPUESTA A  
SEQUÍA.”**

---

**Autor: Peralta Laura Antonela**

**Director: Molas, María Lía**

**Co-director: Camiña, José**

**Carrera: Ingeniería Agronómica.**

**Institución: Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de La Pampa.**

**Año: 2017**

## Índice

1. Resumen.....	pág. 2
2. Introducción.....	pág. 3
2.1.Efecto de macro y micronutrientes en el crecimiento vegetal.....	pág. 4
2.2 Objetivos.....	pág. 5
3. Materiales y Métodos.....	pág. 6
3.1. Ensayo de crecimiento.....	pág. 6
3.2. Tratamiento de muestra y análisis instrumental.....	pág. 7
4. Resultados y Discusión.....	pág. 8
4.1. Análisis de variables morfo-fisiológicas.....	pág. 8
4.2. Análisis elemental.....	pág. 14
4.3. Diferencias entre cultivares y entre tratamientos.....	pág. 15
4.4 Efecto de los elementos sobre las funciones biológicas y crecimiento vegetal.....	pág. 16
4.4.1 Silicio.....	pág. 16
4.4.2 Zinc.....	pág. 17
4.4.3 Hierro.....	pág. 19
4.4.4 Bario.....	pág. 20
4.4.5 Sodio.....	pág. 21
4.4.6 Níquel.....	pág. 23
4.4.7 Cromo.....	pág. 24
4.5 Análisis multivariado.....	pág. 25
4.5.1 Modelo multivariado (PCA-1).....	pág. 25
4.5.2 Modelo multivariado (PCA-2).....	pág. 28
5. Conclusiones.....	pág. 31
6. Bibliografía.....	pág. 33

## 1. RESUMEN

En el marco de la investigación de *Panicum virgatum* L. (pasto varilla) para la producción de forraje en regiones semiáridas, se investigó el comportamiento de dos cultivares de esta especie con comportamiento contrastante en situación de déficit hídrico. Este trabajo compara los cultivares Kanlow y Greenville (tolerante y susceptible respectivamente), mediante el análisis de variables morfo-fisiológicas y del perfil de elementos traza. Se ha propuesto que bajo condiciones de estrés hídrico, la absorción de nutrientes se ve reducida y que en el material genético con mayor tolerancia a sequía la absorción de nutrientes es mayor en comparación con los materiales susceptibles. Asimismo, se piensa que existe una absorción diferencial de elementos minerales en situación de estrés, de manera que se vería favorecida la absorción de ciertos elementos en relación a otros. Para analizar este postulado, se realizó un ensayo en invernáculo, durante 92 días desde la siembra y se efectuó en macetas de 12 cm de diámetro por 50 cm de altura conteniendo suelo representativo de la zona. El diseño experimental fue completamente aleatorizado con 20 repeticiones. Las macetas se mantuvieron bajo riego a capacidad de campo (control) y a los 40 días desde la siembra se suspendió el riego (sequía). Desde el inicio del tratamiento de estrés y con una frecuencia de 3 veces por semana se registraron datos de altura de planta, número de hojas verdes, número de macollos, número de hojas por macollos. Al finalizar el periodo de estrés se midió potencial agua (con bomba de Scholander), el contenido relativo de agua (CRA), peso seco parte aérea, área foliar, peso seco raíz, número final panojas. Se determinó la concentración de micronutrientes con un espectrómetro de emisión atómica por plasma acoplado inductivamente (ICP-AES). Los datos se analizaron mediante ANOVA y LSD; y análisis multivariado de clasificación mediante análisis de componentes principales (PCA). Se encontraron diferencias en los niveles de Si, Fe, Ba y Zn entre el ecotipo de tierras bajas (cv. Kanlow) y el de tierras altas (cv. Greenville), inherentes a la composición genética de cada cultivar. Excepto el Si, el resto de los minerales presentó mayor concentración en el cultivar Kanlow. Mediante análisis multivariado se observó que el cv. Kanlow posee mayor concentración de Li y Zn en comparación a Greenville, siendo estas diferencias atribuibles al genotipo de ambos cultivares. Por su parte, en condiciones de sequía la concentración de Cr y Ni (otros dos metales pesados) se incrementaron, mientras que Na disminuyó su nivel. Los altos niveles encontrados de los elementos Zn, Cr y Ni permiten pensar en la capacidad de esta especie para recuperar suelos contaminados con metales pesados. Otro punto a destacar son los bajos niveles de Na encontrados en ambos cultivares en situación de sequía -una estrategia frecuente en especies tolerantes a salinidad- lo que permitiría pensar en este pasto como una alternativa para ser utilizado en suelos salinos. Lo expuesto fortalece el concepto del uso de esta gramínea en la región semiárida pampeana, donde la limitación hídrica y salina es un componente recurrente.

Palabras claves: Ionomica - Estrés hídrico – Macro y Micronutrientes.

## 2. INTRODUCCIÓN

*Panicum virgatum* (Pasto varilla) es una especie perenne de clima templado originaria de las praderas de Estados Unidos que constituye una importante fuente de alimento para el ganado y está siendo intensamente estudiada como fuente de biomasa celulósica para la producción de bioetanol, que constituye en la actualidad una de las fuentes energéticas alternativas más utilizada en el mundo. Además de su uso en bioetanol, el pasto varilla es utilizado como forraje, produciendo un denso canopeo y un extenso sistema radical que por su alta eficiencia en la utilización de nutrientes y agua del suelo, se adapta muy bien a climas semiáridos. Esto, sumado al carácter perenne de la especie, reduce los costos de producción. Esta cualidad hace que *Panicum virgatum* sea un vegetal de interés en suelos con déficit hídrico (ya sea crónico en las regiones climáticas con baja disponibilidad de agua, o azaroso e impredecible debido a los cambios en las condiciones climáticas durante el período de crecimiento de las plantas) siendo este uno de los factores más limitantes para los cultivos y para la producción de forraje en las regiones semiáridas y áridas. Por ello, las gramíneas tolerantes a sequía son especies que se establecen, crecen y sobreviven durante los períodos de sequía, y además pueden tener buenos rendimientos económicos y buena calidad en estas regiones.

En este contexto, la identificación de material genético de *Panicum virgatum* con buen comportamiento a estrés hídrico durante el crecimiento temprano es crucial si se pretende difundir su uso comercial y expandir el área cultivada. Así, se ha propuesto que bajo condiciones de estrés hídrico, la absorción de nutrientes se ve reducida y que en el material genético con mayor tolerancia a sequía la absorción de nutrientes es mayor en comparación con los materiales susceptibles. Asimismo, se piensa que existe una absorción diferencial de elementos minerales en situación de estrés, de manera que se vería favorecida la absorción de ciertos elementos en relación a otros.

Durante la evolución de las angiospermas, se seleccionaron para el metabolismo básico sólo 19 elementos: C, O, H, Mg, S, N, Ca, P, y K (macronutrientes) y Cu, Zn, Mn, Fe, Mo, B, Ni, Co, Cl, y B (micronutrientes) (Ernst, 2006). El silicio (Si), si bien es un elemento no esencial, se considera como un elemento beneficioso, y se ha informado que está involucrado en el mantenimiento de las estructuras de algunas plantas (Epstein, 1999). Estos elementos son considerados como esenciales porque en su ausencia la planta no puede completar su ciclo de vida. Los nutrientes minerales esenciales incluyen todos aquellos elementos químicos que normalmente son absorbidos de la solución del suelo por las plantas superiores. Se excluyen C, H y O, que comprenden más de 99% de las hojas metabólicamente activas y el 90 a 95% de su materia seca. Los nutrientes minerales esenciales comprenden menos del 1% de la masa fresca en hojas y el 5-10% de su materia seca; sin embargo, dentro de esta pequeña proporción, los 14 o 15 elementos deben estar presentes en adecuadas cantidades para el crecimiento y la reproducción de la planta.

Históricamente, los nutrientes esenciales se han clasificado en dos grupos en función de las cantidades requeridas por las plantas: macronutrientes y micronutrientes, y tal convención ha

sido ampliamente adoptada por la comunidad científica. Esta distinción refleja la secuencia histórica y experimental en el descubrimiento de nutrientes esenciales. A raíz de los avances en la química del siglo XIX, la esencialidad de los macronutrientes fue relativamente fácil de probar. Sin embargo, la esencialidad de los micronutrientes (con excepción del Fe) fue difícil de establecer, ya que para su detección se requiere de una muestra libre de interferencias debido a la presencia de los macronutrientes, así como libre de contaminación debida al agua y de otras fuentes ambientales.

Macro y micronutrientes juegan un papel importante en procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas tales como la biosíntesis de la clorofila, fotosíntesis, síntesis de ADN, modificaciones de las proteínas, reacciones redox en el cloroplasto y la mitocondria, el metabolismo del azúcar, y fijación de nitrógeno.

En este sentido, el Zn es un cofactor para más de 300 enzimas y 200 factores de transcripción asociados con el mantenimiento de la integridad de la membrana, el metabolismo de la auxina, y la reproducción (Marschner, 1995; Barker y Pilbeam, 2007; Briat et al., 2007; Williams y Pittman, 2010; Prasad, 2012; Ricachenevsky et al., 2013).

Sin embargo, en concentraciones elevadas, ciertos elementos de transición producen síntomas graves de toxicidad en las plantas, y por lo tanto, su absorción y utilización están estrechamente controlados por las células vegetales (Janicka-Russak et al, 2008; Saito et al., 2010.; Singh et al, 2012.; Srivastava et al, 2012.; Dal Corso et al, 2013A.; Farías et al, 2013.; Fidalgo et al., 2013). Así, los llamados metales pesados, tales como Cd, Cr, Pb y Hg, no son esenciales y no se les ha asignado aun función fisiológica, pero resultan altamente tóxicos a muy bajas concentraciones (Ernst et al, 2008; Janicka-Russak, et al.2008; Garzón et al., 2011; Hayat y cols, 2012.; Shahid et al, 2012.; Chong-Qing et al, 2013.; Gill et al., 2013).

Los elementos minerales, además de ser necesarios para el crecimiento y desarrollo de la planta, juegan un rol importante en la tolerancia a estrés hídrico (Habibi 2014). Los micronutrientes zinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), boro (B), molibdeno (Mo), cloro (Cl) y níquel (Ni) son componentes importantes para un mejor crecimiento y desarrollo de las plantas (Waraich et al., 2011), y también para la tolerancia al estrés. Ha sido bien documentado el efecto beneficioso de elementos tales como el aluminio (Al), cobalto (Co), sodio (Na), selenio (Se), y silicio (Si) y su influencia positiva en el crecimiento vegetal y la resistencia al estrés (Pilon-Smits et al., 2009). Estos nutrientes están implicados en el aumento de resistencia de la planta a los dos factores de estrés biótico y abiótico que le permiten sobrevivir y mantener la productividad (Marschner, 1995; Waraich et al, 2011).

### **2.1.Efecto de macro y micronutrientes en el crecimiento vegetal**

Los posibles mecanismos de mejora de la tolerancia a estrés, medidos por micronutrientes, no han sido completamente explicados. De hecho, la capacidad de los microelementos para mitigar el estrés ambiental se puede atribuir a varios mecanismos diferentes. Algunos de estos oligoelementos son beneficiosos y tienen un papel funcional durante el crecimiento de la planta y su productividad en condiciones diversas.

Por todo lo expuesto, en este trabajo se presentan los resultados del estudio de la composición de elementos minerales que se acumulan en plantas de dos cultivares de *Panicum virgatum*. Asimismo, se analizó su comportamiento en situación de buena provisión de agua y frente a un estrés hídrico, en cuanto a características morfofisiológicas.

## **2.2.Objetivos**

Los objetivos de este trabajo fueron:

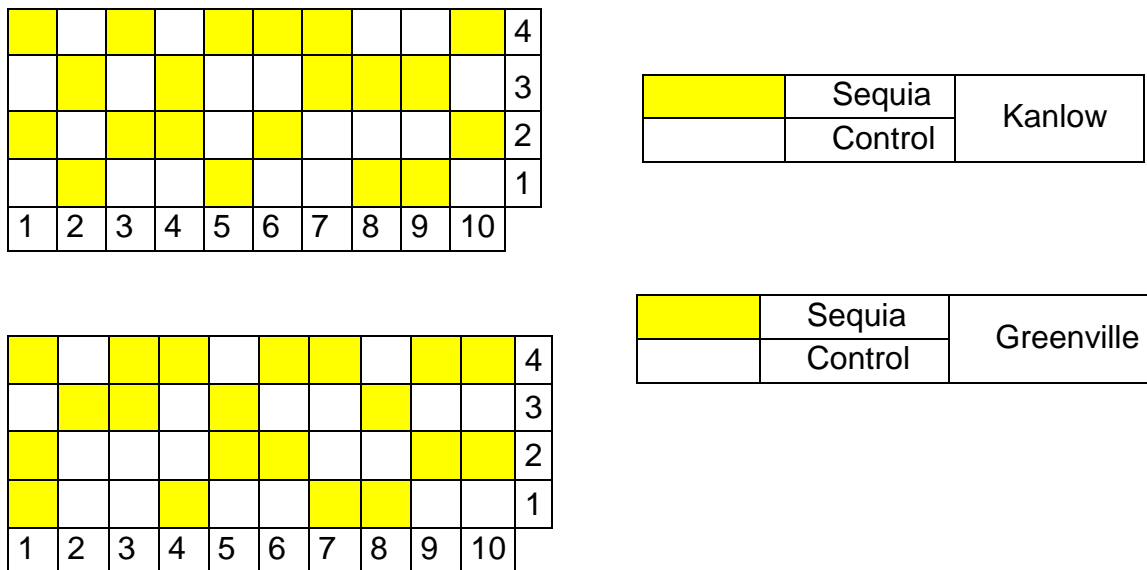
1. Evaluar las variables morfo-fisiológicas en respuesta a estrés hídrico de dos cultivares contrastantes en su tolerancia a sequía (Kanlow y Greenville, tolerante y susceptible respectivamente).
2. Evaluar el contenido de cenizas y del perfil de elementos minerales en condiciones de estrés hídrico en dos cultivares contrastantes en su tolerancia a sequía.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ensayo de crecimiento

El ensayo se llevó a cabo en el invernáculo de la Facultad de Agronomía de la UNLPam ( $36^{\circ}33'21.76''S$ ;  $64^{\circ}18'05.75''O$ ) en dos cultivares de *Panicum virgatum*: variedad Kanlow y variedad Greenville, con comportamientos contrastantes, con el propósito de comparar su tolerancia a estrés hídrico y la absorción diferencial de elementos traza. El ensayo se efectuó en macetas de 12 cm de diámetro por 50 cm de altura conteniendo suelo representativo de la zona. La siembra de ambas variedades se realizó el día 15 de febrero de 2012. Se sembraron 10 semillas por macetas procediéndose a un raleo parcial el día 5 de marzo (20 días desde la siembra) y el raleo definitivo el día 12 de marzo (27 días desde la siembra) dejando una planta por maceta.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado con 20 repeticiones. Las macetas se mantuvieron bajo riego a capacidad de campo hasta el día 26 de marzo (40 días desde la siembra). A partir de ese momento se suspendió el riego a las macetas correspondientes al tratamiento de sequía; se continuó con el riego de las macetas utilizadas como control. Los tratamientos fueron distribuidos al azar tal como se muestran en la Figura 1:



**Figura 1.** Diseño de experimentos para el estudio de las variedades de Panicum.

El estrés hídrico se impuso durante 49 días posteriores a la suspensión del riego (91 días desde la siembra). Desde el inicio del tratamiento de estrés y con una frecuencia de 3 veces por semana se registraron datos de altura de planta, número de hojas verdes, número de macollos, número de hojas por macollos. Al finalizar el periodo de estrés se midió potencial agua (con bomba de Scholander), el contenido relativo de agua (CRA), peso seco parte aérea, área foliar, peso seco raíz, número final panojas. También se calculó la relación raíz parte aérea y área foliar específica.

### **3.2. Tratamiento de muestra y análisis instrumental**

Luego de concluido el crecimiento en invernáculo, se extrajeron las raíces mediante lavado y filtrado de las mismas con dos mallas de tejido de diferente tamaño. Las raíces fueron colectadas y secadas en estufa a 60 ° durante tres días. Para la determinación de la absorción diferencial de micronutrientes se realizaron en muestras por cuadruplicado (cada muestra consistió en un pool de 5 plantas) de cada tratamiento (Greenville control, Greenville sequía, Kanlow control y Kanlow sequia) y fueron analizadas por un espectrómetro de emisión atómica por plasma acoplado inductivamente ICP-AES Varian Vista-PRO, perteneciente a la Empresa Alex Stewart (Assayers) Argentina S.A (Mendoza, Argentina).

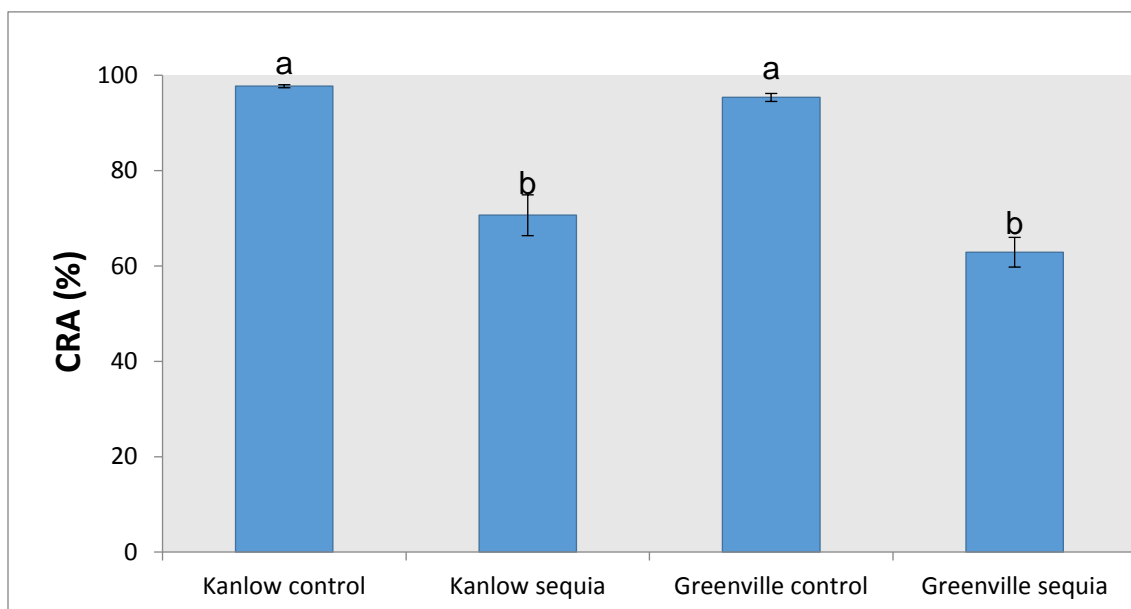
Se tomaron 10 réplicas para el análisis de las variables peso seco de raíz y raíz/parte aérea y 4 réplicas para el análisis de elementos. Los datos se analizaron mediante ANOVA (Prueba de Tuckey y LSD), mediante el software InfoStat (2008 – 2013). Asimismo, los datos multielementales obtenidos por ICP-AES, se estudiaron utilizando análisis multivariado de clasificación mediante análisis de componentes principales (PCA). Los modelos de clasificación obtenidos fueron obtenidos utilizando el programa Unscrambler X 10.3 (Camo, Trondheim, Noruega) empleando como datos originales las concentraciones elementales halladas mediante ICP-AES en cada muestra, con datos centrados por columna para evitar la sobreestimación de variables por diferencias en las magnitudes de concentración.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Análisis de variables morfo-fisiológicas

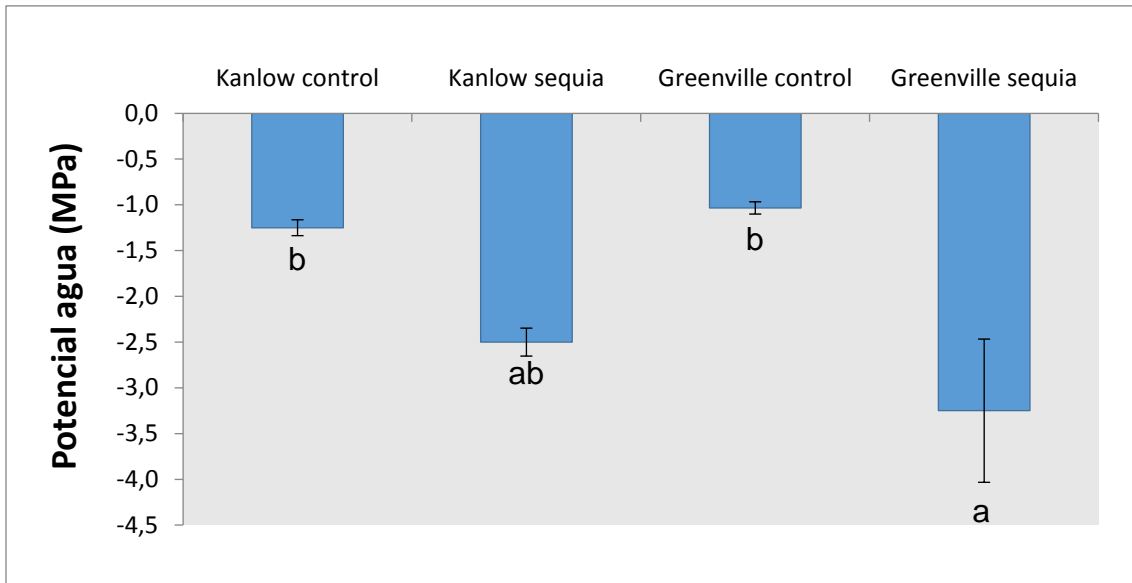
Se evaluó la absorción diferencial de elementos trazas en situación de limitación hídrica en dos cultivares contrastantes en su tolerancia a estrés hídrico (i.e. Kanlow y Greenville, tolerante y sensible respectivamente). Las plantas se consideraron en situación de estrés hídrico al observarse síntomas visibles de acartuchamiento de hojas. En esa situación, se evaluó el CRA en ambos cultivares en situación buena disponibilidad hídrica (control) y con suspensión de riego (sequia). Los valores observados fueron 97.69 % versus 70.6 % en condiciones control y sequia respectivamente para el cv. Kanlow; y 95,34 % versus 62.88 % para el cultivar Greenville (Figura 2).



**Figura 2.** Contenido relativo de agua (CRA) de *P. virgatum* cvs. Kanlow y Greenville bajo condiciones control y estrés hídrico (n=4, p<0,05). Las barras corresponden al error estándar.

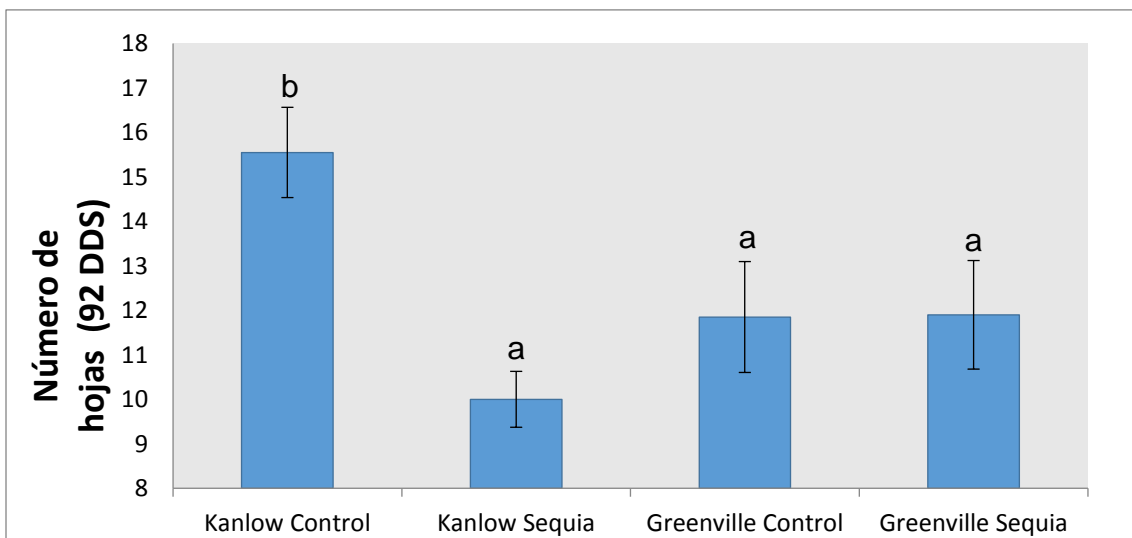
Asimismo, se midió el potencial agua y se registraron valores de -1,25 MPa versus -2.5 MPa para el cultivar tolerante en condiciones control y sequía, mientras que el cultivar sensible registro -1.03 MPa versus -3.5 MPa para los mismos tratamientos (Figura 3).

Una vez alcanzada la condición de estrés, se registró el peso seco de parte aérea y raíces, el área foliar, la altura de plantas, el número de hojas y numero de macollos.

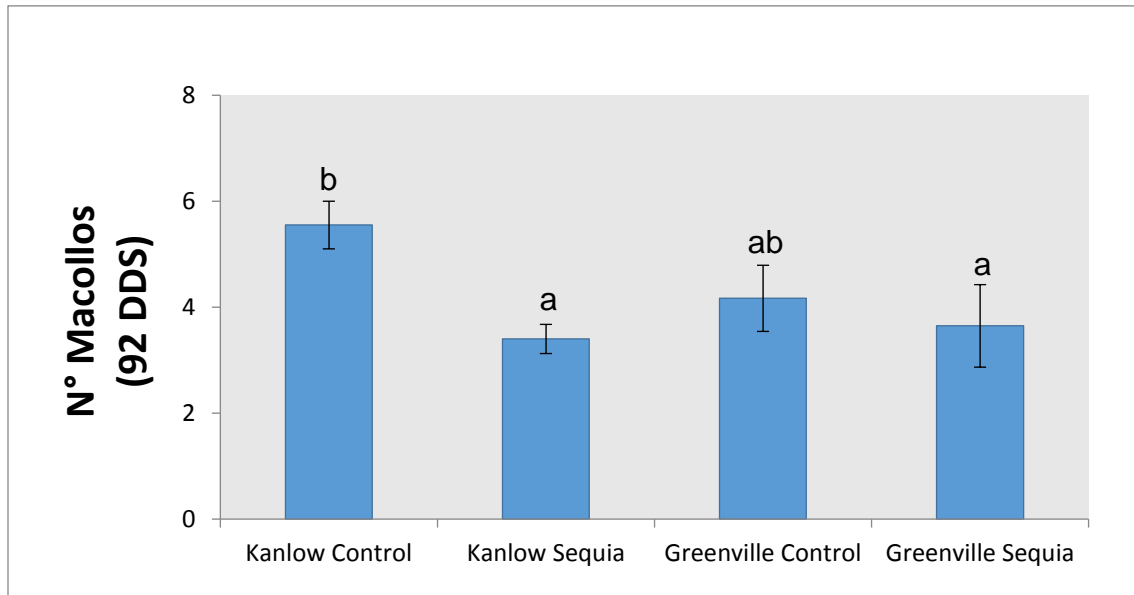


**Figura 3.** Potencial Agua de *P. virgatum* cvs. Kanlow y Greenville bajo condiciones control y estrés hídrico (n=4, p<0,05). Las barras corresponden al error estándar.

En relación al número de hojas y de macollos, el tratamiento de sequía no tuvo un impacto significativo en el cultivar Greenville (p<0,05); sin embargo el cv Kanlow si vio afectadas ambas variables bajo restricción hídrica (p<0,05), sugiriendo un mayor potencial de producción del cultivar (Figuras 4 y 5).

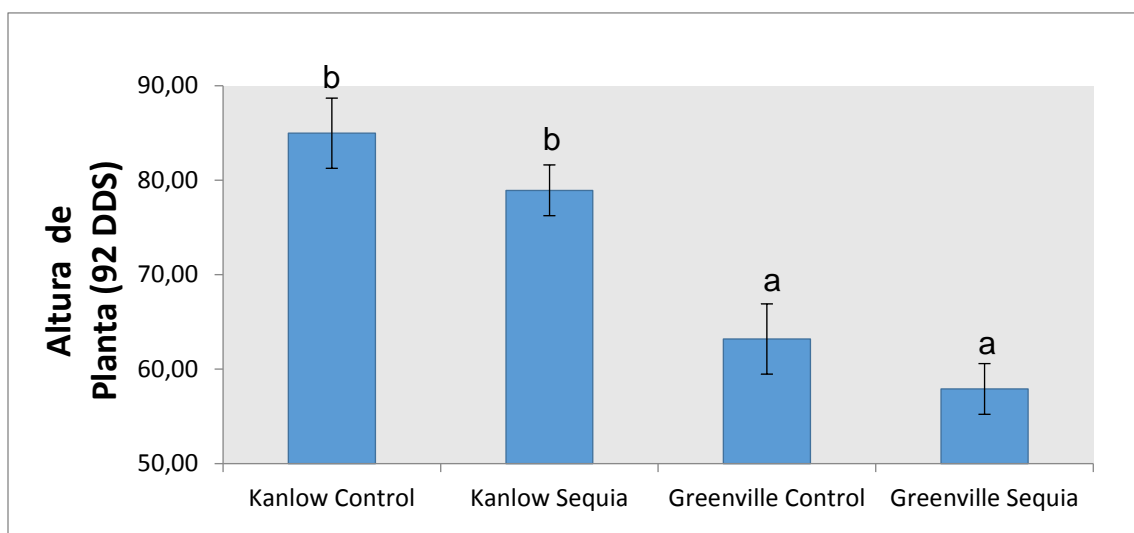


**Figura 4.** Numero de hojas de *P. virgatum* cvs. Kanlow y Greenville bajo condiciones control y estrés hídrico (n=4, p<0,05). Las barras corresponden al error estándar.



**Figura 5.** Numero de macollos de *P. virgatum* cvs. Kanlow y Greenville bajo condiciones control y estrés hídrico (n=4, p<0,05). Las barras corresponden al error estándar.

En cuanto a la altura de planta no se observó diferencias significativas entre tratamientos y cultivares a los 42 y 44 días desde la siembra (datos no mostrados); sin embargo a partir del día 47 después de sembrado (DDS) se observan diferencias significativas entre variedades pero no entre el estrés hídrico y el control dentro de cada cultivar, lo cual se ve mejor reflejado, como lo muestra el grafico, al momento de la cosecha (92 DDS, Figura 6).

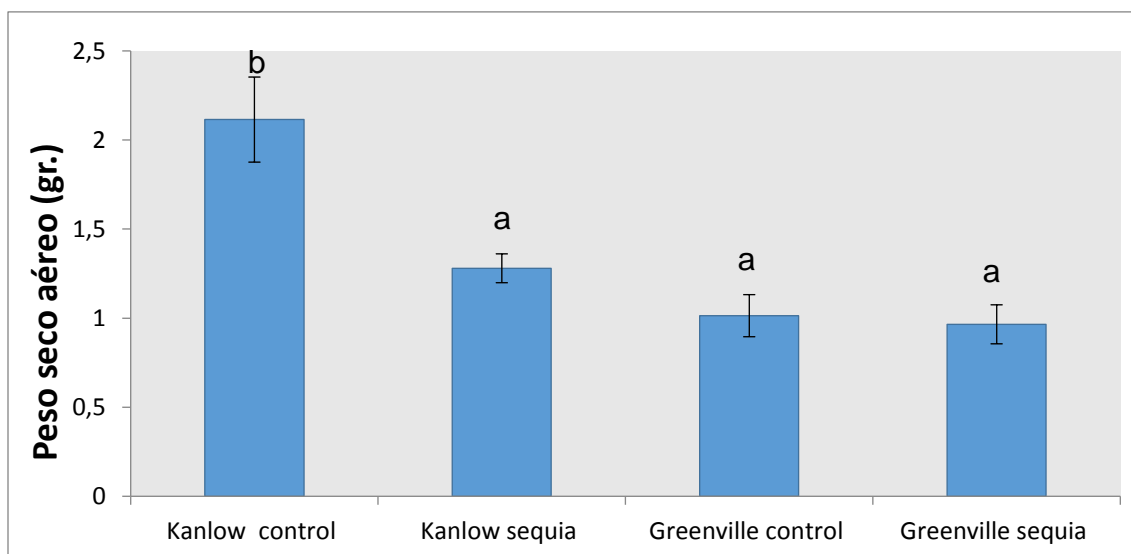


**Figura 6.** Altura de la planta de *P. virgatum* cvs. Kanlow y Greenville bajo condiciones control y estrés hídrico (n=4, p<0,05). Las barras corresponden al error estándar.

Con respecto al peso de raíz, al contrario de lo que se hubiera esperado, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de cada cultivar ni entre cultivares. El tratamiento de sequía fue a partir de los 42 DDS y se prolongó hasta 92 DDS, las raíces

podieron haberse desarrollado en abundancia durante este periodo y enmascarar un efecto del tratamiento o del cultivar. Asimismo, el método utilizado para extraer raíces pudo haber afectado los resultados debido a la pérdida de raíces más delgadas.

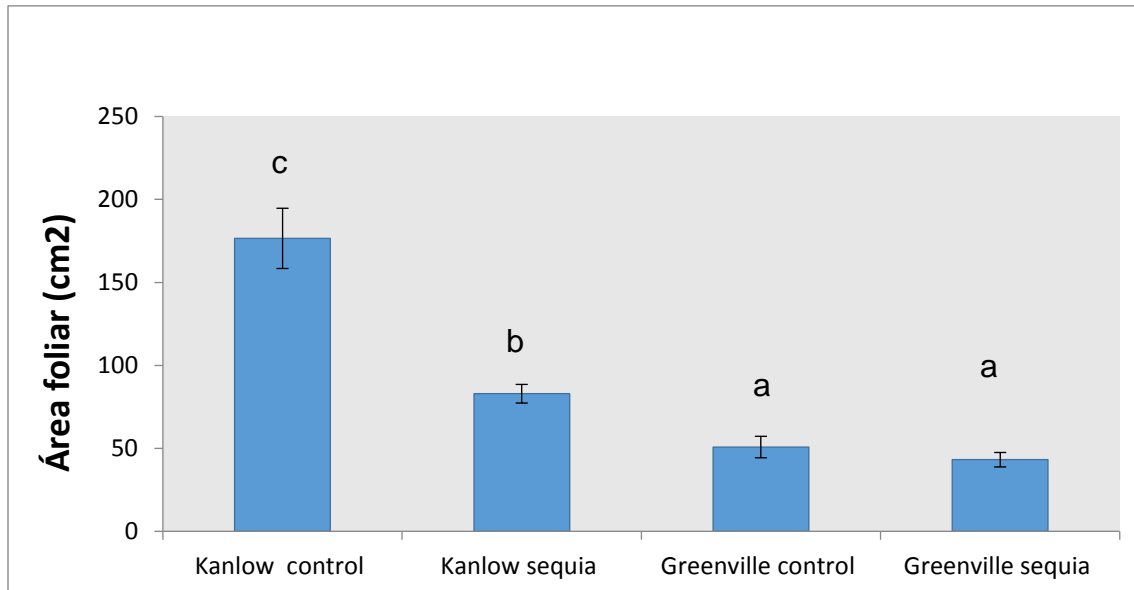
En relación al peso seco aéreo, se observó que el cultivar Kanlow produce mayor materia seca que el cultivar Greenville en condiciones de buena irrigación (Figura 7). En el tratamiento de suspensión del riego, la materia seca disminuye significativamente en el cultivar Kanlow pero no en Greenville. Esta disminución estaría acompañada por la menor producción de hojas y de macollos en situación de estrés.



**Figura 7.** Peso seco aéreo de *P. virgatum* cvs. Kanlow y Greenville bajo condiciones control y estrés hídrico (n=4, p<0,05). Las barras corresponden al error estándar.

En cuanto al área foliar (Figura 8), tal como se esperaba, se vio reducida en el cultivar Kanlow bajo el tratamiento sequia con respecto al control (casi en un 50%), lo que no sucedió en el cultivar Greenville, que no presentó diferencias. Como consecuencia del déficit hídrico las células no alcanzan la turgencia necesaria para su crecimiento y por lo tanto la expansión foliar se ve afectada.

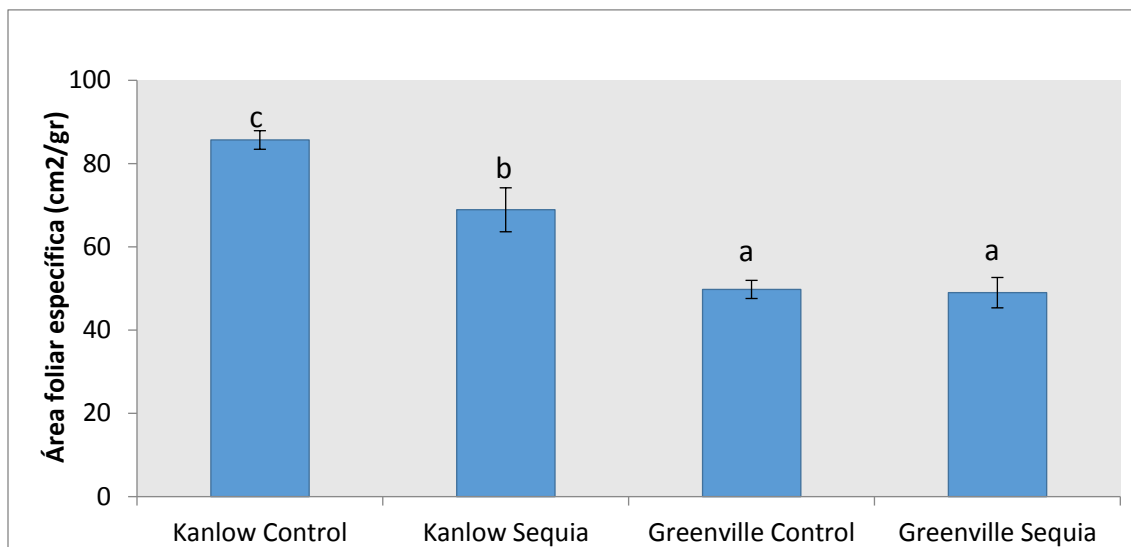
Bajo condiciones de estrés hídrico, en cereales se ha observado hojas más pequeñas y menor número de macollos, lo que lleva a un menor IAF (Araus *et al.*, 2002).



**Figura 8.** Área foliar de *P. virgatum* cvs. Kanlow y Greenville bajo condiciones control y estrés hídrico (n=20, p<0,05). Las barras corresponden al error estándar.

Con respecto al área foliar específica (relacionando área foliar con peso seco de la parte aérea) se observa una diferencia significativa entre los tratamientos del cultivar Kanlow pero no entre los tratamientos del cultivar Greenville (Figura 9). Esta mayor producción de materia seca por unidad de área foliar en el tratamiento Kanlow sequia referido a su tratamiento control, estaría relacionada a un engrosamiento de los tejidos en situación de sequía, especialmente a nivel de la cutícula para disminuir la pérdida de agua. En esta situación la planta también disminuye la superficie foliar.

El estrés hídrico generalmente disminuye el área foliar específica, aunque tales diferencias no siempre resultan significativas, tal como se ha observado en ryegrass (Van Loo, 1992; Guenni *et al.*, 2002). Sugiyama (2006) señala que un mayor área foliar por unidad de masa resulta en una alta tasa de crecimiento potencial en un medio rico en nutrientes, pero a su vez confiere desventajas cuando este es pobre, como ocurre en la presencia de déficit hídrico. Considerando esto se puede afirmar que el cultivar Kanlow responde positivamente ante un buen ambiente de crecimiento, y ajusta esta variable ante situaciones de estrés hídrico.



**Figura 9.** Área foliar específica de *P. virgatum* cvs. Kanlow y Greenville bajo condiciones control y estrés hídrico (n=20, p<0,05). Las barras corresponden al error estándar.

El déficit hídrico comienza a desarrollarse cuando el agua perdida por evapotranspiración excede a la absorbida por las raíces. En este momento, la disponibilidad de agua decrece lo suficiente como para producir disminución del potencial agua en la planta y por ende, las actividades fisiológicas tales como conductancia estomática, fotosíntesis y crecimiento (Sammons *et al.*, 1978; Schonfeld *et al.*, 1988; Morant – Avice *et al.*, 1994; Pugnaire *et al.*, 1994; Lecoeur *et al.*, 1995; Maroco *et al.*, 2000; García *et al.*, 2002; Muns, 2002; Grzesiak *et al.*, 2003; Turhan y Baser, 2004; Assuero *et al.*, 2004; Blum, 2005; Grzesiak *et al.*, 2006; Sugiyama, 2006).

Los efectos producidos por el déficit hídrico dependen en gran medida de la intensidad y duración del mismo. Muchas especies responden con signos visibles tales como marchitamiento foliar o enrollamiento de las láminas foliares (Bittman y Simpson, 1989; Richards *et al.*, 2002). Estos síntomas pueden presentarse aún en condiciones normales a medio día, pero en ese caso se recuperan al atardecer (Pugnaire *et al.*, 1994). Si el estrés persiste, en primer lugar se producirá disminución en el crecimiento de las hojas y tallo (Van Loo, 1992; Maroco, *et al.* 2000; Cabuslay *et al.*, 2002; García *et al.*, 2002; Muns, 2002; Sugiyama, 2006), producto de la pérdida de turgencia celular, y signos de marchitamiento y decoloración; en las gramíneas las hojas son más pequeñas y erectófilas (Araus, 2002). Un área foliar grande al comienzo de la sequía puede ser desventajoso por cuanto las plantas estarán más expuestas a la radiación solar y con mayores pérdidas de agua y fotorrespiración (Cabuslay *et al.*, 2002).

La limitación hídrica disminuye el número de macollos (Baczek-Kwinta *et al.*, 2006) y aumenta la relación raíz / parte aérea (Colabelli *et al.*, 1998; Van Loo, 1992; Pugnaire *et al.*, 1994; Grzesiak *et al.*, 2001; Muns, 2002; Villagra y Cavagnaro, 2005). La menor cantidad de macollos junto a la disminución del área foliar reducen a su vez el índice de área foliar (Araus *et al.* 2002), en consecuencia hay menos superficie capaz de realizar fotosíntesis.

La expansión foliar es afectada antes que la fotosíntesis y por lo tanto, el menor desarrollo vegetativo es una de las principales causas de la disminución del rendimiento (Sammons *et al.*, 1978; Wery, 2005). Las consecuencias finales del déficit hídrico prolongado son plantas de menor tamaño, menor número de macollos, menor cantidad de hojas vivas, y por ende de menor biomasa y producción de forraje y grano (Colabelli *et al.*, 1998; Wardlaw, 2002).

Según lo observado y datos de estudios anteriores, se podría decir que el cultivar Kanlow posee una amplia base genética, que le confiere una buena adaptabilidad y un mayor potencial de rendimiento, capaz de aprovechar buenas condiciones ambientales y traducirlas en producción de materia seca, por lo que en condiciones de sequía tiene la capacidad de disminuir su producción de biomasa para llegar a completar su ciclo. En contraste, el cultivar Greenville no tendría la habilidad para disminuir su potencial de producción de biomasa frente a una situación de estrés poniendo de manifiesto un comportamiento más estable tanto en buenas condiciones de irrigación como en situación de estrés hídrico, aunque esto pone en desventaja al cultivar, ya que tiene que mantener una misma biomasa con menos recursos.

#### 4.2. Análisis elemental

El estudio de los componentes inorgánicos de un organismo, constituido por los nutrientes minerales y elementos traza, se define *ionómica* (Sal *et al.*, 2008). En este estudio se analizó la composición mineral de dos cultivares de *Panicum virgatum*, correspondientes a dos ecotipos diferentes, de tierras altas y tierras bajas.

En términos generales, se señala que ciertos elementos se encuentran fuera del rango de detección de la metodología de análisis por encontrarse en cantidades superiores al rango lineal del método, por lo que no se expusieron en el trabajo. Tal es el caso de aquellos elementos clasificados como macronutrientes para la planta, que son absorbidos en cantidades importantes: fósforo (P), calcio (Ca), magnesio (Mg), potasio (K). Asimismo, otra serie de elementos se encontraron por debajo del límite de detección del método: antimonio (Sb), selenio (Se), estaño (Sn), torio (Th), titanio (Ti), uranio (U), vanadio (V), plata (Ag), arsénico (As), cadmio (Cd), cobalto (Co) y mercurio (Hg). En ambos casos no fue posible analizar su contenido ni las variaciones entre los cultivares evaluados o el tratamiento de estrés aplicado.

En cuanto a los elementos cuyo contenido pudo ser cuantificado por el método de análisis, no se observó un efecto de interacción entre tratamiento y cultivar para ninguno de ellos. Del mismo modo, no se observan diferencias significativas en ambos criterios de clasificación (tratamiento y cultivar) en los elementos aluminio (Al), boro (B), cobre (Cu), litio (Li), manganeso (Mn), molibdeno (Mb), plomo (Pb) y estroncio (Sr).

Por su parte, se hallaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre cultivares en el contenido de bario (Ba), hierro (Fe), silicio (Si) y zinc (Zn) (Tabla 1).

**Tabla 1:** Contenido de Si, Zn, Fe, Ba, Na y Ni en mg por kilo de cenizas. Estos elementos presentaron diferencias significativas entre el cv. Kanlow y el cv. Greenville (n=4, p<0,05).

Elementos	Kanlow (ppm)	Greenville (ppm)
Silicio (Si)	3010,39 b	4396,46 a
Zinc (Zn)	173,83 a	49,06 b
Hierro (Fe)	706,11 a	453,50 b
Bario (Ba)	144,90 a	87,52 b
Sodio (Na)	8299.6 a	6163.7 b
Níquel (Ni)	8.3 a	5.4 b

En cuanto al tratamiento de estrés hídrico, se observaron diferencias significativas en los contenidos promedio de ambos cultivares en el caso del cromo (Cr), sodio (Na) y níquel (Ni) (Tabla 2).

**Tabla 2:** Contenido de Cr, Na y Ni en mg por kilo de ceniza. Estos elementos presentaron diferencias significativas entre el tratamiento de estrés hídrico y el control. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (n=4, p > 0,05).

Elemento	Control (mg kg <sup>-1</sup> )	Sequia (mgkg <sup>-1</sup> )
Cromo (Cr)	3010,39 b	4396,46 a
Sodio (Na)	8296,8 a	6166.6 b
Níquel (Ni)	5.9 b	7.7 a

Por su parte, se detectaron diferencias significativas en los contenidos boro (B) y manganeso (Mn) entre cultivares y entre tratamientos. El contenido de Boro (B) incrementó significativamente (p>0.05) en situación de estrés hídrico en el cultivar Kanlow (127 ppm vs. 81 ppm), pero no en el cultivar Greenville. A su vez, el contenido de B en plantas bien regadas (control) del cv. Kanlow fue superior al de las plantas del cv. Greenville (127 ppm vs. 77 ppm, p<0.05).

### 4.3. Diferencias entre cultivares y entre tratamientos

En este trabajo se encontraron diferencias en los niveles de Si, Fe, Ba y Zn entre el ecotipo de tierras bajas (cv. Kanlow) y el de tierras altas (cv. Greenville). Estas diferencias entre cultivares no obedecen a un comportamiento diferencial frente a estrés hídrico, por el contrario, son inherentes a la composición genética de ambos cultivares. Excepto el Si, el resto de los minerales presentó mayor concentración en el cultivar Kanlow. Esta característica



del cultivar fue reportada con anterioridad en un estudio realizado en *Panicum virgatum*, donde se analizó la variabilidad genotípica en la composición siete minerales (Al, Ca, Cl, K, P, Si y S) en seis cultivares y cuatro localidades de Estados Unidos (El-Nashaar et al., 2009). Este estudio concluyó que la latitud de origen de cada cultivar influyó en las concentraciones de Si y Cl, pero no en los niveles de los otros minerales analizados en el estudio. Es decir que el ecotipo (i.e. tierras altas y tierras bajas) logra explicar parcialmente las diferencias encontradas.

Una fuerte influencia de la localización geográfica quedó demostrada en esa experiencia (El-Nashaar et al., 2009) y sugiere que, tanto prácticas de manejo como otras características inherentes a cada ambiente, influyen en gran medida la concentración mineral en las diferentes poblaciones de *Panicum*. En consecuencia, el genotipo no es en sí mismo, un parámetro suficiente para predecir las concentraciones de componentes minerales en diferentes ambientes. Consecuentemente, es necesario identificar factores de manejo y no-genéticos capaces de controlar la concentración de minerales en la biomasa de esta especie.

En nuestro estudio se investigó la respuesta de ambos cultivares en una situación de déficit hídrico moderado generado mediante suspensión del riego, sembrando una situación de sequía ambiental que se produce en las regiones semiáridas donde *Panicum virgatum* se puede desarrollar. La concentración de Cr, Na y Ni mostró un comportamiento diferencial en condiciones de irrigación y en situación de sequía. Cr y Ni incrementaron su nivel en sequía mientras que Na disminuyó su nivel.

#### **4.4. Efecto de los elementos sobre las funciones biológicas y crecimiento vegetal**

A continuación se describe brevemente la función biológica de cada elemento en particular, y se discuten algunas implicancias en la respuesta al estrés hídrico para ambos cultivares.

##### **4.4.1. Silicio**

La función de silicio en el desarrollo y la nutrición de las plantas han sido discutidas ampliamente en la literatura. Si bien no es un elemento esencial, la mayoría de las dicotiledóneas absorben pequeñas cantidades de silicio y acumulan menos del 0,5 % de su peso seco en los tejidos. Desde este punto de vista las plantas pueden clasificarse en no acumuladoras de Si (< 0.5 %) y acumuladoras (5-10 %). Algunas monocotiledóneas, como el arroz y otros pastos de humedales, *Panicum virgatum* entre ellos, acumulan entre un 5 y un 10 % de silicio en sus tejidos, lo que es más alto que los valores normales de nitrógeno o potasio. Esta variabilidad entre especies de plantas se ha atribuido a la capacidad de las raíces para absorber Si.

El Si contribuye a aliviar la escasez de agua, ya que reduce la transpiración mediante el desarrollo de una capa de gel en la pared celular de las células de la epidermis. Además el Si es componente de las fibras vasculares, haciéndolas más duras y resistentes, no sólo al estrés hídrico, sino también frente a ataques de plagas y patógenos, lo que aumenta su tolerancia a enfermedades. Por lo tanto, la función principal del Si en las plantas es proporcionar una defensa contra los ataques ambientales, tanto biótico y abiótico (Moldes et al., 2013).

En este trabajo, el cultivar sensible Greenville presento mayores valores basales de Si comparado con el cv. Kanlow. Posiblemente estos altos valores contribuyan a su buen desempeño en condiciones de sequía, lo cual se refleja en la producción de materia seca, si consideramos que en condiciones de estrés hídrico, el cv. Greenville produjo la misma cantidad de materia seca que el cv. Kanlow.

La superficie de la hoja adopta algunas características durante la exposición prolongada a temperaturas elevadas, que potencialmente mejoran la termotolerancia mediante la reducción de la transpiración y la temperatura de la superficie de la hoja. El aumento de la densidad de tricomas ensancha la capa límite de aire alrededor de los estomas, una adaptación que disminuye la transpiración y aumenta la eficiencia fotosintética. El aumento en la densidad de tricomas en poblaciones más termotolerantes está asociado con mayores contenidos de Si, lo cual se observa en exposiciones a altas temperaturas. El análisis del tejido de la hoja mediante microscopía indica que los tricomas se componen principalmente de sílice. Es probable que el aumento de la densidad de tricomas y el área superficial, particularmente en la superficie abaxial de la hoja, esté acompañado de un incremento de la condensación y proporcione un efecto de enfriamiento, lo cual reduciría la permeabilidad al agua (Riederer y Schreiber, 2001).

Estudios sobre la acumulación de Si durante el proceso de aclimatación al calor sugiere que las temperaturas elevadas están acompañadas de la formación de cuerpos de silicio y aumento en la densidad de tricomas con elevado contenido de silicio (Banowitz et al., 2008). En el estudio llevado adelante por Vogel y col (2009) encontraron plantas de *Panicum virgatum* con menor contenido de Si en localidades con climas más fríos, mientras que los mayores contenidos de Si se observaron en las localidades de mayor régimen térmico. En la misma línea, se ha reportado que frente a incrementos de temperatura, los genotipos originarios de climas cálidos, al exponerse a altas temperaturas responden con un incremento en los niveles de silicio y densidad de tricomas, mientras que los originarios de lugares más frescos no responden frente a este estímulo. Esto se contrapone a lo observado en nuestro estudio: el cultivar Kanlow pertenece al ecotipo de tierras bajas, cuyo centro de origen corresponde con menores latitudes, más cercanas al Ecuador, con mayor régimen térmico; por otra parte el cultivar Greenville proviene de latitudes mayores, de climas más frescos.

#### **4.4.2. Zinc**

Las funciones metabólicas de zinc se basan en su capacidad para formar complejos tetraédricos con N-, O- y S- (Vallee y Auld, 1990), lo que influye tanto en la estructura

terciaria de proteínas (por ejemplo, a través de la formación de dedos de zinc) como en la actividad catalítica de la enzima. Hay enzimas importantes que contienen zinc, como por ejemplo la enzima alcohol deshidrogenasa, la anhidrasa carbónica, superóxido y la ARN polimerasa. El Zn activa las enzimas responsables de la síntesis de ciertas proteínas. Es utilizado en la formación de clorofila y algunos carbohidratos, y en la conversión de almidones en azúcares; su presencia en el tejido foliar ayuda a las plantas a resistir las bajas temperaturas. Es fundamental en la formación de auxinas, mismas que coadyuvan a la regulación del desarrollo y a la elongación del tallo, además de ser el precursor del triptófano. En consecuencia, la absorción y transporte de Zn está fuertemente regulado.

La homeostasis intracelular del Zn se alcanza mediante la acción coordinada de transportadores específicos encargados del ingreso, salida y compartimentalización del mismo. Los niveles de Zn en la planta afectan sus relaciones hídricas y alteran la conductividad estomática. Tanto la conductividad como la tasa transpiratoria disminuyen cuando hay deficiencias de Zn (Upadhyaya et al., 2013, Hu and Sharma et al.13). La acción protectora del Zn en respuesta al estrés hídrico no solo se observa en la regulación del balance de agua y acumulación de materia seca en la planta sino también en el balance de la actividad antioxidante durante el estrés. El posible rol del Zn en la protección de las células del daño causado por ROS y su efecto en el metabolismo celular es bien conocido y ha sido extensamente tratado (Broadley et al., 2006, Cakmak 2000). El Zn es un constituyente de la enzima superóxido dismutasa (SOD), una enzima clave en la protección contra el estrés oxidativo. La actividad de SOD ha sido propuesta como un indicador del estatus nutricional de Zn. Mas aun, se ha documentado que la relación Cu/Zn-SOD esta cercanamente relacionado con la resistencia al estrés, habiendose encontrado incrementos significativos en la actividad de esa enzima en condiciones de estrés abiotico en tabaco, festuca y arroz entre otras (Chatzistathis T. 2014).

La participación del Zn en la defensa frente a estrés por sequía ha sido estudiado en algodón (Wu et al., 2015), te (Upadhyaya et al., 2013) y maíz (Hong et al., 2008) entre otras. Frente a una suplementación con Zn en plantas sujetas a estrés se han observado, entre otros, incrementos en la tasa fotosintética, en el contenido de clorofila a y b, incremento de la actividad de enzimas antioxidantes e incluso ajuste osmótico.

El Zn es requerido para la actividad de numerosas enzimas, como las hidrogenasas, anhidrasa carbónica, Cu/Zn superóxido dismutasa, para la estabilización de la fracción ribosomal y la síntesis de citocromo (Cakmak 2000). Actúa como un elemento traza importante en el control de variados procesos fisiológicos. La nutrición del Zn parece estar involucrada en la resistencia a varias enfermedades y a la expresión de genes requeridos para la tolerancia de estrés ambiental. Se ha informado que Zn estaría aliviando diferentes tipos de estrés como alta intensidad de luz y temperatura, sequía y salinidad. Se ha reportado un significativo daño a nivel ultraestructural en cloroplastos sujeto a una inadecuada provisión de Zn debido a su interacción con fosfolípidos y grupos sulfhidrilos de las proteínas de membrana (Chatzistathis T. 2014).

En este trabajo, los valores de Zn detectados en el cv. Kanlow triplicaron los valores del cv. Greenville ( $P > 0.05$ ). Estas diferencias posiblemente se expliquen por el diferente origen

de ambos cultivares, correspondientes a ecotipos genéticos de zonas bajas y altas respectivamente. Los ecotipos de tierras bajas provienen de menores latitudes, expuestas a ambientes de sequías prolongadas o frecuentes situaciones de anegamiento, donde los altos contenidos de Zn podrían estar proveyendo de protección frente a estas condiciones. Cakmak et al. (1996) sugieren que la deficiencia de Zn sería más propensa en regiones áridas y semiáridas donde los suelos, en especial los primeros centímetros, usualmente son deficitarios en contenido de agua, y consecuentemente el transporte del Zn de la solución del suelo a las raíces sería débil. Desde este punto de vista, los ecotipos adaptados a ambientes áridos podrían tener una mayor capacidad de absorber y acumular Zn en comparación con genotipos originados en latitudes donde la provisión de agua no es un problema frecuente.

En referencia a sequía, los suelos de regiones áridas con altos contenidos de carbonato de calcio con frecuencia son pobres en el Zn disponible para la planta. Generalmente a medida que incrementa el pH del suelo, la solubilidad del Zn disminuye de manera importante, así en suelos calcáreos o alcalinos es frecuente observar deficiencias de Zn. Esta deficiencia ocasiona una reducción de la tasa de fotosíntesis neta, una disminución de la conductancia estomática, en la concentración de CO<sub>2</sub> y de la actividad de la anhidrasa carbónica. Contrariamente, las plantas con buena provisión de Zn demuestran mayor producción de materia seca y tolerancia al estrés, con respecto a aquellas que sufren deficiencia de Zn (Hajiboland y Amirasad, 2010; Waraich et al., 2011).

La tolerancia de los metales pesados ha sido investigada en las Poáceas y se ha encontrado que es una característica común en esta familia. Se ha observado que *Panicum virgatum* es capaz de crecer en una amplia variedad de suelos, y particularmente se ha observado su tolerancia en condiciones de contaminación con exceso de Zn y lo proponen como un buen candidato para la recuperación de suelos contaminados por la acción de la minería (Gibson y Pollard (1988).

En nuestro trabajo, si bien no hubo diferencias significativas en la acumulación de Zn entre plantas estresadas y bien regadas, si hubo una diferencia altamente significativa entre cultivares. Los altos niveles de Zn encontrados en el cv. Kanlow (supera más de tres veces al cv. Greenville) posiblemente expliquen, al menos de manera parcial, la gran adaptabilidad del cultivar a un amplio rango de ambiente. El origen ecológico de ambos podría explicar una mayor habilidad del ecotipo de tierras bajas en la absorción de este mineral. El cv. Kanlow es originario de la región centro sud de Estados Unidos, correspondiente a los estados de Texas y Oklahoma, caracterizado por ambientes séricos. En estas condiciones, el cv. Kanlow podría tener ventajas adaptativas frente a la absorción de este compuesto mineral en comparación con el cv. Greenville, proveniente de la región central de USA.

#### **4.4.3. Hierro**

Fe es el cuarto elemento más abundante en la geosfera. El contenido de Fe de los suelos varía de 1 a 20% (en promedio 3,2%), pero su concentración normal en las plantas es solamente 0,005% (Graham y Welch, 2000). Esto se debe a que el Fe en suelos existe

principalmente en las formas de óxido de hidrógeno, fosfatos y otros compuestos insolubles (Grusak et al., 1999).

El hierro está involucrado en la formación de clorofila y en la cadena de transporte de electrones. El déficit de Fe está asociado con la reducción del contenido total de clorofila así como con la disminución de la tasa de fotosíntesis, la conductancia estomática, y el rendimiento cuántico máximo del fotosistema PSII (Fv / Fm; Molassiotis et al., 2006). La morfología y la ultraestructura de las mitocondrias también se ven afectados por la deficiencia de Fe (Vigani, 2012). Varias enzimas que pertenecen tanto a la cadena respiratoria y el ciclo del ácido tricarbóxico contienen proteínas con Fe. Cuando las plantas sufren de deficiencia de Fe, el síntoma macroscópico más característico en sus hojas es clorosis. La deficiencia de hierro también afecta el metabolismo del N, ya que el Fe es un cofactor de enzimas de la vía de asimilación reductora; en particular, se ha encontrado que la deficiencia de Fe disminuye la actividad de la nitrato reductasa tanto en la hoja como en la raíz (Borlotti et al., 2012). También se ha identificado recientemente al hierro como un factor central en la regulación de patógenos (Brissot et al., 2011).

La captación de hierro en las plantas está altamente regulada para suministrar cantidades suficientes para un crecimiento óptimo mientras se evita el exceso de acumulación. En respuesta a la deficiencia de hierro, las plantas inducen mecanismos basados en la reducción o basados en la quelación para aumentar la absorción de hierro del suelo. Los genes implicados en cada mecanismo se han identificado a partir de varias plantas modelo incluyendo *Arabidopsis* y arroz. El transporte de hierro dentro de las plantas también está estrechamente controlado. Se ha descubierto una nueva información sobre los transportadores que desempeñan un papel en la carga del xilema y en la carga / descarga de hierro del floema y en los quelantes de hierro que intervienen en la homeostasis del hierro. Algunos de los componentes que regulan las respuestas de deficiencia de hierro también se han dilucidado, lo que demuestra que el hierro depende de la regulación de genes tanto en la transcripción y post-transcripcional (Kim y Guerinot, 2007).

En nuestro trabajo el cultivar Kanlow presentó mayor concentración de Fe en sus tejidos con respecto al cultivar Greenville. No hay registro, a la actualidad, de estudios dirigidos a investigar la acumulación y/o removilización del Fe en *Panicum virgatum*, y desde este punto de vista no es posible comparar este estudio con otros. Posiblemente la mayor disponibilidad de este nutriente provea una mejor condición para afrontar condiciones variables, contribuyendo a la adaptabilidad manifestada por este cultivar.

#### **4.4.4. Bario**

El bario ha sido identificado como un elemento tóxico en la mayoría de las plantas, aunque en gramíneas su toxicidad aún no ha sido determinada (Monteiro et al., 2011). Aunque Ba está presente comúnmente en las plantas, no es un componente esencial de los tejidos vegetales. El contenido de Ba varía su concentración en planta de 1 a 198 ppm (peso seco), las concentraciones más altas corresponden a hojas de cereales y legumbres, y las más bajas a granos y frutos. Hay algunos informes que indican concentraciones tóxicas de Ba en las

plantas. Una posible toxicidad de Ba podría reducirse en gran medida mediante la adición de sales de Ca, Mg y S al medio de crecimiento. Interacciones antagónicas entre estos elementos y Ba son frecuentes, y pueden ocurrir tanto en los tejidos vegetales como en suelos (Kabata-Pendias, 2001).

En un estudio realizado en soja se investigó la fitotoxicidad inducida con bario a 100, 1000, y 5000 mM bajo condiciones de cultivo hidropónico. El crecimiento de la soja y la actividad fotosintética de las hojas fueron significativamente inhibidos por los tres niveles de tratamientos con Ba. Los tratamientos con bario inhibieron la actividad fotosintética y el crecimiento de las plantas, y la razón principal fue el cierre estomático. Las altas concentraciones de Ba en el tratamiento 5000 mM indujeron el cierre estomático y perturbó el metabolismo relacionado con la fijación de carbono, mientras que los niveles más bajos de exposición de Ba (100 y 1000 mM) indujeron sólo el cierre estomático. El cierre de los estomas resultó de la inhibición del transporte de  $K^+$  por la acumulación de Ba en las células de guarda. Este trabajo indica que Ba tiene efectos fitotóxicos en plantas de soja mediante la inhibición de la fotosíntesis (Suwa et al., 2008).

Si bien el Ba ha sido identificado como un elemento tóxico en la mayoría de las especies vegetales, su toxicidad en gramíneas no ha sido aún determinada. En un experimento llevado a cabo en invernáculo con plantas de *Panicum maximum* Jacq. cultivadas en solución nutritiva se analizó el efecto del Ba sobre parámetros de crecimiento y la acumulación de macronutrientes. El rendimiento y área foliar disminuyeron marcadamente con el incremento en la concentración de Ba en la solución nutritiva. La mayor acumulación de Ba se registró en tallos y vainas. Las concentraciones tóxicas se estimaron en 170 ppm en solución nutritiva y 225 ppm en la hoja diagnóstico; los principales síntomas de toxicidad fueron clorosis entre las nervaduras seguida de manchas necróticas en las láminas (Monteiro et al., 2011).

En nuestro trabajo, llevado adelante con dos cultivares de *Panicum virgatum*, se observaron mayores valores en el contenido de Ba en el cultivar Kanlow comparado con el cultivar Greenville (145 vs 88 ppm,  $p < 0,05$ ). Las plantas con estos niveles de Ba encontrados no manifestaron síntomas de toxicidad, sugiriendo que estos niveles no causarían daño en esta especie.

#### 4.4.5. Sodio

El efecto negativo del exceso de sales de Na (estrés salino) es bien conocido y ha sido estudiado en profundidad, mientras que el rol como elemento beneficioso es menos conocido. Está documentado, no obstante, que el Na está estrechamente relacionado a la tolerancia de las plantas a estrés salino (Pilon-Smits et al., 2009), y el incremento de la actividad de transportadores específicos de Na se observa bajo estrés salino. Estos transportadores exportan Na fuera de la raíz, dentro de la vacuola, o en el floema del tallo para ser trasladados a la raíz.

El Na es esencial solo para algunas especies C4, y es beneficioso para algunas especies halófilas que han evolucionado en ambientes salinos. Es requerido por la mayoría de las especies que utilizan la vía metabólica C4 y con metabolismo ácido de Crasuláceas (CAM) ya que es vital para la regeneración del ácido fosfoenolpirúvico, sustrato de la primera

carboxilación de estas plantas. En especies natrofilicas la deficiencia de Na causa clorosis y necrosis, e inclusive puede impedir la formación de flores.

De acuerdo a su tolerancia a Na, las plantas se pueden dividir en natrofilicas y natrofóbicas. Se ha determinado un efecto positivo de la aplicación de fertilizantes sódicos en especies natrofilicas (p. ej. Chenopodiaceas). La remolacha azucarera, el cultivo más importante dentro de este grupo, es el ejemplo más conocido sobre su relativa alta demanda de Na; aquí el Na fomenta la formación de fructuosa y su transformación en glucosa, la cual es acumulada en la remolacha. El ion Na puede activar parcialmente enzimas (ADP-glucosapirifosforilasa) dentro del metabolismo de la planta (síntesis del almidón) que también pueden ser activadas por iones K. Además, regula la presión osmótica a nivel celular el cual conduce a un eficiente uso del agua y, por otra parte, estimula el crecimiento a través del alargamiento celular y en caso de deficiencia de K funciona como un soluto osmóticamente activo. (KALI GmbH, 2017)

En este trabajo, se pudo observar diferencias significativas entre cultivares y tratamientos. La naturaleza C4 del *Panicum virgatum* indica que el Na es un elemento importante para su metabolismo y su concentración en los tejidos responde al genotipo (diferencia entre variedades) y varia con las condiciones del ambiente (por ejemplo, diferente provisión de agua). El cultivar Kanlow presento mayores niveles de Na que el cultivar Greenville. Kanlow ha sido caracterizado como un cultivar de mayor tolerancia a estrés ambiental comparado con Greenville por varios autores (Barney et al., 2009; Anderson et al., 2015, Hu et al., 2015, Liu et al., 2012) y estudios previos realizados en nuestro laboratorio lo confirman (Aimar et al., 2014). Asimismo, el ciclo de crecimiento genera mucho más biomasa, y por ende una mayor demanda de recursos (Casler et al., 2012).

Por otro lado, la concentración de  $\text{Na}^+$  es mayor para los tratamientos control en relación con el tratamiento de estrés en ambos cultivares. Esta disminución en la absorción de  $\text{Na}^+$  en situación de estrés hídrico podría ser un mecanismo de tolerancia que utilizan muchas especies para responder frente a situaciones de estrés salino que, en sus primeras fases, tiene mucho en común con el estrés hídrico. En trabajos realizados en diversas especies de interés agronómico se observa que los genotipos tolerantes acumulan menos cantidades de  $\text{Na}^+$  que aquellos susceptibles. Este comportamiento se ha comprobado en trigo y maíz (Ahmadi et al, 2009), triticale (Karim et al. 1992), arroz (Khan et al. 1997, Mannan et al., 2013), soja (Ali Khan et al. 2014), alfalfa (Liu et al., 2015) entre otros. Altas concentraciones de sales sódicas producen pérdida de  $\text{K}^+$  debido a la despolarización de la membrana y la pérdida de  $\text{Ca}^{++}$  por la competencia que ejerce el  $\text{Na}^+$  por los sitios activos de unión a  $\text{Ca}^{++}$  (Khorshidi et al., 2009, Cramer et al. 1991). El exceso de  $\text{Na}^+$  genera un efecto toxico en los procesos metabólicos y, en consecuencia, los genotipos con altos contenidos de  $\text{Na}^+$  sufren más que aquellos genotipos tolerantes (Karim et a., 1992). El  $\text{Na}^+$  es acumulado en las plantas a expensas de  $\text{K}^+$  debido que ambos compiten por los sitios de absorción a nivel de la raíz (Ioneva, 1988). Esta disminución en la incorporación de Na permite mantener alta la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ . La absorción selectiva de  $\text{K}^+$  en comparación con  $\text{Na}^+$  es considerada como un mecanismo de tolerancia a salinidad importante en muchas especies vegetales y, de hecho, alta relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  es utilizada como un indicador de tolerancia a la salinidad.

#### 4.4.6. Níquel

En el pasado, el níquel no era considerado como un elemento importante para el cultivo de plantas, pero las investigaciones han concluido que en bajas concentraciones es un elemento esencial para el crecimiento de las mismas (Gajewska and Sklodowska 2007; Baccouh et al. 2001); sin embargo es fitotóxico a altas concentraciones (Duman and Ozturk 2010). El rango normal de níquel en la mayoría de los tejidos de las plantas está entre los 0,05 y 5 ppm. Debido a sus bajos requisitos (a menudo en partes por billón o ppb), se encuentra en suficientes niveles como un contaminante en la tierra, el agua, los fertilizantes, etc. La deficiencia de níquel es poco común y a menudo se diagnostica erróneamente, ya que inicialmente no muestra ningún síntoma en las plantas. Esto explica por qué la mayoría de los laboratorios no realizan pruebas de níquel y el por qué no se incluye en la mayoría de los fertilizantes.

El níquel es un componente de algunas enzimas de las plantas, particularmente de la ureasa, que metaboliza el nitrógeno ureico para convertirlo en amoníaco utilizable dentro de la planta. Sin el níquel, se pueden acumular niveles tóxicos de urea dentro del tejido, lo que forma lesiones necróticas en las puntas de las hojas. En este caso, la deficiencia de Ni causa toxicidad de urea. El Ni también se usa como un catalizador en las enzimas que ayudan a que las legumbres fijen el nitrógeno. Hay pruebas de que el níquel ayuda con la tolerancia de las enfermedades en las plantas, a pesar de que aún no se conocen los mecanismos.

Un exceso de Ni afecta la absorción de nutrientes por parte de la raíz (Rahman et al. 2005). Por ejemplo, el estrés producido por un exceso de Ni disminuye la absorción de macro y micro nutrientes en girasol (Ahmad et al. 2011) y en *Brassica napus* (Ali et al. 2009), y afecta el metabolismo de nutrientes en *Elodea canadensis* (Kähkönen and Kairesalo (1998). Más aun, Gajewska y Sklodowska (2007) sugirieron que la competitividad del Ni desplaza al Ca de los lugares de unión con el complejo de oxígeno. El Ni tiene características similares a los de otros nutrientes minerales, tales como Ca, Mg, Mn, Fe, Cu y Zn. Además, es absorbido y transportado por el mismo sistema de transporte que otros micronutrientes, tales como Cu y Zn (Ahmad et al. 2011). Como resultado, niveles elevados de Ni pueden inhibir la absorción de estos nutrientes.

Algunos autores sostienen que Ni podría actuar en la mitigación de efectos adversos causados por el déficit hídrico sobre el crecimiento de las plantas. Por ejemplo, Kachenko (2008) encontró incrementos en los niveles de Ni en *Haplolobus floribundus* bajo condiciones de estrés hídrico. Bhatia et al. (2005) observo un significativo incremento de Ni en condiciones de baja disponibilidad hídrica en plantas de *Stackhousia tryonii* y sugiere que Ni cumple un rol como osmoregulador.

Resultados en nuestro trabajo muestran diferencias significativas en los contenidos de níquel entre cultivares y entre tratamientos (Tablas 2 y 3). Así, los niveles de Ni se incrementan en condiciones de sequía en ambos cultivares, en coincidencia con lo informado por Kachenko (2008) y Bhatia et al. (2005). Asimismo, se observaron diferencias entre cultivares, con mayores niveles en el cv. Kanlow. Este incremento está asociado a mayores



niveles de Zn en este cultivar, al igual que los resultados obtenidos por Moosavi et al. (2015) en colza canola y Rabie et al. (1992) en trigo, sorgo y vicia.

#### 4.4.7. Cromo

Este elemento no es esencial y además es tóxico para las plantas. No tiene ningún mecanismo de absorción específico. Sin embargo, la absorción de Cr depende de su forma química. Por ejemplo, Cr (VI) es tomado activamente, mientras que el Cr (III) ingresa de forma pasiva a través de los transportadores de aniones esenciales, tales como sulfato, y se almacena en la pared celular (Zayed y Terry 2003). Shanker et al. (2005) revisaron las relaciones conocidas en cuanto a los niveles de Cr en plantas y concluyeron que una alta concentración de Cr se asocia con una baja concentración de nutrientes minerales, tales como Ca, K, Mg, P, B, y Cu. Cr puede interferir con la absorción de otros elementos iónicamente similares, tales como Fe y S. Moral et al. (1996) estudiaron el efecto de Cr de la concentración de nutrientes minerales en el tomate y demostraron que afecta negativamente a la absorción de Fe. En el caso de Fe, la reducción de su absorción puede ser debido a la competencia con los iones químicamente similares. Además, Shanker et al. (2003) sugirieron que la absorción de nutrientes puede disminuir debido a la inhibición de la actividad de la H<sup>+</sup> ATPasa en la membrana plasmática. A pesar del consenso general en la literatura, todavía hay cierto desacuerdo sobre si aumentos en concentración de Cr afecta el contenido de Fe (Barceló et al., 1993). Sin embargo hay consenso en cuanto al efecto significativo del Cr en el contenido de N de las plantas. Kumar y Joshi (2008) concluyeron que el Cr (VI) afecta negativamente el contenido de N al interferir con enzimas clave en su metabolismo, hallazgos similares han sido reportados en *Miscanthus sinensis* (Arduini y col., 2006) y *Nelumbo nucifera* (Vajpayee et al., 1999). Dube et al. (2003) estudiaron la interacción entre Cr y P en *Citrullus*, demostrando que concentraciones crecientes de Cr se asociaron con concentraciones crecientes de P en hojas de *Citrullus*. Esta acumulación de P podría ser debido a la interferencia directa de Cr con el metabolismo del P en plantas.

Li et al. (2011) evaluaron la capacidad de *Panicum virgatum* de absorber Cr en suelos contaminados con este metal pesado. En plantas de 40 días se midieron índices fisiológicos y la producción de biomasa y no se encontraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento con bajos e intermedios niveles de Cr. Sin embargo, altos contenidos de Cr en el suelo (mayores a 600 ppm) afectaron el crecimiento de raíces y biomasa aérea y se correspondieron con altos contenidos en tallos y raíces de *Panicum*. Esto da cuenta de la alta capacidad de absorción de Cr y su potencial para la remediación de suelos contaminados con Cr.

Por su parte, Chen et al (2012) estudiaron la capacidad de *Panicum virgatum* para la removilización de Cd, Cr y Zn mediante el análisis de la biomasa producida y el contenido de metal pesado en el tejido vegetal. A partir de ello elaboraron diferentes modelos para predecir la cantidad de metales que *Panicum* puede extraer. Comparado con otras especies, los autores categorizan a *Panicum* como un acumulador moderado de estos metales, más que un

hiperacumulador. Sin embargo, dada su fuerte aptitud agronómica en regiones con frecuencia relegadas a áreas marginales, es un buen candidato para remediación de zonas afectadas.

En nuestro trabajo se observa un incremento de la concentración de Cr en condiciones de sequía, en línea con lo informado por Li et al. (2011) y Chen et al. (2012), dando indicios que *Panicum* es un buen candidato para difundir en suelos con alta concentración de metales pesados, especialmente en regiones marginales como la nuestra, donde la limitación hídrica es un componente permanente.

#### **4.5. Análisis multivariado**

Los datos multielementales obtenidos por ICP-AES son de naturaleza multivariada. Estos datos comprenden una matriz de valores que, en conjunto, generan los llamados datos de primer orden (matriz bidimensional) cuyas columnas corresponden a las variables (concentración de elementos) y cuyas filas a las muestras (tratamientos y variedades). Estos datos pueden ser utilizados para extraer información relevante mediante técnicas quimiométricas no supervisadas, como el análisis de componentes principales (PCA). Esta técnica multivariada se utiliza en la búsqueda de clasificaciones y de información oculta, con la finalidad de reconocer origen geográfico, variedades, calidades, etc.

En esta tesis, el análisis multivariado de clasificación se realizó mediante análisis de componentes principales (PCA) el cual permite la reducción de las variables originales (concentración elemental en cada muestra) a unas pocas componentes principales, resaltando así la información relevante del sistema, la cual se encuentra oculta en las dimensiones de las variables originales. Los modelos de clasificación obtenidos fueron obtenidos utilizando el programa Unscrambler X 10.3 (Camo, Trondheim, Noruega) empleando como datos originales las concentraciones elementales halladas mediante ICP-AES en cada muestra, con datos centrados por columna para evitar la sobreestimación de variables por diferencias en las magnitudes de concentración.

Los métodos de calibración multivariados son ampliamente utilizados para explicar ciertas relaciones entre los datos que son difíciles de observar, de utilidad para identificar las diferencias ocultas y establecer relaciones entre y dentro de grupos de datos, como los dendrogramas o las jerarquías de relaciones entre familias de datos (Mongay Fernández, 2005). El análisis de los resultados obtenidos en este trabajo fueron analizados mediante componentes principales, y se observaron dos modelos que permitirían explicar las variables estudiadas (por ejemplo, cultivar y tratamiento hídrico).

##### **4.5.1. Modelo multivariado (PCA-1)**

En este modelo, los elementos Zn y Li poseen la mayor influencia en el modelo PCA, hallándose por debajo los restantes elementos (loadings, Figura 10). La Figura 11 (scores) muestra que los tratamientos del cultivar Kanlow se agruparon por encima de la componente principal 2, mientras que los correspondientes al cultivar Greenville se agruparon por debajo.

Esta distribución estaría indicando que Kanlow posee mayor concentración de Li y Zn en comparación a Greenville, siendo estas diferencias en el contenido de ambos elementos inherentes al genotipo de ambos cultivares.

El cultivar Kanlow pertenece, según la clasificación actualmente aceptada y propuesta por Porter (1966) a los ecotipos de tierras bajas, mientras que el cv. Greenville pertenece al grupo de tierras altas. Ambos grupos poseen mezclas genéticas de diferente origen y evolución, y mantienen características fenotípicas distintivas.

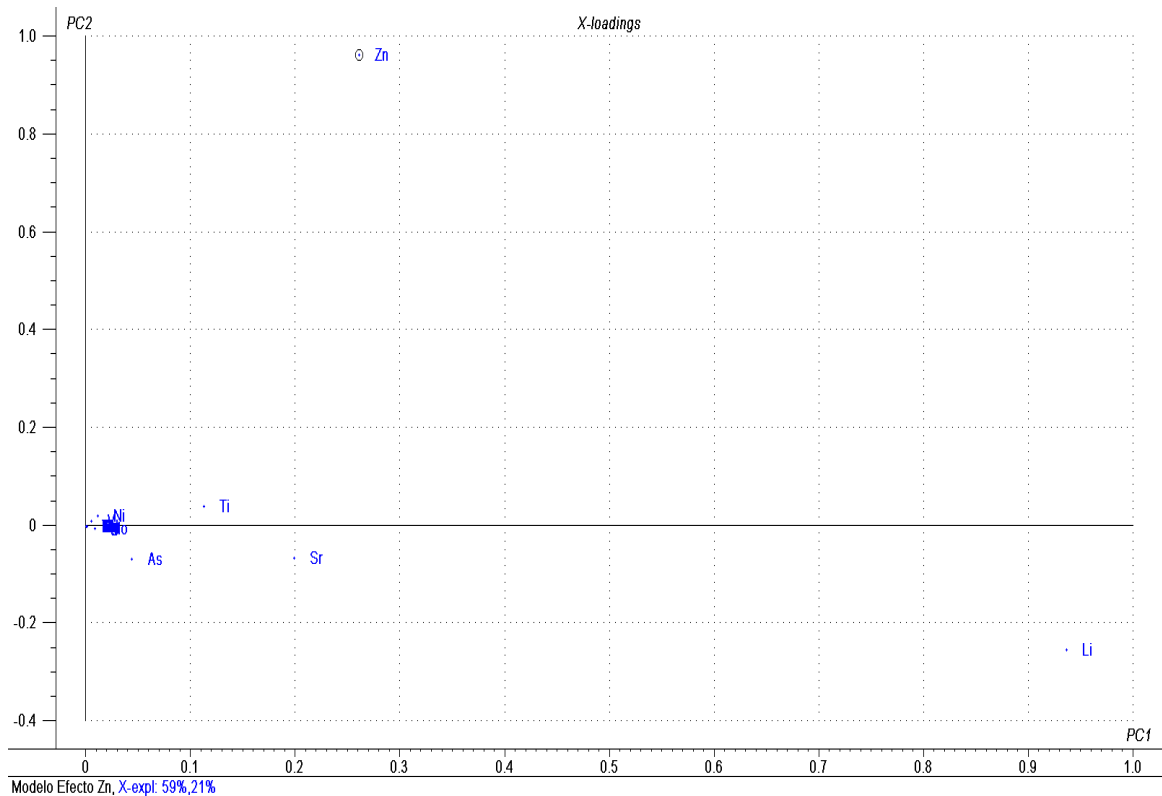


Figura 10. Loadings del modelo PCA-1

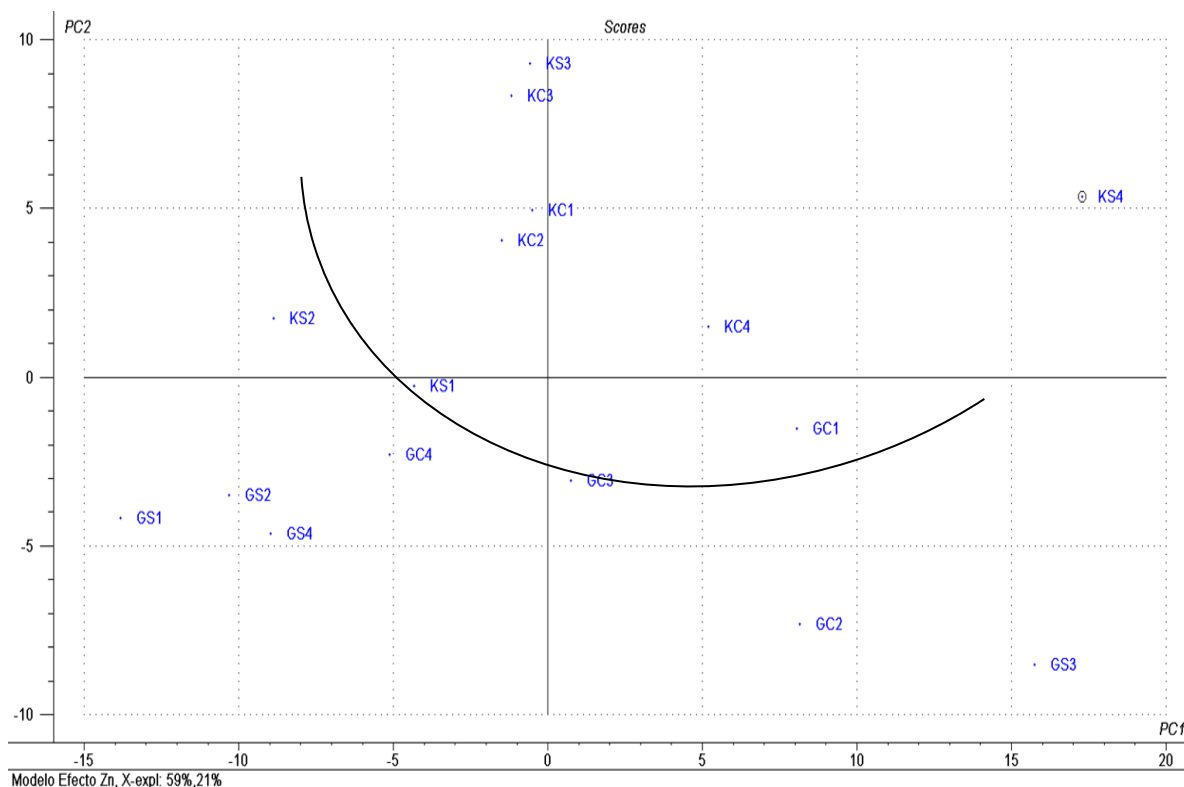


Figura 11. Scores del modelo PCA-1

Ecotipos ampliamente adaptados a tierras altas se extienden desde latitud norte  $34^{\circ}\text{N}$  hasta gran parte del este de Canadá y son extremadamente raros en latitudes por debajo de  $34^{\circ}\text{N}$  sujetas a sequías ocasionales o frecuentes. Mientras tanto, los ecotipos de tierras bajas se encuentran en sitios con suelos húmedos propensos a la estacionalidad, están ampliamente adaptados en la porción occidental de la cordillera a aproximadamente  $42^{\circ}\text{N}$  (Casler, 2012).

El ecotipo de tierras bajas es tetraploide (Casler, 2012), por lo general de alto porte, tallos gruesos y vigorosos, crecimiento acelerado y tipo manojo, debido a que posee rizomas menos vigorosos (Moser y Vogel, 1995; Carrera 2010). La producción de biomasa tiene mayor rendimiento en los lugares más al sur, ventaja que disminuye al aumentar la latitud. Rinde entre un 30-50% más que los cultivares de tierras altas en la zona de transición donde ambos están adaptados, mientras que en los lugares más extremos del norte, el rendimiento de la biomasa está limitado por su incapacidad para sobrevivir varios inviernos (Casler et al., 2004). Contrariamente, el ecotipo de tierras altas (tetraploide y octoploide), tiene bajo porte y tallos finos, posee rizomas más vigorosos y por ello presenta un desarrollo en forma de césped (Casler 2012). Este biotipo logra su mayor desarrollo bajo condiciones más moderadas de agua en el suelo, y de acuerdo a algunos autores presenta mayor tolerancia a la sequía que el ecotipo descrito anteriormente, el cual se destaca en zonas húmedas (Voguel 2004). Sin embargo, otros autores han estudiado la respuesta de ambos ecotipos a diferentes situaciones de estrés y han encontrado que el ecotipo de tierras bajas presenta mayor tolerancia frente a estrés hídrico y salino (Barney et a., 2009, Aimar *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2015).

En la actualidad existe una gran diversidad de material genético, muchos de ellos aun sin clasificar según origen y polimorfismos asociados con su hábitat. En planes de mejoramiento,

la cruce híbrida entre materiales de tierras bajas y tierras altas es un objetivo largamente buscado. En este sentido es crucial la identificación del pool genético de origen para explotar el vigor híbrido de la progenie y la complementariedad entre los padres. En este contexto, la identificación de marcadores que indiquen el origen genético de cada especie es una contribución importante al mejoramiento genético de *Panicum virgatum*. En este trabajo surge como posible discriminante entre ecotipos de tierras altas y bajas el contenido de Zn y Li. Futuros ensayos deberían orientarse al esclarecimiento de esta posibilidad.

#### 4.5.2. Modelo multivariado PCA-2

El modelo PCA-2 explica el 93 % de la distribución de los datos principalmente debido a los elementos Si, P y Na (Figura 11). Los tratamientos sequia de ambos cultivares (a excepción de la réplica 4 del cultivar Kanlow, Figura 12) se agrupan en los cuadrantes I y IV, es decir en la región derecha de la componente principal 1. Este eje está explicado por un mayor contenido del elemento P, de gran relevancia en el metabolismo general de la planta, incluyendo el proceso de fotosíntesis.

Por su parte los tratamientos control, también de ambos cultivares, se encuentran agrupados en el gráfico, y son explicados por el elemento Na. Esta diferencia en el contenido de Na de ambos cultivares también se observó en el análisis univariado mediante ANOVA ( $p < 0,05$ ) y fue mostrado en la Tabla 1. La concentración de Na fue mayor en el cultivar Kanlow y podría estar asociada al metabolismo de este elemento, relevante en el ajuste osmótico en situaciones de estrés hídrico y salino.

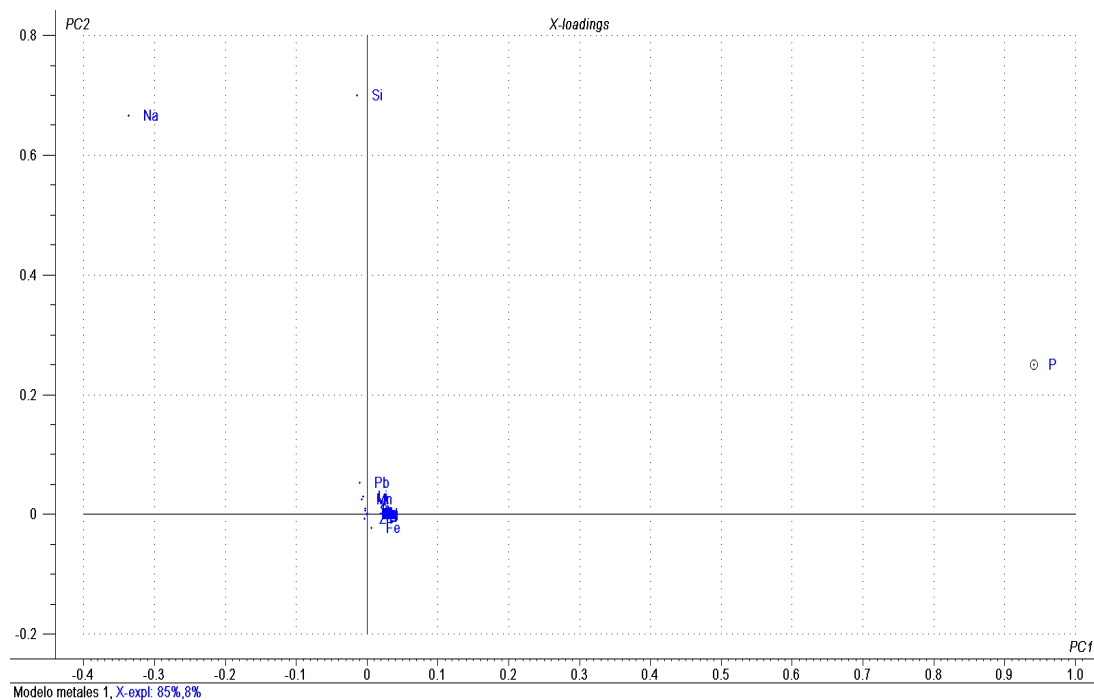


Figura 10. Loadings del modelo PCA-2

En relación al P, los tratamientos de sequía en ambos cultivares estarían indicando su mayor contenido bajo situación de estrés, es decir que bajo déficit hídrico *Panicum virgatum* optimiza su utilización o maximiza su absorción.

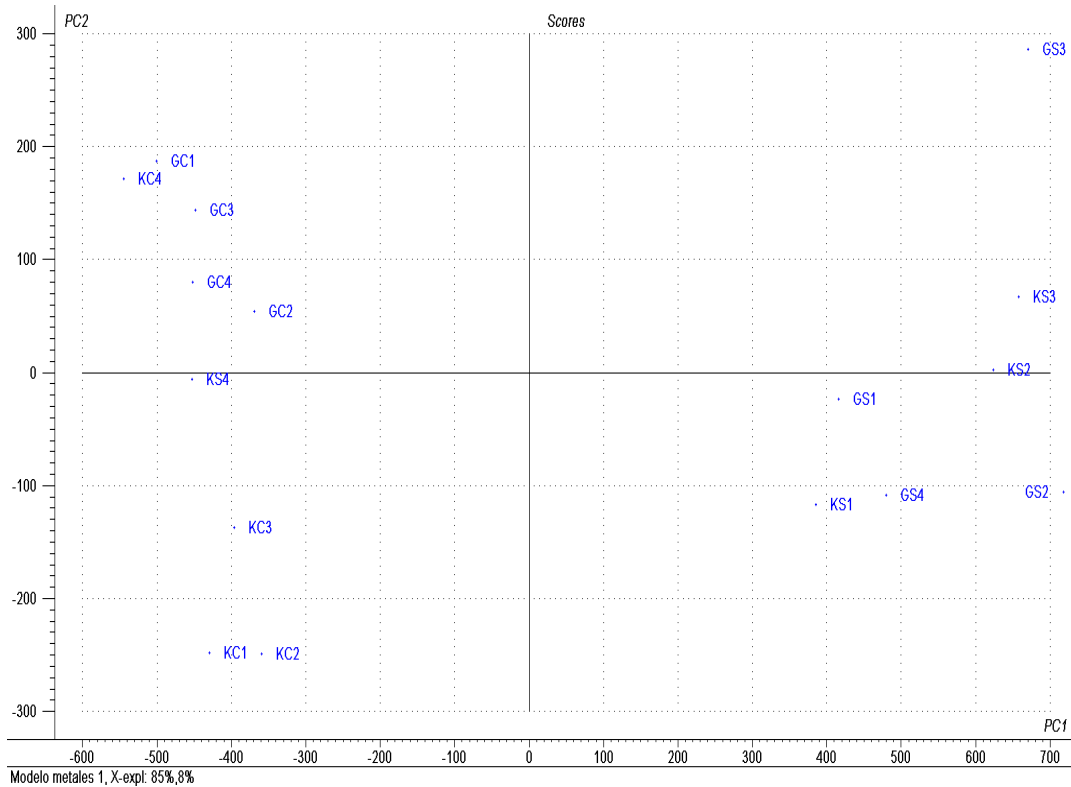


Figura 11. Scores del modelo PCA-2

La síntesis de los fotoasimilados depende de la disponibilidad de Pi en el citoplasma y está relacionada con el transporte de triosa fosfato de los cloroplastos al citoplasma y al proceso de síntesis de sacarosa (Hendrickson, Crow y Furbank, 2004). Durante la fotosíntesis, los cloroplastos reciben Pi y liberan Triosa-P al citoplasma. El flujo entre carbono y Pi está mediado por el transportador Triosa-P, que transporta el sistema antiporte de Triosa-P / Pi a través de la membrana del cloroplasto (Flügge, Häusler, Ludewig, & Fischer, 2003). Además, la partición de asimilados entre almidón y sacarosa depende de una interacción de tres factores: la concentración de P citoplásmico, que regula la exportación de Triosa-P de los cloroplastos; la actividad de las principales enzimas de síntesis de sacarosa; y la regulación de la actividad ADP-glucosa pirofosforilasa (Massonneau, Martinoia, Dietz, & Mimura, 2000). Por lo tanto, la escasez de Pi en el citoplasma limita la síntesis de ATP (Lawlor & Cornic, 2002) y la liberación de Triosa-P en el cloroplasto, que puede restringir la síntesis de ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) y consecuentemente limitar la fotosíntesis.

Los periodos de sequía que duran aproximadamente diez días, pueden reducir drásticamente el flujo de difusión de Pi del suelo a la planta, causando una pérdida significativa de productividad de la planta (Novais y Smyth, 1999). La absorción y acumulación de Pi sucede cuando el suelo está bien provisto de agua, por lo tanto, después de una rehidratación, la absorción y la asimilación de Pi deberían ser eficientes tan pronto como

se restablezca la difusión del flujo (Novais y Smyth, 1999). Según Novais y Smyth (1999), antes de la pérdida de turgencia y del plegamiento de las hojas -ambos síntomas comunes observados como consecuencia de la deficiencia de agua en el suelo- se produce una pérdida de productividad debido a la escasa acumulación de Pi capaz de sostener el crecimiento de la planta. En la literatura hay evidencia de que el suministro de fósforo es un posible mitigador de los daños causados por el estrés hídrico en el crecimiento y la fisiología de las plantas de ciclo C3 (Firmano, Kuwahara, & Souza, 2009) y C4 (Kuwahara & Souza, 2009).

Por su parte, en periodos de sequía más prolongadas (cerca de los 35 días), es posible que el aparato fotosintético se aclimate, restaurando la función de fotosíntesis. A pesar de esta tendencia de mantenimiento de la capacidad fotosintética en las plantas bajo estrés hídrico, las reducciones en el crecimiento de las plantas indican que los fotoasimilados pueden haber sido preferentemente orientados a los procesos de reparación y mantenimiento celular, reduciendo la energía disponible para el mantenimiento de la producción de biomasa (Amthor, 1994).

En un estudio realizado con especies C4 se analizó la capacidad de mitigación del P en condiciones de estrés hídrico comparando cinco genotipos (Kuwahara et al., 2016). Los pastos evaluados disminuyeron la absorción de P en condiciones de sequía, a excepción de *Panicum maximum* que incrementó la absorción de P. Esto podría estar explicado por un mayor desarrollo del sistema radicular, una aclimatación frecuente en muchas especies en condiciones de limitación hídrica. El flujo difusivo, que es el mecanismo predominante del transporte de P en el suelo, puede limitar el suministro de P de plantas deficientes en agua. Sin embargo, esta limitación puede compensarse aumentando el área superficial del sistema radicular. Por lo tanto, los cambios en la arquitectura del sistema radicular pueden contribuir a una mayor adquisición de P, esta mayor relación entre la biomasa de raíces y el número de brotes de plantas es una respuesta a la baja disponibilidad de P, proporcionando así una mayor superficie de absorción en relación con la biomasa total de plantas y mejorar la adquisición del nutriente (Wissuwa, 2003). Este comportamiento de *Panicum maximum* es similar a lo observado en nuestro trabajo con *Panicum virgatum*, y podría explicar el mayor contenido de P en plantas sometidas a estrés.

## 5. CONCLUSIONES

El comportamiento de las variables morfo fisiológicas evaluadas indican que el cultivar Kanlow posee una amplia base genética, que le confiere una buena adaptabilidad y un mayor potencial de rendimiento, capaz de aprovechar buenas condiciones ambientales y traducirlas en producción de materia seca, por lo que en condiciones de sequía tiene la capacidad de disminuir su producción de biomasa para llegar a completar su ciclo. En contraste, el cultivar Greenville no tendría la habilidad para disminuir su potencial de producción de biomasa frente a una situación de estrés poniendo de manifiesto un comportamiento más estable tanto en buenas condiciones de irrigación como en situación de estrés hídrico, aunque esto pone en desventaja al cultivar, ya que tiene que mantener una misma biomasa con menos recursos.

En este trabajo se encontraron diferencias en los niveles de Si, Fe, Ba y Zn entre el ecotipo de tierras bajas (cv. Kanlow) y el de tierras altas (cv. Greenville). Excepto el Si, el resto de los minerales presentó mayor concentración en el cultivar Kanlow. Estas diferencias entre cultivares no obedecen a un comportamiento diferencial frente a estrés hídrico, por el contrario, son inherentes a la composición genética de ambos cultivares. Estos resultados coinciden con lo informado por otros autores (EL-Nashaar et al. ,2009; Lemus et al., 2002), donde se indica que el cv. Kanlow se encuentra entre los genotipos con mayores niveles de minerales en planta. Sin embargo, el trabajo realizado por El-Nashaar et al (2009) resalta la influencia que ejercen los factores ambientales en la concentración de elementos a nivel de la planta, por sobre la contribución del pool genético y la latitud de origen de los cultivares. Estos autores concluyen que el ecotipo logra explicar parcialmente las diferencias encontradas. Por este motivo, se destaca la importancia de realizar estudios en condiciones de campo en diferentes ambientes.

Los altos niveles de Zn encontrados en el cv. Kanlow permiten pensar en la capacidad de este genotipo para tolerar suelos con altos niveles de Zn. Estos resultados están en línea con lo propuesto por Gibson y Pollard (1988) que indican a *Panicum virgatum* como una especie tolerante a altos contenidos de Zinc y lo proponen como un buen candidato para la recuperación de suelos contaminados por la acción de la minería.

Nuestro trabajo también encontró que el nivel de Cr y Ni (otros dos metales pesados) se incrementa de manera significativa en condiciones de sequía. Estos resultados se corresponden con lo informado por Kachenko (2008) y Bhatia et al. (2005) en referencia a la absorción de Ni en situación de déficit hídrico. Por otra parte, Li et al. (2011) y Chen et al. (2012), también encuentran altos niveles de Cr en situación de sequía, y postulan a *Panicum virgatum* como un buen candidato para difundir en suelos con alta concentración de metales pesados, especialmente en regiones marginales con limitaciones ambientales. Lo expuesto fortalece el concepto del uso de esta gramínea en la región semiárida pampeana, la limitación hídrica es un componente permanente.

Otro punto a destacar son bajos niveles de Na encontrados en ambos cultivares en situación de sequía. Se ha observado que la baja absorción de Na es una estrategia usada por algunas especies para tolerar la salinidad, al punto que la relación  $K^+/Na^+$  se ha considerado como un índice de tolerancia a salinidad. Esto podría explicar, al menos en parte, el buen



comportamiento manifestado por *Panicum virgatum* en condiciones de salinidad (Anderson et al., 2015, Hu et al., 2015, Liu et al., 2012) y permitirían pensar en este pasto como una alternativa para ser utilizado en suelos salinos.

Nuestros resultados, en conjunto con otras investigaciones, estarían indicando que *Panicum virgatum* cv. Kanlow es un buen candidato para incorporar en como cultivo forrajero en la Región Semiárida Pampeana. El buen comportamiento del cv. Kanlow bajo restricciones ambientales (i.e. sequía, salinidad, inundación) ha sido reportado por varios autores (Barney et al., 2009, Aimar et al., 2014, Anderson et al., 2015, Hu et al., 2015, Liu et al., 2012). Posiblemente la alta adaptabilidad (i.e. buen desempeño en un rango de condiciones ambientales) demostrada por éste genotipo esté en parte asociada con una alta concentración de minerales. Su gran producción de biomasa y sus características morfo fisiológicas también lo posicionan como un cultivo alternativo para la producción de forraje para el ganado, la producción de bioenergía y la recuperación suelos con problemas de contaminación de diversa índole.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, M.S.A.; Ashraf, M. (2011). "Essential roles and hazardous effects of nickel in plants". *Rev. Env. Cont. Toxicol.*, 214: 125-167.
- Ahmad, M.S.A.; Ashraf, M.; Hussain, M. (2011). "Phytotoxic effects of nickel on yield and concentration of macro- and micro-nutrients in sunflower (*Helianthus annuus* L.) achenes". *J. Hazard. Mat.*, 185: 1295-1303.
- Ahmadi, A.; Emam, Y.; Pessarakli, M. (2009). "Response of various cultivars of wheat and maize to salinity stress". *J. Food Agri. Environ.* 7: 123 – 128.
- Ahmed, A. S.; Muhamed, S.M.; Singla, M. L.; Tabassum, S.; Naqvi, A. H.; Azam, A. (2010). "Band gap narrowing and fluorescence properties of nickel doped SnO<sub>2</sub> nanoparticles". *Journal of Luminescence*: 131 (2011) 1–6.
- Ali, M.A.; Ashraf M.; Athar, H.R. (2009). "Influence of nickel stress on growth and some important physiological/biochemical attributes in some diverse canola (*Brassica napus* L.) cultivars". *J. Hazar. Mater.*, 172, 964-969.
- Anderson, E.K.; Voigt, T.B.; Kim, S.; Lee, D.K. (2015). "Determining effects of sodicity and salinity on switchgrass and Prairie cordgrass germination and plant growth". *Industrial Crops and Products* 64: 79–87.
- Arduini, I.; Masoni, A.; Ercoli, L.; Mariotti M. (2006): "Grain yield, and dry matter and nitrogen accumulation and remobilization in durum wheat as affected by variety and seeding rate". *European Journal of Agronomy*, 25: 309–318.
- Baccouch, S.; Chaoui, A.; El Ferjani, E. (2001). "Nickel toxicity induces oxidative damage in *Zea mays* roots". *Journal of Plant Nutrition*, 24: 1085–1097.
- Banowetza, G.M.; Boatengb, A.; Steiner, J.J.; Griffitha, S.M.; Sethid, V.; El-Nashaara, H. (2008). "Assessment of straw biomass feedstock resources in the Pacific Northwest". *Biomass and Bioenergy* N° 32. 629-634.
- Barcelo, J.; Poschenrieder, C.; Vazquez, M.D.; Gunse, B.; Vernet, J.P. (1993). "Beneficial and toxic effects of chromium in plants: solution culture, pot and field studies". *Studies in Environmental Science* No. 55, Paper Presented at the 5th International Conference on Environmental Contamination, Morges, Switzerland.
- Barker, A.V.; Pilbeam, D. J. (2007). "Handbook of Plant Nutrition". Boca Raton, FL: Taylor and Francis.
- Baxter, L. L. (1993). "Ash deposition during biomass and coal combustion: a mechanistic approach". *Biomass and Bioenergy*, 4(2), 85-102.
- Benito, T. A.; Recoulat, F. (2014). Trabajo Final de Graduación. "Análisis de la interacción genotipo ambiente del rendimiento de forraje y grano de triticales y tricipiros en la región pampeana semiárida y subhúmeda seca." Facultad de Agronomía. Ingeniería Agronómica. UNLPam.
- Bhatia, N.P.; Baker, A.J.M.; Walsh, K.B.; Midmore, D.J. (2005). A role for nickel in osmotic adjustment in drought-stressed plants of the nickel hyperaccumulator *Stackhousia tryonii* Bailey. *Planta* 223: 134-139.

- Borlotti, A.; Vigani, G.; Zocchi, G. (2012) "Iron deficiency affects nitrogen metabolism in cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants". *BMC Plant Biology* 2012; 12: 189. doi: 10.1186/1471-2229-12-189.
- Briat, J. F.; Curie, C.; Gaymard, F. (2007). "Iron utilization and metabolism in plants". *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 276–282 10.1016/j.pbi.2007.04.003.
- Brissot, P.; Ropert, M.; Le Lan, C.; Loréal, O. (2011). "Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*: 1820 (3). 403-410.
- Broadley, M. R.; White, P. J.; Hammond, J. P.; Zelko, I.; Lux, A. (2006) "Zinc in plants". *New Phytol.* 2006, 173, 677–702.
- Buechel, T. (Julio 2016). "Rol del níquel en el cultivo de plantas". PROMIX. // <http://www.pthorticulture.com>.
- Cakmak, I. (2000) "Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species". *New Phytol.* 2000, 146, 185–205.
- Cakman, I.; Yilmaz, A.; Kalayci, M.; Braun, H. J. (1996). "Zinc deficiency as a critical problem in wheat production in Central Anatolia". *Plant and Soil.* 180:165-181.
- Camiña, J.M.; Cantarelli, M.A.; Lozano, V.A.; Boeris, M.S.; Irimia, M.E.; Gil, R.A. y Marchevsky, E.J. (2008). "Chemometric tools for the characterization of honey produced in La Pampa, Argentina, from their elemental content, using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)". *Journal of Apicultural Research and Bee World* 47: 102-107.
- Cantarelli, M.A.; Camiña, J.M.; Pettenati, E.M.; Marchevsky, E.J.; Perellano, R.G. (2011). "Trace mineral content of Argentinean raw propolis by neutron activation analysis (NAA): Assessment of geographical provenance by chemometrics". *LWT-Food Sci Technol* 44: 256-260.
- Cantarelli, C. C., Flyvbjerg, B., Molin, E. J. E., & Wee, B. v. (2010). "Cost Overruns in Large-scale transportation infrastructure projects: Explanations and their theoretical embeddedness". *European Journal of Transport and Infrastructure Research (EJTIR)*, 10(1), 5-18.
- Cantarelli, M.A.; Pellerano, R.G.; Marchevsky, E.J. y Camiña, J.M. (2008). "Quality of honey from Argentina: study of chemical composition and trace elements". *Journal of the Argentina Chemical Society* 96: 33-41.
- Chatzistathis, T. (2014) "Plant responses to Iron, Manganese, and Zinc deficiency stress". En *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance: Volume 1.* Ed. Ahmad, P., Rasool S. Elsevier.
- Chatzistathis, T. (2014) "Micronutrient Deficiency in Soils & Plants, Micronutrient Solubility and Availability in Soils". Bentham Science Publishers Ltd., Oak Park.
- Chen, B.; Lai, H.; Juang, K. (2012). "Model evaluation of plant metal content and biomass yield for the phytoextraction of heavy metals by switchgrass". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80 (2012) 393–400.

- Chong-Qing, W.; Tao, W.; Ping, M.; Zi-chao, L.; Ling, Y. (2013). “Quantitative trait loci for mercury tolerance in rice seedlings”. *Rice Sci.* 20, 238–242. 10.1016/S1672-6308(13)60124-9.
- Cramer, G.R.; Epstein, E.; Läuchli, A. (1991). “Effects of sodium, potassium and calcium on salt-stressed barley”. *Physiol. Plant.* 81,197–202.
- Dal Corso, G.; Manara, A.; Furini, A. (2013a). “An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots”. *Metallomics* 5, 1117–1132. 10.1039/c3mt00038a.
- Di Paola-Naranjo, R.D.; Baroni, M.V.; Podio, N.S.; Rubinstein, H.R.; Fabani, M.P.; Badini, R.G.; et al. (2011). “Fingerprints for main varieties of Argentinean wines: terroir differentiation by inorganic, organic, and stable isotopic analyses coupled to chemometrics”. *J. Agric. Food Chem.* 59: 7854-7865.
- Dube, B.K.; KamleshTewari, K.; Chatterjee, J.; Chatterjee, C. (2003) “Excess chromium alters uptake and translocation of certain nutrients in citrullus”. *Chemosphere* 53:1147-1153.
- Duman F., Ozturk F. (2010). “Nickel accumulation and its effect on biomass, protein content and antioxidative enzymes in roots and leaves of watercress (*Nasturtium officinale* R.)”. *Br. J. Environ. Sci.* 22 526–532. Doi: 10.1016/S1001-0742(09)60137-6.
- El-Nashaar, H. M.; Banowetz, G. M.; Griffith, S. M.; Casler, M. D.; Vogel, K. P. (2009) “Genotypic variability in mineral composition of switchgrass”. *Bioresource Technology* 100: 1809–1814.
- Epstein, E. (1999). “Silicon and Plant Growth. Annual Review of Plant Physiology”. *Plant Mol. Biol.* 50: 641-664.
- Ernst, W.H.O.; Krauss, G.J.; Verkleij, J.A.C.; Wesenberg, D. (2008). “Interaction of heavy metal with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view”. *Plant Cell Environ.* 31, 123–143. 10.1111/j.1365-3040.2007.01746.x.
- Farias, J.G.; Antes, F.L.G.; Nunes, P.A.A.; Nunes, S.T.; Schaich, G.; Rossato, L.V.; et al. (2013). “Effects of excess copper in vineyard soils on the mineral nutrition of potato genotypes”. *Food Energy Security* 2, 49–69. 10.1002/fes3.16.
- Fidalgo, F.; Azenha, M.; Silva, A.F.; de Sousa, A.; Santiago, A.; Ferraz, P.; et al. (2013). “Copper-induced stress in *Solanum nigrum* L. and antioxidant defense system responses”. *Food Energy Security* 2, 70–80. 10.1002/fes3.20.
- Gajewska E, Sklodowska M.(2007) “Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves”. *Biometals.* 2007;20:27–36. doi: 10.1007/s10534-006-9011-5.
- Gajewska, E.; Sklodowska, M. (2007). “Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves”. *Biometals*, 20: 27–36.
- Garzón, T.; Gunsé, B.; Moreno, A.R.; Tomos, A.D.; Barceló, J.; Poschenrieder, C. (2011). “Aluminium-induced alteration of ion homeostasis in root tip vacuoles of two maize varieties differing in Al tolerance”. *Plant Sci.* 180, 709–715. 10.1016/j.plantsci.2011.01.022.
- Gibson, J.P.; Polard, A.J. (1988). “Zinc tolerance in *Panicum virgatum* L. (switch grass) from the Pitcher mine area”. *Proc. Oklahoma Acad. Sci.* 68:45-48.

- Gill, S.S.; Hasanuzzaman, M.; Nahar, K.; Macovei, A.; Tuteja, N. (2013). "Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants". *Plant Physiol. Biochem.* 63, 254–261. 10.1016/j.plaphy.2012.12.001.
- Graham, D.R.; Webb, M.J. (1991). "Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants". In : Mortvedt J.J., Cox F.R., Shuman L.M., Welch, R.M. (Eds.) *Micronutrients in Agriculture*, 2nd ed. Soil Science Society of America Inc., Madison, Wisconsin, USA, pp. 329-370.
- Grusak, M. A.; Delle Penna, D. (1999). "Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition". *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* 50: 133-161.
- Habibi, G. (2014) "Role of Trace Elements in Alleviating Environmental Stress". En *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance: Volume 1*. Ed. Ahmad,P, Rasool S. Elsevier.
- Hayat, S.; Khalique, G.; Irfan, M.; Wani, A.S.; Tripathi, B.N.; Ahmad, A. (2012). "Physiological changes induced by chromium stress in plants: an overview". *Protoplasma* 249, 599–611. 10.1007/s00709-011-0331-0.
- Hong, E.C.; Chung, W.T.; Kang, G.H.; Park, H.D.; Suh, O.S.; Na, J.C.; Kim, W.; Nho, W.G.; Hwangbo, J. (2008). "Evaluation of true metabolizable energy and the effect of corn distillers dried rains with soluble in the diets on broiler performance and nutrient availability". *Korean J. Poul. Sci.* 35:381-389.
- Hrishikesh Upadhyaya, H.; Panda, S. K. (2013), "Abiotic stress responses in tea [*CAMELLIA SINENSIS* L (o) *kUNTZE*]: an overview". *Reviews in Agricultural Science*, 1: 1-10, 2013. doi: 10.7831/ras.1.1.
- Hu, G.; Liu, Y.; Zhang, X.; Yao, F.; Huang, Y.; Ervin, E.H.; Zhao, B. (2015). "Physiological Evaluation of Alkali-Salt Tolerance of Thirty Switchgrass (*Panicum virgatum*) Lines". *PLOS ONE* [DOI:10.1371/journal.pone.0125305].
- Hu, H.; Sparks, D. (1991) "Zinc deficiency inhibits chlorophyll synthesis and gas exchange in 'Stuart' pecan". *Hortic. Sci.* 1991, 26, 267–268.
- Janicka-Russak, M.; Kabała, K.; Burzyński, M.; Kłobus, G. (2008). "Response of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase to heavy metal stress in *Cucumis sativus* roots". *J. Exp. Bot.* 59, 3721–3728. 10.1093/jxb/ern219.
- Jenkins, B.M.; Baxter, L.L.; Miles, T.R. Jr.; Miles, T.R. (1998). "Combustions properties of biomass". *Fuel Process Technol* 54:17-46
- Kabata-Pendias, A. (2001). "Trace elements in soils and plants". CRC Press. Boca Raton London New York Washington, D.C. Third edition. 145 p.
- Kachenko, A.G. (2008). "A role for nickel in drought resistance in water stressed *H. floribundus* subsp. *Floribundus*". Chapter 8: Role of hyper accumulated Ni in osmotic adjustment under water stress. [Online]. Available at <http://ses.library.usyd.edu.au>. Sydney eScholarship Repository.
- Kähkönen, M & Kairesalo, T (1998), "The effect of nickel on the nutrient fluxes and on the growth of *Elodea Canadensis*". *Chemosphere*, vol 37, pp. 1521-1530.

- Kali-gmbh.com. (2017). K+S KALI GmbH - Sodio. [online] Available at: [http://www.kali-gmbh.com/eses/fertiliser/advisory\\_service/nutrients/sodium.html](http://www.kali-gmbh.com/eses/fertiliser/advisory_service/nutrients/sodium.html).
- Karim, M.A.; Nawata, E.; Shigenaga, S. (1992). "Dry matter production and distribution of mineral ions in different parts of the plant in hexaploid triticale". *Japanese Journal of Crop Science*. 61. 439-446.
- Khan, S.A.; Abdullah-Al-Mamun, M.D.; Abullah-Al-Mahmud, M.; Mahfuz Bazzaz, Hossain A.; Alam, S. Md.; Shamimuzzaman, Md. Abdul Karim. (2014). "Effects of salt and water stress on leaf production, sodium and potassium ion accumulation in soybean". *Journal of Plant Sciences* 2014; 2(5): 209-214.
- Khan, M.S.A.; Hamid, A.; Salahuddin, A.B.M.; Quasemand, A.; Karim, M.A. (1997). "Effect of sodium chloride on growth, photosynthesis and mineral ions accumulation of different types of rice (*Oryza sativa* L.)". *J. Agronomy & Crop Science*. 179: 149-161.
- Khorshidi, M.B.; Yarnia, M.; Hassanpanah, D. (2009). "Salinity effect on nutrient accumulation in alfalfa shoots in hydroponic condition". *J. Food Agric. Environ.* 7,787–790.
- Kim SA, Guerinot ML (2007) Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Lett* 581:2273–2280.
- Kuwahara, F.A.; Souza, G.M.; Guidorizi, K.A.; Costa, C.; de Lima Meirelles, P.R. (2016). "Phosphorus as a mitigator of the effects of water stress on the growth and photosynthetic capacity of tropical C4 grasses". *Acta Scientiarum* Doi: 10.4025/actasciagron.v38i3.28454
- Lemus, R.; Brummer, E.C.; Moore, K.J.; Molstad, N.E.; Burras, C.L.; Barker, M.F. (2002). "Biomass yield and quality of 20 switchgrass populations in southern Iowa, USA". *Biomass Bioenergy* 23, 433–442.
- Li, C.; Wang, Q.; Xiao, B.; Li, Y. (2011). "Phytoremediation Potential of Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) for Cr-polluted Soil". (D101105046410001)
- Lindsay, W. L.; Norvell, W. A. (1978) "Development of a DTPA soil test for Zinc, Iron, Manganese, and Copper", *Soil Sci. Amer. J.*, 42:421-428.
- Liu, M., Wang, T.-Z. & Zhang, W.-H. (2015). "Sodium extrusion associated with enhanced expression of SOS1 underlies different salt tolerance between *Medicago falcata* and *Medicago truncatula* seedlings". *Env. Exp. Bot.* 110,46–55, doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.09.005.
- Liu, Y.; Zhang, X.; Miao, J.; Huang, L.; Frazier, T.; Zhao, B. (2012). "Evaluation of salinity tolerance and genetic diversity of thirty-three Switchgrass (*Panicum virgatum*) Populations". *Bioenerg. Res.* DOI 10.1007/s12155-014-9466-0.
- Mannan, M.A.; Karim, M.A.; Haque, M.M.; Khaliq, Q.A.; Higuchi, H.; Nawata, E. (2013). "Response of soybean to salinity: III. Water status and accumulation of mineral ions". *Trop. Agr. Develop.* Vol. 57(1): 41-48. Types of rice (*Oryza sativa*L.). *J. Agronomy & Crop Science*. 179: 149-161.
- Marschner, H. (1995). "Mineral Nutrition of Higher Plants". Boston, MA: Academic Press.

- Molassiotis, A.; Tanou, G.; Diamantidis, G.; Patakas, A.; Therios, L. (2006) “Effects of 4-month Fe deficiency exposure on Fe reduction mechanism, photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and antioxidant defense in two peach rootstocks differing in Fe deficiency tolerance”. *Journal of Plant Physiology*, 163 (2006), pp. 176-185.
- Moldes, C. A.; Molas, M. L.; Kiriachek, S. G.; Tsai, S. M. (2013). “Assessment of the Effect of Silicon on Antioxidant Enzymes in Cotton Plants by Multivariate Analysis”. Article in *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. DOI: 10.1021/jf4039088
- Moldes, C. A.; Camiña, J. M.; Medici, L.; Antunes Azevedo, R. (2012). “Physiological effects of glyphosate over amino acid profile in conventional and transgenic soybean (*Glycine max*)”. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 102: 134-141.
- Mongay Fernández, C. (2005). “Quimiometría”. Universitat de València. Guada Impresores, S.L.
- Monteiro, F.A.; Corrêa Nogueirol, R.; Carrijo Azevedo Melo, L.; Guirado, A. A. y da Rocha, F. (2011). “Effect of Barium on Growth and Macronutrient Nutrition in Tanzania Guineagrass Grown in Nutrient Solution”. *Communications In Soil Science And Plant Analysis Vol. 42 , Iss. 13*.
- Moosavi, A.A.; Mansouri, S.; Zahedifar, M. (2015). “Effect of Soil Water Stress and Nickel Application on Micronutrient Status of Canola Grown on Two Calcareous Soils”. *Plant Prod. Sci.* 18(3): 377—387.
- Moral, R.; Gomez, I.; Pedreno, J.N.; Mataix, J. (1996) “Absorption of Cr and effects on micronutrient content in tomato plant (*Lycopersicum esculentum M*)”. *Agrochimica*; 40:132–138.
- Ortiz, N.H. Seminario: “El estrés en las plantas”. Universidad Complutense de Madrid. The Linchen Cane Team: Grupo de investigación validado (Ref. 910081) “Interacciones Celulares en simbiosis Vegetales”. <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/cvicente>.
- Peck, A. W.; McDonald, G. K., (2010). “Adequate zinc nutrition alleviates the adverse effects of heat stress in bread wheat”. *Plant Soil* 337, 355-374.
- Pereyra Irujo, G.; Izquierdo, N.; Covi, M.; Aguirrezábal, L. (2009). “Variability in sunflower oil quality for biodiesel production: A simulation study”. *Biomass and Bioenergy* 33(3):459-468.
- Pilon-Smits, E. A.; Quinn, C. F.; Tapken, W; Malagoli, M.; Schiavon, M. (2009) “Physiological functions of beneficial elements”. *Curr Opin Plant Biol.* 12:267-74.
- Prasad, A. S. (2012). “Discovery of human zinc deficiency: 50 years later”. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 26, 66–69 10.1016/j.jtemb.2012.04.004
- Rahman, H.S.; Sabreen, S.; Alam, S.; Kawai, S. (2005). “Effects of Ni on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution”. *Journal of Plant Nutrition*, v. 28 (3): 393–404.
- Ranalli, A.; Pollastri, L.; Contento, S.; Di Loreto, G.; Iannucci, E.; Lucera, L.; Russi, F. (2002). “Acyglycerol and fatty acid components of pulp, seed, and whole olive fruit oils. Their use to characterize fruit variety by chemometrics”. *J Agric Food Chem* 50:3775–3779.

- Riederer, M.; Schreiber, L. (2001) "Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles". Article in Journal of Experimental Botany. DOI: <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.363.2023>
- Ricachenevsky F. K., Menguer P. K., Sperotto R. A., Williams L. E., Fett J. P. (2013). Roles of plant metal tolerance proteins (MTP) in metal storage and potential use in biofortification strategies. *Front. Plant Sci* 4:144. Doi:10.3389/fpls.2013.00144.
- Saito, A.; Saito, M.; Ichikawa, Y.; Yoshiba, M.; Tadano, T.; Miwa, E.; et al. . (2010). "Difference in the distribution and speciation of cellular nickel between nickel-tolerant and non-tolerant *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2 cells". *Plant Cell Environ.* 33, 174–187. 10.1111/j.1365-3040.2009.02068.x.
- Shahandeh, H.; Hossner, L.R. (2000). "Plant screening for chromium phytoremediation". *Int. J. Phytoremediat.* 2, 31–51.
- Shahid, M.; Pinelli, E.; Dumat, C. (2012). "Review of Pb availability and toxicity to plants in relation with metal speciation; role of synthetic and natural organic ligands". *J. Hazard. Mater.* 219–220, 1–12. 10.1016/j.jhazmat.2012.01.060.
- Shanker, A. K.; Cervantes, C.; Loza-Taverac, H.; Avudainayagam, S. (2005). "Chromium toxicity in plants". *Environment International* 31. 739 – 753. doi:10.1016/j.envint.2005.02.003.
- Shanker, A.K.; Sudhagar, R.; Pathmanabhan, G. (2003). "Growth, Phytochelatin SH and antioxidative response of Sunflower as affected by chromium speciation". 2nd International Congress of Plant Physiology on sustainable plant productivity under changing environment, New Delhi, India.
- Sharma, P. N.; Kumar, N.; Bisht, S. S. (1994) "Effect of zinc deficiency on chlorophyll contents, photosynthesis and water relations of cauliflower plants". *Photosynthetic* 1994, 30, 353–359.
- Singh, V.P.; Srivastava, P.K.; Prasad, S.M. (2012). "Differential effect of UV-B radiation on growth, oxidative stress and ascorbate-glutathione cycle in two cyanobacteria under copper toxicity". *Plant Physiol. Biochem.* 61, 61–70. 10.1016/j.plaphy.2012.09.005.
- Srivastava, G.; Kumar, S.; Dubey, G.; Mishra, V.; Prasad, S.M. (2012). "Nickel and ultraviolet-B stresses induce differential growth and photosynthetic responses in *Pisum sativum* L. seedlings". *Biol. Trace Elem. Res.* 149, 86–96. 10.1007/s12011-012-9406-9.
- Suwa, R.; Jayachandran, K.; Nguyen, N.T.; Boulenouar, A.; Fujita, K.; Saneoka, H. (2008) "Barium toxicity effects in soybean plants". *Arch Environ Contam Toxicol*, 55:397-403. doi: 10.1007/s00244-008-9132-7.
- Vajpayee, P.; Sharma, S.C.; Rai, U.N.; Tripathi, R.D.; Yunus, M. (1999). "Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments, nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera* Gaertn". *Chemosphere* 39:2159-2169.
- Vallee, B. L.; Auld, D. S. (1990). "Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins". *Biochemistry* 29, 5647-5659. DOI: 10.1021/bi00476a001.
- Vigani, G. (2012). "Discovering the role of mitochondria in the iron deficiency-induced metabolic responses of plants". *J. Plant Physiol.* 168, 1–11. doi: 10.1016/j.jplph.2011.09.008.



- Waraich, E.A.; Ahmad, R.; Ashraf, Yaseen, M.; Saifullah, S.; Ahmad, M. (2011). "Improving agricultural water use efficiency by nutrient management in crop plants". *Acta Agriculture Scandinavica Section B: Soil and Plant Science* 61(4): 291-304.
- Williams, L.E.; Pittman, J.K. (2010). "Dissecting pathways involved in manganese homeostasis and stress in higher plants", in *Cell Biology of Metals and Nutrients, Plant Cell Monographs*, Vol. 17, eds Hell R., Mendal R. R., editors. (Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; ), 95–117
- Wu, S.; Hu, C.; Tan, Q.; Li, L.; Shi, K.; Zheng, Y.; Sun, X. (2015) "Drought stress tolerance mediated by zinc-induced antioxidative defense and osmotic adjustment in cotton (*Gossypium Hirsutum*)". *Acta Physiologiae Plantarum* 2015, 37:167.
- Zayed, A.M.; Terry, N. (2003). "Chromium in the environment: factors affecting biological remediation". *Plant and Soil* 249: 139–156.