UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Efecto de reguladores de crecimiento en la mitigación de estrés térmico en arroz (*Oryza sativa*).

Alvaro Daniel Pantoja Benavides

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencia Agrarias, Departamento de Agronomía
Bogotá D.C., Colombia
2022

Efecto de reguladores de crecimiento en la mitigación de estrés térmico en arroz (*Oryza sativa*).

Alvaro Daniel Pantoja Benavides

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Agrarias

Director:

Ph.D. Hermann Restrepo Díaz

Codirector:

M.S.c Gabriel Garcés Varón

Línea de Investigación:

Fisiología de Cultivos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Agronomía

Bogotá D.C., Colombia

2022

Dedicatoria

A Dios por permitirme llegar hasta este momento, haberme dado salud y sabiduría para lograr mis objetivos. A mis padres Alvaro Pantoja Delgado y Yenny Emperatriz Benavides Diaz, por ser los pilares fundamentales en mi proceso de vida, en mi educación, tanto académica, como de vida, por su apoyo incondicional perfectamente mantenido a través del tiempo. A mis hermanos Andrés y Jorge, a mi prometida Williane, por creer en mí y en mi proceso.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Alvaro Daniel Pantoja Benavides

Fecha 21/04/2022

Fecha 21/04/2022

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas involucradas directa e indirectamente en el desarrollo de esta tesis, brindándome una experiencia única.

A la Escuela de Posgrados de la Facultad de Ciencias Agrarias y a la Universidad Nacional de Colombia, mi alma máter.

Al profesor Hermann Restrepo por su apoyo y consejos durante mi proceso y trabajo en la maestría.

A la Federación Nacional de Arroceros (Fedearroz), especialmente al ingeniero Gabriel Garcés Varón y su equipo de trabajo por su apoyo con el préstamo de equipos e instalaciones, así como su apoyo en la toma de datos.

A mis compañeros de Cristhian Camilo Chávez Arias y Alefsi David Sánchez Reinoso por su apoyo en el desarrollo de los diferentes muestreos, análisis de datos y consejos durante el desarrollo de mi tesis.

A los laboratoristas y personal administrativo por su generoso apoyo prestado en el desarrollo de la investigación.

Resumen

Efecto de reguladores de crecimiento en la mitigación del estrés térmico combinado en plantas de arroz (*Oryza sativa*).

El incremento en las temperaturas globales que se ha venido presentando a lo largo de las últimas décadas está afectando los diferentes procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas. Muchos de los cultivos han disminuido sus rendimientos, entre ellos el arroz, el cual ha presentado disminuciones en su rendimiento entre un 6% a un 7%. Se ha observado que la aplicación exógena de diferentes reguladores de crecimiento (fitohormonas), particularmente el uso de auxinas (AUX), giberelinas (GA), citoquininas (CK), y brasinoesteroides (BR) han mostrado potencial para mitigar los efectos de diferentes tipos de estreses abióticos y bióticos en diferentes especies cultivadas, pero en el caso arroz bajo estrés térmico combinado no se ha estudiado al respecto. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación exógena de diferentes reguladores de crecimiento sobre plantas de arroz expuestas a una condición de alta temperatura diurna y nocturna. En este contexto, se desarrollaron cuatro experimentos, el primero se llevó a cabo en condiciones de invernadero y cámaras de crecimiento el cual tuvo como finalidad conocer cuáles de los reguladores de crecimiento evaluados lograba mitigar los efectos negativos del estrés térmico combinado en diferentes variables fisiológicas y bioquímicas; el segundo y tercer experimento evaluaron que número de aplicaciones de los dos reguladores de crecimiento con la mejor respuesta en el experimento anterior se debía utilizar para mitigar los efectos negativos del estrés térmico combinado en condiciones de invernadero, casa de mallas y cámaras de crecimiento; y el cuarto utilizó la información de los experimentos anteriores y se evaluó en que etapa fenológica (floración o llenado de grano) dichas aplicaciones mitigaban los efectos del estrés térmico combinado en condiciones de casa malla y cámaras de crecimiento. Para esto se evaluaron variables fisiológicas como la fotosíntesis, conductancia estomática, transpiración, uso eficiente del agua, temperatura foliar y parámetros de la fluorescencia de la clorofila en la hoja. Además de variables bioquímicas como el contenido de prolina, producción de malondialdehido y contenido de clorofilas. Adicionalmente para el último experimento las características de

la panícula. Los resultados indicaron que: i) El estrés térmico combinado causó afectaciones negativas en plantas de arroz. Lo anterior se evidenció en una menor conductancia estomática, fotosíntesis, transpiración carbono intracelular, CRA, contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides), variables de fluorescencia de la clorofila α, incremento del NPQT y MDA.; ii) El uso de reguladores de crecimiento mitigó los efectos del estrés térmico combinado en las plantas de arroz. Además, la aplicación de estos reguladores de crecimiento generó una respuesta fisiológica positiva lo cual se reflejó en aumento en los valores de conductancia estomática, fotosíntesis, transpiración carbono intracelular, CRA, contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides), variables de fluorescencia de la clorofila α, acumulación de prolina y una reducción en la peroxidación de lípidos (MDA) y del NPQT.; iii) Los mecanismos fisiológicos y bioquímicos medidos ayudaron a ampliar nuestro conocimiento sobre el mecanismo de tolerancia al estrés por calor en genotipos de arroz cultivados en regiones tropicales.; y iv) El uso de reguladores de crecimiento es una herramienta útil en el manejo de condiciones de estrés por calor severo en cultivos de plantas de arroz cuando se esperan períodos de altas temperaturas.

Palabras clave: Conductancia estomática, relación F_v/F_m, alta temperatura diurna y nocturna, peroxidación lipídica, aclimatación vegetal.

Abstract

Effect of growth regulators in the mitigation of combined heat stress in rice plants (*Oryza sativa*).

The increase in global temperatures that has been occurring over the last decades is affecting the different physiological and biochemical processes of plants. Many crops have decreased their yields, including rice, which has shown decreases in its yield between 6% and 7%. It has been observed that the exogenous application of different growth regulators (phytohormones), particularly the use of auxins (AUX), gibberellins (GA), cytokinins (CK), and brassinosteroids (BR) have shown the potential to mitigate the effects of different types of abiotic and biotic stresses in different cultivated species, but in the case of rice under combined heat stress, this has not been studied. The objective of this work was to evaluate the effect of the exogenous application of different growth regulators on rice plants exposed to high daytime and nighttime temperature conditions. In this context, four experiments were developed. The first was carried out under greenhouse conditions and growth chambers, with the purpose to find out which of the evaluated growth regulators managed to mitigate the negative effects of combined heat stress on different physiological and biochemical variables. The second and third experiments evaluated what number of applications of the two growth regulators with the best response in the previous experiment should be used to mitigate the negative effects of combined heat stress in a greenhouse, shade house, and growth chamber conditions. The fourth experiment used the information from the previous experiments and evaluated at which phenological stage (flowering or grain filling) the foliar applications mitigated the effects of combined heat stress in conditions of shade house and growth chambers. For this, physiological variables such as photosynthesis, stomatal conductance, transpiration, efficient use of water, leaf temperature, and chlorophyll fluorescence parameters in the leaf were evaluated. In addition, biochemical variables such as proline content, malondialdehyde production, and chlorophyll content were measured. Additionally, for the last experiment, the characteristics of the panicle also were measured. The results indicated that: i) The combined heat stress caused negative effects on rice plants. This was evidenced in lower stomatal conductance, photosynthesis, intracellular carbon, transpiration, RWC, the content of photosynthetic pigments (chlorophyll and carotenoids), fluorescence variables of chlorophyll α, increase in NPQT and MDA.; ii) The use of growth regulators mitigated the effects of combined heat

stress on rice plants. In addition, the application of these growth regulators generated a positive physiological response, which was reflected in an increase in the values of stomatal conductance, photosynthesis, intracellular carbon, transpiration, RWC, the content of photosynthetic pigments (chlorophyll and carotenoids), fluorescence variables of the α-chlorophyll, proline accumulation and a reduction in lipid peroxidation (MDA) and NPQT.; iii) The measured physiological and biochemical mechanisms helped to expand our knowledge on the mechanism of tolerance to heat stress in rice genotypes grown in tropical regions; and iv) The use of growth regulators is a useful tool in managing severe heat stress conditions in rice plant crops when periods of high temperatures are expected.

Keywords: Stomatal conductance, Fv/Fm ratio, high day and night temperatures, lipid peroxidation, plant acclimatization.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XVI**

Lista de tablas ..... **XIX**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XX**

Introducción **1**

1. Respuesta diferencial entre hormonas y variedades de arroz expuestas a estrés térmico combinado. **8**

1.1 Resumen 8
1.2 Introducción 9
1.3 Materiales y métodos 14
1.3.1 Material vegetal y condiciones generales de crecimiento 14
1.3.2 Tratamientos de estrés térmico y reguladores de crecimiento 15
1.3.3 Conductancia estomática y contenido relativo de agua (CRA) 17
1.3.4 Contenido relativo de clorofila y parámetros de fluorescencia de clorofila α 17
1.3.5 Variables bioquímicas: pigmentos fotosintéticos foliares, peroxidación lipídica (malondialdehído-MDA) y prolina 18
1.3.6 Temperatura del dosel vegetal e índice de estrés del cultivo (CSI) 19
1.3.7 Índice de tolerancia relativa (IRT) 19
1.3.8 Diseño experimental y análisis de datos 20
1.4 Resultados 20
1.4.1 Pigmentos fotosintéticos de las hojas, contenido relativo de clorofila y parámetros de fluorescencia de la clorofila α 20
1.4.2 Contenido relativo de agua (CRA), conductancia estomática, producción de MDA y contenido de prolina 24
1.4.3 Temperatura del dosel de la planta, índice de tolerancia relativa (IRT) e índice de estrés del cultivo (CSI) 25
1.5 Discusión 28

2. El número de aplicaciones foliar de dos de reguladores crecimiento (citoquininas vs brasinoesteroides) influye sobre la aclimatación de plantas de arroz a estrés térmico combinado. **33**

2.1 Resumen 33
2.2 Introducción 34
2.3 Materiales y métodos 38

2.3.1 Material vegetal y condiciones generales de crecimiento 38
2.3.2 Primer experimento (E1): Evaluación del número de aplicaciones foliares de citoquininas y brasinoesteroides en plántulas de arroz (genotipo F2000) para mitigación de los efectos del estrés térmico combinado. 40
2.3.3 Segundo experimento (E2): Efecto de un número diferente de aplicaciones foliares de citoquininas o brasinoesteroides sobre la hoja bandera a plantas de arroz (genotipo F2000) para mitigación de los efectos del estrés térmico combinado. 41
2.3.4 Tercer experimento (E3): Evaluación de tres aplicaciones foliares de citoquininas o brasinoesteroides en plantas de arroz (genotipo F2000) en dos etapas reproductivas (floración y llenado de grano) durante el estrés térmico combinado... 42
2.3.5 Tratamiento de estrés térmico combinado..... 42
2.3.6 Variables determinadas en los experimentos 1 y 2..... 43
2.3.7 Conductancia estomática 43
2.3.8 Temperatura de la hoja, contenido relativo de clorofila y parámetros de fluorescencia de clorofila α..... 44
2.3.9 pH, conductividad eléctrica, concentración de nitrato, calcio y potasio en la savia 44
2.3.10 Índice de estrés del cultivo (CSI) e índice de tolerancia relativa (IRT) 45
2.3.11 Variables bioquímicas: pigmentos fotosintéticos foliares, peroxidación lipídica (malondialdehído-MDA) y prolina..... 46
2.3.12 Variables determinadas en el experimento 3. 47
2.3.13 Variables fotosintéticas: Fotosíntesis (Pn), transpiración (E), conductancia estomática (gs), carbono intercelular (Ci), uso eficiente del agua (UEA), eficiencia de la carboxilación (Pn/Ci), relación Fv/Fm, quenching no fotoquímico (NPQT). 47
2.3.14 Características de la panícula 48
2.3.15 Diseño experimental y análisis estadístico 48
2.4 Resultados..... 49
2.4.1 Primer experimento: Evaluación de un número diferente de aplicaciones foliares de citoquininas y brasinoesteroides en plantas de arroz (genotipo F2000) en etapa vegetativa durante el estrés térmico combinado..... 49
2.4.1.1 Conductancia estomática y temperatura de la hoja 49
2.4.1.2 Relación Fv/Fm, quenching no fotoquímico (NPQT) y contenido de clorofila. 50
2.4.1.3 pH, conductividad eléctrica, concentración de nitrato, calcio y potasio en la savia 52
2.4.1.4 Índice de estrés del cultivo (CSI) e índice de tolerancia relativa (IRT) 54
2.4.1.5 Variables bioquímicas: pigmentos fotosintéticos foliares, peroxidación lipídica (malondialdehído-MDA) y prolina..... 55
2.4.2 Segundo experimento: Evaluación de un número diferente de aplicaciones foliares de citoquininas y brasinoesteroides en plantas de arroz (genotipo F2000) en etapa reproductiva durante el estrés térmico combinado. 58
2.4.2.1 Conductancia estomática y temperatura de la hoja 58
2.4.2.2 Relación Fv/Fm, quenching no fotoquímico (NPQT) y contenido de clorofila. 61
2.4.2.3 pH, conductividad eléctrica, concentración de nitrato, calcio y potasio en la savia 64
2.4.2.4 Variables bioquímicas: pigmentos fotosintéticos foliares, peroxidación lipídica (malondialdehído-MDA) y prolina. 66
2.4.2.5 Índice de estrés del cultivo (CSI) e índice de tolerancia relativa (IRT) 68

2.4.3 Tercer experimento: Evaluación de aplicaciones foliares de citoquininas y brasinoesteroides en plantas de arroz (genotipo F2000) en dos etapas reproductivas (floración y llenado de grano) durante el estrés térmico combinado. 70
2.4.3.1 Variables fotosintéticas: Fotosíntesis (P_n), transpiración (*E*), conductancia estomática (g_s), carbono intercelular (C_i), uso eficiente del agua (UEA), eficiencia de la carboxilación (P_n/C_i), relación F_v/F_m, quenching no fotoquímico (NPQT).....70
2.4.3.2 Características de la panícula.....71
2.5 Discusión 73

3. Modelo conceptual.....79

4. Conclusiones y recomendaciones.....81
4.1 Conclusiones..... 81
4.2 Recomendaciones..... 82

Bibliografía 83

Lista de figuras

Pág.

Figura 1.1. Efecto del estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) sobre el contenido relativo de agua (CRA) (A), la conductancia estomática (g_s) (B), la producción de malondialdehído (MDA) (C) y contenido de prolina (D) en plantas de dos genotipos de arroz (F67 y F2000) a los 55 días después de la emergencia (DDE). Los tratamientos evaluados en cada genotipo fueron: control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), estrés térmico + auxinas (AUX), estrés térmico + giberelinas (GA), estrés térmico + citoquininas (CK) y estrés térmico + brasinoesteroides (BR). Cada columna representa la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Las barras seguidas de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤ 0,05). ..26

Figura 1.2. Efecto del estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) sobre la temperatura del dosel de la planta (A), el índice de tolerancia relativa (IRT) (B) y el índice de estrés del cultivo (CSI) (C) de dos genotipos comerciales de arroz (F67 y F2000) expuestos a diferentes tratamientos térmicos. Los tratamientos evaluados en cada genotipo fueron: control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), estrés térmico + auxinas (AUX), estrés térmico + giberelinas (GA), estrés térmico + citoquininas (CK) y estrés térmico + brasinoesteroides (BR). El estrés térmico combinado consistió en exponer las plantas de arroz a altas temperaturas diurnas / nocturnas (40 ° / 30 ° C día / noche). Cada columna representa la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Las barras seguidas de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤ 0,05). 27

Figura 2.1. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento (citoquininas o brasinoesteroides) sobre la conductancia estomática (g_s) (A) y la temperatura de la hoja (B) en plantas de arroz del cultivar Fedearroz 2000 sometidas a un estrés térmico combinado (40 ° / 30 °C día / noche) a los 55 días después de la emergencia (DDE). Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), 1 aplicación foliar de CK (CK1), 2 aplicaciones foliares de CK (CK2), 3 aplicaciones foliares de CK (CK3), 1 aspersión foliar de BR (BR1), 2 aplicaciones foliares de BR (BR2) o 3 aplicaciones foliares de BR (BR3). Cada columna representa la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Las barras seguidas de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤ 0,05). 50

Figura 2.2. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento (citoquininas o brasinoesteroides) sobre la eficiencia máxima de PSII (F_v/F_m) (A), quenching no fotoquímico (B) y contenido de clorofila (C) en plantas de arroz del cultivar Fedearroz 2000 sometidas a un estrés térmico combinado (40 ° / 30 °C día / noche) a los 55 días después de la emergencia (DDE). Los tratamientos evaluados fueron los

siguientes: control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), 1 aplicación foliar de CK (CK1), 2 aplicaciones foliares de CK (CK2), 3 aplicaciones foliares de CK (CK3), 1 aspersión foliar de BR (BR1), 2 aplicaciones foliares de BR (BR2) o 3 aplicaciones foliares de BR (BR3). Cada columna representa la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Las barras seguidas de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤ 0,05). 52

Figura 2.3. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento (citoquininas o brasinoesteroides) sobre el pH (A), la conductividad eléctrica (B), el contenido de nitrato (C), el contenido de potasio (D) y el contenido de calcio (E) en plantas de arroz del cultivar Fedearroz 2000 sometidas a un estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) a los 55 días después de la emergencia (DDE). Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), 1 aspersión foliar de CK (CK1), 2 aplicaciones foliares de CK (CK2), 3 aplicaciones foliares de CK (CK3), 1 aspersión foliar de BR (BR1), 2 aplicaciones foliares de BR (BR2) o 3 aplicaciones foliares de BR (BR3). Cada columna representa la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Las barras seguidas de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤ 0,05)..... 54

Figura 2.4. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento sobre la conductancia estomática (g_s): período de estrés previo (A), durante el período de estrés (B), después del período de estrés (C); y Temperatura de la hoja: período de estrés previo (D), durante el período de estrés (E), después del período de estrés (F); en plantas de arroz del cultivar F2000 sometidas a estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) a los 88 días después de la emergencia (DDE). Los tratamientos evaluados fueron control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), 1 aspersión foliar de CK (CK1), 2 aplicaciones foliares de CK (CK2), 3 aplicaciones foliares de CK (CK3), 1 aspersión foliar de BR (BR1), 2 aplicaciones foliares de BR (BR2) y 3 aplicaciones foliares de BR (BR3). Cada columna representa la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Las barras seguidas de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤ 0,05)..... 62

Figura 2.5. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento sobre la eficiencia máxima de PSII (F_v/F_m): período de estrés anterior (A), durante el período de estrés (B), después del período de estrés (C), quenching no fotoquímico: período de estrés anterior (D), durante el período de estrés (E), después del período de estrés (F), y contenido de clorofila: período de estrés anterior (G), durante el período de estrés (H), después del período de estrés (I); en plantas de arroz del cultivar F2000 sometidas a estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) a los 88 días después de la emergencia (DDE). Los tratamientos evaluados fueron control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), 1 aspersión foliar de CK (CK1), 2 aplicaciones foliares de CK (CK2), 3 aplicaciones foliares de CK (CK3), 1 aspersión foliar de BR (BR1), 2 aplicaciones foliares de BR (BR2) y 3 aplicaciones foliares de BR (BR3). Cada columna representa la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Las barras seguidas de letras diferentes indican diferencias

estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤ 0,05). 65
Figura 2.6. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento sobre el pH (A), la conductividad eléctrica (B) el contenido de nitrato (C), el contenido de potasio (D) y el contenido de calcio (E) en plantas de arroz del cultivar F2000 sometidas a estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) a los 88 días después de la emergencia (DDE). Los tratamientos evaluados fueron control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), 1 aspersión foliar de CK (CK1), 2 aplicaciones foliares de CK (CK2), 3 aplicaciones foliares de CK (CK3), 1 aspersión foliar de BR (BR1), 2 aplicaciones foliares de BR (BR2) y 3 aplicaciones foliares de BR (BR3). Cada columna representa la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Las barras seguidas de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤ 0,05). 67
Figura 3.1. Modelo conceptual del impacto del estrés térmico combinado y las aplicaciones foliares de reguladores de crecimiento en plantas de arroz. Las flechas rojas y las flechas azules indican el efecto negativo o positivo de la interacción entre el estrés por calor combinado y las aplicaciones foliares de BR (brasinoesteroides) y CK (citoquininas) en las respuestas fisiológicas, bioquímicas y características de la panícula, respectivamente. . 82

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1.1. Nombre químico del ingrediente activo, nombre comercial y fabricante de los reguladores de crecimiento utilizados para evaluar aplicaciones foliares en plantas de arroz bajo estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche). 16
Tabla 1.2. Resumen del análisis de varianza entre el experimento (genotipos) y los tratamientos de estrés por térmico sobre las variables fisiológicas y bioquímicas de las plantas de arroz..... 22
Tabla 1.3. Efecto del estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) sobre los pigmentos fotosintéticos de las hojas (clorofila total (Chl total), clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b) y carotenoides (Cx + c)), contenido relativo de clorofila (unidades Atleaf) y parámetros de fluorescencia de clorofila (fluorescencia inicial (F_0), fluorescencia máxima (F_m), fluorescencia variable (F_v), eficiencia máxima de PSII (F_v/F_m), rendimiento cuántico máximo de fotoquímica de PSII (F_v / F_0) y la relación F_m / F_0 en plantas de dos genotipos de arroz (Fedearroz 67 (F67) y Fedearroz 2000 (F2000)) a los 55 días después de la emergencia (DDE)..... 23
Tabla 2.1. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento sobre el índice de estrés del cultivo (CSI) e índice de tolerancia relativa (IRT) en plantas de arroz del cultivar F2000 sometidas a estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) a los 55 días después de la emergencia (DDE). 56
Tabla 2.2. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento sobre las variables bioquímicas en plantas de arroz del cultivar Fedearroz 2000 sometidas a estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) a los 55 días después de la emergencia (DDE)..... 59
Tabla 2.3. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento sobre las variables bioquímicas en plantas de arroz del cultivar F2000 sometidas a estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) a los 88 días después de la emergencia (DDE). 69
Tabla 2.4. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento sobre el índice de estrés del cultivo (CSI) e índice de tolerancia relativa (IRT) en plantas de arroz del cultivar Federarroz 2000 sometidas a estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) a los 88 días después de la emergencia (DDE). 71
Tabla 2.5. Efecto de las aplicaciones de dos reguladores de crecimiento sobre las variables fotosintéticas en plantas de arroz del cultivar Federarroz 2000 sometidas a estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) en R2(88 DDE) o R8 (108DDE). .. 74
Tabla 2.6. Efecto de las aplicaciones de dos reguladores de crecimiento sobre las variables fotosintéticas en plantas de arroz del cultivar Federarroz 2000 sometidas a estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) a los 88 y 120 días después de la emergencia (DDE)..... 75

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
A	Área	m^2	$\iint dx\, dy$
D	Diametro	m	
L	Longitud	m	DF
T	Temperatura	C	DF
T	Tiempo	s	DF

Superíndices

Superíndice	Término
n	Exponente, potencia

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AC	Control Absoluto
SC	Control Estresado
DDE	Días después de emergencia
PSII	Fotosistema II
MDA	Malondialdehído
AUX	Auxinas
GA	Giberelinas
CK	Citoquininas
BR	Brasnoesteroides
T	Temperatura de la hoja

Abreviatura	Término
F_v/F_m	Eficiencia máxima potencial del fotosistema II
NPQT	Quenching no fotoquímico
Pn	Fotosintesis
E	Transpiración
g_s	Conductancia estomática
Chl Total	Clorofila tota
Chl a	Clorofila a
Chl b	Clorofila b
Cx+c	Carotenoides
F_v/F_m	Eficiencia máxima potencial del fotosistema II

Introducción

El arroz es un cultivo alimentario fundamental, este es importante desde el punto de vista de la seguridad alimentaria mundial porque es consumido por la mayoría de las personas en condición de pobreza del mundo (IRRI, 2006; Samal y Babu, 2018). Se espera que aumente la demanda con el crecimiento de la población para el año 2050 y llegue a valores de 607 millones de toneladas basados en el consumo actual (Samal y Babu, 2018; Gérardeaux et al. 2021). Del mismo modo, el cultivo de arroz presenta un gran valor económico a nivel nacional debido a su alta demanda y grandes extensiones a través del territorio nacional (Garcés, 2020). Este cultivo ocupó 617,934 ha con un volumen de producción nacional de 2,937,840 t y un rendimiento promedio de 5.02 t ha^{-1} en 2020 (Fedearroz, 2021).

El cultivo de arroz ha sido afectado por el calentamiento global, provocando diferentes tipos de estrés abiótico, como altas temperaturas y períodos de sequía (Wassman et al., 2009; Chandio et al., 2019). El cambio climático ha aumentado la temperatura, pronosticándose que la temperatura atmosférica aumentará entre 1.0 y 3.7°C durante el siglo XXI, lo que incrementará la frecuencia y magnitud de los eventos de estrés térmico (IPCC, 2013). Este aumento de las temperaturas ambientales ha afectado al arroz, generando una disminución de entre un 6-7% en sus rendimientos (Lesk et al., 2016). Por otro lado, la variabilidad climática también ha generado condiciones ambientales adversas en los cultivos como períodos de intensa sequía o altas temperaturas en las regiones tropicales y subtropicales (Feller y Vasseva, 2014). En Colombia, las áreas productoras de arroz esperarán aumentos en las temperaturas entre 2 y 2.5°C para 2050, lo que reducirá los rendimientos de arroz y tendrá un impacto en los flujos de productos a los mercados y cadenas de suministro (Ramirez-Villegas et al., 2012).

La mayoría de los cultivos de arroz se cultivan en regiones donde las temperaturas están cerca del rango óptimo para el crecimiento de esta especie (Shah et al., 2011). Se ha informado que las temperaturas medias óptimas para el crecimiento y desarrollo del arroz

suelen ser de 28 y 22°C para el día y la noche, respectivamente (Kilasi et al., 2018; Calderón-Paez et al., 2021). Las temperaturas por encima de esos umbrales pueden causar períodos de estrés térmico moderado o severo durante las etapas sensibles del desarrollo del arroz (macollamiento, antesis, floración y llenado del grano), afectando negativamente el rendimiento del grano (Shah et al., 2011). Estas reducciones de rendimiento se han asociado principalmente con períodos prolongados de estrés térmico (más de 7 días) que afectan la fisiología de la planta (Shah et al., 2011; Sanchez-Reinoso et al., 2014).

Las altas temperaturas son perjudiciales para la mayoría de los procesos fisiológicos como la apertura de estomas, la fotosíntesis, el crecimiento y el rendimiento del grano (Ahammed et al., 2014). Los estudios de estrés por altas temperaturas se han centrado principalmente en la etapa reproductiva debido a su alta sensibilidad y la relación entre el comportamiento de la hoja bandera del arroz y el rendimiento del grano (Das et al., 2014; Hatfield y Prueger, 2015; Wu et al., 2016). En este aspecto, se ha estudiado como el funcionamiento de la hoja bandera es afectado por el estrés, principalmente, en la etapa reproductiva del arroz (Restrepo y Garces, 2013). Karwa et al. (2015) observaron que las propiedades de intercambio gaseoso de la hoja bandera (previo a la entrada del estado reproductivo) de dos cultivares de arroz disminuyeron cuando las plantas eran sometidas a condiciones de estrés térmico. También, se ha reportado que las plantas de arroz sometidas a condiciones de estrés térmico combinado (altas temperaturas diurnas y nocturnas) se afectan diferentes factores fisiológicos y bioquímicos en las hojas banderas como la tasa fotosintética, los contenidos de clorofilas, los parámetros de fluorescencia de la clorofila a y la peroxidación lipídica (Zhang et al., 2015).

Los cambios bioquímicos son un aspecto relevante de la aclimatación de las plantas al estrés térmico (Wahid et al., 2007). El contenido de prolina se ha utilizado como un indicador bioquímico de estrés en plantas (Ahmed y Hasan, 2011). La prolina juega un papel importante en el metabolismo de las plantas, ya que actúa como una fuente de C o N y como estabilizador de membrana en condiciones de alta temperatura (Sánchez-Reinoso et al., 2014). Las altas temperaturas también afectan la estabilidad de la membrana por la peroxidación de lípidos, lo que conduce a la producción de malondialdehído (MDA) (Wahid et al., 2007). En consecuencia, el contenido de MDA

también se ha utilizado para conocer la integridad estructural de las membranas celulares bajo estrés térmico (Cao et al., 2008; Chavez-Arias et al., 2018). Finalmente, el estrés térmico combinado (37 °C / 30 °C (día / noche)) aumentó el porcentaje de fuga de electrolitos y el contenido de MDA en las plantas de arroz (Liu et al., 2013).

Se ha estudiado el uso de reguladores de crecimiento (RC) para mitigar los efectos negativos del estrés térmico, debido a que estas sustancias participan activamente en las respuestas o mecanismos de las plantas para desarrollar protección fisiológica frente a este tipo de estrés (Peleg y Blumwald, 2011; Yin et al., 2011; Ahammed et al., 2014). La aplicación exógena de RC ha mostrado una respuesta positiva en la tolerancia de las plantas al estrés térmico en diferentes cultivos. Los estudios han observado que las hormonas vegetales como las giberelinas (GA), citoquininas (CK), auxinas (AUX) o los brasinoesteroides (BR) han provocado un aumento de diferentes variables fisiológicas y bioquímicas (Peleg y Blumwald, 2011; Yin et al., 2011; Mittler et al., 2012; Zhou et al., 2014). En Colombia, la aplicación exógena de RC y sus efectos aún no están bien esclarecidos o estudiados en el cultivo de arroz. Sin embargo, un estudio anterior mostró que las aplicaciones foliares de BR mejoraron la tolerancia del arroz porque favorecieron las propiedades de intercambio de gases de las hojas, el contenido de clorofila o prolina (Quintero-Calderon et al., 2021).

El ácido giberélico (GA) ha mostrado una respuesta positiva al estrés por altas temperaturas. Diferentes estudios han demostrado que la biosíntesis de GA interviene en diferentes vías metabólicas y mejora la tolerancia en condiciones de alta temperatura (Alonso-Ramirez et al., 2009; khan et al., 2020). Abd El-Naby et al., (2020) encontraron que la aplicación foliar exógena de GA (25 o 50 mg L^{-1}) aumentó la tasa fotosintética y la actividad antioxidante en plantas de naranja con estrés térmico en comparación con las plantas control. También, se ha observado que la aplicación exógena de GA mejoró el contenido relativo de agua, clorofila y carotenoides, y disminuyó la peroxidación lipídica en la palmera datilera (*Phoenix dactylifera*) bajo estrés térmico (Khan et al., 2020).

Las auxinas (AUX) desempeñan un papel esencial en la regulación de las respuestas de crecimiento adaptativo a las condiciones de alta temperatura (Sun et al., 2012; Wang et al., 2016). Este regulador de crecimiento actúa como marcador bioquímico durante

distintos procesos como la síntesis o degradación de prolina bajo estrés abiótico (Ali et al., 2007). Además, AUX mejoran la actividad antioxidante, provocando una disminución de MDA en la planta debido a una menor peroxidación de lípidos (Bielach et al., 2017). Sergiev et al., (2018) observaron que el contenido de prolina aumentó cuando las plantas de arveja (*Pisum sativum*) se trataron con análogos de auxinas (sal de calcio ácido 1- [2-cloroetoxicarbonil-metil] -4-naftalenosulfónico (TA-12) y clormetilato de 1- [2-dimetilaminoetoxicarbonilmetil] naftaleno (TA-14)) bajo estrés térmico. En el mismo experimento, también observaron que los niveles de MDA eran más bajos en las plantas tratadas en comparación con las plantas sin aplicación de AUX.

Las citoquininas (CK) generan respuestas a los efectos adversos ocasionados por estreses abióticos y bióticos en las plantas, siendo una posible estrategia a considerar para mitigar los daños causados a los mecanismos fisiológicos y bioquímicos de estas (Veselov et al. 2017). Se ha informado que las aplicaciones exógenas de CK pueden reducir los daños por altas temperaturas. Por ejemplo, las aplicaciones exógenas de zeatina mejoraron la tasa de fotosíntesis, el contenido de clorofila a y b y la eficiencia del transporte de electrones durante el estrés térmico en Agrostis rastrero (*Agrotis estolonífera*) (Xu y Huang, 2009; Jespersen y Huang, 2015).

Las aplicaciones exógenas de zeatina también mejoraron la actividad antioxidante y mejoraron la síntesis de diferentes proteínas, disminuyendo el daño de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la producción de malondialdehído (MDA) en los tejidos vegetales (Chernyad'ev, 2009; Yang et al. 2016; Kumar et al., 2020).Se ha reportado que el número de aplicaciones exógenas de CK es un factor para tener en cuenta en la reducción de los daños causados por altas temperaturas (Veselov et al. 2017; Zhen et al.,2020). Por otro lado, se ha observado que tres aplicaciones foliares de citoquininas en diferentes etapas de desarrollo retardaron la senescencia de las hojas y mejoraron la tolerancia al estrés térmico mediante un aumento de las actividades antioxidantes y disminución de la peroxidación lipídica en pasto rastrero (*Agrostis stolonifera*) (Veerasamy et al., 2007). Wu et al., (2016) también encontraron que dos aplicaciones de 6-benzylaminopurine mejoraron su actividad fisiológica bajo una condición de estrés en una variedad de arroz susceptible al estrés térmico. También, se ha reportado que una sola aplicación de CK (zeatina) ayudó a la actividad antioxidante y síntesis de diferentes enzimas, disminuyendo el daño de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la

producción de malondialdehído (MDA) en garbanzo bajo estrés térmico (Kumar et al., 2020).

Los brasinoesteroides (BR) son reguladores del crecimiento que se han también utilizado para mitigar los efectos de diferentes estreses abióticos, entre ellos, el estrés por altas temperaturas (Kothari y Lachowiec, 2021). Ogweno et al., (2007 y 2008) informaron que las aplicaciones exógenas de BR aumentaron la tasa fotosintética neta, la conductancia estomática y la tasa máxima de carboxilación de Rubisco en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) sometidas a estrés térmico durante ocho días. La aplicación foliar de un epibrasinolido también provocó una mayor tasa fotosintética neta en plantas de pepino (*Cucumis sativus*) sometidas a estrés térmico (Yu et al., 2004). Además, las aplicaciones exógenas de BR retrasaron la degradación de la clorofila y mejoraron la eficiencia del uso del agua y el rendimiento cuántico máximo del fotosistema PSII en plantas sometidas a este tipo de estrés abiótico (Hola, 2011; Thussagunpanit et al., 2015).

Thussagunpanit et al. (2015) mostraron que cuando se realizaba una aplicación exógena de BR generaba tolerancia al estrés térmico mediante protección a la maquinaria fotosintética (favorecer la tasa de fotosíntesis y la conductancia estomática y disminuir la fotoinhibición) en plantas de arroz durante la etapa reproductiva. También, se observó que una aplicación exógena de BR aceleró el proceso de aclimatación a altas temperaturas y generó termotolerancia porque aumentó la tasa de supervivencia de plántulas de trigo (Hairat et al., 2015). En la misma investigación, Hairat et al. (2015) también reportan una mejora sobre la tasa de fotosíntesis y disminución del daño de la membrana en las plantas expuestas al estrés térmico y tratadas con BR en comparación con las plantas no tratadas. Un estudio realizado por Sonjaroon et al. (2018) también se observó que plantas de arroz tratadas con una aplicación de 7,8-dihidro-8α-20-hidroxiecdisona (αDHECD, 0,0001 μM) (brasinoesteroide sintético) aumentaron sus parámetros fotosintéticos bajo un estrés térmico en comparación a plantas no tratadas y estresadas.

Los cultivos de arroz enfrentan períodos de altas temperaturas diurnas y nocturnas debido al cambio y la variabilidad climática (Lesk et al., 2016; Garcés, 2020; Fedearroz, 2021). El uso de nutrientes o bioestimulantes se ha evaluado como una estrategia agronómica para mitigar el estrés térmico en áreas de cultivo de arroz recientemente en Colombia (Calderón-Paez et al., 2021; Quintero-Calderón et al., 2021). Además, el uso de variables

bioquímicas y fisiológicas (temperatura del dosel de la hoja, conductancia estomática, parámetros de fluorescencia de la clorofila, contenido relativo de clorofila y agua, síntesis de malondialdehído y prolina) son herramientas confiables para seleccionar genotipos de arroz bajo estrés térmico a nivel local e internacional (Sánchez-Reinoso et al., 2014; Alvarado-Sanabria, 2017; Sarsu et al., 2018). Sin embargo, la investigación sobre el uso de aplicaciones foliares de hormonas vegetales en plantas de arroz todavía es escasa a nivel local. Por lo tanto, el estudio de las respuestas fisiológicas y bioquímicas al uso de reguladores del crecimiento es un importante punto de partida para proponer estrategias agronómicas y prácticas que reduzcan los efectos negativos de los períodos combinados de estrés térmico en el arroz.

Con lo mencionado anteriormente este trabajo permitió responder lo planteado en la hipótesis la cual consistía en saber si la aplicación foliar de diferentes reguladores de crecimiento en diferentes estados fenológicos ayudará a sobrellevar la condición de estrés por altas temperaturas combinados mediante la expresión de mecanismos fisiológicos en las plantas de arroz. Bajo dicho contexto el presente estudio tuvo como objetivo general evaluar el efecto de la aplicación exógena de diferentes reguladores de crecimiento sobre diferentes parámetros fisiológicos y bioquímicos en plantas de arroz expuestas a una condición de alta temperatura diurna y nocturna. Para ello se plantearon tres objetivos específicos los cuales fueron: i) Determinar el efecto de dos aplicaciones foliares de cuatro reguladores de crecimiento (AUX, CK, GA y BR) sobre los parámetros fisiológicos (conductancia estomática, fluorescencia de clorofila y contenido relativo de agua) y bioquímicos (pigmentos fotosintéticos, malondialdehído y contenido de prolina) en dos genotipos comerciales de arroz sometidos a estrés térmico combinado (altas temperaturas diurnas (40°C) / nocturnas(30°C)); ii) evaluar el efecto de diferente número aplicaciones foliares de dos reguladores del crecimiento (CK o BR) sobre los parámetros fisiológicos (conductancia estomática, fluorescencia de clorofila y contenido relativo de agua) y bioquímicos (pigmentos fotosintéticos, malondialdehído y contenido de prolina) en dos estados fenológicos de un genotipo comercial de arroz sometidos a un estrés térmico combinado (altas temperaturas diurnas / nocturnas); iii) estudiar el efecto de las citoquininas o brasinoesteroides en diferentes parámetros fisiológicos (fotosíntesis, conductancia estomática, transpiración, carbono intrínseco, uso eficiente del agua, eficiencia de la carboxilación, fluorescencia de clorofila y quenching no fotoquímico) y características de la panícula (espiguillas totales, espiguillas vanas y porcentaje de

vaneamiento) en las etapas de inicio de floración y llenado de grano de las plantas de arroz.

1. Respuesta diferencial entre hormonas y variedades de arroz expuestas a estrés térmico combinado.

1.1 Resumen

El rendimiento del arroz ha disminuido debido a la variabilidad y el cambio climático en Colombia. Los reguladores de crecimiento de las plantas se han utilizado como estrategia para mitigar el estrés por altas temperaturas en diferentes cultivos. Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de las aplicaciones foliares de cuatro reguladores del crecimiento (auxinas (AUX)(ácido 1-naftalenoacético a $5x10^{-5}$ M), brasinoesteroides (BR) (espirostan-6-ona, 3,5-dihidroxi-, (3b, 5a, 25R) a $5x10^{-5}$ M), citoquininas (CK) (Trans-Zeatin a $1x10^{-5}$ M), o giberelinas (GA) (ácido giberélico: GA3) a $5x10^{-5}$ M)) sobre la fisiología (conductancia estomática, contenido total de clorofila, relación F_v/F_m, temperatura del dosel de la planta y contenido relativo de agua) y variables bioquímicas (contenido de malondialdehído (MDA) y prolina) en dos genotipos comerciales de arroz expuestos a estrés térmico combinado (altas temperaturas diurnas y nocturnas). Se llevaron a cabo dos experimentos separados utilizando plantas de dos genotipos de arroz, Fedearroz 67 ('F67') y Fedearroz 2000 ('F2000') para el primer y segundo experimento, respectivamente. Ambos ensayos se analizaron juntos como una serie de experimentos. Los tratamientos establecidos fueron los siguientes: control absoluto (AC) (plantas de arroz cultivadas a temperaturas óptimas (30/25°C temperaturas día / noche), control de estrés térmico (SC) (plantas de arroz solo expuestas a estrés térmico combinado (40/30°C)), y plantas de arroz estresadas y rociadas dos veces (cinco días antes y después del estrés térmico) con un regulador de crecimiento (estrés + AUX, estrés + BR, estrés + CK o estrés + GA). Las aspersiones de CK mejoraron el contenido total de clorofila en ambos cultivares (3,25 y 3,65 mg g^{-1} de peso fresco para las plantas de arroz 'F67' y 'F2000', respectivamente) en comparación con las plantas SC (2,36 y 2,56 mg g^{-1} de peso

fresco para 'F67 'y' F2000 'plantas de arroz, respectivamente). La aplicación foliar de CK también mejoró la conductancia estomática principalmente en el genotipo ‘F2000' en comparación con su control sometido a estrés térmico (499,25 frente a 150,60 mmol m-2s-1). Las aplicaciones foliares de CK y BR redujeron la temperatura del dosel de la planta entre 2 y 3 ° C y el contenido de MDA en plantas sometidas a estrés térmico. El índice de tolerancia relativo sugiere que las aplicaciones foliares de CK (97,69%) y BR (60,73%) ayudaron a mitigar el estrés térmico combinado principalmente en las plantas de arroz 'F2000'. En conclusión, las aplicaciones foliares de BR o CK pueden considerarse una estrategia agronómica para ayudar a mejorar el efecto negativo de las condiciones combinadas de estrés térmico sobre el comportamiento fisiológico de las plantas de arroz.

1.2 Introducción

El arroz (Oryza sativa) pertenece a la familia de las gramíneas y es uno de los cereales más cultivados en todo el mundo junto con el maíz y el trigo (Bajaj y Mohanty, 2005). En Colombia, el arroz ocupó 617,934 ha con un volumen de producción nacional de 2,937,840 t y un rendimiento promedio de 5.02 t ha^{-1} en 2020 (Fedearroz, 2021).

El cultivo de arroz ha sido afectado por el calentamiento global, provocando diferentes tipos de estrés abiótico, como altas temperaturas y períodos de sequía (Wassman et al., 2009; Chandio et al., 2019). El cambio climático ha aumentado la temperatura global en todo el mundo; pronosticándose que la temperatura atmosférica aumentará entre 1.0 y 3.7°C durante el siglo XXI, lo que potencialmente incrementará la frecuencia y magnitud de los eventos de estrés térmico (IPCC, 2013). Este aumento de las temperaturas ambientales ha afectado al arroz, generando una disminución de entre un 6-7% en sus rendimientos (Lesk et al., 2016). Por otro lado, la variabilidad climática también ha generado condiciones ambientales adversas en los cultivos como períodos de intensa sequía o altas temperaturas en las regiones tropicales y subtropicales (Feller y Vasseva, 2014). Además, fenómenos de variabilidad climática como el fenómeno ENSO –Oscilación del pacífico Sur “El Niño” pueden provocar condiciones de estrés térmico y agravar el daño a los cultivos en algunas regiones tropicales (Lizumi et al., 2014; Amanullah et al., 2017). En Colombia, las áreas productoras de arroz esperarán aumentos en las temperaturas entre 2 y 2.5°C

para 2050, lo que reducirá los rendimientos de arroz y tendrá un impacto en los flujos de productos a los mercados y cadenas de suministro (Ramirez-Villegas et al., 2012).
La mayoría de los cultivos de arroz se cultivan en regiones donde las temperaturas están cerca del rango óptimo para el crecimiento de esta especie (Shah et al., 2011). Se ha informado que las temperaturas medias óptimas para el crecimiento y desarrollo del arroz suelen ser de 28 y 22°C para el día y la noche, respectivamente (Kilasi et al., 2018; Calderón-Paez et al., 2021). Las temperaturas por encima de esos umbrales pueden causar períodos de estrés térmico moderado o severo durante las etapas sensibles del desarrollo del arroz (macollamiento, antesis, floración y llenado del grano), afectando negativamente el rendimiento del grano (Shah et al., 2011). Estas reducciones de rendimiento se han asociado principalmente con períodos prolongados de estrés térmico (más de 7 días) que afectan la fisiología de la planta (Shah et al., 2011; Sanchez-Reinoso et al., 2014). El estrés térmico puede ocasionar una serie de daños irreversibles en el metabolismo y desarrollo de las plantas debido a la interacción de diferentes factores como la duración del estrés o la temperatura máxima alcanzada (Porch y Hall, 2013; Zhou et al., 2014).

El estrés térmico afecta a diferentes procesos fisiológicos en las plantas (Bita y Gerats, 2013; Chavez-Arias et al., 2018). La fotosíntesis de las hojas es uno de los procesos más susceptibles al estrés térmico en las plantas de arroz, ya que la tasa de fotosíntesis puede disminuir en un 50% cuando las temperaturas diurnas superan los 35°C (Restrepo-Diaz y Garces-Varon, 2013). La respuesta fisiológica en las plantas de arroz varía según el tipo del estrés térmico. Por ejemplo, la tasa fotosintética y la conductancia estomática se inhiben cuando las plantas están expuestas a altas temperaturas diurnas (33°C a 40°C) o a una combinación de altas temperaturas diurnas y nocturnas (35°C a 40°C durante el día, y 28°C a 30°C por la noche) (Lü et al., 2013; Fahad et al., 2016b; Chaturvedi et al., 2017). Una temperatura nocturna alta (30°C) provocó una inhibición moderada de la fotosíntesis, pero incrementó la respiración nocturna (Fahad et al., 2016b; Alvarado-Sanabria et al., 2017). El estrés térmico también afecta el contenido de clorofila de la hoja, la proporción de fluorescencia de clorofila variable a máxima (F_v/F_m) y la activación de la rubisco en plantas de arroz independientemente del período de estrés (Cao et al., 2009; Yin et al., 2010).

Los cambios bioquímicos son otro aspecto de la aclimatación de las plantas al estrés térmico (Wahid et al., 2007). El contenido de prolina se ha utilizado como un indicador bioquímico de estrés en plantas (Ahmed y Hasan, 2011). La prolina juega un papel importante en el metabolismo de las plantas, ya que actúa como una fuente de C o N y como estabilizador de membrana en condiciones de alta temperatura (Sánchez-Reinoso et al., 2014). Las altas temperaturas también afectan la estabilidad de la membrana por la peroxidación de lípidos, lo que conduce a la producción de malondialdehído (MDA) (Wahid et al., 2007). En consecuencia, el contenido de MDA también se ha utilizado para conocer la integridad estructural de las membranas celulares bajo estrés térmico (Cao et al., 2008; Chavez-Arias et al., 2018). Finalmente, el estrés térmico combinado (37 °C / 30 °C (día / noche)) aumentó el porcentaje de fuga de electrolitos y el contenido de MDA en las plantas de arroz (Liu et al., 2013).

Se ha evaluado el uso de reguladores de crecimiento (RC) para mitigar los efectos negativos del estrés térmico, ya que estas sustancias participan activamente en las respuestas o mecanismos de las plantas para desarrollar protección fisiológica frente a este tipo de estrés (Peleg y Blumwald, 2011; Yin et al., 2011; Ahammed et al., 2014). La aplicación exógena de RC ha mostrado una respuesta positiva en la tolerancia de las plantas al estrés térmico en diferentes cultivos. Los estudios han observado que las hormonas vegetales como las giberelinas (GA), citoquininas (CK), auxinas (AUX) o los brasinoesteroides (BR) han provocado un aumento de diferentes variables fisiológicas y bioquímicas (Peleg y Blumwald, 2011; Yin et al., 2011; Mittler et al., 2012; Zhou et al., 2014). En Colombia, la aplicación exógena de RC y sus efectos aún no están bien esclarecidos o estudiados en el cultivo de arroz. Sin embargo, un estudio anterior mostró que las aplicaciones foliares de BR mejoraron la tolerancia del arroz porque favorecieron las propiedades de intercambio de gases de las hojas, el contenido de clorofila o prolina (Quintero-Calderon et al., 2021).

Las citoquininas (CK) median las respuestas de las plantas al estrés abiótico, incluido el estrés térmico (Ha et al., 2011). Además, se ha informado que las aplicaciones exógenas de CK pueden reducir los daños por altas temperaturas. Por ejemplo, las aplicaciones exógenas de zeatina mejoraron la tasa de fotosíntesis, el contenido de clorofila a y b y la eficiencia del transporte de electrones durante el estrés térmico en Agrostis rastrero

(*Agrotis estolonífera*) (Xu y Huang, 2009; Jespersen y Huang, 2015). Las aplicaciones exógenas de zeatina también mejoraron la actividad antioxidante y mejoraron la síntesis de diferentes proteínas, disminuyendo el daño de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la producción de malondialdehído (MDA) en los tejidos vegetales (Chernyad'ev, 2009; Yang et al. 2016; Kumar et al., 2020).

Las aplicaciones de ácido giberélico (GA) también han mostrado una respuesta positiva al estrés por altas temperaturas. Los estudios han demostrado que la biosíntesis de GA interviene en diferentes vías metabólicas y mejora la tolerancia en condiciones de alta temperatura (Alonso-Ramirez et al., 2009; khan et al., 2020). Abd El-Naby et al., (2020) encontraron que la aplicación foliar exógena de GA (25 o 50 mg L^{-1}) aumentó la tasa fotosintética y la actividad antioxidante en plantas de naranja con estrés térmico en comparación con las plantas control. También, se ha observado que la aplicación exógena de GA mejoró el contenido relativo de agua, clorofila y carotenoides, y disminuyó la peroxidación lipídica en la palmera datilera (*Phoenix dactylifera*) bajo estrés térmico (Khan et al., 2020).

Las auxinas (AUX) también juegan un papel esencial en la regulación de las respuestas de crecimiento adaptativo a las condiciones de alta temperatura (Sun et al., 2012; Wang et al., 2016). Este regulador de crecimiento actúa como un marcador bioquímico durante diferentes procesos como la síntesis o degradación de prolina bajo estrés abiótico (Ali et al., 2007). Además, AUX mejoran la actividad antioxidante, provocando una disminución de MDA en la planta debido a una menor peroxidación de lípidos (Bielach et al., 2017). Sergiev et al., (2018) observaron que el contenido de prolina aumentó cuando las plantas de arveja (*Pisum sativum*) se trataron con análogos de auxinas (sal de calcio ácido 1- [2-cloroetoxicarbonil-metil] -4-naftalenosulfónico (TA-12) y clormetilato de 1- [2-dimetilaminoetoxicarbonilmetil] naftaleno (TA-14)) bajo estrés térmico. En el mismo experimento, también observaron que los niveles de MDA eran más bajos en las plantas tratadas en comparación con las plantas sin aplicación de AUX.

Los brasinoesteroides (BR) son otro grupo de reguladores de crecimiento que se han utilizado para mitigar los efectos del estrés térmico. Ogweno et al., (2007 y 2008) informaron que las aplicaciones exógenas de BR aumentaron la tasa fotosintética neta, la

conductancia estomática y la tasa máxima de carboxilación de Rubisco en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) sometidas a estrés térmico durante ocho días. La aplicación foliar de un epibrasinolido también provocó una mayor tasa fotosintética neta en plantas de pepino (*Cucumis sativus*) sometidas a estrés térmico (Yu et al., 2004). Además, las aplicaciones exógenas de BR retrasaron la degradación de la clorofila y mejoraron la eficiencia del uso del agua y el rendimiento cuántico máximo del fotosistema PSII en plantas sometidas a este tipo de estrés abiótico (Hola, 2011; Thussagunpanit et al., 2015).

Los cultivos de arroz enfrentan períodos de altas temperaturas diurnas y nocturnas debido al cambio y la variabilidad climática (Lesk et al., 2016; Garcés, 2020; Fedearroz, 2021). El uso de nutrientes o bioestimulantes se ha evaluado como una estrategia agronómica para mitigar el estrés térmico en áreas de cultivo de arroz recientemente en Colombia (Calderón-Paez et al., 2021; Quintero-Calderón et al., 2021). Además, el uso de variables bioquímicas y fisiológicas (temperatura del dosel de la hoja, conductancia estomática, parámetros de fluorescencia de la clorofila, contenido relativo de clorofila y agua, síntesis de malondialdehído y prolina) son herramientas confiables para seleccionar genotipos de arroz bajo estrés térmico a nivel local e internacional (Sánchez-Reinoso et al., 2014; Alvarado-Sanabria, 2017; Sarsu et al., 2018). Sin embargo, la investigación sobre el uso de aplicaciones foliares de hormonas vegetales en plantas de arroz todavía es escasa a nivel local. Por lo tanto, el estudio de las respuestas fisiológicas y bioquímicas al uso de reguladores del crecimiento es un importante punto de partida para proponer estrategias agronómicas y prácticas que reduzcan los efectos negativos de los períodos combinados de estrés térmico en el arroz. En consecuencia, el objetivo de este primer capítulo era evaluar el efecto de dos aplicaciones foliares de cuatro reguladores de crecimiento (AUX, CK, GA y BR) sobre los parámetros fisiológicos (conductancia estomática, fluorescencia de clorofila y contenido relativo de agua) y bioquímicos. (pigmentos fotosintéticos, malondialdehído y contenido de prolina) en dos genotipos comerciales de arroz sometidos a estrés térmico combinado (altas temperaturas diurnas (40°C) / nocturnas(30°C)).

1.3 Materiales y métodos

1.3.1 Material vegetal y condiciones generales de crecimiento

En este capítulo se llevaron a cabo dos experimentos separados. Semillas de arroz de los genotipos Fedearroz 67 (F67: genotipo mejorado en condiciones de alta temperatura en la última década) y Fedearroz 2000 (F2000: genotipo mejorado en la última década del siglo XX que muestra tolerancia al virus de la hoja blanca del arroz (VHB)) se utilizaron en el primer y segundo experimento, respectivamente. Ambos genotipos se seleccionaron porque son ampliamente cultivados por agricultores colombianos. Las semillas se sembraron en bandejas de 10 L de capacidad (39,6 cm de largo x 28,8 cm de ancho x 16,8 cm de alto), que contenían un suelo franco arenoso con un 2% de materia orgánica. Se plantaron cinco semillas pregerminadas en cada bandeja. Las bandejas se colocaron en el invernadero de vidrio de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, campus Bogotá (43 ° 50'56 ”N, 74 ° 04'051” W), a una altitud de 2556 metros sobre el nivel del mar (msnm), de octubre a diciembre de 2019 para el primer experimento (Fedearroz 67), y en la misma temporada en 2020 para el segundo experimento (Fedearroz 2000).

Las condiciones ambientales en el invernadero durante cada época de siembra fueron las siguientes: 30°/25° C de temperatura día / noche, 60%-80% de humedad relativa y un fotoperiodo natural de 12 h (radiación fotosintéticamente activa de 1500 µmol (fotones) $m^{-2}s^{-1}$ al mediodía). A los 20 días después de la emergencia de la semilla (DDE), las plantas fueron fertilizadas siguiendo las cantidades de cada elemento según Sánchez-Reinoso et al. (2019): 670 mg de N por planta, 110 mg de P por planta, 350 mg de K por planta, 68 mg de Ca por planta, 20 mg de Mg por planta, 20 mg de S por planta, 17 mg de Si por planta, 10 mg de B por planta, 17 mg de Cu por planta y 44 mg de Zn por planta. Las plantas de arroz se mantuvieron en las condiciones iniciales hasta 47 DDE en cada experimento, donde las plantas de arroz alcanzaron la etapa fenológica V5 durante ese período. Estudios previos han demostrado que esta etapa fenológica es un momento adecuado para realizar estudios de estrés térmico en plantas de arroz (Sánchez-Reinoso et al., 2014; Alvarado et al., 2017).

1.3.2 Tratamientos de estrés térmico y reguladores de crecimiento

En cada experimento se realizaron dos aplicaciones foliares separadas de reguladores de crecimiento. El primer grupo de aplicaciones foliares de hormonas vegetales se realizó cinco días antes de los tratamientos de estrés térmico (42 DDE) para preparar las plantas para el estrés ambiental. Luego, las segundas aplicaciones foliares se realizaron cinco días después de someter las plantas a condiciones de estrés (52 DDE). Se utilizaron cuatro hormonas vegetales y las características de cada ingrediente activo utilizado en este estudio se mencionan en la Tabla 1.1. Las concentraciones de los reguladores de crecimiento foliar utilizados fueron las siguientes: i) auxinas (ácido 1-naftalenoacético: NAA) a $5x10^{-5}$ M; ii) giberelinas (ácido giberélico: GA3) a $5x10^{-5}$ M; iii) citoquininas (Trans-Zeatin) a $1x10^{-5}$ M; y iv) brasinoesteroides (espirostan-6-ona, 3,5-dihidroxi-, (3b, 5a, 25R)) a $5x10^{-5}$ M. Estas concentraciones se seleccionaron porque han causado una respuesta positiva de tolerancia de la planta al estrés térmico (Zahir et al., 2001; Wen et al., 2010; El-Bassiony et al., 2012; Salehifar et al., 2017). Las plantas de arroz sin aplicaciones de reguladores de crecimiento solo se trataron foliarmente con agua destilada (plantas control). Todas las plantas de arroz se asperjaron usando una bomba manual. El volumen de aplicación fue de 20 ml de H_2O por planta, humedeciendo el haz y el envés de las hojas. Todas las aplicaciones foliares se realizaron con un adyuvante agrícola (Agrotin, Bayer CropScience, Colombia) a una dosis de 0.1% (v / v). La distancia entre la bandeja y el atomizador fue de 30 cm.

Los tratamientos de estrés térmico se llevaron a cabo cinco días después de las primeras aplicaciones foliares (47 DDE) en cada experimento. Las plantas de arroz se transfirieron del invernadero a cámaras de crecimiento de 294 L de capacidad (MLR-351H, Sanyo, Illinois, EE. UU.) Para establecer estrés térmico o continuar con las condiciones ambientales anteriores (47 DDE). El tratamiento combinado de estrés térmico se realizó configurando las cámaras con las siguientes temperaturas día / noche: un período de alta temperatura diurna (40°C durante 5 horas (de 11:00 a 16:00)) y nocturna (30°C durante 5 horas (de 19:00 a 24:00)) durante 8 días consecutivos. Las temperaturas de estrés y su tiempo de exposición se seleccionaron con base a estudios previos (Sánchez-Reinoso et al., 2014; Alvarado-Sanabria et al., 2017). Por otro lado, un grupo de plantas transferidas

a la cámara de crecimiento se mantuvieron a la misma temperatura del invernadero (30 ° C día / 25 ° C noche) durante 8 días consecutivos.

Al final del experimento, se obtuvieron los siguientes grupos de tratamientos: i) condiciones de temperatura de crecimiento (30°/25°C de temperatura día / noche) + aplicaciones de agua destilada (control absoluto (AC)), ii) condiciones de estrés térmico + aplicaciones de agua destilada (control de estrés térmico (SC)), iii) condiciones de estrés térmico + aplicaciones de auxinas (AUX), iv) condiciones de estrés térmico + aplicaciones de giberelinas (GA), v) condiciones de estrés térmico + aplicaciones de citoquininas (CK), y vi) condiciones de estrés térmico + aplicaciones de brasinoesteroides (BR). Estos grupos de tratamientos se utilizaron en ambos genotipos (F67 y F2000). Todos los tratamientos se organizaron en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones, y cada repetición consistió en una planta. Cada planta se utilizó para lecturas de las variables determinadas al final del experimento. El experimento duró 55 DDE en ambas variedades.

Tabla 1.1. Nombre químico del ingrediente activo, nombre comercial y fabricante de los reguladores de crecimiento utilizados para evaluar aplicaciones foliares en plantas de arroz bajo estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche).

Nombre químico del ingrediente activo	Nombre comercial (fabricante)	Actividad biológica del compuesto
Ácido 1-naftalenacético	HORMONAGRO® A.N.A (Colinagro, Bogotá, Colombia)	Estimula la apertura de los estomas y la producción de pequeñas proteínas de choque térmico (sHSP) (Ha et al., 2012)
Ácido giberélico	Gibberellic acid (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)	Induce la germinación y el crecimiento de las plántulas y desacelera la transición floral (Alonso-Ramirez et al., 2009)
Trans-Zeatin	M977 trans-Zeatin, 98% (HPLC) (AK scientific)	Se une a las proteínas chaperonas para mitigar el efecto de las altas temperaturas, funciona como marcador de la proteína de choque térmico 90 (HSP90) (Ahammed et al., 2014; Wang et al., 2016)
Espirostan-6-ona, 3,5-dihidroxi-, (3b, 5a, 25R)	Biomex DI-31 (Minerales exclusivos SA, Bogotá, Colombia)	Aumenta la síntesis y acumulación de HSP, la fotosíntesis y el intercambio de gases (Dhaubhadel et al., 2002; Ogweno et al., 2007)

1.3.3 Conductancia estomática y contenido relativo de agua (CRA)

La conductancia estomática (g_s) se determinó utilizando un porómetro portátil (SC-1, METER Group Inc., EE. UU.) con un rango de 0 a 1000 mmol m^{-2} s^{-1} y una apertura de la cámara de muestra de 6,35 mm. Las medidas se tomaron colocando el sensor del porómetro sobre una hoja madura completamente expandida de la macolla principal de la planta. Se tomaron lecturas de g_s entre las 11:00 y las 16:00 h en tres hojas por planta en cada tratamiento y se promediaron los valores.

El CRA se determinó siguiendo el método descrito por Ghoulam et al., (2002). También, se utilizó una hoja completamente expandida utilizada para determinar g_s para medir esta variable. El peso fresco (PF) se determinó inmediatamente después de la cosecha utilizando una balanza digital. Posteriormente, las hojas se colocaron dentro de recipientes de plástico con agua en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente (22°C) durante 48 horas. Luego, se pesaron en una balanza digital para registrar el peso turgente (TW). Las hojas turgentes se secaron en un horno a 75 ° C durante 48 horas y se registró su peso seco (DW).

1.3.4 Contenido relativo de clorofila y parámetros de fluorescencia de clorofila α

El contenido relativo de clorofila se determinó utilizando un medidor de clorofila (medidor atLeaf, FT Green LLC, EE. UU.) y se expresó como unidades atLeaf (Dey et al., 2016). Las lecturas de máxima eficiencia cuántica de PSII (relación F_v/F_m) se registraron utilizando un fluorómetro de clorofila de excitación continua (Handy PEA, Hansatech Instruments, Reino Unido). Antes de tomar las medidas de F_v/F_m, las hojas se adaptaron a la oscuridad mediante clips de hojas durante 20 minutos (Restrepo-Diaz y Garces-Varon, 2013). Después de la adaptación de la hoja en la oscuridad, se midieron la línea de base (F_0) y la fluorescencia máxima (F_m). La fluorescencia variable ($F_v = F_m – F_0$), la relación entre la fluorescencia variable y la máxima (F_v/F_m), el rendimiento cuántico máximo del fotosistema PSII (F_v / F_0) y la relación F_m / F_0 se calcularon basándose en estos datos (Zhao et al., 2008; Baker, 2008; Li et al., 2017). Las lecturas de los parámetros relativos de la clorofila y la fluorescencia de la clorofila se tomaron en las mismas hojas utilizadas para las lecturas de g_s.

1.3.5 Variables bioquímicas: pigmentos fotosintéticos foliares, peroxidación lipídica (malondialdehído-MDA) y prolina

Se recolectaron aproximadamente 800 mg de peso fresco de hojas para las variables bioquímicas. Luego, las muestras de hojas se homogeneizaron en nitrógeno líquido y se almacenaron para su posterior análisis. El método de determinación espectral utilizado para estimar el contenido de clorofila a, b y carotenoides en el tejido se basó en la metodología y las ecuaciones descritas por Wellburn (1994). Se recolectaron muestras de tejido foliar (30 mg) y se homogeneizaron en 3 mL de acetona al 80%. Luego, las muestras se centrifugaron (Modelo 420101, Becton Dickinson Primary Care Diagnostics, EE. UU.) a 5000 rpm durante 10 min para eliminar las partículas. El sobrenadante se diluyó hasta un volumen final de 6 ml añadiendo acetona al 80% (Sims y Gamon, 2002). El contenido de clorofila se determinó a 663 (clorofila a) y 646 (clorofila b) nm, mientras que los carotenoides se estimaron a 470 nm utilizando un espectrofotómetro (Spectronic BioMate 3 UV-vis, Thermo, EE. UU.).

El método del ácido tiobarbitúrico (TBA) descrito por Hodges et al. (1999) se utilizó para estimar la peroxidación de lípidos de membrana (MDA). También, se homogeneizaron aproximadamente 30 mg de tejido foliar en nitrógeno líquido. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm y luego se midieron las absorbancias a 440, 532 y 600 nm con el espectrofotómetro. Finalmente, se utilizó un coeficiente de extinción ($157\ M \cdot ml - 1$) para obtener la concentración de MDA.

El contenido de prolina se determinó para todos los tratamientos utilizando el método descrito por Bates et al. (1973). Se añadieron diez ml de una solución acuosa al 3% de ácido sulfosalicílico a las muestras almacenadas, que luego se filtraron con papel Whatman (No. 2). Posteriormente, se hicieron reaccionar 2 mL de este filtrado con 2 mL de ácido ninhidrina y 2 mL de ácido acético glacial. La mezcla se colocó en un baño de agua a 90 ° C durante 1 hora. La reacción se detuvo mediante incubación en hielo. La solución resultante se disolvió en 4 ml de tolueno agitando vigorosamente los tubos de ensayo usando un agitador de vórtice. Las lecturas de absorbancia se determinaron a 520 nm con el mismo espectrofotómetro utilizado en la cuantificación de pigmentos fotosintéticos (Spectronic BioMate 3 UV-Vis, Thermo, Madison, WI, EE. UU.).

1.3.6 Temperatura del dosel vegetal e índice de estrés del cultivo (CSI)

Se utilizó la metodología descrita por Gerhards et al., (2016) para calcular la temperatura del dosel de la planta y el CSI. Se tomaron fotografías térmicas con una cámara FLIR 2 (FLIR Systems Inc., Boston, MA, EE. UU.) con una precisión de ± 2 ° C al final del período de estrés. Se colocó una superficie blanca detrás de las plantas para la fotografía. Asimismo, se consideraron dos plantas como patrón de referencia. Estas plantas se colocaron sobre una superficie blanca; uno de ellos se cubrió con un adyuvante agrícola (Agrotin, Bayer CropScience, Bogotá, Colombia) para simular la apertura de todos los estomas (patrón húmedo (Twet)), y el otro fue una hoja sin ninguna aplicación (patrón seco (Tdry)) (Castro-Duque et al., 2020). La fotografía se tomó con una distancia de 1 m entre la cámara y la maceta. Con las fotografías obtenidas y utilizando la siguiente ecuación se calculó el CSI

$$\mathrm{CSI} = \frac{\mathrm{Tleaf} - \mathrm{Twet}}{\mathrm{Tdry} - \mathrm{Twet}}$$

1.3.7 Índice de tolerancia relativa (IRT)

El índice de tolerancia relativa se calculó indirectamente para determinar la tolerancia de los genotipos tratados evaluados en esta investigación, utilizando la conductancia estomática (g_s) de las plantas tratadas en relación con las plantas control (plantas sin tratamiento de estrés y aplicación de reguladores de crecimiento). El IRT se obtuvo utilizando la ecuación adaptada de Chávez-Arias et al., (2020).

$$IRT = (g_s\ plantas\ sometidas\ a\ estrés\ térmico \\ /\ g_s\ plantas\ no\ sometidas\ a\ estrés\ térmico) * 100$$

Todas las variables fisiológicas descritas anteriormente se determinaron y registraron a los 55 DDE en cada experimento utilizando hojas completamente expandidas recolectadas de la parte superior del dosel. Asimismo, las mediciones se realizaron dentro de la cámara de crecimiento para evitar alterar las condiciones ambientales en las que se cultivaron las plantas.

1.3.8 Diseño experimental y análisis de datos

Los datos del primer y segundo experimentos se analizaron juntos como una serie de experimentos. Cada grupo de tratamiento constaba de cinco plantas y cada planta era una unidad experimental. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) ($P \leq 0.05$). Cuando se encontraron diferencias significativas, se utilizó la prueba comparativa post hoc de Tukey a $P \leq 0.05$. Los valores porcentuales se transformaron utilizando la función arcoseno. Los datos se analizaron utilizando el software Statistix v 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, EE. UU.), y el SigmaPlot (versión 10.0; Systat Software, San José, CA, EE. UU.) se utilizó para las figuras. Se realizó un análisis de componentes principales con el software InfoStat 2016 (software analítico, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) para identificar los mejores reguladores del crecimiento de las plantas en el estudio.

1.4 Resultados

La Tabla 1.2 resume el análisis de varianza que muestra el efecto de los experimentos, los diferentes tratamientos y su interacción sobre los pigmentos fotosintéticos foliares (clorofila a, b, contenido total y carotenoides), contenido de malondialdehído (MDA) y prolina, conductancia estomática (g_s), contenido relativo de agua (CRA), contenido de clorofila, parámetros de fluorescencia de clorofila α, temperatura del dosel de la planta (T) (° C), índice de estrés del cultivo (CSI) e índice de tolerancia relativa de las plantas de arroz a 55 DDE.

1.4.1 Pigmentos fotosintéticos de las hojas, contenido relativo de clorofila y parámetros de fluorescencia de la clorofila α

Las diferencias ($P \leq 0.01$) en la interacción entre los experimentos y tratamientos sobre los pigmentos fotosintéticos de las hojas, el contenido relativo de clorofila (lecturas de Atleaf) y los parámetros de fluorescencia de la clorofila α se muestran en la Tabla 1.2. Las altas temperaturas diurnas / nocturnas disminuyeron el contenido total de clorofila y carotenoides. Las plántulas de arroz sin aplicaciones foliares de hormonas vegetales y sometidas a condiciones de estrés térmico combinado mostraron un contenido de clorofila total menor (2,36 mg g^{-1} para 'F67' y 2,56 mg g^{-1} para 'F2000') en comparación con las plantas cultivadas en condiciones óptimas de temperatura (2,67 mg g^{-1} para 'F67' y 2,80 mg g^{-1} para 'F2000') en ambos experimentos. Además, las plántulas de arroz sometidas a

estrés térmico y tratadas con aplicaciones de AUX y GA también mostraron una disminución en el contenido de clorofila en ambos genotipos (AUX = 1,96 mg g^{-1} y GA = 1,45 mg g^{-1} para 'F67'; AUX = 2,24 mg g^{-1} y GA = 1,43 mg g^{-1} para 'F2000') en condiciones de estrés por altas temperaturas combinadas. Las aplicaciones foliares de BR provocaron un ligero aumento de esta variable en ambos genotipos en condiciones de estrés térmico. Finalmente, las aplicaciones foliares de CK mostraron los valores de pigmento fotosintético más altos de todos los tratamientos (tratamientos AUX, GA, BR, SC y AC) en los genotipos F67 (3.24 mg g^{-1}) y F2000 (3.65 mg g^{-1}). El contenido relativo de clorofila (unidades Atleaf) también disminuyó por el estrés térmico combinado. Los valores más altos también se registraron en plantas tratadas con CK en ambos genotipos (41,66 para 'F67' y 49,30 para 'F2000'). La relación F_v/F_m mostró diferencias significativas entre los tratamientos y cultivares (Tabla 1.2). En general, el cultivar F67 se vio menos influenciado por el estrés térmico que 'F2000' en estas variables. La relación F_v y F_v/F_m se vio más afectada en el segundo experimento. Las plántulas estresadas de la variedad 'F2000' sin ninguna aplicación de hormonas vegetales registraron los valores más bajos de F_v (2120,15) y la relación F_v/F_m (0,59); sin embargo, las aplicaciones foliares de CK ayudaron a que estas variables se recuperaran (F_v: 2591.89, y relación F_v/F_m: 0.73), obteniendo lecturas similares a las registradas en plantas 'F2000' cultivadas en condiciones óptimas de temperatura (F_v: 2955.35, y relación F_v/F_m: 0,72). No se presentaron diferencias significativas en la fluorescencia inicial (F_0), la fluorescencia máxima (F_m), el rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica de PSII (F_v/F_0) y la relación F_m/F_0. Finalmente, BR mostró tendencias similares a las observadas con la aplicación de CK (2545.06 para F_v y 0.73 para la relación F_v/F_m).

Tabla 1.2. Resumen del análisis de varianza entre el experimento (genotipos) y los tratamientos de estrés por térmico sobre las variables fisiológicas y bioquímicas de las plantas de arroz.

Fuente de variación	df	g_s	CRA	CC	F_v/F_m	F_0	F_m	F_v	F_v/F_0	F_m/F_0	T (°C)	CSI	IRT	Chl *a*	Chl *b*	Chl total	Cx+c	MDA	Prolina
Experimento (*E*)	1	<0.001	0.0183	<0.001	<0.001	<0.001	0.728	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	0.767	<0.001	<0.001	0.107	<0.001	<0.001	0.484	<0.001
Tratamiento (*T*)	5	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.0542	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
E* x *T	5	<0.001	<0.05	<0.001	<0.001	0.361	0.280	<0.05	0.296	0.312	<0.05	0.679	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
C.V. (%)		7.58	3.05	5.16	3.93	15.26	5.31	2.27	9.64	8.20	1.61	12.12	8.81	6.92	8.67	16.50	8.97	54.15	32.77

g_s, conductancia estomática; CRA, contenido relativo de agua; CC, contenido de clorofila; F_v/F_m, máxima eficiencia cuántica de PSII; fluorescencia inicial (F_0), fluorescencia máxima (F_m), fluorescencia variable (F_v), eficiencia máxima de PSII (F_v/F_m), rendimiento cuántico máximo de fotoquímica de PSII (F_v/F_0) y la relación F_m/F_0, T, temperatura del dosel (°C), disminución de la máxima eficiencia cuántica del PSII; CSI: índice de estrés del cultivo; IRT, índice de tolerancia relativa; Chl a, clorofila a; Chl b, clorofila b; Chl total, clorofila total; Cx+c, carotenoides; MDA, malondialdehído. C.V., coeficiente de variación.

Tabla 1.3. Efecto del estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) sobre los pigmentos fotosintéticos de las hojas (clorofila total (Chl total), clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b) y carotenoides (Cx + c)), contenido relativo de clorofila (unidades Atleaf) y parámetros de fluorescencia de clorofila (fluorescencia inicial (F_0), fluorescencia máxima (F_m), fluorescencia variable (F_v), eficiencia máxima de PSII (F_v/F_m), rendimiento cuántico máximo de fotoquímica de PSII (F_v / F_0) y la relación F_m / F_0 en plantas de dos genotipos de arroz (Fedearroz 67 (F67) y Fedearroz 2000 (F2000)) a los 55 días después de la emergencia (DDE).

		Pigmentos fotosintéticos					**parámetros de fluorescencia de clorofila**					
Genotipo	**Tratamiento**	**Chl total mg g^{-1} (PF)**	**Chl *a* mg g^{-1} (PF)**	**Chl *b* mg g^{-1} (PF)**	**Cx+c mg g^{-1} (PF)**	**Atleaf units**	**F_0**	**F_m**	**F_v**	**F_v/F_m**	**F_v/F_0**	**F_m/F_0**
F67	AC	2.67cd	2.08 cd	0.59 cd	0.45 cd	41.93 bc	829.75	3863.75	3029.98 a	0.78 ab	3.66	4.66
(Experimento 1)	SC	2.36 def	1.79 de	0.56 d	0.52 bc	33.50 d	814.50	3278.00	2456.79 cd	0.75 bcd	3.02	4.03
	AUX	1.95f	1.36 fg	0.59 cd	0.14 g	38.0 cd	733.50	3352.75	2605.44 bc	0.78 abc	3.56	4.58
	GA	1.45g	1.07 g	0.38 ef	0.27 f	37.59 cd	814.00	3327.25	2513.07 bc	0.76 abcd	3.16	4.16
	CK	3.25 ab	2.52 b	0.73 ab	0.59 ab	41.66 bc	751.00	3579.25	2826.34 ab	0.79 ab	3.76	4.76
	BR	2.14 ef	1.65 ef	0.49 de	0.38 de	40.30 bc	763.75	3469.50	2745.60 abc	0.79 a	3.61	4.56
F2000	AC	2.80 c	2.19 c	0.60 bcd	0.53 bc	48.92 a	1061.40	4016.75	2955.35 a	0.74 cde	2.79	3.79
(Experimento 2)	SC	2.56 cde	2.09 cd	0.54 d	0.50 bc	33.72 d	1266.45	3218.25	2120.15 de	0.66fg	1.76	2.67
	AUX	2.24 ef	1.70 e	0.54 d	0.35 ef	47.45 a	1041.47	3462.25	2420.78 cd	0.70 ef	2.34	3.34
	GA	1.43 g	1.09 g	0.33 f	0.26 f	39.07 c	1112.23	3063.50	1951.27 e	0.64 g	1.76	2.76
	CK	3.65 a	2.87 a	0.78 a	0.66 a	49.30 a	918.86	3510.75	2591.89 bc	0.74 cde	2.82	3.82
	BR	2.88 bc	2.19c	0.69 abc	0.48 cd	44.52 ab	940.69	3485.75	2545.06 bc	0.73 de	2.72	3.72
Significancia		***	***	***	***	***	NS	NS	*	**	NS	NS

Los tratamientos evaluados en cada genotipo fueron: control absoluto (AC), control de estrés por térmico (SC), estrés térmico + auxinas (AUX), estrés térmica + giberelinas (GA), estrés térmico + citoquininas (CK) y estrés térmico + brasinoesteroides (BR). Los datos representan la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Los datos seguidos de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤0.05). NS, *, ** o *** no significativo o significativo a P ≤ 0.05, 0.01 o 0.001, respectivamente.

1.4.2 Contenido relativo de agua (CRA), conductancia estomática, producción de MDA y contenido de prolina

El contenido relativo de agua (CRA) de las plantas de arroz sometidas a los diferentes tratamientos mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la interacción entre experimentos y tratamientos foliares (Figura 1.1A). El tratamiento SC registró los valores más bajos en ambos genotipos (74,01% para F67 y 76,6% para F2000). Se registró un aumento significativo del CRA en plantas de arroz de ambos genotipos tratadas con diferentes hormonas vegetales bajo estrés térmico. En general, las aplicaciones foliares de CK, GA, AUX o BR mejoraron el CRA, alcanzando valores similares a los de las plantas cultivadas en condiciones óptimas durante los experimentos. Los valores registrados para las plantas control absoluto y las hormonas anteriormente mencionadas, estuvieron alrededor del 83% para ambos genotipos. Por otro lado, g_s también mostró diferencias significativas ($P \leq 0.01$) en la interacción entre experimentos y tratamientos (Figura 1.1B). Las plantas de control absoluto (AC) también registraron los valores más altos en cada genotipo (440,65 mmol $m^{-2}s^{-1}$ para F67 y 511,02 mmol $m^{-2}s^{-1}$ para F2000). Las plantas de arroz sometidas únicamente a estrés térmico combinado mostraron los valores de g_s más bajos para ambos genotipos (150,60 mmol $m^{-2}s^{-1}$ para F67 y 171,32 mmol $m^{-2}s^{-1}$ para F2000). g_s también se mejoró con las aplicaciones foliares de todos los reguladores del crecimiento de las plantas. Los efectos de las aplicaciones foliares de hormonas vegetales fueron más notorios en las plantas de arroz 'F2000' asperjadas con CK. Este grupo de plantas no mostró diferencias en comparación con las plantas de control absoluto (511.02 para AC y 499.25 mmol $m^{-2}s^{-1}$ para CK).

Los contenidos de MDA ($P \leq 0.01$) y prolina ($P \leq 0.01$) también mostraron diferencias significativas en la interacción entre experimentos y tratamientos con hormonas vegetales (Figura 1.1C y D). Se observó un aumento de la peroxidación lipídica en los tratamientos SC en ambos genotipos (Figura 1.1C); sin embargo, las plantas tratadas con aplicaciones foliares de reguladores del crecimiento mostraron una disminución en la peroxidación lipídica para ambos genotipos. En general, el uso de hormonas vegetales (CK, AUX, BR o GA) provocó una reducción de la peroxidación lipídica (contenido de MDA). No se obtuvieron diferencias entre las plantas AC y plantas sometidas a estrés térmico y tratadas con hormonas vegetales en ambos genotipos (valores observados entre 4,38 y 6,77 µmol g^{-1} de PF en plantas 'F67' y 2,84 y 9,18 µmol g^{-1} de PF en plantas 'F2000'). Por otro lado,

la síntesis de prolina fue menor en las plantas 'F67' que en las plantas 'F2000' bajo estrés combinado. Las aplicaciones foliares de AUX o BR también provocaron una mayor producción de prolina en plantas de arroz sometidas a estrés térmico en ambos experimentos. Se observó que el uso de estas hormonas aumentó notoriamente el contenido de este aminoácido (30,44 y 18,34 µmol g^{-1} de PF para AUX y BR, respectivamente) en plantas 'F2000' (Figura 1.1D).

1.4.3 Temperatura del dosel de la planta, índice de tolerancia relativa (IRT) e índice de estrés del cultivo (CSI)

El efecto de las aplicaciones foliares de reguladores de crecimiento y el estrés térmico combinado sobre la temperatura del dosel de las plantas y el índice de tolerancia relativa (IRT) se muestra en la Figura 1.2 A y B. Las plantas del tratamiento AC registraron temperaturas cercanas a 27 °C en el dosel de las plantas; mientras que las plantas SC mostraron una temperatura del dosel de alrededor de 28 ° C para ambos genotipos. También, se observó que los tratamientos foliares con CK y BR provocaron una mayor disminución en la temperatura del dosel de la planta entre 2 y 3 ° C en comparación con las plantas SC (Figura 1.2A). El IRT mostró un comportamiento similar al resto de variables fisiológicas, mostrando diferencias significativas ($P \leq 0.01$) en las interacciones entre experimentos y tratamientos (Figura 1.2B). Las plantas SC mostraron una menor tolerancia de las plantas en ambos genotipos (34,18% y 33,52% para las plantas de arroz 'F67' y 'F2000', respectivamente). La aplicación foliar de hormonas vegetales mejoró la IRT en plantas expuestas a temperaturas estresantes. Este efecto fue más notorio en las plantas del genotipo 'F2000' tratadas con CK, registrando un IRT de 97,69%. Por otro lado, solo se observaron diferencias significativas en el índice de estrés del cultivo (CSI) de las plantas de arroz sometidas a la condición de estrés ($P \leq 0.01$) en el factor aplicaciones foliares (Figura 1.2C). Las plantas de arroz solo expuestas a estrés térmico combinado mostraron los valores de índice de estrés más altos (0,816). El índice de estrés fue menor (valores entre 0,6 y 0,67) cuando las plantas de arroz fueron aplicadas con las diferentes hormonas vegetales. Finalmente, las plantas de arroz cultivadas en condiciones óptimas mostraron un valor de 0,138.

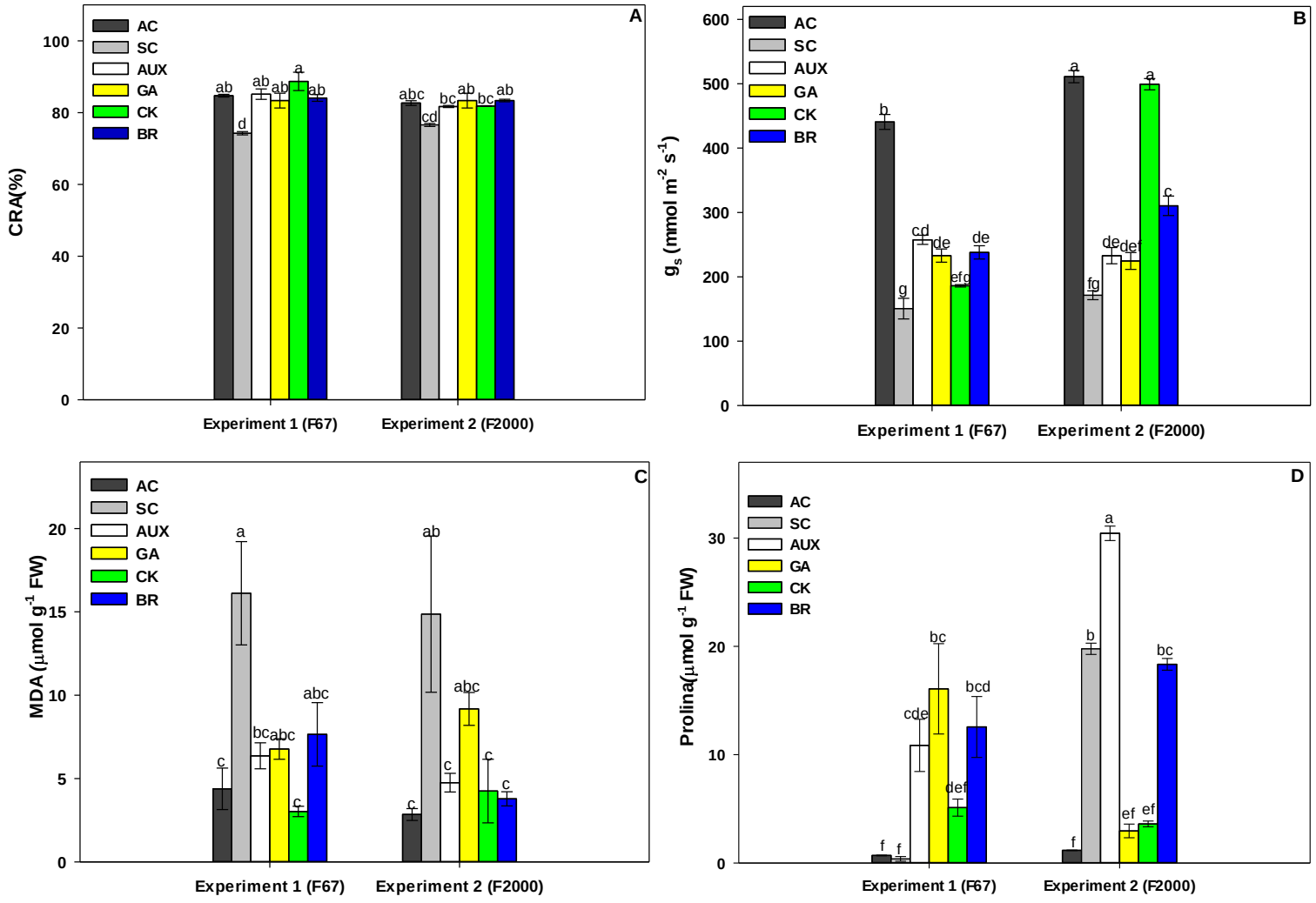

Figura 1.1. Efecto del estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) sobre el contenido relativo de agua (CRA) (A), la conductancia estomática (g_s) (B), la producción de malondialdehído (MDA) (C) y contenido de prolina (D) en plantas de dos genotipos de arroz (F67 y F2000) a los 55 días después de la emergencia (DDE). Los tratamientos evaluados en cada genotipo fueron: control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), estrés térmico + auxinas (AUX), estrés térmico + giberelinas (GA), estrés térmico + citoquininas (CK) y estrés térmico + brasinoesteroides (BR). Cada columna representa la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Las barras seguidas de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤ 0,05).

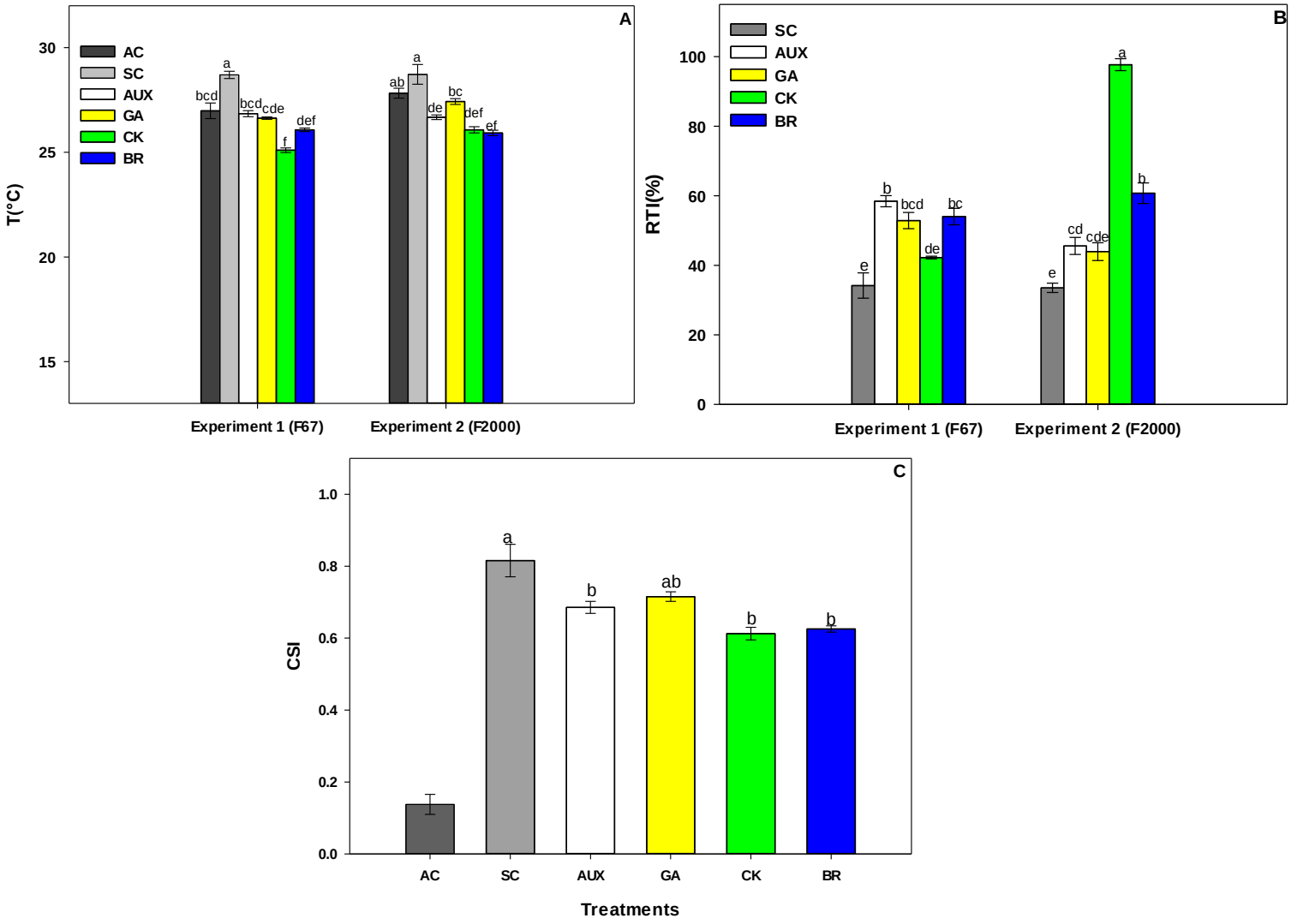

Figura 1.2. Efecto del estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) sobre la temperatura del dosel de la planta (A), el índice de tolerancia relativa (IRT) (B) y el índice de estrés del cultivo (CSI) (C) de dos genotipos comerciales de arroz (F67 y F2000) expuestos a diferentes tratamientos térmicos. Los tratamientos evaluados en cada genotipo fueron: control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), estrés térmico + auxinas (AUX), estrés térmico + giberelinas (GA), estrés térmico + citoquininas (CK) y estrés térmico + brasinoesteroides (BR). El estrés térmico combinado consistió en exponer las plantas de arroz a altas temperaturas diurnas / nocturnas (40 ° / 30 ° C día / noche). Cada columna representa la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Las barras seguidas de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de

Tukey (P ≤ 0.05). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤ 0,05).

1.5 Discusión

Variables como el contenido de clorofila, conductancia estomática, relación F_v/F_m, CSI, MDA, IRT y contenido de prolina son útiles para comprender la aclimatación de los genotipos del arroz y evaluar el impacto de las estrategias agronómicas bajo estrés térmico (Sarsu et al., 2018; Quintero -Calderon et al., 2021). El objetivo del experimento fue evaluar el efecto de la aplicación de cuatro reguladores de crecimiento sobre las variables fisiológicas y bioquímicas de plántulas de arroz sometidas a estrés térmico combinado. La prueba de plántulas de arroz es un método simple y rápido que permite la evaluación simultánea de genotipos o tratamientos en función del tamaño o condiciones de la infraestructura disponible (Sarsu et al., 2018). Los resultados de este estudio mostraron que el estrés térmico combinado provocó diferentes respuestas fisiológicas y bioquímicas en ambos genotipos de arroz, lo que indica un proceso de aclimatación. Estos resultados también mostraron que las aplicaciones foliares de reguladores de crecimiento (principalmente citoquininas y brasinoesteroides) ayudaron a la aclimatación del arroz al estrés combinado de altas temperaturas, ya que se favorecieron principalmente la relación g_s, CRA y F_v/F_m, los pigmentos fotosintéticos y el contenido de prolina.

La aplicación de reguladores de crecimiento ayudó al estado hídrico de las plantas de arroz en condiciones de estrés térmico, lo que puede estar asociado con una g_s más alto y una temperatura más baja del dosel de la planta. Este estudio mostró que las plantas de arroz tratadas principalmente con CK o BR registraron valores de g_s más altos y T (°C) más bajos que el tratamiento con SC en plantas 'F2000' (genotipo susceptible). Estudios anteriores también han encontrado que g_s y T (°C) son indicadores fisiológicos precisos para determinar la respuesta de aclimatación de las plantas de arroz y el efecto de las estrategias agronómicas al estrés térmico (Restrepo y Garcés, 2013; Sarsu et al., 2018; Quintero-Calderón et al., 2021). Las CK o BR aplicados foliarmente mejoran g_s en condiciones de estrés, ya que estas hormonas vegetales pueden ayudar a la apertura estomática al interactuar con la síntesis de otras moléculas de señalización como ABA (promotor de cierre de estomas en condiciones de estrés abiótico) (Mackova et al., 2013; Zhou et al., 2014). La apertura de estomas promueve el enfriamiento de las hojas y ayuda

a disminuir la temperatura del dosel (Sonjaroon et al., 2018; Quintero-Calderón et al., 2021). Por estas razones, la temperatura del dosel de las plantas podría ser más baja en las plantas de arroz rociadas con CK o BR bajo estrés térmico combinado.

Los estreses por altas temperatura disminuyen el contenido de pigmentos fotosintéticos en las hojas (Chen et al., 2017b; Ahammed et al., 2018). En este estudio, los pigmentos fotosintéticos tendieron a disminuir en ambos genotipos cuando las plantas de arroz se encontraban en condiciones de estrés térmico y sin ninguna aplicación de reguladores de crecimiento (Tabla 1.3). Feng y Col. (2014) también informaron una disminución sustancial en el contenido de clorofila de las hojas en dos genotipos de trigo expuestos al estrés térmico. La exposición a altas temperaturas generalmente da como resultado un bajo contenido de clorofila que puede ser causado por una disminución de la biosíntesis de clorofila, la degradación del pigmento o su efecto combinado bajo estrés térmico (Fahad et al., 2017). Sin embargo, las plantas de arroz tratadas principalmente con CK y BR aumentaron la concentración de pigmento fotosintético de las hojas bajo estrés térmico. Jespersen y Huang (2015) y Thussagunpanit et al., (2015) encontraron resultados similares donde observaron que los valores de clorofila de las hojas aumentaron después de la aplicación de hormonas zeatina y epibrasinolide en plantas de pasto rastrero y arroz expuestas a estrés térmico, respectivamente. Una explicación plausible de por qué CK y BR ayudaron al contenido de clorofila de la hoja bajo estrés térmico combinado es porque CK puede regular el inicio de la inducción continua de los promotores de expresión (como el promotor activado por senescencia (SAG12) o el promotor HSP18), reduciendo la pérdida de clorofila de la hoja, retrasando la senescencia de las hojas y mejorando la resistencia al calor de las plantas (Liu et al., 2020). BR puede proteger la clorofila de las hojas y mejorar el contenido de clorofila de las hojas activando o induciendo la síntesis de enzimas involucradas en la biosíntesis de clorofila bajo estrés (Sharma et al., 2017; Siddiqui et al., 2018). Finalmente, ambas hormonas vegetales (CK y BR) también ayudan a la expresión de proteínas de choque térmico, mejorando diferentes procesos de aclimatación metabólica como el aumento de la biosíntesis de clorofila (Sharma et al., 2017; Liu et al., 2020).

Los parámetros de fluorescencia de la clorofila a son una técnica rápida y no destructiva que permite estimar la tolerancia o aclimatación de la planta a condiciones de estrés abiótico (Chaerle et al., 2007; Kalaji et al., 2017). Se han utilizado parámetros como la

relación F_v/F_m como indicadores de aclimatación de la planta a condiciones estresantes (Alvarado-Arias et al., 2017; Chavez-Arias et al., 2020). En esta investigación, las plantas del tratamiento SC mostraron los valores más bajos de esta variable, principalmente en las plantas de arroz 'F2000'. Yin y Col. (2010) también encontraron que la relación F_v/F_m disminuyó significativamente a temperaturas superiores a 35 °C en las hojas de arroz al máximo de macollamiento. Según Feng et al. (2014), una relación F_v/F_m baja bajo estrés térmico sugiere una disminución en la captura y tasa de conversión de la energía de excitación por los centros de reacción del PSII, lo que indica la desorganización de los centros de reacción del PSII bajo condiciones de estrés térmico. Esta observación nos permite inferir que el desorden en la maquinaria fotosintética pareció ser más pronunciado en cultivares sensibles (Fedearroz 2000) que en los resistentes (Fedearroz 67).

El uso de CK o BR mejoró principalmente la eficiencia de PSII bajo estrés térmico combinado. Assagunpanit et al., (2015) obtuvieron resultados similares, quienes observaron que la aplicación de BR mejoró la eficiencia del PSII bajo estrés térmico en plantas de arroz. Kumar et al., (2020) también encontraron que las plantas de garbanzo tratadas con CK (6-Benciladenina) y expuestas a estrés térmico aumentaron la relación F_v/F_m, concluyendo que la aplicación foliar de CK ayudó a la actividad de PSII al activar la operación del ciclo de la zeaxantina. Además, las aplicaciones foliares de BR favorecieron la maquinaria fotosintética del PSII en condiciones de estrés combinado, lo que sugiere que la aplicación de esta hormona vegetal resultó en una menor disipación de la energía de excitación en las antenas del PSII y promovió la acumulación de pequeñas proteínas cloroplásticas de choque térmico (Ogweno et al., 2008; Kothari y Lachowiec, 2021).

El contenido de MDA y prolina generalmente aumentó cuando las plantas estaban bajo estrés abiótico en comparación con las plantas cultivadas en condiciones óptimas. Estudios previos también identificaron que los niveles de MDA y prolina son mecanismos bioquímicos utilizados para comprender el proceso de aclimatación o el efecto de las prácticas agronómicas en plantas de arroz bajo altas temperaturas diurnas o nocturnas (Alvarado-Sanabria et al., 2017; Quintero-Calderón et al., 2021). Esos estudios también informaron que los contenidos de MDA y prolina eran generalmente más altos en las plantas de arroz expuestas a altas temperaturas diurnas o nocturnas, respectivamente. Sin embargo, la aplicación foliar de CK y BR ayudó a disminuir MDA y aumentar los niveles de prolina, principalmente en el genotipo tolerante (Fedearroz 67). Las aplicaciones de CK

podrían ayudar a la sobreexpresión de citoquinina oxidasa / deshidrogenasa que aumenta el contenido de compuestos protectores como betaína, prolina, etc. (Liu et al., 2020). Los BR promueven la inducción de osmoprotectores como betaínas, azúcares y aminoácidos, incluida la prolina libre, manteniendo el equilibrio osmótico celular en muchas condiciones ambientales desfavorables (Kothari y Lachowiec, 2021).

El índice de estrés del cultivo (CSI) y el índice de tolerancia relativa (IRT) se utilizan para determinar si los tratamientos evaluados ayudan a mitigar diferentes estreses (abióticos y bióticos) y tienen un efecto positivo en la fisiología de la planta (Castro-Duque et al., 2020; Chavez-Arias et al., 2020). Los valores de CSI pueden oscilar entre cero y uno, lo que representa las condiciones no estresadas y estresadas, respectivamente (Lee et al., 2010). Los valores de las plantas con estrés térmico (SC) mostraron un CSI entre 0,8 y 0,9 (Figura 1.2C), lo que sugiere que las plantas de arroz se vieron afectadas negativamente bajo estrés combinado. Sin embargo, las aplicaciones foliares de BR (0,6) o CK (0,6) causaron principalmente una disminución en este índice bajo estrés abiótico en comparación con las plantas de arroz SC. En las plantas de 'F2000', el IRT mostró un mayor aumento con el uso de CK (97,69%) y BR (60,73%) en comparación con SC (33,52%), lo que sugiere que estos reguladores del crecimiento de las plantas también ayudaron a mejorar la tolerancia del arroz al estrés térmico combinado. Estos índices se han sugerido para el manejo de situaciones estresantes en diferentes especies. Estudios realizados por Lee et al., (2010) mostraron que dos cultivares de algodón bajo estrés hídrico moderado tenían un CSI alrededor de 0.85, mientras que cultivares bien irrigados registraron valores de CSI entre 0.4 y 0.6, concluyendo que este índice es un indicador de la adaptabilidad del cultivar a las condiciones de estrés hídrico. Además, Chavez-Arias et al., (2020) evaluaron el efecto de elicitores sintéticos como una estrategia para mitigar el estrés combinado en plantas de uchuva, encontrando que las plantas rociadas con estos compuestos mostraron un IRT más alto (65%) en comparación con las plantas solo expuestas al estrés combinado (estrés biótico y abiótico). Con base en lo anterior, el uso de CK y BR puede considerarse una estrategia agronómica para inducir la tolerancia del arroz al estrés térmico combinado, ya que estos reguladores del crecimiento de las plantas causaron respuestas bioquímicas y fisiológicas positivas.

En los últimos años, los estudios de arroz en Colombia se han centrado en la evaluación de genotipos con resistencia a altas temperaturas diurnas o nocturnas utilizando rasgos

fisiológicos o bioquímicos (Sánchez-Reinoso et al., 2014; Alvarado-Sanabria et al., 2021). Sin embargo, el análisis de técnicas prácticas, económicas y rentables ha cobrado importancia en los últimos años para proponer un manejo integrado de cultivos para mitigar los efectos de períodos combinados de estrés térmico en el país (Calderón-Páez et al., 2021; Quintero- Calderón et al., 2021). Por esta razón, las respuestas fisiológicas y bioquímicas de las plantas de arroz al estrés térmico combinado (40°C día / 30°C noche) observadas en este capítulo indican que las aplicaciones foliares de CK o BR pueden ser una técnica apropiada de manejo del cultivo para mitigar los efectos adversos de períodos moderados de estrés térmico. Estos tratamientos aumentaron la tolerancia (bajo CSI y alto IRT) de los dos genotipos de arroz, mostrando tendencias comunes en las respuestas fisiológicas y bioquímicas de las plantas bajo estrés térmico combinado. Las principales respuestas de las plantas de arroz fueron una disminución en g_s, clorofila total, Chl α y β y contenido de carotenoides. Además, las plantas registraron un aumento en el daño del PSII (reduciendo los valores de los parámetros de fluorescencia de la clorofila como la relación F_v/F_m) y la peroxidación lipídica. Por otro lado, estos efectos negativos fueron mitigados y el contenido de prolina aumentó cuando las plantas de arroz fueron tratadas con CK y BR (Figura 2.2).

En resumen, las respuestas fisiológicas y bioquímicas de este estudio revelaron que las plantas de arroz Fedearroz 2000 eran más susceptibles al período combinado de estrés térmico que las plantas de arroz Fedearroz 67. Todos los reguladores de crecimiento evaluados en esta investigación (auxinas, giberelinas, citoquininas o brasinoesteroides) demostraron un cierto nivel de mitigación del estrés térmico combinado. Sin embargo, las citoquininas y los brasinoesteroides indujeron una mejor aclimatación de las plantas, ya que ambos reguladores de crecimiento aumentaron el contenido de clorofila, los parámetros de fluorescencia de la clorofila α, g_s y CRA y disminuyeron el contenido de MDA y la temperatura del dosel, en comparación con las plantas de arroz sin ninguna aplicación. Lo anterior nos permite concluir que el uso de reguladores de crecimiento vegetal (citoquininas y brasinoesteroides) son una herramienta útil para manejar condiciones de estrés térmico en cultivos de arroz cuando se esperan períodos de altas temperaturas.

2. El número de aplicaciones foliar de dos de reguladores crecimiento (citoquininas vs brasinoesteroides) influye sobre la aclimatación de plantas de arroz a estrés térmico combinado.

2.1 Resumen

El rendimiento del arroz ha disminuido debido a la variabilidad y el cambio climático en Colombia. Los reguladores de crecimiento de las plantas se han utilizado como estrategia para mitigar el estrés por altas temperaturas en diferentes cultivos. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de diferente número aplicaciones foliares de dos reguladores del crecimiento (CK y BR) sobre los parámetros fisiológicos (conductancia estomática, fluorescencia de clorofila y contenido relativo de agua) y bioquímicos (pigmentos fotosintéticos, malondialdehído y contenido de prolina) en dos estados de desarrollo de un genotipo comercial de arroz (Máximo macollamiento e inicio de floración) sometidos a un estrés térmico combinado (altas temperaturas diurnas / nocturnas); asimismo evaluar el efecto de las citoquininas (Trans-Zeatina a una concentración de 1×10^{-5}M) y brasinoesteroides (Espirostan-6-ona, 3,5-dihidroxi-, (3b, 5a, 25R) a una concentración de 5×10^{-5} M) en diferente parámetros fisiológicos y de características de la panícula en las etapas de inicio de floración y llenado de grano de las plantas de arroz. Se llevaron a cabo tres experimentos separados utilizando plantas del genotipo Fedearroz 2000 ('F2000'). Los ensayos se analizaron como experimentos separados. Los tratamientos establecidos para los dos primeros experimentos fueron los siguientes: : i) Control absoluto (AC), ii) control de estrés (SC), iii) estrés térmico + una aspersión foliar de CK (CK1), iv) estrés térmico + dos aplicaciones foliares de CK (CK2), v) estrés térmico + tres aplicaciones foliares de CK (CK3), vi) estrés térmico + una aspersión foliar de BR

(BR1), vii) estrés térmico + dos aplicaciones foliares de BR (BR2) o viii) estrés térmico + tres aplicaciones foliares de BR (BR3). Para el tercer experimento los tratamientos fueron los siguientes: i) Control absoluto (AC), ii) control de estrés (SC), iii) estrés térmico + tres aplicaciones foliares de CK (CK3), iv) estrés térmico + tres aplicaciones foliares de BR (BR3). El uso de tres aplicaciones de CK mejoraron el contenido total de clorofila en ambas etapas fenológicas (3.39 y 3.63 mg g^{-1} de peso fresco en las etapas fenológicas V5 y R2, respectivamente) en comparación con las plantas SC (2.80 y 3.04 mg g^{-1} de peso fresco en las etapas fenológicas V5 y R2, respectivamente). El uso de tres aplicaciones foliares de CK y BR también mejoró la conductancia estomática en ambas etapas fenológicas en comparación con su control sometido a estrés térmico (550 y 420 mmol m-2s-1 frente a 150 mmol m-2s-1 para V5 respectivamente; 430 y 750 mmol m-2s-1 frente a 200 mmol m-2s-1 para R2 respectivamente). Las aplicaciones foliares de CK y BR redujeron la temperatura del dosel de la planta entre 2 y 3 ° C y el contenido de MDA en plantas sometidas a estrés térmico. Por otro lado, el contenido de prolina aumentó con las aplicaciones de CK y BR El índice de tolerancia relativo sugiere que tres aplicaciones foliares de CK (108.18% para V5 y 44.49% para R2) y BR (98.53% para V5 y 77.31% para R2) ayudaron a mitigar el estrés térmico combinado en ambas etapas fenológicas. Por otro lado, las aplicaciones de CK y BR en plantas sometidas a estrés térmico combinado en las etapas de floración y llenado de grano generaron un aumento en la fotosíntesis, y mejoraron las características de la panícula como el número de espiguillas llenas y el porcentaje de vaneamiento. En conclusión, las aplicaciones foliares de BR o CK pueden considerarse una estrategia agronómica para ayudar a mejorar el efecto negativo de las condiciones combinadas de estrés térmico sobre el comportamiento fisiológico de las plantas de arroz durante diferentes etapas fenológicas.

2.2 Introducción

El arroz es un cultivo alimentario fundamental, el cual es producido en muchos países del mundo y alimenta una gran parte de la población mundial (IRRI, 2006; Kaur y Pati, 2017). El cultivo es importante desde el punto de vista de la seguridad alimentaria mundial porque es consumido por la mayoría de las personas en condición de pobreza del mundo (Samal y Babu, 2018). La demanda de arroz se espera que aumente con el crecimiento de la población para el año 2050 y llegue a valores de 607 millones de toneladas basados en el

consumo actual (Samal y Babu, 2018; Gérardeaux et al. 2021). Asimismo, el cultivo de arroz a nivel local presenta un gran valor económico debido a su alto consumo y grandes extensiones por el territorio colombiano (Garcés, 2020). En Colombia, el arroz ocupó 617,934 ha con un volumen de producción nacional de 2,937,840 t y un rendimiento promedio de 5.02 t ha^{-1} en 2020 (Fedearroz, 2021).

El cambio climático ha generado un incremento de la temperatura, exponiendo a la mayoría de los cultivos (incluido el arroz) a condiciones de estrés térmico en sus etapas fenológicas sensibles (Stocher et al, 2013; Sharma et al., 2017). El aumento de las temperaturas ha generado una disminución entre un 6-7% sobre la producción de los cultivos de arroz en los últimos años (Lesk et al., 2016). Además, fenómenos de variabilidad climática (como el fenómeno del Niño Oscilación del Sur (ENSO)) también pueden generar episodios de estrés térmico en algunas regiones generando afectaciones a los cultivos (Lizumi et al., 2014; Amanullah et al., 2017). En Colombia, las áreas productoras de arroz esperarán aumentos en las temperaturas entre 2 y 2.5 °C para 2050, lo que reducirá los rendimientos de arroz y tendrá un impacto en los flujos de productos agrícolas a los mercados y cadenas de suministro (Castro-Llanos et al., 2019).

Las altas temperaturas, en general, son perjudiciales para la mayoría de los procesos fisiológicos como la apertura de estomas, la fotosíntesis, el crecimiento y el rendimiento del grano (Ahammed et al., 2014). Los estudios de estrés por altas temperaturas se han centrado principalmente en la etapa reproductiva debido a su alta sensibilidad y la relación entre el comportamiento de la hoja bandera del arroz y el rendimiento del grano (Das et al., 2014; Hatfield y Prueger, 2015; Wu et al., 2016). En este aspecto, se ha estudiado como el funcionamiento de la hoja bandera es afectado por el estrés, principalmente, en la etapa reproductiva del arroz (Restrepo y Garces, 2013). Karwa et al. (2015) observaron que las propiedades de intercambio gaseoso de la hoja bandera (previo a la entrada del estado reproductivo) de dos cultivares de arroz disminuyeron cuando las plantas eran sometidas a condiciones de estrés térmico. También, se ha reportado que las plantas de arroz sometidas a condiciones de estrés térmico combinado (altas temperaturas diurnas y nocturnas) se afectan diferentes factores fisiológicos y bioquímicos en las hojas banderas como la tasa fotosintética, los contenidos de clorofilas, los parámetros de fluorescencia de la clorofila a y la peroxidación lipídica (Zhang et al., 2015).

El uso de reguladores de crecimiento o bioestimulantes se han evaluado como una estrategia de manejo agronómico para mitigar los efectos negativos ocasionados por el estrés térmico durante los últimos años (Peleg y Blumwald, 2011; Ahammed et al., 2014: Quintero-Calderón et al., 2021). Fahad et al. (2015) observaron que el uso de reguladores de crecimiento (entre ellos brasinoesteroides) ayudó a una aclimatación a la condición de estrés térmico, mejorando la conductancia estomática, fotosíntesis y transpiración en plantas de arroz. Kosakivska et al. (2022) también encontraron que aplicaciones exógenas de citoquininas favorecieron la conductancia estomática, la fotosíntesis y diferentes pigmentos fotosintéticos en diferentes cereales sometidos a estrés térmico. En Colombia, estudios previos han mostrado que las aplicaciones foliares de brasinoesteroides o bioestimulantes (con citoquininas en su formulación) mitigaron los efectos del estrés térmico en plantas de arroz porque mejoraron las propiedades de intercambio de gases de las hojas, el contenido de clorofila y prolina (Quintero-Calderon et al., 2021).

Las citoquininas (CK) son reguladores del crecimiento que generan respuestas a los efectos adversos ocasionados por estreses abióticos y bióticos en las plantas, siendo una herramienta a considerar para mitigar los daños causados a los mecanismos fisiológicos y bioquímicos de estas (Veselov et al. 2017). Se ha reportado que el número de aplicaciones exógenas de CK es un factor para tener en cuenta en la reducción de los daños causados por altas temperaturas (Veselov et al. 2017; Zhen et al.,2020). Por ejemplo, se ha observado que tres aplicaciones foliares de citoquininas en diferentes etapas de desarrollo retardaron la senescencia de las hojas y mejoraron la tolerancia al estrés térmico mediante un aumento de las actividades antioxidantes y disminución de la peroxidación lipídica en pasto rastrero (*Agrostis stolonifera*) (Veerasamy et al., 2007). Wu et al., (2016) también encontraron que dos aplicaciones de 6-benzylaminopurine mejoraron su actividad fisiológica bajo una condición de estrés en una variedad de arroz susceptible al estrés térmico. También, se ha reportado que una sola aplicación de CK (zeatina) ayudó a la actividad antioxidante y síntesis de diferentes enzimas, disminuyendo el daño de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la producción de malondialdehído (MDA) en garbanzo bajo estrés térmico (Kumar et al., 2020).

Los brasinoesteroides (BR) son reguladores del crecimiento que se han también utilizado para mitigar los efectos de diferentes estreses abióticos, entre ellos, el estrés por altas temperaturas (Kothari y Lachowiec, 2021). Thussagunpanit et al. (2015) mostraron que

cuando se realizaba una aplicación exógena de BR generaba tolerancia al estrés térmico mediante protección a la maquinaria fotosintética (favorecer la tasa de fotosíntesis y la conductancia estomática y disminuir la fotoinhibición) en plantas de arroz durante la etapa reproductiva. También, se observó que una aplicación exógena de BR aceleró el proceso de aclimatación a altas temperaturas y generó termotolerancia porque aumentó la tasa de supervivencia de plántulas de trigo (Hairat et al., 2015). En la misma investigación, Hairat et al. (2015) también reportan una mejora sobre la tasa de fotosíntesis y disminución del daño de la membrana en las plantas expuestas al estrés térmico y tratadas con BR en comparación con las plantas no tratadas. Un estudio realizado por Sonjaroon et al. (2018) también se observó que plantas de arroz tratadas con una aplicación de 7,8-dihidro-8α-20-hidroxiecdisona (αDHECD, 0,0001 μM) (brasinoesteroide sintético) aumentaron sus parámetros fotosintéticos bajo un estrés térmico en comparación a plantas no tratadas y estresadas.

Los cultivos de arroz han sufrido recientemente periodos de altas temperaturas diurnas y nocturnas debido al cambio y la variabilidad climática en diferentes regiones del mundo (incluido Colombia) (Sharma et al., 2017; Garcés, 2020). El uso de diferentes tipos de bioestimulantes (entre ellos compuestos con nutrientes y reguladores de crecimiento) se ha evaluado como una estrategia agronómica para mitigar el estrés térmico en áreas de cultivo de arroz recientemente a nivel local y mundial (Sonjaroon et al., 2018; Calderón-Paez et al., 2021; Quintero-Calderón et al., 2021). Por otra parte, el uso de variables bioquímicas (síntesis de malondialdehído y prolina) y fisiológicas (temperatura del dosel de la hoja, conductancia estomática, parámetros de fluorescencia de la clorofila, contenido relativo de clorofila y agua,) han sido herramientas para evaluar la eficiencia de tratamientos para mitigar los daños del estrés térmico (Fahad et al.,2015; Sarsu et al., 2018). El uso de aplicaciones foliares de CK y BR es una herramienta que puede ayudar en la mitigación del estrés térmico; sin embargo, la efectividad de esta técnica puede estar condicionada a parámetros como: la concentración del compuesto o el número de aplicaciones por ciclo de cultivo o la etapa de desarrollo donde se aplica (Kothari y Lachowiec, 2021). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de diferente número aplicaciones foliares de dos reguladores del crecimiento (CK y BR) sobre los parámetros fisiológicos (conductancia estomática, fluorescencia de clorofila y contenido relativo de agua) y bioquímicos (pigmentos fotosintéticos, malondialdehído y contenido de prolina) en dos estados de desarrollo de dos genotipos comerciales de arroz sometidos a

un estrés térmico combinado (altas temperaturas diurnas / nocturnas); como también el efecto de las citoquininas y brasinoesteroides en diferente parámetros fisiológicos y de características de la panícula en las etapas de inicio de floración y llenado de grano de las plantas de arroz.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Material vegetal y condiciones generales de crecimiento

En esta investigación se realizaron tres experimentos separados. Se utilizaron semillas de arroz del genotipo Fedearroz 2000 (F2000: genotipo liberado en la última década del siglo XX por su tolerancia al virus de la hoja blanca (VHB)) en las tres pruebas. Este genotipo es ampliamente cultivado por agricultores colombianos y en el capítulo anterior mostró una mayor susceptibilidad al estrés térmico. Las semillas se sembraron en bandejas de 10 L (39,6 cm de largo x 28,8 cm de ancho x 16,8 cm de alto) que contenían un suelo franco arenoso con un 2% de materia orgánica (suelo proveniente del Centro Experimental Las Lagunas). Se plantaron cinco semillas pregerminadas en cada bandeja. Las bandejas para el primer experimento (E1) se colocaron en un invernadero en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, campus Bogotá (43 ° 50'56” N, 74 ° 04'051” W), a una altitud de 2556 metros sobre el nivel del mar (msnm), entre diciembre de 2020 y febrero de 2021. Las condiciones ambientales en el invernadero durante este ensayo fueron las siguientes: temperatura media diurna 30 °C, temperatura media nocturna 25 °C, 60% -80% de humedad relativa, y un fotoperiodo natural de 12 h (radiación fotosintéticamente activa de 1500 µmol (fotones) m^{-2} s^{-1} al mediodía).

El segundo (E2) y tercer experimento (E3) se llevaron a cabo en condiciones de casa de mallas en el centro de investigación “Las Lagunas” de la Federación Nacional de Arroceros (Fedearroz) ubicado en Saldaña (Colombia) (3º54'46 '' N; 74º59'7 '' W) entre diciembre de 2020 hasta abril de 2021 y entre agosto y noviembre de 2021 para E2 y E3, respectivamente. Las condiciones ambientales a lo largo de los experimentos fueron las siguientes: temperatura media diurna de 33°C, temperatura media nocturna de 24°C, humedad relativa del 77% y fotoperiodo natural de 12 horas. Los valores anteriores fueron registrados por una estación meteorológica (Davis Vantage Pro-2 Plus, NSW, AUS) ubicada en el área del experimento. Las plantas fueron fertilizadas a los 20 días después

de la emergencia de la semilla (DDE) en los tres experimentos, siguiendo las cantidades de cada elemento según Sánchez et al. (2019) en los experimentos 2 y 3: 670 mg de N por planta, 110 mg de P por planta, 350 mg de K por planta, 68 mg de Ca por planta, 20 mg de Mg por planta, 20 mg de S por planta, 17 mg de Si por planta, 10 mg de B por planta, 17 mg de Cu por planta y 44 mg de Zn por planta.

Las plantas de arroz se mantuvieron en esas condiciones generales de crecimiento hasta 47 DDE cuando alcanzaron la etapa fenológica V5 durante ese período. Diferentes estudios han mostrado que en esta etapa fenológica es un momento oportuno para establecer ensayos en estrés térmico en plantas de arroz (Sánchez-Reinoso et al., 2014; Alvarado et al., 2017). Por otro lado, el inicio de los tratamientos de estrés térmico combinado se estableció a los 80 DDE (R2-inicio de floración) en el segundo experimento. Con respecto al E3, las plantas de arroz también se mantuvieron en las condiciones de casa de malla hasta los 80 DDE donde alcanzaron la etapa fenológica R2 (inicio de floración) en este momento un primer grupo de plantas entraron a estrés térmico combinado. Luego, un segundo grupo de plantas era también sometido a condiciones de estrés combinado a los 100 días cuando se encontraban en la etapa fenológica R8 (llenado de grano). En los experimentos 2 y 3, las plantas solamente tuvieron la macolla principal con su respectiva hoja bandera. Finalmente, los periodos de estrés en las pruebas con plantas adultas se seleccionaron porque la literatura reporta que las plantas de arroz son más sensibles a los efectos del estrés térmico en estas etapas fenológicas (reproductiva y maduración) (Restrepo y Garces, 2013; Alvarado et al., 2017; Alvarado et al., 2021).

2.3.2 Primer experimento (E1): Evaluación del número de aplicaciones foliares de citoquininas y brasinoesteroides en plántulas de arroz (genotipo F2000) para mitigación de los efectos del estrés térmico combinado.

Un experimento preliminar fue desarrollado con el propósito de evaluar el efecto del número de aplicaciones (1, 2 o 3 aplicaciones) foliares de dos fitohormonas (citoquininas vs. Brasinoesteroides) sobre la mitigación de un estrés térmico combinado en estado de plántula. Los compuestos a aplicar con las aplicaciones foliares fueron determinados con base a los resultados obtenidos en el capítulo previo. En este ensayo, plantas de arroz del genotipo F2000 se dividieron inicialmente en ocho diferentes grupos de tratamientos donde se combinaban condiciones de estrés térmico y número de aplicaciones de las hormonas

usadas. Al final, los grupos de tratamiento establecidos fueron los siguientes: i) Control absoluto (AC), ii) control de estrés (SC), iii) estrés térmico + una aspersión foliar de CK (CK1), iv) estrés térmico + dos aplicaciones foliares de CK (CK2), v) estrés térmico + tres aplicaciones foliares de CK (CK3), vi) estrés térmico + una aspersión foliar de BR (BR1), vii) estrés térmico + dos aplicaciones foliares de BR (BR2) o viii) estrés térmico + tres aplicaciones foliares de BR (BR3).

Las aplicaciones foliares con citoquininas se usó una trans-zeatina con una pureza del 97% a una concentración de a $1x10^{-5}$ M (AK Scientific, Union City, CA, USA). Mientras, las aplicaciones de brasinoesteroides se emplearon un brassinoesteroide análogo ((25 R) – 3β. 5α – dihydroxy-spirostan-6-ona) a una concentración de $5x10^{-5}$ M (Biomex DI-31, Minerales exclusivos S.A., Colombia). Las dosis usadas fueron empleadas en la investigación anterior donde mostraron un efecto positivo en la mitigación del estrés térmico combinado en las hojas de arroz. Por otro lado, las aplicaciones foliares de los reguladores de crecimiento se realizaron mediante el uso de un atomizador con un volumen de aplicación de 25 ml por planta, mojando tanto la haz y el envés de la hoja. Las plantas del control absoluto (AC) y control estresado (SC) solo se asperjaron con agua destilada. Todas las aplicaciones se realizaron a las 09:00 h. Finalmente, las plantas se dispusieron en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento y cada repetición consistía en una planta. Cada planta se utilizó como unidad de muestreo para las respectivas lecturas de las variables determinadas al final del experimento preliminar. El experimento duró 55 DDE.

2.3.3 Segundo experimento (E2): Efecto de un número diferente de aplicaciones foliares de citoquininas o brasinoesteroides sobre la hoja bandera a plantas de arroz (genotipo F2000) para mitigación de los efectos del estrés térmico combinado.

Plantas de arroz del genotipo Fedearroz 2000 también se usaron en esta prueba y se dispusieron en ocho tratamientos diferentes como se hizo en el experimento preliminar (E1). Esta prueba también tenía como objetivo estimar el efecto del número de aplicaciones foliares de citoquininas o brasinoesteroides sobre el comportamiento fisiológico de hojas banderas sometidas a un estrés térmico combinado. Al final, los diferentes grupos de tratamiento establecidos fueron los siguientes: i) Control absoluto (AC), ii) control de estrés (SC), iii) estrés térmico + una aspersión foliar de CK (CK1), iv) estrés térmico + dos aplicaciones foliares de CK (CK2), v) estrés térmico + tres aplicaciones foliares de CK (CK3), vi) estrés térmico + una aspersión foliar de BR (BR1), vii) estrés térmico + dos aplicaciones foliares de BR (BR2) o viii) estrés térmico + tres aplicaciones foliares de BR (BR3). Los compuestos y dosis para las aplicaciones de citoquininas (CK) o brasinoesteroides (BR) fueron los mismos utilizados en el experimento uno. El diferente número de aplicaciones foliares de los reguladores de crecimiento y tratamientos control (agua destilada) se desarrollaron en máximo macollamiento, inicio de primordio floral o embuchamiento, buscando que los momentos de aplicación coincidieran con prácticas agronómicas del cultivo. La aplicación foliar de los tratamientos siguió la misma metodología indicada en el experimento uno. Todos los tratamientos se organizaron también en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones y cada repetición consistía en una planta. Cada planta se utilizó como unidad de muestreo para las respectivas lecturas de las variables determinadas al final del experimento. El experimento duró 88 DDE.

2.3.4 Tercer experimento (E3): Evaluación de tres aplicaciones foliares de citoquininas o brasinoesteroides en plantas de arroz (genotipo F2000) en dos etapas reproductivas (floración y llenado de grano) durante el estrés térmico combinado.

Plantas de arroz del genotipo F2000 se sometieron a un estrés térmico combinado en dos diferentes estados fenológicos (etapa reproductiva (R2) o maduración (R8)) con el

propósito de evaluar el efecto de tres aplicaciones foliares de CK o BR sobre las propiedades de intercambio gaseoso de la hoja bandera y características de la panícula. Al final, ocho grupos de tratamiento fueron también establecidos: i) Control absoluto en floración o maduración (AC), ii) control de estrés térmico en floración o maduración (SC), iii) estrés térmico combinado en floración o maduración + tres aplicaciones foliares de CK (CK3), iv) estrés térmico combinado en floración o maduración + tres aplicaciones foliares de BR (BR3). Los compuestos y dosis para las aplicaciones de citoquininas (CK) y brasinoesteroides (BR) fueron los mismos utilizados en el experimento uno. El diferente número de aplicaciones foliares de los reguladores de crecimiento y tratamientos control (agua destilada) se desarrollaron en máximo macollamiento, inicio de primordio floral o embuchamiento, buscando que los momentos de aplicación coincidan con prácticas agronómicas del cultivo. La aplicación foliar de los tratamientos siguió la misma metodología indicada en E1 y E2. Todos los tratamientos se organizaron en un arreglo factorial donde el factor principal era la imposición del estrés en el estado fenológico (R2 o R8) y el factor secundario eran aplicaciones foliares. Cada tratamiento contó también con cinco repeticiones y cada repetición consistía en una planta. Cada planta se utilizó como unidad de muestreo para las respectivas lecturas de las variables determinadas al final del experimento. El experimento duró 120 DDE.

2.3.5 Tratamiento de estrés térmico combinado

Los tratamientos de estrés térmico combinado se llevaron a cabo en las siguientes fechas: 47 DDE para E1; 80 DDE para E2 y 80 o 100 DDE para E3, respectivamente. Las plántulas arroz (E1) se transfirieron del invernadero a cámaras de crecimiento de 294 L de capacidad (MLR-351H, Sanyo, Illinois, EE. UU.) a los 47 DDE. En el E2, las plantas de arroz de la casa de mallas se dispusieron en cámaras de crecimiento de 698 L de capacidad (KBW-720, Binder, Germany) a los 80 DDE. Con respecto al E3, las plantas también se colocaron en una Cámara de 698 L a los 80 DDE o 100 DDE lo que corresponde a las etapas fenológicas R2 y R8, respectivamente. El situar el material vegetal en cámaras de crecimiento tenía el propósito de simular las condiciones de estrés térmico o continuar con las condiciones ambientales previas. Para todos los experimentos, el tratamiento combinado de estrés térmico se estableció configurando las cámaras con las siguientes temperaturas día / noche: un período de alta temperatura diurna (40 ° C durante 5 horas

(de 11:00 a 16:00)) y nocturno (30 ° C durante 5 horas (de 19:00 a 24:00)) durante 8 días consecutivos. Las temperaturas de estrés y el tiempo de exposición se seleccionaron en base a estudios previos (Sánchez-Reinoso et al., 2014; Alvarado-Sanabria et al., 2017). Por otro lado, un grupo de plantas transferidas a la cámara de crecimiento se mantuvo a la misma temperatura del invernadero (30 ° C día / 25 ° C noche) durante 8 días consecutivos (controles absolutos).

2.3.6 Variables determinadas en los experimentos 1 y 2

Para los experimentos uno y dos se midieron las siguientes variables fisiológicas y bioquímicas:

2.3.7 Conductancia estomática

La conductancia estomática (g_s) se determinó utilizando un porómetro portátil (SC-1, METER Group Inc., EE. UU.) con un rango de 0 a 1000 mmol m^{-2} s^{-1} y una apertura de la cámara de muestra de 6,35 mm en ambos experimentos. Las medidas se tomaron colocando el sensor del porómetro sobre una hoja madura completamente expandida de la macolla principal de la planta. Se tomaron lecturas de g_s entre las 11:00 y las 16:00 h en tres hojas por planta en cada tratamiento y se promediaron los valores.

2.3.8 Temperatura de la hoja, contenido relativo de clorofila y parámetros de fluorescencia de clorofila α

La temperatura de la hoja, el contenido relativo de clorofila y los parámetros de fluorescencia de clorofila α (relación de fluorescencia variable a máxima (F_v/F_m) y extinción de fluorescencia de clorofila no fotoquímica (NPQ)) se midieron utilizando el equipo MultispeQ v1 (Kuhlgert et al., 2016; PhotosynQ, 2019) al final de cada experimento. Las lecturas se desarrollaron según el protocolo “Fotosíntesis hoja MultispeQ v2.0”. Un sensor en el MultispeQ detecta la radiación ambiental fotosintéticamente activa (PAR) en el campo y reproduce este valor PAR usando un LED interno. Cuando el sensor se coloca sobre la hoja, la lectura comienza registrando la PAR local, la temperatura de la hoja, la temperatura ambiente, el ángulo de la hoja y la posición. Después de un breve período de iluminación en el PAR ambiental medido, se registra el primer conjunto de mediciones ópticas. Una

vez completada, la hoja se expone a un período de alta PAR (2.000 µmol · m^{-2} · s^{-1}, equivalente a pleno sol) durante 10 s. Las mediciones ópticas se repiten a una PAR alta. Luego, la hoja se adapta a la oscuridad (la luz actínica se apaga), con una luz de fondo roja lejana débil durante 10 s. Se realiza un conjunto final de mediciones ópticas para evaluar la rápida disipación de NPQT (Atsuko et al. 2021). La medición de una sola hoja tomó aproximadamente 120 segundos. Las lecturas se tomaron en las mismas hojas que se utilizaron para las lecturas de g_s.

2.3.9 pH, conductividad eléctrica, concentración de nitrato, calcio y potasio en la savia

Al final de los experimentos (55 DDE para el experimento 1, 88 DDE para el experimento 2), se recolectaron ocho vainas de hojas maduras de arroz de cada tratamiento para el primer experimento; mientras, se utilizó la vaina de la hoja bandera para el segundo experimento. La savia se extrajo con el uso de una prensa mecánica y se colocaron cuatro gotas de savia en los respectivos ionómetros (Horiba, Kyoto, JA) para determinar el PH, conductividad eléctrica (mS cm^{-1}), nitrato (NO_3 en mg L^{-1}), calcio (Ca^{++} en mg L^{-1}) y potasio (K^{+} en mg L-1). Finalmente, se registraron cinco lecturas por tratamiento.

2.3.10 Índice de estrés del cultivo (CSI) e índice de tolerancia relativa (IRT)

El cálculo del CSI se utilizó la metodología descrita por Gerhards et al., (2016) en ambos experimentos. Se tomaron fotografías con una cámara térmica (FLIR 2, FLIR Systems Inc., MA, US) con una precisión de ± 2 ° C al final del período de estrés de cada uno de los experimentos. Se colocó una superficie blanca detrás de las plantas para la fotografía. Del mismo modo, se utilizaron dos plantas como patrón de referencia. Estas plantas se colocaron sobre una superficie blanca; una de ellas se cubrió con un adyuvante agrícola (Agrotin, Bayer CropScience, Colombia) para simular la apertura total de estomas (patrón húmedo (Twet)), y el otro fue una planta sin ninguna aplicación (patrón seco (Tdry)) (Castro-Duque et al., 2020). La fotografía se tomó con 1 m entre la cámara y la maceta. Con las fotografías obtenidas, se calculó el CSIutilizando la siguiente ecuación (1).

$$CSI = \frac{Tleaf - Twet}{Tdry - Twet}$$ *Ecuación(1)*

El índice de tolerancia relativa se calculó indirectamente para determinar la tolerancia de los genotipos tratados evaluados en esta investigación, utilizando g_s de plantas con estrés térmico combinado con respecto a plantas control (plantas sin tratamiento de estrés y aplicación de reguladores de crecimiento). IRT se obtuvo utilizando la ecuación (2) adaptada de Chávez-Arias et al., (2020).

$$IRT = (g_s\ plantas\ sometidas\ a\ estrés\ térmico / \ g_s\ plantas\ no\ sometidas\ a\ estrés\ térmico) * 100$$

Ecuacion 2

Todas las variables fisiológicas descritas anteriormente se determinaron y registraron a los 55 DDE en el primer experimento utilizando hojas completamente expandidas recolectadas de la parte superior del dosel. Para el segundo experimento, las variables descritas anteriormente se determinaron y registraron a los 80 (inicio del estrés), 88 (finalización del estrés) y 96 DDE (periodo de recuperación) utilizando la hoja bandera de cada planta. Asimismo, las mediciones se realizaron dentro de la cámara de crecimiento para evitar alterar las condiciones ambientales en las que se encontraban las plantas en ambas pruebas.

2.3.11 Variables bioquímicas: pigmentos fotosintéticos foliares, peroxidación lipídica (malondialdehído-MDA) y prolina

Se recolectaron aproximadamente 800 mg de peso fresco de hojas para las variables bioquímicas en cada uno de los experimentos a los 55 DDE para el experimento 1 y 88 DDE para el experimento 2. Luego, las muestras de hojas se homogeneizaron en nitrógeno líquido y se almacenaron para su posterior análisis. El método de determinación espectral utilizado para estimar el contenido de clorofila a, b y carotenoides en el tejido se basó en la metodología y las ecuaciones descritas por Wellburn (1994). Se recolectaron muestras de tejido foliar (30 mg) y se homogeneizaron en 3 mL de acetona al 80%. Luego, las muestras se centrifugaron (Modelo 420101, Becton Dickinson Primary Care Diagnostics, US) a 5000 rpm durante 10 min para eliminar las partículas. El sobrenadante se diluyó

hasta un volumen final de 6 ml añadiendo acetona al 80% (Sims y Gamon, 2002). El contenido de clorofila se determinó a 663 (clorofila a) y 646 (clorofila b) nm, mientras que los carotenoides se estimaron a 470 nm utilizando un espectrofotómetro (Spectronic BioMate 3 UV-vis, Thermo, US).

El método del ácido tiobarbitúrico (TBA) descrito por Hodges et al. (1999) se utilizó para estimar la peroxidación de lípidos de membrana (MDA). También se homogeneizaron aproximadamente 0,3 g de tejido foliar en nitrógeno líquido. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm y luego se midieron las absorbancias a 440, 532 y 600 nm con el espectrofotómetro. Finalmente, se utilizó un coeficiente de extinción (157 $M \cdot ml^{-1}$) para obtener la concentración de MDA.

El contenido de prolina se determinó para todos los tratamientos utilizando el método descrito por Bates et al. (1973). Se añadieron 10 ml de una solución acuosa al 3% de ácido sulfosalicílico a las muestras almacenadas, que luego se filtraron con papel Whatman (No. 2). Posteriormente, se hicieron reaccionar 2 mL de este filtrado con 2 mL de ácido ninhidrina y 2 mL de ácido acético glacial. La mezcla se colocó en un baño de agua a 90 ° C durante 1 hora. La reacción se detuvo mediante incubación en hielo. La solución resultante se disolvió en 4 ml de tolueno agitando vigorosamente los tubos de ensayo usando un agitador de vórtice. Las lecturas de absorbancia se determinaron a 520 nm con el mismo espectrofotómetro utilizado en la cuantificación de pigmentos fotosintéticos (Spectronic BioMate 3 UV-Vis, Thermo, Madison, US).

2.3.12 Variables determinadas en el experimento 3.

Se midieron las siguientes variables fisiológicas y características de la panícula en el experimento 3:

2.3.13 Variables fotosintéticas: Fotosíntesis (Pn), transpiración (E), conductancia estomática (gs), carbono intercelular (Ci), uso eficiente del agua (UEA), eficiencia de la carboxilación (Pn/Ci), relación Fv/Fm, quenching no fotoquímico (NPQT).

Para realizar las mediciones de las variables fotosintéticas de la hoja se siguió la metodología descrita por Alvarado-Sanabria et al. (2017). Las mediciones del intercambio de gases en las hojas se tomaron al finalizar el periodo de estrés al cual fueron sometidos las plantas (88 DDE para las plantas de la etapa fenológica R2 y108 DDE para las plantas de la etapa fenológica R8) utilizando un analizador de gases infrarrojo portátil (LI-6400XT; LI-COR, Lincoln, NE) entre las 10:00 y las 15:00 h. Se seleccionó la hoja bandera de la planta para realizar las lecturas de estas variables. Las hojas se adaptaron previamente al medio circundante y no se tocó la superficie de la hoja para evitar el cierre de los estomas antes de las mediciones. Las variables medidas fueron las siguientes: La fotosíntesis (P_n), conductancia tomatal (g_s), transpiración (*E*) y concentración de CO2 intercelular dentro de la hoja (C_i). Durante las lecturas, las condiciones de la cámara del LI-COR fueron las siguientes: Una fuente de luz roja:azul (modelo 6400-02B LED; LICOR) suministró 1200 µmol m^{-2} s^{-1} PPFD, que es la saturación de luz determinada con una curva de respuesta de luz realizada antes del comienzo del experimento. Otros ajustes incluyeron un nivel de referencia de CO_2 de 400 mmol mol^{-1}, una temperatura de cámara constante de 27°C y un caudal de gas de 400 mmol s^{-1}. Del mismo modo se calculó la eficiencia intrínseca del uso del agua dada por la relación (P_n/g_s=UEA) y la eficiencia de carboxilación (P_n/C_i) (Flexas et al., 2001).

Los parámetros de fluorescencia de clorofila α (relación de fluorescencia variable a máxima (F_v/F_m) y extinción de fluorescencia de clorofila no fotoquímica (NPQT) se midieron utilizando el equipo MultispeQ v1 (Kuhlgert et al., 2016; PhotosynQ, 2019) al final de cada periodo de estrés (88 DDE para las plantas de la etapa fenológica R2; 108 DDE para las plantas de la etapa fenológica R8) usando la metodolgia descrita en el E2.

2.3.14 Características de la panícula

Las panículas se cosecharon al final del ciclo de crecimiento del genotipo F2000 (120 DDE). Luego, se determinaron las siguientes características de la panícula: Espiguillas llenas, espiguillas vanas, espiguillas totales, porcentaje de vaneamiento.

2.3.15 Diseño experimental y análisis estadístico

Los datos de los tres diferentes experimentos se analizaron separadamente. Un diseño completamente aleatorizado se utilizó para los E1 y E2, respectivamente; mientras, un arreglo factorial (factor principal etapas fenológicas y factor secundario tratamientos de aplicaciones foliares) se empleó en el E3. Cada grupo de tratamiento constaba de cinco plantas y cada planta era una unidad experimental en todos los experimentos. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) ($P \leq 0.05$) en cada experimento desarrollado. Cuando se encontraron diferencias significativas, se utilizó la prueba comparativa post hoc de Tukey a $P \leq 0.05$. Los valores porcentuales se transformaron utilizando la función arcoseno. Los datos se analizaron utilizando el software Statistix v 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, EE. UU.) y SigmaPlot (versión 10.0; Systat Software, San José, CA, EE. UU.) se utilizó para las figuras.

2.4 Resultados.

2.4.1 Primer experimento: Evaluación de un número diferente de aplicaciones foliares de citoquininas y brasinoesteroides en plantas de arroz (genotipo F2000) en etapa vegetativa durante el estrés térmico combinado.

2.4.1.1 Conductancia estomática y temperatura de la hoja

Se encontraron diferencias ($P \leq 0.01$) entre los tratamientos sobre la g_s (Figura 2.1A). Las plántulas de arroz sometidas únicamente a estrés térmico combinado (SC) mostraron los valores de g_s más bajos (149,5 mmol m^{-2} s^{-1}) comparadas al control absoluto (511 mmol

m^{-2} s^{-1}). Las plantas de arroz tratadas con el diferente número de aplicaciones foliares de citoquininas (CK) o brasinoesteroides (BR)y sometidas a un estrés térmico combinado registraron valores superiores a SC (entre 400 y 552,85 mmol m^{-2} s^{-1} en todos los tratamientos, siendo el valor mayor para CK3 (552,85 mmol m^{-2} s^{-1})). Por otro lado, la temperatura de la hoja también mostró diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.01$) (Figura 2.1B). Tendencias opuestas fueron encontradas en esta vriable. El tratamiento SC registró la temperatura más alta de todos los tratamientos (36,21 °C). Las temperaturas registradas para plantas con diferente número de aplicaciones foliares de CK estuvieron entre 21 °C a 23 °C; mientras, las aplicaciones foliares con BR sus lecturas oscilaron entre 23 ° C a 25 ° C. En estos casos, los valores estuvieron inferiores a los registrados en el tratamiento SC. Finalmente, las temperaturas de las hojas observadas en las plantas de arroz tratadas con estas dos hormonas se acercaron a los valores registrados por AC (21,16 °C).

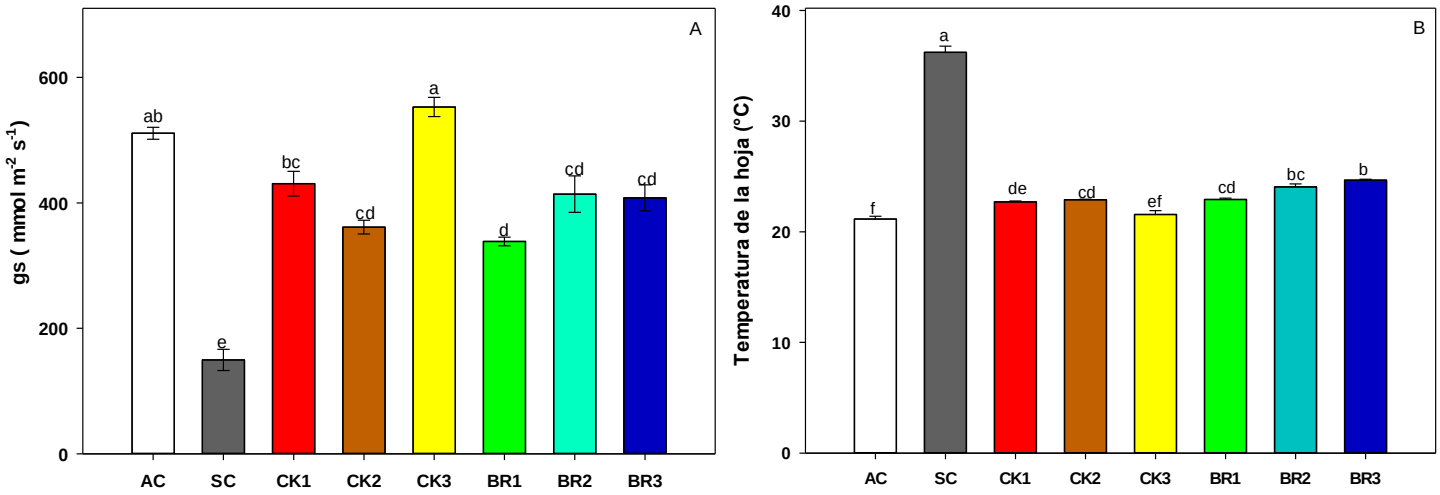

Figura 2.1. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento (citoquininas o brasinoesteroides) sobre la conductancia estomática (g_s) (A) y la temperatura de la hoja (B) en plantas de arroz del cultivar Fedearroz 2000 sometidas a un estrés térmico combinado (40 ° / 30 °C día / noche) a los 55 días después de la emergencia (DDE). Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), 1 aplicación foliar de CK (CK1), 2 aplicaciones foliares de CK (CK2), 3 aplicaciones foliares de CK (CK3), 1 aspersión foliar de BR (BR1), 2 aplicaciones foliares de BR (BR2) o 3 aplicaciones foliares de BR (BR3). Cada columna representa la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Las barras seguidas de letras diferentes

indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤ 0,05).

2.4.1.2 Relación Fv/Fm, quenching no fotoquímico (NPQT) y contenido de clorofila.

La relación F_v/F_m mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($P \leq 0.01$) como se muestra en la Figura 2.2A. Las plantas estresadas sin ninguna aplicación de reguladores de crecimiento registraron la relación F_v/F_m más baja (0,51); sin embargo, las diferentes aplicaciones foliares de CK o BR ayudaron a mejorar esta variable, aumentando esta relación entre 0,67 a 0,71 para CK y 0,66 a 0,70 para BR, respectivamente. Los valores anteriormente mencionados de los tratamientos fueron superiores a AC (0,63). El quenching no fotoquímico (NPQT) mostró tendencias opuestas que la relación F_v/F_m donde el valor más alto se observó en las plantas del tratamiento SC. Además, no hubo diferencias significativas entre las plantas de arroz tratadas foliarmente t con reguladores y el control absoluto (0,95) (Figura 2.2B).Finalmente, el contenido de clorofila (unidades SPAD)(Figura 2.2C) también disminuyó por el estrés térmico combinado en el tratamiento SC, registrándose valores de 48,34. El diferente número de aplicaciones foliares con CK o BR favoreció el contenido relativo de este pigmento en plantas de arroz bajo estrés térmico combinado (53,38 para CK1, 49,62 para CK2, 54,05 para CK3, 54,50 para BR1, 55,22 para BR2 y 53,61 para BR3). Las lecturas obtenidas de los tratamientos BR o CK fueron similares a los obtenidos en plantas cultivadas en condiciones normales (AC) (52,86).

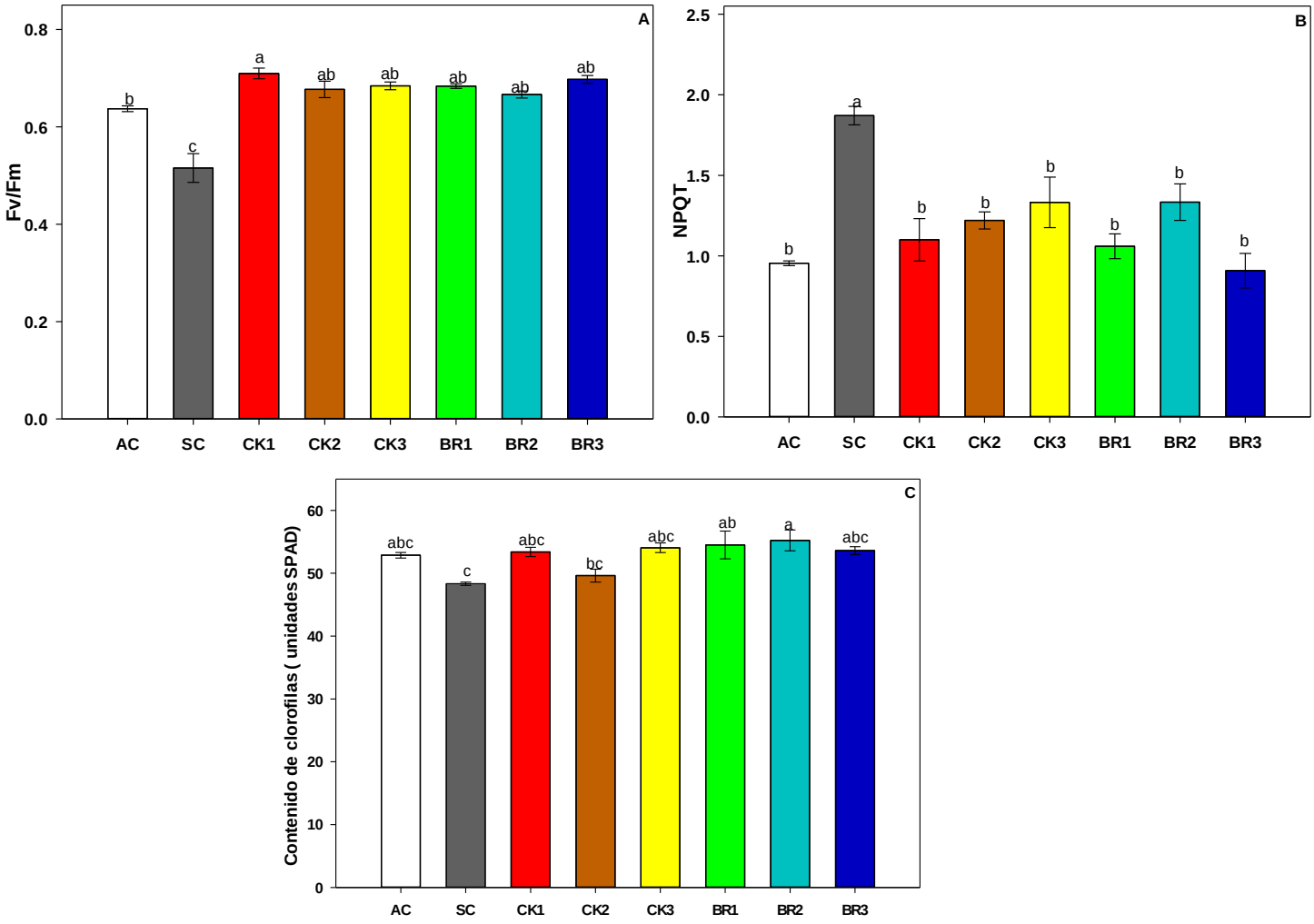

Figura 2.2. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento (citoquininas o brasinoesteroides) sobre la eficiencia máxima de PSII (F_v/F_m) (A), quenching no fotoquímico (B) y contenido de clorofila (C) en plantas de arroz del cultivar Fedearroz 2000 sometidas a un estrés térmico combinado (40 ° / 30 °C día / noche) a los 55 días después de la emergencia (DDE). Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), 1 aplicación foliar de CK (CK1), 2 aplicaciones foliares de CK (CK2), 3 aplicaciones foliares de CK (CK3), 1 aspersión foliar de BR (BR1), 2 aplicaciones foliares de BR (BR2) o 3 aplicaciones foliares de BR (BR3). Cada columna representa la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Las barras seguidas de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤ 0,05).

2.4.1.3 pH, conductividad eléctrica, concentración de nitrato, calcio y potasio en la savia

La variable pH mostró también diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.01$) (Figura 2.3A). El tratamiento que estuvo bajo estrés térmico combinado y no se aplicó ningún regulador de crecimiento foliar (SC:6,44) mostró ligeramente valores superiores al resto de tratamientos (AC: 6,14 y las diferentes aplicaciones foliares de CK o BR: entre 5,8 y 5,99). La conductividad eléctrica registró un comportamiento diferente en comparación a los datos al pH. En esta variable, el valor más alto se obtuvo en las plantas tratadas dos veces con BR (BR2: 9,37 mS cm^{-1}); mientras, el tratamiento CK1 (plantas estresadas con dos aplicaciones de CK) registraron los menores valores (6,51 mS cm^{-1}). No se presentaron diferencias significativas entre los demás tratamientos (valores oscilaron entre 7 mS cm^{-1} a 8,5 mS cm^{-1}) (Figura 2.3B).

Con respecto a la concentración de nutrientes en savia, el nitrato (mg L^{-1}) mostró diferencias significativas ($P \leq 0.01$) entre tratamientos (Figura 2.3C). Las plantas de arroz de los tratamientos CK3, BR1 o BR3 registraron valores más altos entre tratamientos (407,5, 395 y 407,5 mg L^{-1}, respectivamente) seguidos por el resto de los tratamientos incluyendo AC y SC (lecturas entre 185 a 240 mg L^{-1}). Por otro lado, el contenido de potasio fue menor en plantas cultivadas en condiciones normales (AC) (2525 mg L^{-1}). Lecturas intermedias se observaron en plantas de arroz bajo estrés térmico y sin aplicaciones foliares (SC) (2812 mg L^{-1}); mientras, las plantas de arroz tratadas con diferentes aplicaciones foliares de CK o BR estuvieron entre 2950 a 4625 mg L^{-1}, siendo el tratamiento BR2 el que presentó las mayores lecturas (4625 mg L^{-1}) para este catión (Figura 2.3D). Finalmente, los tratamientos CK2, BR2 y BR3 mejoraron la concentración del calcio dentro de la planta (36; 51,25 y 26,75 mg L^{-1}, respectivamente) (Figura 2.3E). Para el resto de los tratamientos, los valores registrados estuvieron entre 7,75 a 19,25 mg L^{-1} donde el último dato hace referencia al tratamiento AC.

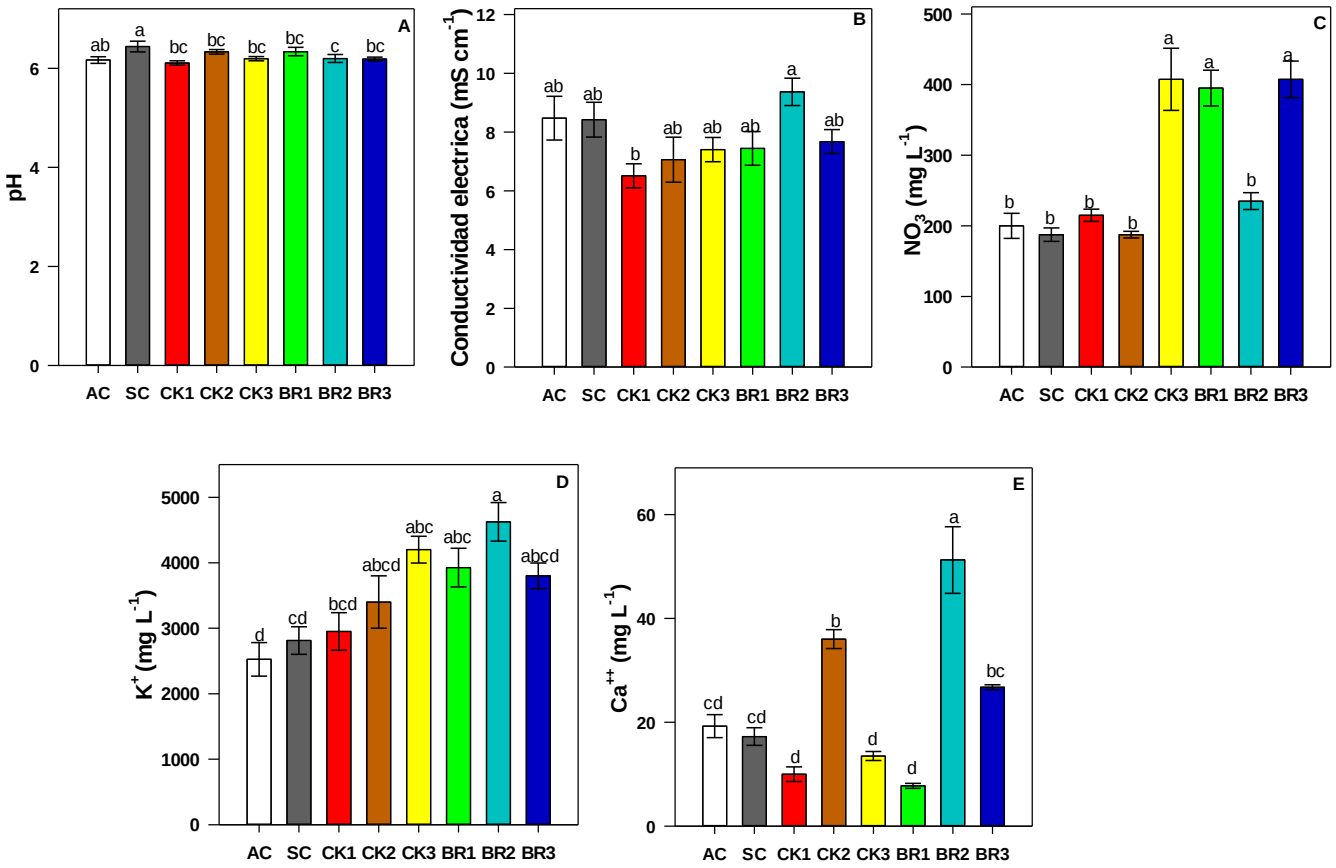

Figura 2.3. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento (citoquininas o brasinoesteroides) sobre el pH (A), la conductividad eléctrica (B), el contenido de nitrato (C), el contenido de potasio (D) y el contenido de calcio (E) en plantas de arroz del cultivar Fedearroz 2000 sometidas a un estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) a los 55 días después de la emergencia (DDE). Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), 1 aspersión foliar de CK (CK1), 2 aplicaciones foliares de CK (CK2), 3 aplicaciones foliares de CK (CK3), 1 aspersión foliar de BR (BR1), 2 aplicaciones foliares de BR (BR2) o 3 aplicaciones foliares de BR (BR3). Cada columna representa la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Las barras seguidas de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤ 0,05).

2.4.1.4 Índice de estrés del cultivo (CSI) e índice de tolerancia relativa (IRT)

El efecto del diferente número de aplicaciones foliares de reguladores de crecimiento (BR o CK) y el estrés térmico combinado sobre el índice de tolerancia relativa (IRT) y el índice de estrés de cultivo (CSI) se muestra en la Tabla 2.1. Se observaron diferencias sobre el índice de estrés del cultivo (CSI) entre los diferentes tratamientos de las plantas de arroz sometidas a la condición de estrés ($P \leq 0.01$). Las plantas de arroz solo expuestas a estrés térmico combinado mostraron los valores de índice de estrés más altos (0,95). El CSI fue menor (valores entre 0,1 y 0,45) cuando las plantas de arroz fueron tratadas con los diferentes números de aplicaciones de los reguladores de crecimiento. Finalmente, las plantas de arroz cultivadas en condiciones óptimas mostraron un valor de 0,38. Por otro lado, El IRT mostró un comportamiento similar al resto de variables fisiológicas, observándose diferencias significativas ($P \leq 0.01$) entre tratamientos. Las plantas SC mostraron una menor tolerancia que el resto de los tratamientos (29,25%). La aplicación foliar de hormonas vegetales mejoró la IRT en plantas expuestas a temperaturas estresantes. Este efecto fue más notorio en las plantas 'F2000' tratadas con tres aplicaciones de CK (IRT de 108%), y con dos o tres aplicaciones de BR (IRT de 100% y 98,53% respectivamente).

Tabla 2.1. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento sobre el índice de estrés del cultivo (CSI) e índice de tolerancia relativa (IRT) en plantas de arroz del cultivar F2000 sometidas a estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) a los 55 días después de la emergencia (DDE).

Tratamientos	CSI	IRT (%)
Control Absoluto	0,38 b	-------
Control estresado	0,95 a	29,25 d
1 aplicación de CK	0,23 b	84,27 bc
2 aplicaciones de CK	0,29 b	70,72 c
3 aplicaciones de CK	0,19 b	108,18 a
1 aplicación de BR	0,30 b	66,23 c
2 aplicaciones de BR	0,40 b	100 ab
3 aplicaciones de BR	0,41 b	98,53 ab
Significancia	***	***

Los tratamientos evaluados fueron: control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), 1 aspersión foliar de CK (CK1), 2 aplicaciones foliares de CK (CK2), 3 aplicaciones foliares de CK (CK3), 1 aspersión foliar de BR (BR1), 2 aplicaciones foliares de BR (BR2) o 3 aplicaciones foliares de BR (BR3). Los datos representan la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Los datos seguidos de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤0.05). NS, *, ** o *** no significativo o significativo a P ≤ 0.05, 0.01 o 0.001, respectivamente.

2.4.1.5 Variables bioquímicas: pigmentos fotosintéticos foliares, peroxidación lipídica (malondialdehído-MDA) y prolina

Las diferencias (P ≤ 0.01) entre los tratamientos sobre el contenido foliar de pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides) se muestran en la Tabla 2.2. Las altas temperaturas (diurnas / nocturnas) causaron una degradación sobre el contenido total de clorofila y carotenoides. Las plántulas de arroz sin aplicaciones foliares de hormonas vegetales y expuestas a un estrés térmico combinado mostraron una caída en el contenido de clorofila a y b (para clorofila a y 0,67 mg g^{-1} para clorofila b) en comparación con las plantas cultivadas en condiciones óptimas de temperatura (1,84 mg g^{-1} para clorofila a y 0,65 mg g^{-1} para clorofila b). En general, las aplicaciones foliares de CK o BR favorecieron la síntesis de clorofilas bajo condiciones de estrés donde los tratamientos foliares de dos o tres aplicaciones de CK o BR provocaron un aumento de esta variable en condiciones de estrés térmico (2,0 a 3,93 mg g^{-1})

Los contenidos de MDA ($P \leq 0.01$) y prolina ($P \leq 0.01$) también mostraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Tabla 2.2). Las plántulas de arroz sin aplicaciones foliares de hormonas vegetales y expuestas a un periodo corto de estrés térmico combinado (40°/30°C día/noche) también mostraron una mayor síntesis de MDA (16,12 µmol g^{-1} (PF)) en comparación con las plantas cultivadas en condiciones óptimas de temperatura o las plantas estresadas y tratadas con los diferentes números de aplicaciones de reguladores de crecimiento (valores entre 4,38 µmol g^{-1} y 7,7 µmol g^{-1} (PF) para el resto de los tratamientos). En general, la aplicación de CK o BR en sus diferentes momentos de aplicación redujo la producción de MDA (registrando valores entre 3,02 µmol g^{-1} (PF) y 7,70 µmol g^{-1} (PF) para en el contenido de MDA) bajo condiciones estresantes. Con respecto el contenido prolina, las plántulas de arroz sin aplicaciones foliares de hormonas vegetales mostraron un menor contenido de prolina (0,91 µmol g^{-1} (PF)) en comparación con las plantas cultivadas en condiciones óptimas de temperatura (1,37 µmol g^{-1} (PF)) y el resto de los tratamientos en el experimento. Las plántulas de arroz sometidas a estrés térmico y tratadas con una, dos o tres aplicaciones de CK mostraron un aumento en el contenido de prolina mostrando valores entre 4,00 y 12,00 µmol g^{-1} (PF). Los tratamientos foliares de una o dos aplicaciones de BR provocaron un aumento de esta variable en condiciones de estrés térmico (valores de 13,14 µmol g^{-1} (PF) y 16,90 µmol g^{-1} (PF), respectivamente). El tratamiento foliar de tres aplicaciones de BR mostró la mayor síntesis de prolina entre todos los tratamientos (18,86 µmol g^{-1} (PF)).

Tabla 2.2. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento sobre las variables bioquímicas en plantas de arroz del cultivar Fedearroz 2000 sometidas a estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) a los 55 días después de la emergencia (DDE).

Tratamientos	Chl a mg g^{-1} (PF)	Chl b mg g^{-1} (PF)	Chl total mg g^{-1} (PF)	Cx+c mg g^{-1} (PF)	MDA µmol g-1 (PF)	Prolina µmol g-1 (PF)
Control Absoluto	2,24 ab	0,75 ab	2,99 ab	0,43 cd	4,38 b	1,37 c
Control estresado	2,13 bc	0,67 bc	2,80 bc	0,50 abc	16,12 a	0,91 c
1 aplicación de CK	1,49 e	0,59 cd	2,07 d	0,28 f	6,36 b	11,63 ab
2 aplicaciones de CK	1,58 de	0,54 d	2,12 d	0,34 ef	6,77 b	4,10 bc
3 aplicaciones de CK	2,57 a	0,81 a	3,39 a	0,58 a	3,02 b	5,69 bc
1 aplicación de BR	1,71 de	0,59 cd	2,29 d	0,37 de	7,65 b	13,14 ab
2 aplicaciones de BR	2,27 ab	0,73 ab	3,00 ab	0,52 ab	4,14 b	16,90 a
3 aplicaciones de BR	2,10 bc	0,66 bc	2,76 bc	0,48 bc	3,80 b	18,86 a
Significancia	***	***	***	***	***	***

Los tratamientos evaluados fueron: control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), 1 aspersión foliar de CK (CK1), 2 aplicaciones foliares de CK (CK2), 3 aplicaciones foliares de CK (CK3), 1 aspersión foliar de BR (BR1), 2 aplicaciones foliares de BR (BR2) o 3 aplicaciones foliares de BR (BR3). Los datos representan la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Los datos seguidos de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤0.05). NS, *, ** o *** no significativo o significativo a $P \leq 0.05$, 0.01 o 0.001, respectivamente.

2.4.2 Segundo experimento: Evaluación de un número diferente de aplicaciones foliares de citoquininas y brasinoesteroides en plantas de arroz (genotipo F2000) en etapa reproductiva durante el estrés térmico combinado.

2.4.2.1 Conductancia estomática y temperatura de la hoja

En este experimento, las variables de g_s y temperatura foliar fueron registradas previamente al período combinado de estrés térmico, cuando este período terminó, y ocho días después del período de estrés (recuperación). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos sobre la g_s previo al período de estrés (Figura 2.4A). Durante el período de estrés, las plantas de arroz solo sometidas a estrés térmico combinado (SC) mostraron los valores de g_s más bajos (149.5 mmol m^{-2} s^{-1}). Por otro lado, las plantas de arroz tratadas con diferente número de aplicaciones de citoquininas (CK) registraron valores entre 350 a 555 mmol m^{-2} s^{-1} y las aplicaciones con brasinoesteroides (BR) entre 260 a 750 mmol m^{-2} s^{-1}; sin embargo, los tratamientos con ambas hormonas mejoraron sustancialmente la g_s, pero estos valores no alcanzaron las lecturas observadas en plantas cultivadas en condiciones normales (control absoluto (AC) 970.4 mmol m^{-2} s^{-1}) (Figura 2.4B). Después del periodo de recuperación, las plantas de arroz tratadas con un número diferente de aplicaciones foliares tanto de CK o BR no presentaron diferencias significativas en comparación con AC. Finalmente, las hojas banderas del tratamiento SC continuaron mostrando las menores lecturas de todos los tratamientos (397.75 mmol m^{-2} s^{-1}) (Figura 2.4C).

La temperatura de la hoja también mostró diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.01$) durante los tres diferentes momentos de medición (6D, E y F). Previo al inicio del período combinado de estrés térmico, el tratamiento CK3 tuvo la temperatura más baja entre todos los tratamientos (28,4 °C); mientras, plantas de arroz SC registraron una de las mayores temperaturas (34,3 °C). Las lecturas de los demás tratamientos (CK1, CK2, BR1, BR2 y BR3) oscilaron entre 31 °C y 33,5 ° C. Por otro lado, la temperatura foliar de las hojas banderas del tratamiento SC continuaron siendo mayores (37,1°C) durante el periodo de estrés. Las aplicaciones con las diferentes hormonas (CK o BR) causaron una

reducción en la temperatura (oscilaron entre 34 ° C a 37 ° C), observándose que este grupo de plantas tuvieron lecturas cercanas a las registradas en plantas de arroz sin estrés y no tratadas (AC: 31,16 °C). A los ocho días después del período de estrés (periodo de recuperación), las plantas de arroz tratadas con un número diferente de aplicaciones foliares de CK o BR registraron valores entre 33 ° C a 36 ° C similares a los obtenidos en las hojas banderas de plantas AC (34 ° C). Finalmente, el tratamiento SC continuó teniendo la mayor temperatura foliar (38 °C) donde no se observa alguna variación de esta variable en el periodo de recuperación con respecto al final del periodo de exposición al estrés térmico combinado.

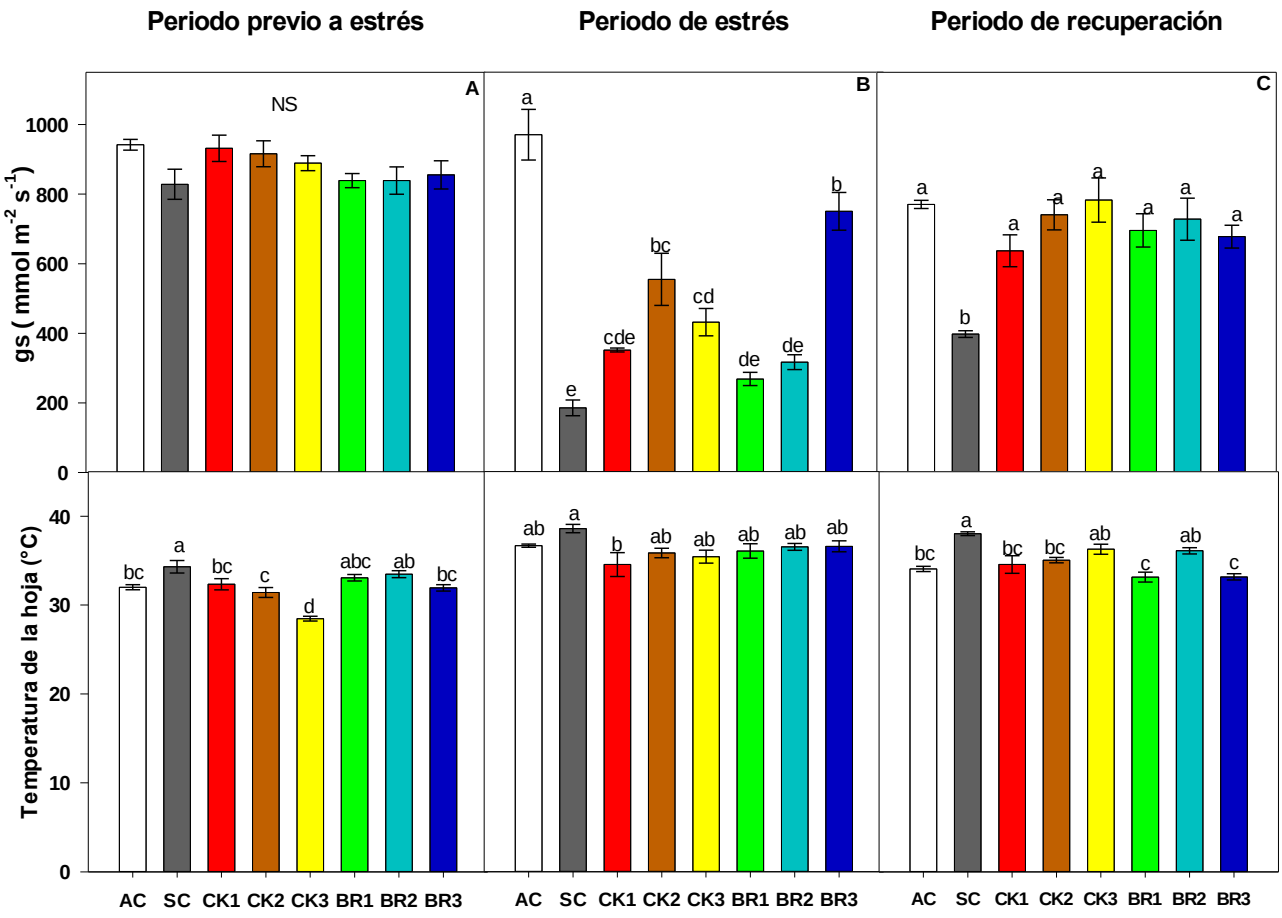

Figura 2.4. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento sobre la conductancia estomática (g_s): período de estrés previo (A), durante el período de estrés (B), después del período de estrés (C); y Temperatura de la hoja: período de estrés previo (D), durante el período de estrés (E), después del período de estrés (F); en plantas de arroz del cultivar F2000 sometidas a estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) a los 88 días después de la emergencia (DDE). Los tratamientos evaluados fueron control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), 1 aspersión foliar de CK (CK1), 2 aplicaciones foliares de CK (CK2), 3 aplicaciones foliares de CK (CK3), 1 aspersión foliar de BR (BR1), 2 aplicaciones foliares de BR (BR2) y 3 aplicaciones foliares de BR (BR3). Cada columna representa la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Las barras seguidas de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤ 0,05).

2.4.2.2 Relación Fv/Fm, quenching no fotoquímico (NPQT) y contenido de clorofila.

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos sobre la relación F_v/F_m antes del período de estrés (Figura 2.5A). Durante el período de estrés, las plantas de arroz solo sometidas a estrés térmico combinado (SC) mostraron la relación F_v/F_m más baja (0,57) (Figura 2.5B). Por otro lado, las plantas de arroz tratadas con brasinoesteroides (BR) registraron valores entre 0,61 a 0,63; mientras, las citoquininas (CK) presentaron valores entre 0,65 a 0,68, siendo el mayor valor el de las plantas tratadas con CK2 o CK3 (0,671 y 0,767, respectivamente). El valor obtenido para el control absoluto (AC) fue 0,60. Ocho días después del período de estrés, la mayoría de las plantas de arroz tratadas con un número diferente de aplicaciones foliares de CK o BR no presentaron diferencias significativas en comparación con AC (±0,65). El tratamiento SC continuó mostrando el menor valor de todos los tratamientos con una relación de 0,51.

El quenching no fotoquímico (NPQT) también tuvo diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.01$) durante los tres momentos de medición. En el período previo al estrés, plantas sometidas a altas temperaturas y tratadas con tres aplicaciones foliares de CK presentaron el menor NPQT (0,50); mientras, las plantas expuestas al estrés (SC) mostraron el mayor coeficiente (0,79). Con respecto a las plantas sometidas a estrés y tratadas con BR, el NPQT registró valores entre 0,57 a 0,70. Al final del período de estrés térmico combinado, el tratamiento SC continuó mostrando el mayor valor (1,81) (Figura 2.5E). No se presentaron diferencias significativas entre el resto de los tratamientos sobre dicho coeficiente (valores entre 0,80 a 1,22), indicando que las aplicaciones foliares ayudaron a la presente variable en condiciones de estrés. Ocho días después del período de estrés, las plantas de arroz tratadas con un número diferente de aplicaciones foliares de CK o BR registraron valores entre 1 a 1,5, presentándose lecturas similares a las plantas AC (1,2). El tratamiento SC continuó mostrando el mayor valor de todos los tratamientos con una temperatura de 1,8 (Figura 2.5F).

El contenido relativo de clorofila (unidades SPAD) también mostró diferencias ($P \leq 0.01$) debido a los diferentes tratamientos durante los tres momentos de medición (7G, H, I). Antes del período combinado de estrés térmico, las plantas de arroz tratadas con un número diferente de aplicaciones foliares de BR mostraron un mayor contenido de clorofila que el resto de los tratamientos (48,4 para BR1, 53,7 para BR2 y 50,7 para BR3). Para el

resto de los tratamientos, los valores de contenido de clorofila estuvieron entre 42 a 45 unidades SPAD. Durante el período de estrés combinado, el tratamiento SC también registró el contenido de clorofila más bajo (45,89). Los tratamientos tratados con las diferentes aplicaciones de reguladores de crecimiento (CK o BR) presentaron un incremento en el contenido de clorofilas posiblemente por un aumento en la síntesis de estas. Los tratamientos AC y CK2 presentaron valores de 50,8 y 49,6 unidades SPAD, respectivamente. Los tratamientos CK3, BR1, BR2 o BR3 registraron los valores más altos (oscilando entre 53,5 y 55 unidades SPAD). Ocho días después del período de estrés, las plantas de arroz que fueron tratadas con un número diferente de aplicaciones foliares de CK o BR siguieron presentando valores más altos que el tratamiento SC (≥ 48 unidades SPAD), pero no alcanzaron los valores observados en el AC (51 unidades SPAD).

-

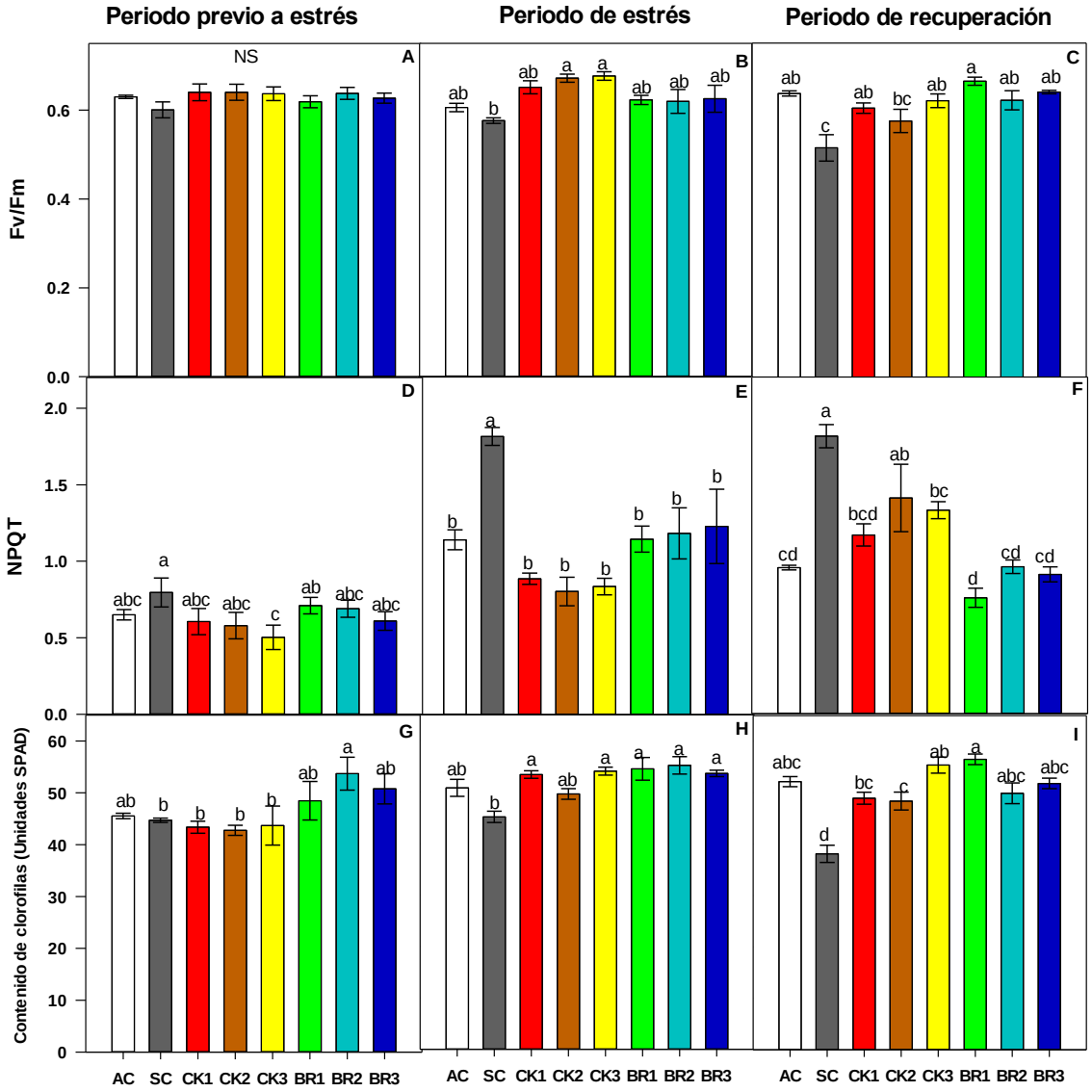

Figura 2.5. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento sobre la eficiencia máxima de PSII (F_v/F_m): período de estrés anterior (A), durante el período de estrés (B), después del período de estrés (C), quenching no fotoquímico: período de estrés anterior (D), durante el período de estrés (E), después del período de estrés (F), y contenido de clorofila: período de estrés anterior (G), durante el período de estrés (H), después del período de estrés (I); en plantas de arroz del cultivar F2000 sometidas a estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) a los 88 días después de la emergencia (DDE). Los tratamientos evaluados fueron control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), 1 aspersión foliar de CK (CK1), 2 aplicaciones foliares de CK (CK2), 3 aplicaciones foliares de CK (CK3), 1 aspersión foliar de BR (BR1), 2 aplicaciones foliares de BR (BR2) y 3 aplicaciones foliares de BR (BR3). Cada columna representa la media de cinco datos ±

error estándar (n = 5). Las barras seguidas de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤ 0,05).

2.4.2.3 pH, conductividad eléctrica, concentración de nitrato, calcio y potasio en la savia

La variable pH mostró diferencias significativas entre tratamientos (P ≤ 0.01) como se puede observar en la Figura 2.6A. Las plantas de arroz bajo estrés térmico combinado y sin ninguna aplicación de regulador de crecimiento foliar mostraron un pH más básico en comparación a los demás grupos de tratamientos (6,45). En este sentido, las plantas estresadas y con una aplicación foliar de CK mostraron un menor pH (6,10); mientras, los restantes grupos de plantas (CK, BR o AC) presentaron valores intermedios (entre 6,16 y 6,33). La variable conductividad eléctrica mostró diferencias significativas entre tratamientos (P ≤ 0.01) (Figura 2.6B). Las plantas de arroz bajo estrés térmico combinado y sin ninguna aplicación de regulador de crecimiento foliar no mostraron diferencias en su conductividad eléctrica al compararla con el tratamiento de control absoluto (AC). En este sentido, las plantas estresadas y con una aplicación foliar de CK mostraron una mayor conductividad eléctrica (11,5 mS cm^{-1}); mientras, los restantes grupos de plantas (CK, BR o AC) no presentaron diferencias significativas entre ellos, registrando valores dentro de 7,17 mS cm^{-1} a 8,5 mS cm^{-1}.

Diferencias se observaron en la concentración de nitrato, potasio y calcio en las plantas de arroz debido a los diferentes grupos de tratamiento (Figura 2.6C, D y E). En general, las plantas de arroz de los controles absolutos (AC) y estresado (SC) mostraron los menores contenidos de nitrato (200 mgL^{-1} y 180 mgL^{-1}; respectivamente), potasio (2500 mgL^{-1} y 2800 mgL^{-1}; respectivamente) y Calcio (20 mgL^{-1} y 18 mgL^{-1}; respectivamente). El diferente número de aplicaciones de CK tuvieron contenidos de nitrato entre 180 mgL^{-1} y 280 mgL^{-1}; potasio entre 3300 mgL^{-1} y 3800 mgL^{-1}, y Calcio entre 10 mgL^{-1} y 15 mgL^{-1}. Con respecto a las diferentes aplicaciones de BR, se observaron contenidos de nitrato entre 180 mgL^{-1} y 250 mgL^{-1}; potasio entre 3200 mgL^{-1} y 3500 mgL^{-1}, y Calcio entre 35 mgL^{-1} y 50 mgL^{-1}.

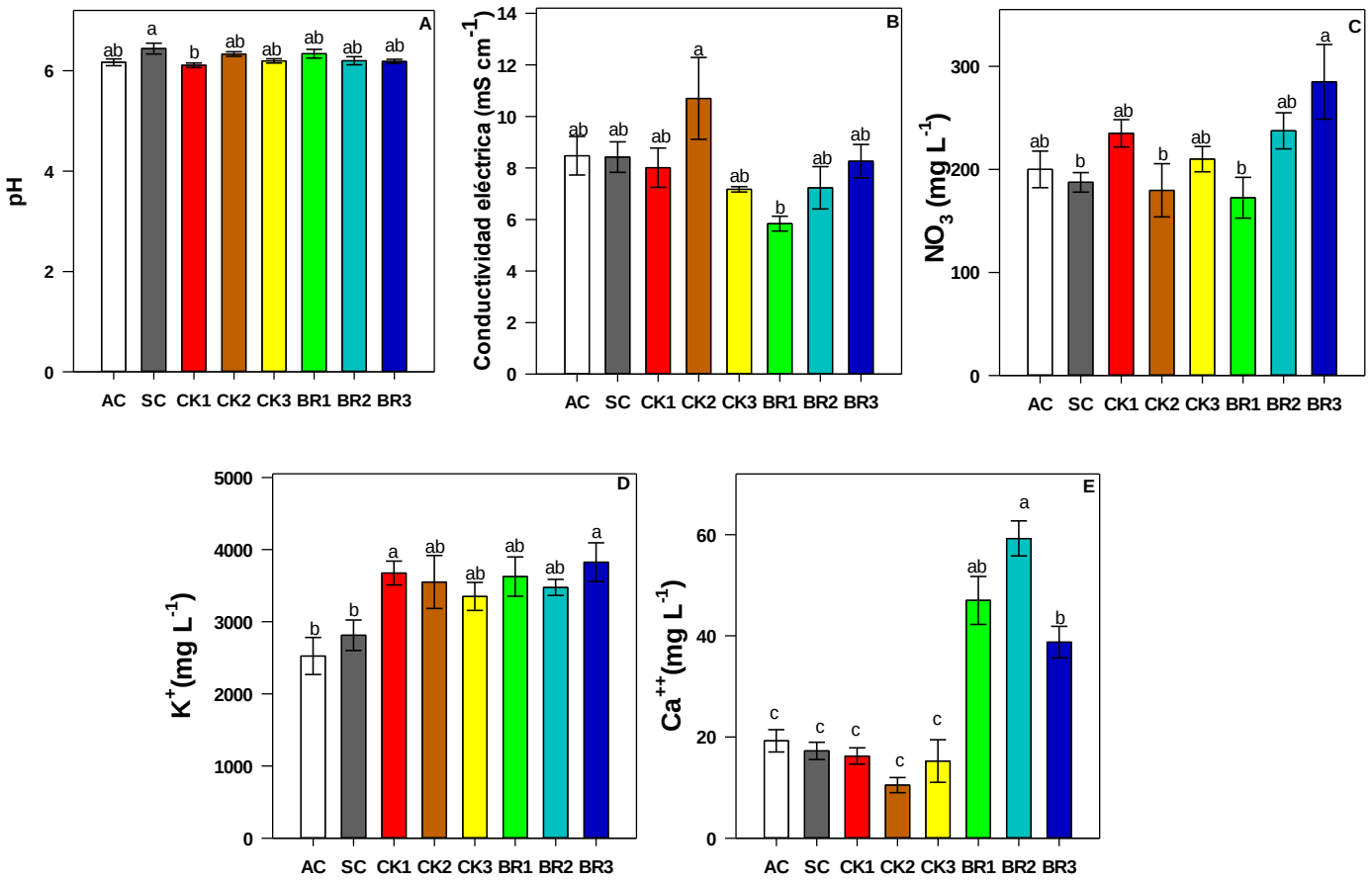

Figura 2.6. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento sobre el pH (A), la conductividad eléctrica (B) el contenido de nitrato (C), el contenido de potasio (D) y el contenido de calcio (E) en plantas de arroz del cultivar F2000 sometidas a estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) a los 88 días después de la emergencia (DDE). Los tratamientos evaluados fueron control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), 1 aspersión foliar de CK (CK1), 2 aplicaciones foliares de CK (CK2), 3 aplicaciones foliares de CK (CK3), 1 aspersión foliar de BR (BR1), 2 aplicaciones foliares de BR (BR2) y 3 aplicaciones foliares de BR (BR3). Cada columna representa la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Las barras seguidas de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤ 0,05).

2.4.2.4 Variables bioquímicas: pigmentos fotosintéticos foliares, peroxidación lipídica (malondialdehído-MDA) y prolina.

Las diferencias ($P \leq 0.01$) entre los tratamientos sobre los pigmentos fotosintéticos de las hojas bandera se muestran en la Tabla 2.3. Las altas temperaturas diurnas / nocturnas causaron un mayor contenido total de clorofila y carotenoides. Las plántulas de arroz sin aplicaciones foliares de hormonas vegetales mostraron un contenido de clorofila a (2,22 mg g^{-1}) y b (0,82 mg g^{-1}) mayor en comparación con las plantas cultivadas en condiciones óptimas de temperatura (1,94 mg g^{-1} para clorofila a y 0,80 mg g^{-1} para clorofila b). Los tratamientos foliares de dos o tres aplicaciones de BR provocaron un aumento de esta variable en condiciones de estrés térmico (valores de 2,40 mg g^{-1} y 2,23 mg g^{-1} para clorofila a; valores entre 0,94 mg g^{-1} y 0,87 mg g^{-1} para clorofila b, respectivamente). El tratamiento foliar de tres aplicaciones de CK favoreció la mayor síntesis de clorofila bajo condiciones estresantes debido a los mayores valores de pigmento fotosintético en comparación al resto de tratamientos ((2,67 mg g^{-1} para clorofila a y 0,96 mg g^{-1} para clorofila b).

Los contenidos de MDA ($P \leq 0.01$) y prolina ($P \leq 0.01$) también mostraron diferencias significativas debido a los diferentes tratamientos (Tabla 2.3). Las plántulas de arroz sin aplicaciones foliares de hormonas vegetales (16,19µmol g^{-1} (PF)) mostraron un contenido de MDA mayor en comparación con las plantas cultivadas en condiciones óptimas de temperatura (4,45 µmol g^{-1} (PF)) y el resto de los tratamientos en el experimento. En general, las plántulas de arroz sometidas a estrés térmico y tratadas con diferentes números de aplicaciones de CK o BR generaron una disminución en la peroxidación lipídica, ya que el contenido de MDA era menor comparados con el control estresado (SC) (valores entre 6,45 µmol g^{-1} (PF) a 7,72 µmol g^{-1} (PF)).

El contenido de prolina fue menor en plantas SC (1,49 µmol g^{-1} (PF)) en comparación con las plantas cultivadas en condiciones óptimas de temperatura (AC:2,11 µmol g^{-1} (PF)) y el resto de los tratamientos en el experimento. Las diferentes aplicaciones de CK presentaron un contenido de este aminoácido superior comparados con el tratamiento SC (valores entre 4,50 µmol g^{-1} (PF) a 12,50 µmol g^{-1} (PF)). Del mismo modo, Las aplicaciones de BR incrementaron los contenidos de prolina dentro de la planta (valores de 13,78 µmol g^{-1} (PF) a 9,43 µmol g^{-1} (PF)).

Tabla 2.3. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento sobre las variables bioquímicas en plantas de arroz del cultivar F2000 sometidas a estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) a los 88 días después de la emergencia (DDE).

Tratamientos	Chl a	Chl b	Chl total	Cx+c	MDA	Prolina
	mg g^{-1} (PF)	mg g^{-1} (PF)	mg g^{-1} (PF)	mg g^{-1} (PF)	µmol g-1 (PF)	µmol g-1 (PF)
Control Absoluto	2,54 ab	0,80 ab	3,34 ab	0,40 bc	4,45 b	2,11 c
Control estresado	2,22 bc	0,82 bc	3,04 bc	0,47 ab	16,19 a	1,49 c
1 aplicación de CK	1,58 e	0,74 cd	2,32 d	0,25 e	6,43 b	12,48 ab
2 aplicaciones de CK	1,68 de	0,70 d	2,37 d	0,31 de	6,84 b	4,65 bc
3 aplicaciones de CK	2,67 a	0,96 a	3,63 a	0,55 a	3,09 b	6,33 bc
1 aplicación de BR	1,81 d	0,75 cd	2,55 d	0,34 cd	7,72 b	13,78 ab
2 aplicaciones de BR	2,40 ab	0,94 a	3,35 ab	0,47 ab	4,21 b	17,81 a
3 aplicaciones de BR	2,23 bc	0,87 ab	3,10 bc	0,44 b	3,87 b	19,43 a
Significancia	***	***	***	***	***	***

Los tratamientos evaluados fueron: control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), 1 aspersión foliar de CK (CK1), 2 aplicaciones foliares de CK (CK2), 3 aplicaciones foliares de CK (CK3), 1 aspersión foliar de BR (BR1), 2 aplicaciones foliares de BR (BR2) y 3 aplicaciones foliares de BR (BR3). Los datos representan la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Los datos seguidos de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤0.05). NS, *, ** o *** no significativo o significativo a P ≤ 0.05, 0.01 o 0.001, respectivamente.

2.4.2.5 Índice de estrés del cultivo (CSI) e índice de tolerancia relativa (IRT)

La Tabla 2.4 muestra el efecto de los diferentes números de las aplicaciones foliares de reguladores de crecimiento (BR vs CK) y el estrés térmico combinado sobre el índice de tolerancia relativa (IRT) o el índice de estrés de cultivo (CSI) en plantas de arroz. El IRT presentó un comportamiento similar al resto de variables fisiológicas, obteniéndose diferencias significativas ($P \leq 0.01$) entre los diferentes tratamientos (Tabla 2.4). Las plantas SC mostraron una menor tolerancia que el resto de los tratamientos (19,10%). La aplicación foliar de hormonas vegetales mejoró el IRT en plantas expuestas a temperaturas estresantes. Este efecto fue más notorio en las plantas 'F2000' tratadas con dos aplicaciones de CK o tres aplicaciones de BR (57,14 y 77,31%, respectivamente). Por otro lado, se observaron diferencias sobre el índice de estrés del cultivo (CSI) de las plantas de arroz sometidas a la condición de estrés y tratadas foliarmente ($P \leq 0.01$). Las plantas de arroz solo expuestas a estrés térmico combinado registraron el mayor índice (0,93); sin embargo, el CSI fue menor cuando las plantas de arroz fueron tratadas foliarmente con los diferentes números de aplicaciones de los reguladores de crecimiento evaluados (valores entre 0,3 y 0,64). Finalmente, las plantas de arroz cultivadas en condiciones óptimas mostraron un CSI de 0,56.

Tabla 2.4. Efecto del número de aplicaciones de dos reguladores de crecimiento sobre el índice de estrés del cultivo (CSI) e índice de tolerancia relativa (IRT) en plantas de arroz del cultivar Federarroz 2000 sometidas a estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) a los 88 días después de la emergencia (DDE).

Tratamientos	CSI	IRT (%)
Control Absoluto	0,56 ab	-------
Control estresado	0,93 a	19,10 d
1 aplicación de CK	0,32 b	36,20 cd
2 aplicaciones de CK	0,40 ab	57,14 b
3 aplicaciones de CK	0,38 ab	44,49 bc
1 aplicación de BR	0,49 ab	27,66 cd
2 aplicaciones de BR	0,51 ab	32,64 cd
3 aplicaciones de BR	0,64 ab	77,31 a
Significancia	*	***

Los tratamientos evaluados fueron: control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), 1 aspersión foliar de CK (CK1), 2 aplicaciones foliares de CK (CK2), 3 aplicaciones foliares de CK (CK3), 1 aspersión foliar de BR (BR1), 2 aplicaciones foliares de BR (BR2) y 3 aplicaciones foliares de BR (BR3). Los datos representan la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Los datos seguidos de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤0.05). NS, *, ** o *** no significativo o significativo a P ≤ 0.05, 0.01 o 0.001, respectivamente.

2.4.3 Tercer experimento: Evaluación de aplicaciones foliares de citoquininas y brasinoesteroides en plantas de arroz (genotipo F2000) en dos etapas reproductivas (floración y llenado de grano) durante el estrés térmico combinado.

2.4.3.1 Variables fotosintéticas: Fotosíntesis (P_n), transpiración (*E*), conductancia estomática (g_s), carbono intercelular (C_i), uso eficiente del agua (UEA), eficiencia de la carboxilación (P_n/C_i), relación F_v/F_m, quenching no fotoquímico (NPQT).

Los valores de las diferentes variables fotosintéticas medidas en el experimento tres se encuentran resumidos en la Tabla 2.5. Se observó interacción entre el factor estado fenológico y tratamiento de aplicaciones sobre las variables: P_n, UEA, P_n/C_i, F_v/F_m y NPQT. Los tratamientos Estrés-R2 + BR3 y Control Absoluto (AC)-R8 registraron los mayores valores fotosintéticos (22.53 y 11.88 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}, respectivamente) comparado con el resto de los tratamientos (entre 4.39 hasta 9.38 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}). Con respecto al uso eficiente del agua (UEA), se observó que el tratamiento Estrés-R2 + BR3 presentó una mayor relación (90.81% vs ± 17% para el resto de los tratamientos). Finalmente, la eficiencia de la carboxilación (P_n/C_i) era favorecida en plantas por los tratamientos Estrés-R8 + CK3 (0.070) y Estrés-R2 + BR3 (0.036).

La variable F_v/F_m se observó que el tratamiento SC registró la relación menor de todos los tratamientos (± 0.60 para ambos estados fenológicos, indicando una afectación causada por el estrés térmico combinado. Sin embargo, las plantas eran tratadas con tres aplicaciones de CK o BR mostraron una mejoría en esta variable, registrando valores promedio de 0,67 en R2 y 0,62 para R8 para ambos tratamientos, respectivamente. El NPQT mostró que los tratamientos SC en ambos periodos de estrés térmico combinado presentaron los valores más altos entre los tratamientos (± 1.80 para ambos estados fenológicos). Los tratamientos de tres aplicaciones de CK o BR mitigaron los daños en PSII, ya que los valores promedio registrados fueron 1.05 y 1.19 para R2 y R8, respectivamente. Por otro lado, la transpiración (*E*), conductancia estomática (g_s) y carbono intercelular (C_i) no presentaron diferencias significativas entre estados fenológicos, tratamientos de aplicaciones foliares o su interacción.

2.4.3.2 Características de la panícula.

La tabla 2.6 también muestra diferencias entre el estado fenológico y tratamientos sobre número de espiguillas llenas, espiguillas vanas y porcentaje de vaneamiento. Se pudo observar que un periodo de estrés térmico combinado en el estado fenológico de floración genera un mayor número espiguillas vanas y un mayor porcentaje de vaneamiento. En este estado fenológico, se observó que la aplicación de CK redujo el daño sobre las espiguillas, repercutiendo en un porcentaje de vaneamiento menor. Con respecto al estado de maduración (R8), no se generó un daño tan notorio en los componentes evaluados de las panículas donde los valores promedio de número de espiguillas vanas y porcentaje de vaneamiento fueron menor que los tratamientos en fase reproductiva.

Tabla 2.5. Efecto de las aplicaciones de dos reguladores de crecimiento sobre las variables fotosintéticas en plantas de arroz del cultivar Federarroz 2000 sometidas a estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) en R2(88 DDE) o R8 (108DDE).

Tratamiento	P_n	*E*	g_s	Ci	UEA	P_n/C_i	F_v/F_m	NPQT
Etapa fenológica (E)	***	NS	NS	NS	**	***	*	*
Tratamiento (T)	***	NS	NS	*	**	***	**	**
Interacción (ExT)	***	NS	NS	NS	**	***	**	**
Control Absoluto (AC)-R2	9.38 bc	8.19 a	0.74 a	346.78 a	37.59 b	0.026 bc	0.65 ab	0.55 d
Control estrés (SC)-R2	9.02 bc	8.28 a	0.69 a	324.72 a	12.25 b	0.026 bc	0.61 c	1.78 a
Estrés-R2 + CK3	6.71 cd	9.60 a	0.25 a	326.08 a	31.82 b	0.020 bc	0.67 a	0.98 b
Estrés-R2 + BR3	22.53 a	13.20 a	0.21 a	326.29 a	90.81 a	0.036 b	0.67 a	1.12ab
Control Absoluto (AC)-R8	11.88 b	10.97 a	0.45 a	356.45 a	28.82 b	0.016 c	0.67 a	0.70 c
Control estrés (SC)-R8	6.10 cd	8.70 a	0.41 a	337.15 a	14.06 b	0.010 c	0.59 c	1.84 a
Estrés-R8 + CK3	4.39 d	9.11 a	0.45 a	355.83 a	17.02 b	0.070 a	0.62 b	1.21 ab
Estrés-R8 + BR3	8.71 cd	10.49 a	0.49 a	337.14 a	27.53 b	0.026 bc	0.63 b	1.17 ab
CV (%)	15.38	30.70	86.41	4.35	44.91	19.97	3.91	4.51

Los tratamientos evaluados fueron: control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), 3 aplicaciones foliares de CK (CK3), 3 aplicaciones foliares de BR (BR3). Los datos representan la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Los datos seguidos de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤0.05). NS, *, ** o *** no significativo o significativo a $P \leq 0.05$, 0.01 o 0.001, respectivamente.

Tabla 2.6. Efecto de las aplicaciones de dos reguladores de crecimiento sobre las variables fotosintéticas en plantas de arroz del cultivar Federarroz 2000 sometidas a estrés térmico combinado (40 ° / 30 ° C día / noche) a los 88 y 120 días después de la emergencia (DDE).

	Espiguillas llenas	Espiguillas vanas	% de vaneamiento
Etapa fenológica (E)	***	***	***
Tratamiento (T)	*	*	**
Interacción (ExT)	*	**	**
Control Absoluto (AC)-R2	89.25 b	18.00 b	17.94 c
Control estrés (SC)-R2	48.33 b	68.33 a	59.85 a
Estrés-R2 + CK3	85.50 b	30.00 ab	25.67 bc
Estrés-R2 + BR3	138.00 a	52.75 ab	49.69 ab
Control Absoluto (AC)-R8	146.40 a	10.40 b	6.62 c
Control estrés (SC)-R8	121.00 b	11.00 b	8.18 c
Estrés-R8 + CK3	100.00 c	14.75 a	11.59 a
Estrés-R8 + BR3	138.00 a	13.75 a	10.94 b
CV (%)	24.38	54.32	43.19

Los tratamientos evaluados fueron: control absoluto (AC), control de estrés térmico (SC), 3 aplicaciones foliares de CK (CK3), 3 aplicaciones foliares de BR (BR3). Los datos representan la media de cinco datos ± error estándar (n = 5). Los datos seguidos de letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). Letras iguales indican que las medias no son estadísticamente significativas (≤0.05). NS, *, ** o *** no significativo o significativo a P ≤ 0.05, 0.01 o 0.001, respectivamente.

2.5 Discusión

Los resultados de los diferentes experimentos desarrollados dentro de este estudio mostraron que las diferentes aplicaciones de CK o BR ayudaron a la aclimatación del arroz a la exposición de un estrés térmico combinado donde el grado de aclimatación se valoró mediante el uso de variables fisiológicas y bioquímicas (fotosíntesis, g_s, temperatura de las hojas, relación F_v/F_m, los pigmentos fotosintéticos, el porcentaje de vaneamiento, el UEA y el contenido de prolina y nutrientes).

Las aplicaciones foliares desarrolladas con los dos reguladores de crecimiento (1, 2 o 3 aplicaciones foliares) incrementó propiedades de intercambio gaseoso de las hojas (g_s o fotosíntesis (P_n) y redujo la temperatura foliar bajo un estrés térmico combinado según el experimento. Estudios previos también mostraron que la aplicación foliar de bioestimulantes, nutrientes u hormonas causaron efecto positivo sobre estas variables en plantas expuestas a un estrés térmico por una alta temperatura diurna, concluyendo que la g_s, P_n o la temperatura de la hoja son variables fisiológicas confiables para evaluar el uso de estrategias agronómicas para mitigar los efectos del estrés por altas temperaturas (Calderon-Paez et al., 2021; Quintero-Calderon et al., 2021). Un incremento en las propiedades de intercambio gaseoso y disminución de las temperaturas es debido a que los reguladores (CK o BR) están involucrados en la interacción con la síntesis de osmolitos secundarios (prolina); como también, la interacción con otras hormonas de señalización como ABA, la cual está involucrada en el cierre de estomas bajo condiciones de estrés (Mackova et al., 2013; Zhou et al., 2014). También, se ha reportado que estos reguladores de crecimiento (CK o BR) pueden ayudar a una protección de los aparatos fotosintéticos mediante una mayor síntesis de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa) encargadas de degradar especies reactivas de oxígeno (ROS). Con lo mencionado anteriormente, se puede inferir que el uso de estos compuestos (CK o BR) ayuda a un mayor intercambio gaseoso de la hoja porque favorece una mayor apertura estomática, mejorando el flujo de agua dentro de la planta y regulando la temperatura de la planta (Sonjaroon et al., 2018; Quintero-Calderón et al., 2021).

El uso de la relación F_v/F_m es una técnica sencilla que permite estimar las respuestas de las plantas a condiciones de estrés tanto abiótico como biótico (Chaerle et al., 2007; Kalaji et al., 2017). En los tres experimentos realizados, se observó que las plantas del tratamiento SC presentaron los valores más bajos en la variable F_v/F_m. Najeeb et al., (2021) y Quintero-Calderon et al. (2021) también encontraron que la relación F_v/F_m disminuyó significativamente en las hojas de plantas de arroz bajo un estrés térmico. Una caída de la relación F_v/F_m durante un estrés por altas temperaturas infiere una disminución en la captura y conversión de la energía en el PSII, indicando una desorganización en el PSII (Feng et al., 2014). El uso de BR o CK mejoró notoriamente la actividad del PSII, en general, cuando se realizaron al menos dos aplicaciones en las plantas estresadas en los diferentes experimentos. En este sentido, se ha también observado que dos aplicaciones de BR generaron una mejora en la actividad del PSII bajo estrés térmico en plantas de arroz (Thussagunpanit et al., 2015). Lo anterior puede ser asociado a que las plantas asperjadas con BR generan mayor cantidad de proteínas de choque térmico, las cuales se acumulan y protegen al PSII (Kothari y Lachowiec, 2021). Con respecto al uso de CK, Kumar et al. (2020) también encontraron que aplicaciones foliares de CK mejoran la actividad del PSII mediante una mayor actividad de la zeaxantina.

El quenching no fotoquímico (NPQT) es otro parámetro de la fluorescencia de la clorofila α, el cual es un indicador de la disipación de energía en forma de calor bajo condiciones ambientales (Chaudhary et al., 2020). Las plantas que solo fueron sometidas a un estrés

térmico combinado y no fueron aplicadas con ninguna de las hormonas en los experimentos presentaron los valores más altos de NPQT. Qu et al. (2021) obtuvieron resultados similares donde plantas de arroz expuestas a un estrés térmico de 40°C, presentaron un NPQT más elevado con respecto a plantas en condiciones óptimas (25°C). Plantas de arroz sometidas a estrés térmico combinado y tratadas con aplicaciones exógenas de CK o BR tuvieron una disminución del NPQT (Figura 2.2B y 7B), indicando que estas hormonas ayudaron a la aclimatación de la planta mediante la disipación de energía en forma de calor. Se ha observado que las aplicaciones foliares de CK o BR también causaron una reducción del quenching no fotoquímico bajo condiciones de estrés abiótico (hídrico o salino) en lulo y melón, sugiriendo que estos reguladores juegan un rol importante en la disipación de energía y la optimización de la fotosíntesis (Wu et al., 2012; Castañeda-Murillo et al., 2022). Un mejor desempeño de los parámetros F_v/F_m y NPQT en plantas tratadas con BR o CK bajo estrés térmico combinado puede deberse a que estos compuestos pueden favorecer síntesis de proteínas de choque térmico (HSPs) o enzimas antioxidantes y disminuir la perdida de fotones principalmente en forma de calor, optimizando el uso de la luz en procesos fotoquímicos (Kothari y Lachowiec, 2021; Castañeda-Murillo et al., 2022).

Se ha observado que la mayoría de los estreses abióticos pueden generar cambios en los contenidos de pigmentos fotosintéticos en las hojas (Chen et al., 2017b). En general, plantas de arroz expuestas solamente a un estrés térmico combinado presentaron un menor contenido de pigmentos fotosintéticos en los dos primeros experimentos. Una disminución de los contenidos de clorofilas también se observó cuando plantas de trigo sometidas durante tres días a condiciones de estrés por altas temperaturas (mayor a 35°C) (Feng et al., 2013). Fahad et al. (2017) explican que el estrés térmico puede inhibir la biosíntesis, acelerar la degradación o generar un efecto combinado en la producción de clorofila, causando un menor contenido de este pigmento fotosintético en hojas. Dos o tres aplicaciones foliares CK o BR mejoraron los contenidos de clorofilas en las plantas del genotipo F2000 bajo estrés térmico combinado. Resultados similares se observaron cuando plantas de arroz también eran tratadas con dos aplicaciones exógenas de zeatina o epibrasinolide bajo a un estrés térmico (Veerasamy et al., 2007; Thussagunpanit et al., 2015). Liu et al. (2020) mencionan que las CK generan una protección en los contenidos de clorofilas porque inhibe la senescencia de las hojas mediante la expresión de proteínas de choque térmico (HSP18) bajo estrés térmico. Por otro lado, Sharma et al. (2017) también reportan que los BR pueden proteger las clorofilas de las hojas mediante la inducción de la síntesis de distintas enzimas involucradas en la biosíntesis de clorofilas bajo estrés térmico y también favorecer la expresión de proteínas de choque térmico, las cuales protegen las clorofilas existentes y ayudan con la aclimatación metabólica (Sharma et al., 2017; Liu et al., 2020).

Los niveles de MDA y prolina son útiles para comprender los procesos de aclimatación o el efecto de aplicaciones o practicas agronómicas cuando las plantas están expuestas estreses (Ahmed and Hassan, 2011; Tang et al.,2018). En general, las aplicaciones de CK o BR ayudaron a disminuir los contenidos de MDA y aumentar la síntesis de prolina,

principalmente, cuando las plantas eran tratadas con dos o tres aplicaciones foliares. Estudios desarrollados por Zhang et al. (2008) y Quintero-Calderon et al. (2021) observaron que la producción de MDA disminuyó en plantas de pasto rastrero y arroz expuestas a condiciones de estrés térmico y tratadas con un extracto de algas marinas a base de citoquininas o un análogo de brasinoesteroide, respectivamente. Ambas hormonas pueden promover la síntesis de osmoprotectantes como la betaina, prolina o ectoina, los cuales ayudan a mitigar los efectos de los diferentes estreses (Liu et al., 2020; Kothari y Lachowiec, 2021).

El estrés térmico a menudo disminuye la concentración de nutrientes en los tejidos vegetales o el contenido total de nutrientes en las plantas (Hussain et al., 2019). Los tratamientos SC fueron los que presentaron la menor concentración de nutrientes (N, K y Ca) de todos los tratamientos. Una reducción del contenido de N, P, K, y Ca también se observó en plantas de arroz (Chaturvedi et al., 2017) y quinua (Rodríguez et al., 2021) estresadas por altas temperaturas. Una reducción del contenido de nutrientes bajo condiciones de estrés térmico puede deberse al hecho que este tipo de estrés puede afectar las enzimas implicadas en la asimilación de nitrógeno (actividad de la nitrato reductasa) (Huang; 2012; Sehgal et al., 2018), perdida de nutrientes inorgánicos por daño en la integridad de las membranas (Wahid et al., 2007), o una bajo el flujo de masas (Fahad et al., 2017; Giri et al., 2017). Las aplicaciones de BR o CK (entre dos o tres aplicaciones) favorecieron la concentración de nutrientes (N, K y Ca) en plantas expuestas a estrés térmico combinado. Wang et al. (2013) también observaron que el uso de CK favorecieron el estado nutritivo de nitrógeno durante un estrés térmico en pasto rastrero. Por otro lado, Praveena et al. (2020) reportan que el uso de brasinoesteroides favorece el contenido de nutrientes en múltiples estreses abióticos. Lo mencionado anteriormente, se puede deber a que estos compuestos aumentan los contenidos de osmolitos dentro de raíces, favorecen el flujo de masas, evitan la degradación de proteínas encargadas de toma de nitrógeno y favorecen la expresión de canales transportadores (Liu et al., 2020; Praveena et al., 2020; Kothari y Lachowiec, 2021).

Las características de la panícula evaluadas son una gran herramienta para determinar el comportamiento de la planta a un estrés térmico (Abdelaal et al., 2021). Las plantas que estuvieron expuestas a un estrés térmico combinado en la etapa R2 presentaron un mayor porcentaje de vaneamiento que las plantas en etapa R8. Wang et al. (2019) también observaron un mayor porcentaje de vaneamiento cuando las plantas fueron expuestas a un estrés térmico en floración (≥35°C). Las aplicaciones foliares de CK o BR favorecieron el número de espiguillas llenas y disminuyeron el porcentaje de vaneamiento, principalmente, en plantas de arroz sometidas a estrés térmico en estado R2. Resultados similares fueron también observados por Janeczko et al. (2010) y Yang et al. (2016) donde observaron que la aplicación exógena de BR o CK favorecen componentes de rendimiento de la espiga de cebada o trigo, respectivamente. Se infiere que estas hormonas ayudaron a mitigar los daños en los órganos reproductivos ya que estas están involucradas en la diferenciación de la panícula, elongación del tubo polínico, y producción de flores mediante

la regulación de procesos como la división celular, biosíntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Waisi et al., 2018; Yang et al., 2021).

El índice de estrés del cultivo (CSI) y tolerancia relativa (IRT) se utilizan para determinar la efectividad de estrategias en la mitigación de estreses (abióticos y bióticos) (Castro-Duque et al., 2020; Chavez-Arias et al., 2020). Las aplicaciones foliares de BR o CK causaron una disminución en este índice bajo estrés abiótico (0,3 a 0,5) en comparación con las plantas de arroz SC (0,8-0,9). En el capítulo previo se observó un comportamiento similar para este índice. Lee et al., (2010) mostraron que dos cultivares de algodón bajo estrés hídrico tenían un CSI de 0,85; mientras, cultivares bien irrigados registraron valores de CSI entre 0,4 y 0,6, mostrando a este índice como un indicador de adaptabilidad del cultivar a condiciones de estrés hídrico. El IRT también mostró un mayor aumento con el uso de dos y tres aplicaciones de CK o BR en comparación con SC, sugiriendo que estos compuestos ayudaron a mejorar la tolerancia del arroz al estrés térmico combinado. Chavez-Arias et al., (2020) evaluaron el efecto de elicitores sintéticos como estrategia para mitigar un estrés combinado (biótico y abiótico) en plantas de uchuva, encontrando que las plantas rociadas con estos compuestos mostraron un IRT más alto comparadas a las plantas solo expuestas a la condición estresante.

Los estudios de arroz inicialmente se han centrado en la evaluación de genotipos con resistencia a altas temperaturas diurnas o nocturnas utilizando rasgos fisiológicos o bioquímicos en Colombia (Sánchez-Reinoso et al., 2014; Alvarado-Sanabria et al., 2021; Quintero-Calderon et al., 2021). Se ha buscado la forma de generar técnicas prácticas, económicas y rentables en los últimos años para proponer un manejo integrado de cultivos y así mitigar los efectos de períodos de estrés térmico en el país (Calderon-Paez et al., 2021; Quintero- Calderón et al., 2021). Por esta razón, las respuestas fisiológicas, bioquímicas y características de la panícula de las plantas de arroz al estrés térmico combinado (40°C día / 30°C noche) observadas en este capítulo indican que el uso de dos o tres aplicaciones foliares de CK o BR pueden ser una técnica más a considerar para mitigar los efectos adversos de períodos moderados de estrés térmico en cultivos de arroz.

En resumen, las respuestas fisiológicas y bioquímicas de este estudio corroboraron que las plantas de arroz Fedearroz 2000 son susceptibles a un período moderado de estrés térmico combinado. Los resultados obtenidos indican que tres aplicaciones de citoquininas o brasinoesteroides se induce una mejor aclimatación de las plantas, ya que estos tratamientos aumentaron el contenido de clorofila, los parámetros de fluorescencia de la clorofila α, g_s y P_n y disminuyeron el contenido de MDA, el NPQT y la temperatura del dosel, en comparación con las plantas de arroz sin ninguna aplicación. Lo anterior nos permite concluir que el uso de reguladores de crecimiento vegetal (citoquininas o brasinoesteroides) mediante la aplicación foliar son una herramienta útil para preparar plantas de arroz cuando se esperan períodos de altas temperaturas durante su ciclo productivo.

3. Modelo conceptual.

Este trabajo permitió evaluar en general un grupo respuestas fisiológicas, bioquímicas y características de la panícula en plantas de arroz sometidas a estrés térmico combinado Las cuales fueron tratadas con diferentes reguladores de crecimiento con el fin de evaluar cual o cuales mitigaban los efectos de este estrés. Estas respuestas son resumidas en el modelo conceptual que se muestra en la **Figura 3.1**.

En este modelo se pueden observar dos escenarios principales: i) los efectos que sufren las plantas cuando se encuentran sometidas a un estrés térmico combinado (40°C día/ 30°C noche) (lado izquierdo Figura 3.1) y ii) Como las CK y BR mejoran el estado de diferentes factores que se ven afectado de manera negativa bajo este tipo de estrés (lado derecho Figura 3.1). En el primer escenario las respuestas iniciales de la planta ante la condición de estrés es generar un cierre de estomas probablemente debido a que los niveles de ácido abscísico (ABA) tienden a aumentar bajo periodos extremos de altas temperaturas. Este cierre de estomas genera una disminución en la conductancia estomática lo que también puede afectar los mecanismos fisiológicos de la planta (fotosíntesis) y toma de diferentes nutrientes. Por otro lado, las plantas en condiciones de estrés térmico combinado presentan estrés oxidativo por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a una mayor peroxidación lipídica, las cuales generan daños que repercuten en limitaciones de la fotosíntesis de tipo no estomático. Entre los efectos negativos evidenciados en el presente trabajo en plantas de arroz sin ninguna aplicación de reguladores de crecimiento se encuentra la degradación de pigmentos fotosintéticos, mayor peroxidación lipídica y reducción de la eficiencia máxima del quantum en PSII (F_v/F_m).

Con respecto al segundo escenario, se puede observar las principales respuestas mostradas por las plantas de arroz cuando estas se trataban con los reguladores de crecimiento CK o BR. Estas aplicaciones indujeron una mejor aclimatación de las plantas a la condición de estrés térmico combinado, ya que ambos reguladores de crecimiento aumentaron el contenido de clorofila, mejoraron los parámetros de fluorescencia de la clorofila α, g_s, aumentaron los contenidos de nutrientes y prolina dentro de la planta. Del mismo modo, disminuyeron el contenido de MDA y la temperatura del dosel, en comparación con las plantas de arroz sin ninguna aplicación.

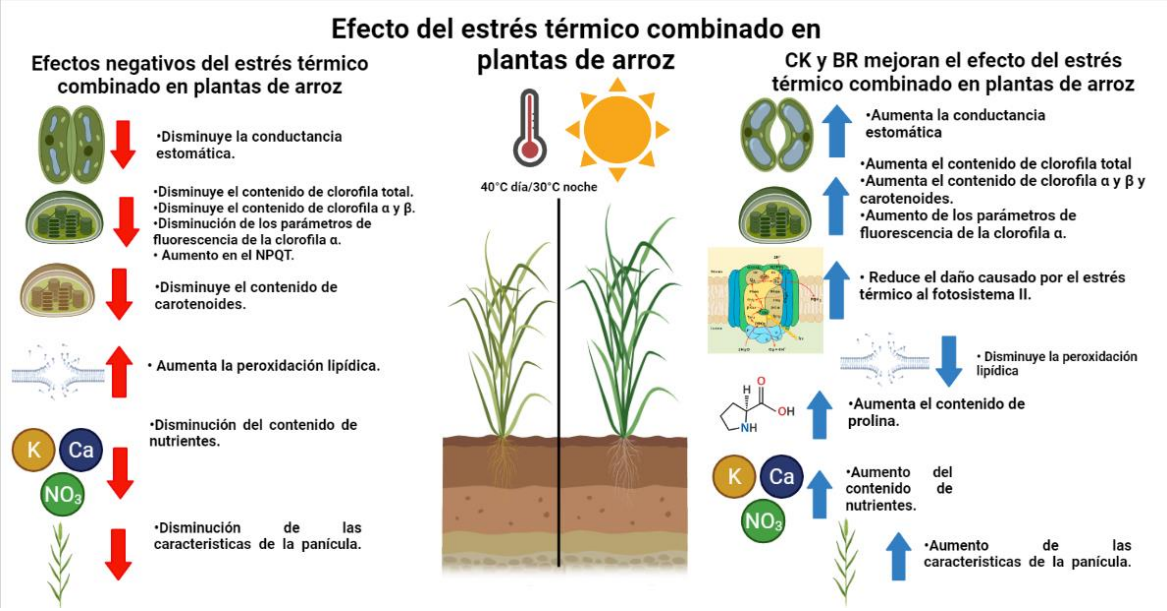

Figura 3.1. Modelo conceptual del impacto del estrés térmico combinado y las aplicaciones foliares de reguladores de crecimiento en plantas de arroz. Las flechas rojas y las flechas azules indican el efecto negativo o positivo de la interacción entre el estrés por calor combinado y las aplicaciones foliares de BR (brasinoesteroides) y CK (citoquininas) en las respuestas fisiológicas, bioquímicas y características de la panícula, respectivamente.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

El estrés térmico combinado causó afectaciones negativas en plantas de arroz. Lo anterior se evidenció en una menor conductancia estomática, fotosíntesis, transpiración carbono intracelular, CRA, contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides), variables de fluorescencia de la clorofila α, incremento del NPQT y MDA.

El uso de reguladores de crecimiento mitigó los efectos del estrés térmico combinado en las plantas de arroz. Además, la aplicación de estos reguladores de crecimiento generó una respuesta fisiológica positiva lo cual se reflejó en aumento en los valores de conductancia estomática, fotosíntesis, transpiración carbono intracelular, CRA, contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides), variables de fluorescencia de la clorofila α, acumulación de prolina y una reducción en la peroxidación de lípidos (MDA) y del NPQT.

Este estudio reveló que las plantas de arroz del genotipo Fedearroz 67 son más tolerantes al período combinado de estrés por calor de 8 días que el genotipo Fedearroz 2000, pero ambos cultivares sufren alteraciones en sus mecanismos fisiológicos y bioquímicos.

Los mecanismos fisiológicos y bioquímicos medidos ayudaron a ampliar nuestro conocimiento sobre el mecanismo de tolerancia al estrés por calor en genotipos de arroz cultivados en regiones tropicales.

El uso de reguladores de crecimiento es una herramienta útil en el manejo de condiciones de estrés por calor severo en cultivos de plantas de arroz cuando se esperan períodos de altas temperaturas.

4.2 Recomendaciones

Realizar nuevos estudios en los que se evalúe el efecto de diferentes períodos de estrés térmico en etapas fenológicas distintas de la planta tanto en condiciones de invernadero como en campo para complementar los resultados obtenidos en este estudio.

Evaluar los reguladores de crecimiento encontrados como promisorios en este estudio en cultivos comerciales de arroz en diferentes zonas de producción.

Cuantificar variables bioquímicas como el contenido de prolina y la producción de MDA en otros órganos de la planta como la raíz como posibles marcadores de estrés.

Caracterizar la actividad antioxidante enzimática y no enzimática como respuesta a la presencia del periodo de estrés térmico combinado y el tratamiento con los reguladores de crecimiento.

Tener en cuenta que al realizar un experimento con estreses abióticos en campo estos fenómenos si lleguen a presentarse de forma moderada a severa.

Bibliografía

Abd El-Naby S.K.M., A. Abdelkhalek, M.H.M. Baiea and O.A. Amin (2020). MITIGATION OF HEAT STRESS EFFECTS ON WASHINGTON NAVEL ORANGE BY USING MELATONIN, GIBBERELLIN AND SALICYLIC TREATMENTS. Plant Archives Vol. 20 Supplement 1, 2020 pp. 3523-3534

Ahammed GJ, Xu W, Liu A, Chen S (2018). COMT1 silencing aggravates heat stress induced reduction in photosynthesis by decreasing chlorophyll content, photosystem II activity, and electron transport efficiency in tomato. Frontiers in Plant Science 9:998. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.009998

Ahammed, G. J., Xia, X. J., Li, X., Shi, K., Yu, J. Q., and Zhou, Y. H. (2015). Role of brassinosteroid in plant adaptation to abiotic stresses and its interplay with other hormones. Current protein and peptide science, 16(5), 462–473. https://doi.org/10.2174/1389203716666150330141427

Ahmed, J., and Hassan, M. (2011). Evaluation of seedling proline content of wheat genotypes in relation to heat tolerance. Bangladesh Journal of Botany, 40(1). doi:10.3329/bjb.v40i1.7991

Allakhverdiev, S. I., Kreslavski, V. D., Klimov, V. V., Los, D. A., Carpentier, R., and Mohanty, P. (2008). Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. Photosynthesis Research, 98(1-3), 541–550. doi:10.1007/s11120-008-9331-0

Alonso-Ramirez A, Rodriguez D, Reyes D, Jimenez JA, Nicolas G, Lopez-Climent M, GomezCadenas A, and Nicolas, C. (2009). Evidence for a Role of Gibberellins in Salicylic Acid-Modulated Early Plant Responses to Abiotic Stress in Arabidopsis Seeds. PLANT PHYSIOLOGY, 150(3), 1335–1344. doi:10.1104/pp.109.139352

Alvarado-Sanabria, O. H., Garces-Varon, G. A., and Restrepo-Diaz, H. (2017). The Effects of Night-time Temperatures on Physiological and Biochemical Traits in

Rice. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 45(1), 157-163. https://doi.org/10.15835/nbha45110627

Amanullah, Fahad, S., Anwar, S., Baloch, S. K., Saud, S., Alharby, H., … Ihsan, M. Z. (2017). Rice Crop Responses to Global Warming: An Overview. Rice - Technology and Production. doi:10.5772/68035

Bajaj, S., and Mohanty, A. (2005). Recent advances in rice biotechnology-towards genetically superior transgenic rice. Plant Biotechnology Journal, 3(3), 275–307. doi:10.1111/j.1467-7652.2005.00130.x

Baker, N. R. (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. Annual Review of Plant Biology, 59(1), 89–113. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759

Bates, L. S., Waldren, R. P., and Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39(1), 205–207. doi:10.1007/bf00018060

Bielach, A., Hrtyan, M., and Tognetti, V. B. (2017). Plants under Stress: Involvement of Auxin and Cytokinin. International journal of molecular sciences, 18(7), 1427. https://doi.org/10.3390/ijms18071427

Bita, C. E., and Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. Frontiers in Plant Science, 4. doi:10.3389/fpls.2013.00273

Cao, Y-Y., H. Duan, L-N. Yang, Z-Q. Wang, L-J. Liu, and Yang, J-C. (2009). Effect of high temperature during heading and early filling on grain yield and physiological characteristics in Indica rice. Acta Agronomica Sinica 35:512-521.

Castro-Duque, N. E., Chávez-Arias, C. C., and Restrepo-Díaz, H. (2020). Foliar Glycine Betaine or Hydrogen Peroxide Sprays Ameliorate Waterlogging Stress in Cape Gooseberry. Plants, 9(5), 644. MDPI AG. Retrieved from http://dx.doi.org/10.3390/plants9050644

Chaerle, L., Leinonen, I., Jones, H. G., and Van Der Straeten, D. (2007). Monitoring and screening plant populations with combined thermal and chlorophyll fluorescence imaging. Journal of Experimental Botany, 58(4), 773–784. doi:10.1093/jxb/erl257

Chaturvedi, A. K., Bahuguna, R. N., Shah, D., Pal, M., and Jagadish, S. V. K. (2017). High temperature stress during flowering and grain filling offsets beneficial impact of elevated CO2 on assimilate partitioning and sink-strength in rice. Scientific Reports, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-07464-6

Chávez-Arias, C. C., Gómez-Caro, S., and Restrepo-Díaz, H. (2020). Mitigation of the impact of vascular wilt and soil hypoxia on cape gooseberry plants by foliar application of synthetic elicitors. Hortscience 55, 121–132. doi: 10.21273/HORTSCI14550-19

Chavez-Arias, C. C., Ligarreto-Moreno, G. A., and Restrepo-Díaz, H. (2018). Evaluation of heat stress period duration and the interaction of daytime temperature and cultivar on common bean. Environmental and Experimental Botany, 155, 600–608. doi:10.1016/j.envexpbot.2018.08.012

Chen J, Nolan TM, Ye H, Zhang M, Tong H, Xin P, Chu J, Chu C, Li Z, Yin Y. Arabidopsis WRKY46, WRKY54, and WRKY70 Transcription Factors Are Involved in Brassinosteroid-Regulated Plant Growth and Drought Responses. Plant Cell. 2017 Jun;29(6):1425-1439. doi: 10.1105/tpc.17.00364. Epub 2017 Jun 2. PMID: 28576847; PMCID: PMC5502465.

Chernyad'ev, I. I. (2009). The protective action of cytokinins on the photosynthetic machinery and productivity of plants under stress (review). Applied Biochemistry and Microbiology, 45(4), 351–362. doi:10.1134/s0003683809040012

Dey, A. K., Sharma, M., and Meshram, M. R. (2016). An Analysis of Leaf Chlorophyll Measurement Method Using Chlorophyll Meter and Image Processing Technique. Procedia Computer Science, 85, 286–292. doi:10.1016/j.procs.2016.05.235

El-Bassiony, A. M., Ghoname, A. A., El-Awadi, M. E., Fawzy, Z. F., and Gruda, N. (2012). Ameliorative Effects of Brassinosteroids on Growth and Productivity of Snap Beans Grown Under High Temperature. Gesunde Pflanzen, 64(4), 175–182. doi:10.1007/s10343-012-0286-x

Fahad S, Bajwa AA, Nazir U, Anjum SA, Farooq A, Zohaib A, Sadia S, Nasim W, Adkins S, Saud S, Ihsan MZ, Alharby H, Wu C, Wang D and Huang J (2017). Crop Production

under Drought and Heat Stress: Plant Responses and Management Options. Frontiers in Plant Science, 8. doi:10.3389/fpls.2017.01147

Fahad, S., Hussain, S., Saud, S., Khan, F., Hassan, S., Amanullah, et al., (2016b). Exogenously applied plant growth regulators affect heat-stressed rice pollens. J. Agron. Crop Sci. 202, 139-150. https://doi.org/10.1111/jac.12148

Federarroz (Federación Nacional de Arroceros). 2021. On line statistical database: Area, production and yields in Colombia. Retrieved from http://www.fedearroz.com.co/new/apr_public.php

Feller, U., and Vaseva, I. I. (2014). Extreme climatic events: impacts of drought and high temperature on physiological processes in agronomically important plants. Frontiers in Environmental Science, 2. doi:10.3389/fenvs.2014.00039

Feng, B., Liu, P., Li, G., Dong, S. T., Wang, F. H., Kong, L. A., & Zhang, J. W. (2013). Effect of Heat Stress on the Photosynthetic Characteristics in Flag Leaves at the Grain-Filling Stage of Different Heat-Resistant Winter Wheat Varieties. Journal of Agronomy and Crop Science, 200(2), 143–155. doi:10.1111/jac.12045.

Garcés, G. (2020). Adaptación del sector arrocero colombiano al cambio y la variabilidad climática. Arroz 68(547): 38-48.

Gerhards, M., Rock, G., Schlerf, M., and Udelhoven, T. (2016). Water stress detection in potato plants using leaf temperature, emissivity, and reflectance. International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation, 53, 27–39. doi:10.1016/j.jag.2016.08.004

Ghoulam, C., Foursy, A., and Fares, K. (2002). Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. Environmental and Experimental Botany, 47(1), 39–50. doi:10.1016/s0098-8472(01)00109-5

Ha, S., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., and Tran, L.-S. P. (2012). Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. Trends in Plant Science, 17(3), 172–179. doi:10.1016/j.tplants.2011.12.005

Hanif, S., Saleem, M. F., Sarwar, M., Irshad, M., Shakoor, A., Wahid, M. A., and Khan, H. Z. (2020). Biochemically Triggered Heat and Drought Stress Tolerance in Rice by Proline Application. Journal of Plant Growth Regulation. doi:10.1007/s00344-020-10095-3

Harsh A, Sharma YK, Joshi U, Rampuria S, Singh G, Kumar S, Sharma R (2016). Effect of short-term heat stress on total sugars, proline and some antioxidant enzymes in moth bean (Vigna aconitifolia). Annals of Agricultural Sciences 61:57-64. https://doi.org/10.1016/j.aoas.2016.02.001

Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam MM, Roychowdhury R, Fujita M (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. International Journal of Molecular Sciences 14:9643-9684

Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., and Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta, 207(4), 604–611. doi:10.1007/s004250050524

Holá, D., Rothová, O., Kočová, M., Kohout, L., and Kvasnica, M. (2010). The effect of brassinosteroids on the morphology, development and yield of field-grown maize. Plant Growth Regulation, 61(1), 29–43. doi:10.1007/s10725-010-9446-0

Iizumi, T., Luo, J.-J., Challinor, A. J., Sakurai, G., Yokozawa, M., Sakuma, H., … Yamagata, T. (2014). Impacts of El Niño Southern Oscillation on the global yields of major crops. Nature Communications, 5(1). doi:10.1038/ncomms4712

IPCC (2013). Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press.

Jespersen, D., and Huang, B. (2015). Proteins associated with heat-induced leaf senescence in creeping bentgrass as affected by foliar application of nitrogen, cytokinins, and an ethylene inhibitor. PROTEOMICS, 15(4), 798–812. doi:10.1002/pmic.201400393

Kalaji, H. M., Schansker, G., Brestic, M., Bussotti, F., Calatayud, A., Ferroni, L., Goltsev, V., Guidi, L., Jajoo, A., Li, P., Losciale, P., Mishra, V. K., Misra, A. N., Nebauer, S. G., Pancaldi, S., Penella, C., Pollastrini, M., Suresh, K., Tambussi, E., Yanniccari, M., … Bąba, W. (2017). Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. Photosynthesis research, 132(1), 13–66. https://doi.org/10.1007/s11120-016-0318-y

Khan A, Bilal S, Khan AL, Imran M, Shahzad R, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, Al-Azhri M, Mohanta TK, Lee I-J. (2020). Silicon and Gibberellins: Synergistic Function in Harnessing ABA Signaling and Heat Stress Tolerance in Date Palm (Phoenix dactylifera L.). Plants, 9(5), 620. doi:10.3390/plants9050620

Kilasi, N. L., Singh, J., Vallejos, C. E., Ye, C., Jagadish, S. V. K., Kusolwa, P., and Rathinasabapathi, B. (2018). Heat Stress Tolerance in Rice (Oryza sativa L.): Identification of Quantitative Trait Loci and Candidate Genes for Seedling Growth Under Heat Stress. Frontiers in Plant Science, 9. doi:10.3389/fpls.2018.01578

Kothari, A., Lachowiec, J. (2021). "Roles of Brassinosteroids in Mitigating Heat Stress Damage in Cereal Crops" Int. J. Mol. Sci. 22, no. 5: 2706. https://doi.org/10.3390/ijms22052706

Kumar, P., Yadav, S. and Singh, M.P. (2020). Bioregulators application improved heat tolerance and yield in chickpea (Cicer arietinum L.) by modulating zeaxanthin cycle. Plant Physiol. Rep. **25,** 677–688. https://doi.org/10.1007/s40502-020-00555-z

Lee, W. S., Alchanatis, V., Yang, C., Hirafuji, M., Moshou, D., & Li, C. (2010). Sensing technologies for precision specialty crop production. Computers and Electronics in Agriculture, 74(1), 2–33. doi:10.1016/j.compag.2010.08.005

Lesk, C., Rowhani, P., and Ramankutty, N. (2016). Influence of extreme weather disasters on global crop production. Nature, 529(7584), 84–87. doi:10.1038/nature16467

Liu Q, Wu X, Ma J, Li T, Zhou X, Guo T. 2013. Effects of high air temperature on rice grain quality and yield under field condition. Agronomy Journal105, 446–454. https://doi.org/10.2134/agronj2012.0164

Liu, Y., Zhang, M., Meng, Z., Wang, B., & Chen, M. (2020). Research Progress on the Roles of Cytokinin in Plant Response to Stress. International Journal of Molecular Sciences, 21(18), 6574. doi:10.3390/ijms21186574

Macková, H., Hronková, M., Dobrá, J., Turečková, V., Novák, O., Lubovská, Z., … Vanková, R. (2013). Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. Journal of Experimental Botany, 64(10), 2805–2815. doi:10.1093/jxb/ert131

Mathur, S., Agrawal, D., and Jajoo, A. (2014). Photosynthesis: Response to high temperature stress. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 137, 116–126. doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.01.010

Mittler, R., Finka, A., and Goloubinoff, P. (2012). How do plants feel the heat? Trends in Biochemical Sciences, 37(3), 118–125. doi:10.1016/j.tibs.2011.11.007

Ogweno, J.O., Song, X.S., Shi, K., Hu, W.H., Mao, W.H., Zhou, Y.H., Yu, J.Q., Nogues, S. (2008). Brassinosteroids Alleviate Heat-Induced Inhibition of Photosynthesis by Increasing Carboxylation Efficiency and Enhancing Antioxidant Systems in Lycopersicon esculentum. Journal of Plant Growth Regulation, 27(1), 49–57. doi:10.1007/s00344-007-9030-7

Peleg, Z., and Blumwald, E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. Current Opinion in Plant Biology, 14(3), 290–295. doi:10.1016/j.pbi.2011.02.001

Porch Clay, T.G., Hall,, A.E. 2013. Heat Tolerance. In: Genomics and Breeding for Climate-Resilient Crops. Vol. 2:167-202.

Quintero-Calderón, E. H., Sánchez-Reinoso, A. D., Chávez-Arias, C. C., Garces-Varon, G., and Restrepo-Díaz, H. (2021). Rice seedlings showed a higher heat tolerance through the foliar application of biostimulants. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 49(1), 12120. https://doi.org/10.15835/nbha49112120

Rajewska I, Talarek M, Bajguz A (2016). Brassinosteroids and response of plants to heavy metals action. Frontiers in Plant Science 7:629. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00629

Ramirez-Villegas, J., Salazar, M., Jarvis, A., and Navarro-Racines, C. E. (2012). A way forward on adaptation to climate change in Colombian agriculture: perspectives towards 2050. Climatic Change, 115(3-4), 611–628. doi:10.1007/s10584-012-0500-y

Restrepo-Diaz, H., Garces-Varon, G. (2013). Response of rice plants to heat stress during initiation of panicle primordia or grain-filling phases. Journal of Stress Physiology and Biochemistry 9 (3):319-325.

Salehifar, M.; Rabiei, B.; Afshar Mohammadian, M.; and Asghari, J. (2017). Physiological and Fluorescence Reaction of Four Rice Genotypes to Exogenous Application of IAA and Kinetin under Drought Stress. Notulae Scientia Biologicae, 9(3), 378. doi:10.15835/nsb9310091

Sánchez-Reinoso, A. D., Garcés-Varón, G., and Restrepo-Díaz, H. (2014). Biochemical and physiological characterization of three rice cultivars under different daytime temperature conditions. Chilean Journal of Agricultural Research, 74(4), 373–379. doi:10.4067/s0718-58392014000400001

Sánchez-Reinoso, A. D., Nieto, M. F., Dossmann, J., Camacho-Tamayo, J. H., and Restrepo-Díaz, H. (2019). Nutrient uptake, partitioning, and removal in two modern high-yielding Colombian rice genotypes. Journal of Plant Nutrition, 1–15. doi:10.1080/01904167.2019.1659334

Sergiev I, Todorova D, Shopova E, Jankauskienė J, Jankovska-Bortkevič E, Jurkonienė S (2018) Effects of auxin analogues and heat stress on garden pea. Zemdirbyste-Agricult 105(3):243–248. https://doi.org/10.13080/z-a.2018.105.031

Shah, F., Huang, J., Cui, K., Nie, L., Shah, T., Chen, C., and Wang, K. (2011). Impact of high-temperature stress on rice plant and its traits related to tolerance. The Journal of Agricultural Science, 149(05), 545–556. doi:10.1017/s0021859611000360

Shi, P., Zhu, Y., Tang, L., Chen, J., Sun, T., Cao, W., & Tian, Y. (2016). Differential effects of temperature and duration of heat stress during anthesis and grain filling stages in rice. Environmental and Experimental Botany, 132, 28-41.

Siddiqui, H., Hayat, S., & Bajguz, A. (2018). Regulation of photosynthesis by brassinosteroids in plants. Acta Physiologiae Plantarum, 40(3). doi:10.1007/s11738-018-2639-2

Sims, D. A., and Gamon, J. A. (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. Remote Sensing of Environment, 81(2-3), 337–354. doi:10.1016/s0034-4257(02)00010-x

Sobol S., Chayut N., Nave N., Kafle D., Hegele M., Kaminetsky R., Wunsche J.N., Samach A. (2013). Genetic variation in yield under hot ambient temperatures spotlights a role for cytokinin in protection of developing floral primordia. Plant, Cell and Environment, 37(3), 643–657. doi:10.1111/pce.12184

Sonjaroon, W., Jutamanee, K., Khamsuk, O., Thussagunpanit, J., Kaveeta, L., and Suksamrarn, A. (2018). Impact of brassinosteroid mimic on photosynthesis, carbohydrate content and rice seed set at reproductive stage under heat stress. Agriculture and Natural Resources. doi:10.1016/j.anres.2018.09.001

Sun J, Qi L, Li Y, Chu J, Li C (2012). PIF4–mediated activation of YUCCA8, expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating Arabidopsis hypocotyl growth. PLoS Genet 8(3):e1002594

Thussagunpanit, J., Jutamanee, K., Sonjaroon, W., Kaveeta, L., Chai-Arree, W., Pankean, P., and Suksamrarn, A. (2015). Effects of brassinosteroid and brassinosteroid mimic on photosynthetic efficiency and rice yield under heat stress. Photosynthetica, 53(2), 312–320. doi:10.1007/s11099-015-0106-5

Waisi, H., Janković, B., Nikolić, B., Dragičević, V., Panić, I., Tosti, T., & Trifković, J. (2018). Influence of various concentrations of 24-epibrassinolide on the kinetic parameters during isothermal dehydration of two maize hybrids. South African Journal of Botany, 119, 69-79.

Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., and Foolad, M.R. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. Environmental and Experimental Botany, 61(3), 199–223. doi:10.1016/j.envexpbot.2007.05.011

Wang, R., Zhang, Y., Kieffer, M., Yu, H., Kepinski, S., and Estelle, M. (2016). HSP90 regulates temperature-dependent seedling growth in Arabidopsis by stabilizing the auxin co-receptor F-box protein TIR1. Nature Communications, 7, 10269. doi:10.1038/ncomms10269

Wang, Y., Wang, L., Zhou, J., Hu, S., Chen, H., Xiang, J., ... & Zhang, Y. (2019). Research progress on heat stress of rice at flowering stage. Rice Science, 26(1), 1-10.

Wassie, Misganaw; Zhang, Weihong; Zhang, Qiang; Ji, Kang; Chen, Liang. 2019. "Effect of Heat Stress on Growth and Physiological Traits of Alfalfa (Medicago sativa L.) and a Comprehensive Evaluation for Heat Tolerance" *Agronomy* 9, no. 10: 597. https://doi.org/10.3390/agronomy9100597

Wassmann, R., Jagadish, S. V. K., Heuer, S., Ismail, A., Redona, E., Serraj, R., … Sumfleth, K. (2009). Chapter 2 Climate Change Affecting Rice Production. Advances in Agronomy, 59–122. doi:10.1016/s0065-2113(08)00802-x

Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. Journal of Plant Physiology, 144(3), 307–313. doi:10.1016/s0176-1617(11)81192-2

Wen, F., Zhang, Z., Bai, T., Xu, Q., and Pan, Y. (2010). Proteomics reveals the effects of gibberellic acid (GA3) on salt-stressed rice (Oryza sativa L.) shoots. Plant Science, 178(2), 170–175. doi:10.1016/j.plantsci.2009.11.006

Wu, C., Tang, S., Li, G., Wang, S., Fahad, S., & Ding, Y. (2019). Roles of phytohormone changes in the grain yield of rice plants exposed to heat: a review. PeerJ, 7, e7792.

Xu, Y., and Huang, B. (2009). Effects of Foliar-Applied Ethylene Inhibitor and Synthetic Cytokinin on Creeping Bentgrass to Enhance Heat Tolerance. Crop Science, 49(5), 1876. doi:10.2135/cropsci2008.07.0441

Yang D, Li Y, Shi Y, Cui Z, Luo Y, Zheng M, et al., (2016) Exogenous Cytokinins Increase Grain Yield of Winter Wheat Cultivars by Improving Stay-Green Characteristics under Heat Stress. PLoS ONE 11(5): e0155437. doi:10.1371/journal.pone.0155437

Yang, J., Miao, W., & Chen, J. (2021). Roles of jasmonates and brassinosteroids in rice responses to high temperature stress–A review. The Crop Journal, 9(5), 977-985.

Yin, B., Zhang, Y., and Zhang, Y. (2011). Effects of plant growth regulators on growth and yields characteristics in adzuki beans (Phaseolus angularis). Frontiers of Agriculture in China, 5(4), 519–523. doi:10.1007/s11703-011-1150-y

Yin, Y., Li, S., Liao, W., Lu, Q., Wen, X., and Lu, C. (2010). Photosystem II photochemistry, photoinhibition, and the xanthophyll cycle in heat-stressed rice leaves. Journal of Plant Physiology, 167(12), 959–966. doi:10.1016/j.jplph.2009.12.021

Yu, J. Q., Huang, L. F., Hu, W. H., Zhou, Y. H., Mao, W. H., Ye, S. F., and Nogués, S. (2004). A role for brassinosteroids in the regulation of photosynthesis in Cucumis sativus. Journal of experimental botany, 55(399), 1135–1143. https://doi.org/10.1093/jxb/erh124

Zahir, Z. A., Asghar, H. N., and Arshad, M. (2001). Cytokinin and its precursors for improving growth and yield of rice. Soil Biology and Biochemistry, 33(3), 405–408. doi:10.1016/s0038-0717(00)00145-0

Zhou, J., Wang, J., Li, X., Xia, X.-J., Zhou, Y.-H., Shi, K., Chen, Z., Yu, J.-Q. (2014). H2O2 mediates the crosstalk of brassinosteroid and abscisic acid in tomato responses to heat and oxidative stresses. Journal of Experimental Botany, 65(15), 4371–4383. doi:10.1093/jxb/eru217