

# Respuestas fisiológicas y bioquímicas al déficit hídrico en eucaliptos de interés forestal y su relación con la tolerancia cruzada a sequía y heladas

Gustavo Pedro Javier Oberschelp<sup>1</sup>, Carla Susana Salto<sup>1</sup>,  
Leonel Harrand<sup>1</sup>, Ezequiel Margarit<sup>2</sup>

**Palabras clave:** Eucalipto, sequía, heladas.

## Introducción

El estrés abiótico representa una limitante para las plantaciones de eucalipto, especialmente en etapas iniciales del cultivo. Así, las heladas y el estrés hídrico, de forma aislada o combinados, pueden tener gran impacto al provocar deshidratación celular, daños en membranas y biomoléculas, y en casos más extremos, la pérdida de conductividad hidráulica por cavitación. Sin embargo, las plantas son capaces de activar cambios fisiológicos y bioquímicos para tolerar el impacto de estos estreses y prevenir el daño (Gusta & Wisniewski 2013; Fürtauer et al. 2019; Mukarram et al. 2020). Notablemente, existen mecanismos de tolerancia compartidos para la sequía y la congelación, como la acumulación de solutos compatibles como azúcares o aminoácidos, que contribuyen a la prevención de la deshidratación y a la protección de las membranas celulares (Beck et al. 2007). Identificar estos mecanismos en especies de eucaliptos de interés forestal, es clave para la aplicación de técnicas de mejoramiento genético. En este trabajo se evaluaron las respuestas a nivel fisiológico y bioquímico de plantines de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus benthamii*, *Eucalyptus dunnii* y un clon híbrido *E. grandis* x *E. camaldulensis* expuestos a estrés hídrico, y su relación con la tolerancia sequía y congelación.

## Materiales y Métodos

Plantines de *E. grandis* (Eg), *E. benthamii* (Eb), *E. dunnii* (Ed), y un clon de *E. grandis* x *E. camaldulensis* GC\_INTA\_27 (GC) de 90 días fueron transplantados a macetas de 2 L y cultivados por 45 días, siendo las macetas irrigadas a saturación, drenadas y mantenidas en bolsas de plástico para evitar la evaporación. Se aplicaron dos regímenes de riego (tratamientos): 100 % (C, control) y 25 % (D, estrés hídrico) de reposición de agua transpirada (valores obtenidos por diferen-

cia de peso) cada dos días durante 20 días. Luego, se muestrearon hojas (3.er y 4.a) de 10 plantas por tratamiento y se evaluó la tolerancia a congelación mediante ensayos de pérdida de electrolitos (EL; Thalhammer et al. 2014) a cuatro temperaturas de congelación (0, -2, -4 y -6 °C). Adicionalmente, se conservaron a -80 °C hojas (5 plantas por tratamiento) para ensayos de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GCMS) y medidas espectrofotométricas de metabolitos (Oberschelp et al. 2020, 2022). Se evaluó el contenido relativo de agua (RWC), el contenido de materia seca en hojas (LDW), raíces (RDW), tallo (SDW) y su porcentaje (PDW), el área foliar total (LA), el área foliar específica (SLA) y la eficiencia en el uso del agua (WUE), en cinco plantas por tratamiento. Para evaluar la tolerancia a sequía y la capacidad de recuperación, se excluyó del riego por 10 días a las plantas de los tratamientos C y D, volviendo éstas a riego completo por 45 días. Luego, se evaluó el daño en las plantas con una escala de 0 o 1 (sin y con daño en tallo) y el número de rebrotes basales. Los datos se analizaron y graficaron en R, con los paquetes 'emmeans', 'mulcomp', 'FactoMineR' y 'ggplot2'. El mapa de calor fue generado con MeV (TM4).

## Resultados

### Tolerancia a congelación y sequía en plantas

Eb y Ed presentaron menores niveles de daño por congelación (menor EL) a -2 °C, tanto para plantas C como D, y evidenciaron un aumento de la tolerancia a la congelación con el tratamiento D, en especial Ed con bajos valores de daño a -4 y -6°C (Figura 1A). Por otra parte, Eg y GC presentaron tolerancia solamente en plantas sometidas a estrés hídrico (D), siendo ésta muy limitada en Eg (Figura 1A).

Se observaron altos niveles de daño por exclusión total de riego en Eg y Ed, independientemente del nivel de estrés previo (C o D). GC en cambio manifestó poco daño para las plantas C, mientras que Eb no manifestó

1 EEA Concordia del INTA, ruta 22 y vías del ferrocarril, Concordia, Entre Ríos.

2 Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI-CONICET). Suipacha 570, Rosario, Santa Fe. Contacto: margarit@cefobi-conicet.gov.ar

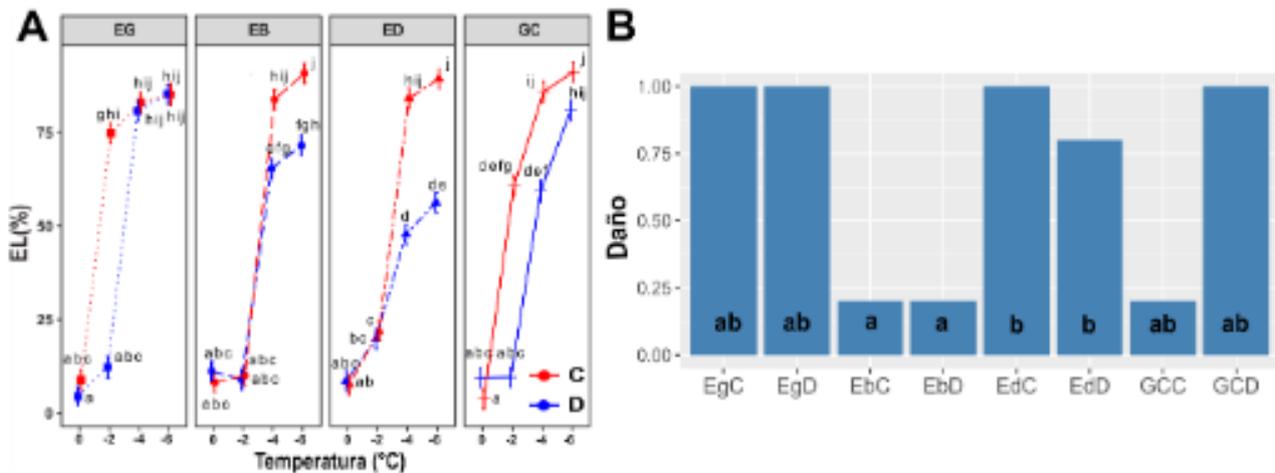


Figura 1. A, Determinación de tolerancia a congelación (0, -2, -4, y -6 °C) por pérdida de electrolitos (EL) en hojas de *E. grandis* (Eg), *E. benthamii* (Eb), *E. dunnii* (Ed) y *E. grandis* x *E. camaldulensis* (GC). C, control; D, sequía. B, Determinación de tolerancia a sequía por medida de daño en plantas expuestas a restricción total de riego por 10 días. En A y B, diferentes letras indican puntos y barras, respectivamente, con diferencias significativas (Ajuste de Tukey de 'emmeans',  $p < 0,05$ ).

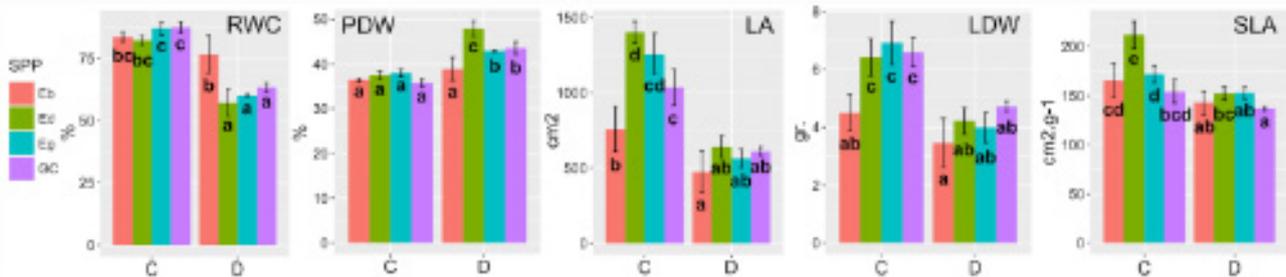


Figura 2. Contenido relativo de agua (RWC), porcentaje de materia seca (PDW), área foliar total (LA), peso seco de hojas (LDW) y área foliar específica (SLA) en *E. grandis* (Eg), *E. benthamii* (Eb), *E. dunnii* (Ed) y *E. grandis* x *E. camaldulensis* (GC) expuestas a condiciones C (control) y D (estrés hídrico) por 20 días. Letras diferentes indican diferencias significativas (Ajuste de Tukey de 'emmeans',  $p < 0,05$ ).

daños significativos en ninguna de las dos condiciones (Figura 1B). En todos los casos, el alto daño en los tallos se tradujo en pérdida de dominancia y en la emergencia de brotes basales (no mostrado).

### Respuesta fisiológica de las plantas

Los valores de RWC, LA, LDW y SLA disminuyeron significativamente con el tratamiento D en Eg, Ed y GC, mientras que los de PDW se incrementaron (Figura 2). Eb no mostró cambios significativos en RWC y PDW, aunque presentó una disminución en LA y SLA (Figura 2). En todas las especies se observó un incremento de la WUE con el tratamiento D (no mostrado).

### Caracterización del metaboloma de las hojas en respuesta a los tratamientos

El estudio del metaboloma foliar permitió encontrar ocho grupos (clusters) de metabolitos, algunos de ellos conteniendo metabolitos con mayores niveles en una especie, como el cluster VII para Eg (mayormente monosacáridos), el cluster II en Eb (ácido quínico, myo inositol y algunos aminoácidos) y el V y el VI en Ed y GC, respectivamente (Figura 3). Asimismo, se observaron metabolitos incrementados por la restricción hídrica (D) en Eb (cluster I, serina, prolina, arginina y ácido aspártico), o diferentes monosacáridos en Eg y GC (clusters VII y VIII), así como ácido glutámico, cítrico y sacarosa en Eb y Ed (cluster IV). Llamativamente, la sacarosa, principal azúcar soluble en plantas, se encontró acumulada en Eg, Eb y Ed en respuesta al tratamiento D (cluster IV).

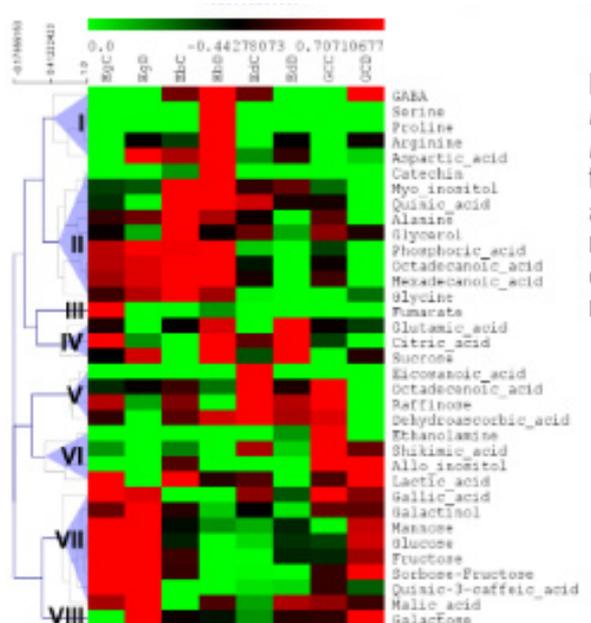


Figura 3. Mapa de calor del metaboloma foliar de *E. grandis* (Eg), *E. benthamii* (Eb), *E. dunnii* (Ed) y *E. grandis* x *E. camaldulensis* (GC) para los tratamientos C (control) y D (sequía). Los datos se agrupan jerárquicamente por patrones de metabolitos (ocho grupos, números romanos). La escala muestra los valores más altos en rojo y los más bajos en verde.

#### Integración de las respuestas observadas

La integración de los datos obtenidos mediante un análisis de componentes principales permitió asociar el 86 % de la variabilidad a 4 componentes, con el 56 % representado por las componentes 1 y 2 (31,6 y 25 %, respectivamente). El análisis gráfico mostró que las observaciones se agruparon según los tratamientos de estrés sobre la CP1 (Figura 4). A esta componente contribuyen las medidas de pérdida de electrolitos

(EL) a distintas temperaturas, LA, LDW, RDW, SDW, almidón, y los ácidos shikímico y gálico, que en general presentan altos valores para las muestras EgC, EdC y GCC.

Por otra parte, las muestras bajo estrés (D) estuvieron relacionadas por la CP1 a altos niveles de sacarosa, myo inositol, arginina, ácido aspártico, serina, prolina, así como altos valores de eficiencia del uso del agua (WUE). La CP2 sugiere un ordenamiento a nivel de especies, ya que agrupa a EbC y EbD en el extremo superior. Así, Eb se ubica con mayores niveles de ácido quínico, myo inositol, y altos valores de RWC, mientras que las muestras correspondientes a Eg, Ed y GC estuvieron asociadas a mayores valores de azúcares, galactinol, a daño por restricción de riego y altos niveles de rebrote (Figura 4).

#### Discusión

Los estudios permitieron observar diferencias en las respuestas al estrés hídrico entre las especies. Eb destacó por una menor sensibilidad al tratamiento de sequía en cuanto a los parámetros fisiológicos medidos y por una elevada tolerancia a la restricción total de riego, donde no evidenció daño, un hecho no observado previamente para esta especie. Además, Eb mostró tolerancia a la congelación, en coincidencia con Floriani et al. (2013) y Oberschelp et al. (2020, 2022). Los estudios bioquímicos indicaron que en Eb se acumulaban aminoácidos y solutos compatibles, como el myo inositol o el ácido quínico, recientemente asocia-

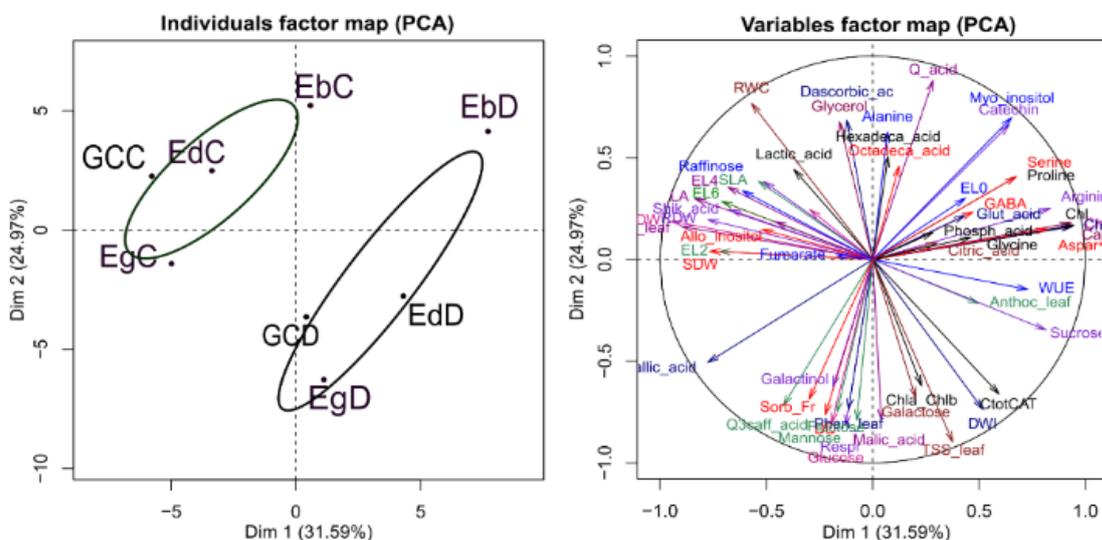


Figura 4. Análisis de componentes principales para los datos de tolerancia, medidas fisiológicas y bioquímicas. Biplot de componente 1 y 2 para tratamientos y variables. *E. grandis* (Eg), *E. benthamii* (Eb), *E. dunnii* (Ed) y *E. grandis* x *E. camaldulensis* (GC). C, control; D, sequía.

dos a la tolerancia al frío en esta especie (Oberschelp et al. 2022). Adicionalmente, existió en Eb y las otras especies, una contribución de distintos azúcares a la tolerancia los cuales podrían haber contribuido principalmente a la tolerancia a la congelación, hecho ya reportado en otras especies (Mukarram et al. 2021; Oberschelp et al. 2020, 2022).

### Conclusiones

Los materiales genéticos ensayados presentaron respuestas diferenciales a la restricción hídrica, así como también diferente tolerancia a sequía, donde destacó Eb. Llamativamente, se observó tolerancia cruzada a la congelación, donde dos especies mostraron los mayores niveles (Eb y Ed). Estudios bioquímicos asociaron los elevados niveles de tolerancia cruzada a frío y sequía en Eb con algunos metabolitos protectores, lo que abre las puertas a identificar caracteres de mejoramiento para especies de interés productivo.

### Bibliografía Citada

Beck EH, Fettig S, Knake C, Hartig K, Bhattarai T. 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences* 32: 501-510.

Floriani MMP, Steffens CA, Chaves DM, do Amarante CVT, Pikart TG, Ribeiro MS. 2013. Relationship between concentrations of total soluble carbohydrates in the leaves and cold tolerance in different species of *Eucalyptus* spp. *Ciência Florestal* 23: 165-174.

Fürtauer L, Weiszmann J, Weckwerth W, Nägele T. 2019. Dynamics of plant metabolism during cold acclimation. *International Journal of Molecular Sciences* 20(21): 5411. 20(21).

Gusta LV, Wisniewski M. 2013. Understanding plant cold hardiness: An opinion. *Physiologia Plantarum* 147(1): 4-14.

Mukarram M, Choudhary S, Kurjak D, Petek A, Khan MMA. 2021. Drought: Sensing, signalling, effects and tolerance in higher plants. *Physiologia Plantarum* 172(2): 1291-1300.

Oberschelp GPJ, Guarnaschelli AB, Teson N, Harrand L, Podestá FE, Margarit E. 2020. Cold acclimation and freezing tolerance in three *Eucalyptus* species: A metabolomic and proteomic approach. *Plant Physiology and Biochemistry* 154: 316-327.

Oberschelp GPJ, Morales LL, Montecchiarini ML, Harrand L, Podestá FE, Margarit E. 2022. Harder, better, faster, stronger: Frost tolerance of *Eucalyptus benthamii* under cold acclimation. *Plant Physiology and*

*Biochemistry* 186: 64-75.

Thalhammer A, Hinch DK, Zuther E. 2014. Measuring Freezing Tolerance: Electrolyte Leakage and Chlorophyll Fluorescence Assays. In: Hinch, D., Zuther, E. (eds) *Plant Cold Acclimation. Methods in Molecular Biology*, vol 1166. Humana Press, New York, NY.