

# Caracterización del proteoma y sus variaciones en eucaliptos expuestos a estrés hídrico

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

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

## Introducción

Las sequías y las heladas, cuyas incidencias se ven acrecentadas en magnitud y frecuencia por el cambio climático, son capaces de afectar las plantaciones de eucalipto, especialmente en fases iniciales de cultivo, ocasionando pérdidas económicas. No obstante, las plantas presentan o son capaces de activar cambios anatómicos, fisiológicos y bioquímicos para prevenir o disminuir el impacto de estos estreses (Mukarram et al. 2020). El estudio del conjunto de las proteínas presentes en tejidos (proteoma) y sus variaciones resulta una herramienta fundamental en la comprensión de las respuestas de las plantas al estrés hídrico, la caracterización de especies y genotipos, y la búsqueda de blancos de mejoramiento (Bedon et al. 2012; Martins et al. 2020). Sin embargo, se dispone de una cantidad de información limitada para especies del género *Eucalyptus* de interés para nuestro país. En este trabajo se estudió la tolerancia a sequía y la congelación, el proteoma foliar y sus respuestas en plantines de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus benthamii*, *Eucalyptus dunnii*, y un clon híbrido *E. grandis* x *E. camaldulensis* expuestos a condiciones de estrés hídrico.

## Materiales y Métodos

Plantines (de 90 días) de *E. grandis* (Eg), *E. benthamii* (Eb), *E. dunnii* (Ed), y un clon de *E. grandis* x *E. camaldulensis* GC\_INTA\_27 (GC) fueron trasplantados y cultivados en macetas (2 L) con riego a saturación por 45 días. Luego, se aplicaron dos tratamientos de riego: 100 % (C, control) y 25 % (D, estrés hídrico) de reposición de agua transpirada (según diferencia de peso) cada dos días durante 20 días. Al final se muestrearon hojas (nudos 3 y 4 desde el ápice) de 10 plantas por tratamiento y evaluó la tolerancia a congelación mediante pérdida de electrolitos a 0, -2, -4 y -6 °C (Thalhammer et al. 2014). La tolerancia a se-

quía se evaluó por exclusión del riego por 10 días, volviendo éstas a riego completo por 45 días. Se evaluó el daño en las plantas con una escala de 0 o 1 (sin y con daño en tallo). A los 20 días de tratamiento C y D, se colectaron y conservaron hojas a -80 °C para luego extraer proteínas (triplicado biológico) según Oberschelp et al. (2020). Se analizaron las proteínas en nano cromatógrafo líquido (EASY-nLC 1000) acoplado a espectrómetro de masas (Orbitrap Q-Exactive). Los resultados se analizaron mediante el programa Perseus (mapas de calor, agrupamiento, ANOVA, análisis de componentes principales). La identidad de las proteínas se estudió por asignación en bases de datos (Phytozome) y el análisis de enriquecimiento de ontología genérica/vías metabólicas (KEGG) mediante ShinyGO.

## Resultados

### Tolerancia a congelación y sequía en plantas

Eb y Ed, tanto C y D, presentaron bajos niveles de daño por congelación (menor EL) a -2 °C, 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 1). Eg y GC por otra parte presentaron incrementos de tolerancia en plantas D, siendo esta muy limitada en Eg (Figura 1A). Por su parte, GC incrementó su tolerancia a la congelación con el tratamiento D, llegando a disminuir el daño causado a -4 °C. Se observaron altos niveles de daño por exclusión total de riego en Eg y Ed, tanto en C como en D. GC en cambio manifestó poco daño para las plantas C, mientras que Eb no manifestó daños significativos en ninguna de las dos condiciones (no mostrado).

### Caracterización del proteoma y sus variaciones

Se identificaron un total de 1843 proteínas en los tejidos ensayados (aproximadamente 1600-1750 proteínas por muestra). De ellas, 1463 fueron detectadas en todas las especies y condiciones para al menos dos de las tres réplicas biológicas y 786 mostraron diferen-

<sup>1</sup> EEA Concordia del INTA, ruta 22 y vías del ferrocarril, Concordia, Entre Ríos.

<sup>2</sup> Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOTBI-CONICET). Suipacha 570, Rosario, Santa Fe. Contacto: margarit@cefotbi-conicet.gov.ar.

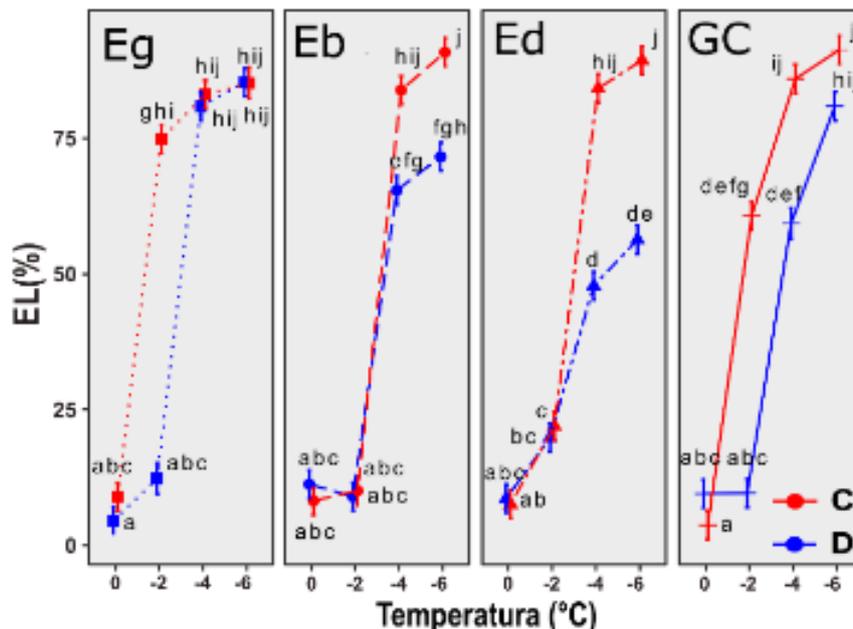


Figura 1. A, Tolerancia a congelación (0, -2, -4, y -6 °C) medida por pérdida de electrolitos (EL) en hojas de *E. grandis* (Eg), *E. benthamii* (Eb), *E. dunnii* (Ed) y *E. grandis* x *E. camaldulensis* (GC). C, control; D, sequía. Muestras con letras diferentes indican diferencias significativas (Ajuste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

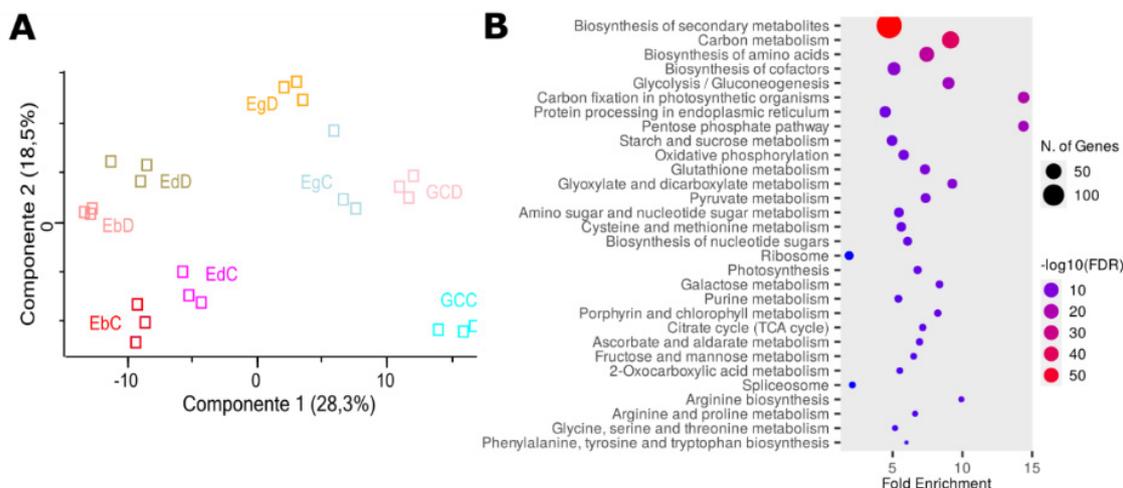


Figura 2. A, Análisis de componentes principales para los datos de proteómica de hojas de *E. grandis* (Eg), *E. benthamii* (Eb), *E. dunnii* (Ed) y *E. grandis* x *E. camaldulensis* (GC) sometidas a tratamientos control (C) y de sequía (D). B, Estudio de enriquecimiento en vías metabólicas (KEGG). Se muestra: número de genes por categoría, enriquecimiento (Fold enrichment) y estadística asociada ( $-\log_{10}(\text{FDR})$ ).

cias estadísticamente significativas para alguna condición experimental (especie o tratamiento; ANOVA,  $p < 0,05$ ). El estudio de componentes principales para identificar diferencias y similitudes entre las especies y los tratamientos encontró que 5 componentes (CP) describieron el 79,2 % de la variabilidad de los datos. Las primeras dos incluyeron el 46,8 % de la variabilidad observada (CP1 el 28,3 %, CP2 el 18,5 %), y permitieron establecer que Eb y Ed se diferenciaban de

Eg y GC por la CP1 y que la CP2 diferenciaba plantas C de las D (Figura 2A), mientras que las CP3-5 separaban tratamientos C del D para las distintas especies (no mostrado).

El estudio de las vías metabólicas (KEGG) (Figura 2B) y los procesos biológicos (gene ontology) (no mostrado) a los que estaban asociadas las 786 proteínas mostraron un enriquecimiento en vías metabólicas relacionadas con el metabolismo del carbono (azúcares y almidón),



sensibles, pero altamente productivas como Eg. El estudio de los proteomas foliares permitió identificar 1843 proteínas y observar diferencias tanto a nivel de especie como a nivel de tratamiento, donde las proteínas que mostraban variación se encontraban ligadas al metabolismo, la fotosíntesis, la respuesta a estímulos y la protección, tal como fuera observado por Martins et al. (2020) y Bedon et al. (2012) en otras especies del género. Se observó la presencia de respuestas comunes y divergentes entre especies frente a los tratamientos, habiéndose identificado clusters de proteínas directamente asociados a las especies con mayores niveles de tolerancia. Así, se pudo identificar que el ajuste del metabolismo, la fotosíntesis y de algunos mecanismos de protección juegan un rol activo en la protección de las plantas de este y otros géneros frente a distintos estreses (Mukarram et al. 2020).

### Conclusiones

Los materiales genéticos y tratamientos ensayados evidenciaron diferencias en cuanto a la tolerancia a la congelación y la sequía y en la composición y respuestas de los proteomas. Estos resultados sirven de punto de partida para la comprensión del comportamiento de las distintas especies ante situaciones climáticas desafiantes y su potencial aplicación en el mejoramiento genético de especies sensibles.

### Bibliografía Citada

Bedon F, Villar E, Vincent D, Dupuy JW, Lomenech AM, Mabialangoma A, Chaumeil P, Barré A, Plomion C, Gion JM. 2012. Proteomic plasticity of two Eucalyptus genotypes under contrasted water regimes in the field. *Plant, Cell and Environment* 35(4): 790-805.

Martins RS, Faria JMR, Rossini BC, Marino CL, dos Santos LD, José AC. 2020. Proteomic analyses unraveling water stress response in two Eucalyptus species originating from contrasting environments for aridity. *Molecular Biology Reports* volume 47: 5191–5205

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, bet-

ter, 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.