

AÑO 2016

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN MODALIDAD TESINA

“EVALUACIÓN DE
PARÁMETROS
FISIOLÓGICOS Y
DE CRECIMIENTO
EN DOS
CULTIVARES DE
YERBA MATE BAJO
CONDICIONES DE
DÉFICIT HÍDRICO”



AUTOR

Pablo Leandro Capellari

DIRECTOR

Ing. Agr. (Dr.) Pedro Sansberro

LUGAR DE TRABAJO

Laboratorio de Biotecnología
Aplicada y Genómica Funcional
Instituto de Botánica del Nordeste
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional del
Nordeste

ÍNDICE

RESUMEN	3
AGRADECIMIENTOS	4
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	5
OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES	8
HIPÓTESIS.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
CONCLUSIONES.....	16
TABLAS Y FIGURAS	18
BIBLIOGRAFÍA	24

RESUMEN

Ilex paraguariensis (yerba mate) es una especie arbórea que crece espontáneamente en el sotobosque de *Araucaria angustifolia*. Requiere temperaturas tropicales o subtropicales y una elevada humedad ambiente, así como frecuentes precipitaciones en el orden de los 1500 mm anuales. Tradicionalmente se cosechaba de manera extractiva a partir de ejemplares que crecían en la selva; sin embargo, acompañando el crecimiento del mercado, fue necesaria la domesticación de la especie a través del monocultivo en sistemas intensivos de explotación comercial. La exposición a condiciones ambientales disímiles a su habitat natural, caracterizadas por una mayor radiación lumínica, menor humedad relativa y una densidad de plantación cada vez mayor, predispone a la planta a padecer déficit hídrico por periodos cortos (horas de máxima temperatura) y prolongados (sequías estacionales).

A fin de estudiar los mecanismos involucrados en la defensa de la planta para mitigar efectos deletéreos causados por la deshidratación de sus tejidos, el objetivo de este trabajo fue caracterizar las respuestas fisiológicas y de crecimiento en dos cultivares de yerba mate sujetos a déficit hídrico. A tal fin, plantas que crecían en macetas bajo condiciones ambientales controladas fueron sometidas a estrés hídrico mediante supresión del riego (variación del contenido de agua disponible del suelo: 0 – 100%), incluyéndose un tratamiento de rehidratación una vez que se alcanzó el límite de disponibilidad hídrica. En tales condiciones, el cv San Isidro 49 evidenció un mayor potencial agua de sus brotes durante el estrés; hecho que le permitió mantener la tasa de fijación de CO₂, redirigiendo el destino de los fotoasimilados hacia el crecimiento del sistema radical como estrategia para el abastecimiento del recurso limitante.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme dado fuerzas y bendiciones en cada momento de mi vida.

A mis padres, Daniel y Carmen, por darme la vida y que junto a toda mi familia me apoyaron en el desarrollo de cada uno de mis proyectos.

A mi Director, Dr. Pedro Sansberro, por el apoyo académico, humano y por su total confianza a lo largo de estos años como becario y como tesista.

A todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología Aplicada y Genómica Funcional, en especial al Bioq. Edgardo Avico por su acompañamiento y apoyo para llevar adelante mi tesina.

A la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) a través de su Unidad Académica, la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), por el marco académico e institucional.

A mi novia, amigos y compañeros que hicieron de la etapa universitaria un camino que me llenó de herramientas para empezar mi vida como profesional.

A la agrupación NADCA que contribuyó en mi formación como persona, a través de un gran grupo humano con los mejores objetivos académicos e institucionales.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La yerba mate es una especie perenne que se caracteriza por presentar un crecimiento rítmico periódico como estrategia de sobrevivencia ante factores ambientales adversos (Sansberro 2000). En el crecimiento periódico las fases de actividad y dormición son cortas, constantes a través del tiempo y se alternan casi indefinidamente. Presenta una marcada organización en la actividad del meristema apical, quien gobierna los procesos morfogénicos del crecimiento y desarrollo. Primero se originan los primordios foliares, luego se produce la brotación, continúa la elongación de los entrenudos y finalmente la expansión foliar (Crabbe y Barnola 1996). De esta manera, bajo las condiciones agroclimáticas imperantes en el NE de Argentina, es posible determinar tres períodos de brotación perfectamente definidos en primavera, verano y otoño. Sin embargo, las altas temperaturas y ausencias de lluvias en verano, reducen la disponibilidad hídrica del suelo y aumentan la demanda evaporativa de la atmósfera, durante gran parte del período potencial de crecimiento (Sansberro et al. 2004).

Estudios previos realizados tendientes a esclarecer los factores internos que median la señal ambiental, y que por consiguiente, participan en el control de dichos períodos de brotación, determinaron que las giberelinas (GAs) están involucradas tanto en el control de la brotación, como en el control fotomorfogénico del crecimiento de los tallos; el cual, a su vez es modulado por los niveles de GAs con diferentes estructuras; evidenciándose una correlación positiva entre el alargamiento de los entrenudos en plantas sometidas a disminución en la irradiación y el incremento en los contenidos de GA₁ y GA₃. Asimismo, se demostró que una aplicación foliar de GA₄ promueve el alargamiento de los tallos independientemente de las condiciones luminosas del dosel (Sansberro et al. 2002), confirmando los resultados de los estudios precedentes realizados *in vitro* con segmentos uninodales, en donde se encontró que las GAs con una doble ligadura en el anillo A (GA₃ y GA₇) inhibieron el crecimiento de los explantes, mientras que aquellas que no poseen dicha característica estructural (GA₁ y GA₄) tuvieron efectos promotores (Sansberro et al. 2001). Asimismo, existen evidencias que relacionan el crecimiento de la especie estudiada con la habilidad de la planta para mantener un estado de turgencia hídrica necesario para promover dicho proceso morfogénico. En este sentido, es posible afirmar que el ácido abscísico (ABA), al producir cierre parcial de estomas, especialmente en horas de mayor pérdida de agua por transpiración, disminuye la situación de estrés hídrico que se genera a nivel de hoja. Consecuentemente posibilita una mayor turgencia y ésta promovería un crecimiento superior en volumen, demandando más fotoasimilados con el consiguiente aumento en la acumulación de materia seca como consecuencia de una mayor actividad fotosintética y/o un mejor transporte de sus productos (Sansberro et al. 2004).

Tomando en consideración que el hábitat natural de la yerba mate lo constituye el sotobosque de climas subtropicales donde predominan condiciones de baja irradiación y alta humedad atmosférica, ésta deberá adaptarse a las nuevas condiciones ambientales imperantes en los doseles de las plantaciones comerciales, relacionadas principalmente con un incremento de la irradiación

lumínica y el consiguiente aumento de la demanda de agua debido a la evapotranspiración. Esta situación se agrava debido a la disminución de las precipitaciones y alteración de los patrones de distribución observados en los últimos años. En este contexto, la generación de cultivares tolerantes a sequía debería constituir una prioridad en los programas de mejoramiento genético. Considerando que la respuesta de un determinado genotipo resultará de la interacción entre éste y el ambiente, la identificación de cultivares tolerantes resulta imprescindible para transferir exitosamente caracteres deseables a genotipos más sensibles.

El déficit hídrico, que se define como un desequilibrio entre la disponibilidad de agua del suelo y la demanda evaporativa, disminuye la acumulación de carbono y la expansión de los tejidos, reduciendo a su vez el número de células. Las plantas en respuesta a esta situación desfavorable comprometen la participación de un vasto número de genes, enzimas, metabolitos y hormonas (Tardieu et al. 2011). No obstante, el conjunto de alteraciones que se suscitan en el metabolismo de la planta como resultado de la expresión génica es aún desconocido debido a la complejidad que reviste la tolerancia a sequía, constituida por un complejo de caracteres cuantitativos controlados por la acción aditiva de numerosos genes (Barnabas et al. 2008). Para hacer frente a la complejidad de la respuesta de la planta a este flagelo, resulta imprescindible conocer las bases genéticas y fisiológicas que la determinan.

En tal sentido, es bien sabido que la falta de agua limita el crecimiento y productividad de los cultivos al generar un estado de insuficiencia hídrica en la planta denominado déficit hídrico (Jewelet al. 2010). Éste puede surgir debido a la presencia de períodos secos inesperados, por disminución de las precipitaciones (en zonas húmedas); o bien, por escasez o ausencia de lluvias por lapsos de tiempo prolongados como resultado del cambio climático (Petitet al. 1999). En la actividad agrícola este flagelo repercute fuertemente afectando la fenología, la fijación de carbono, la distribución de asimilados y la reproducción de la planta (Fuad-Hassan et al. 2008).

Las especies mesófitas que padecen déficit hídrico, tales como la yerba mate, modifican o ajustan su metabolismo celular a las nuevas condiciones impuestas por el estrés. Cuando la regulación es inadecuada y el metabolismo no es ajustado para mantener sus funciones, se desencadenan una serie de daños nocivos que pueden eventualmente ocasionar la muerte del vegetal; siendo ésta fuertemente influenciada por el genotipo y el ambiente (Passioura 2007).

Numerosos factores pueden afectar la respuesta de la planta al estrés hídrico, entre los que se incluyen la duración e intensidad de la situación adversa; como así también la posibilidad de que ésta pueda aclimatarsé como resultado de una exposición previa (Walter et al. 2011). En la naturaleza las plantas pueden experimentar un estado de deshidratación como consecuencia de un proceso lento y paulatino de disminución hídrica (días, semanas o meses) o bien, éste puede acontecer a través de un proceso rápido y repentino (horas o días). Ante un proceso de desarrollo lento del déficit hídrico, la planta puede evitar la deshidratación acortando su ciclo de vida (un hecho común en cultivos de granos y oleaginosas); o bien, maximizando la ganancia de recursos mediante distintos procesos de aclimatación. De presentarse una deshidratación rápida, ésta responde minimizando las pérdidas de agua o desplegando mecanismos de

protección metabólica contra los daños deletéreos producidos por la deshidratación y co-desarrollo de estrés oxidativo (Chaves et al. 2003). Independientemente de la velocidad con que se genere la deshidratación, la respuesta fisiológica dependerá principalmente de la interacción entre el genotipo y el ambiente.

Las plantas pueden fortalecer su respuesta a una situación de sequía evitando la deshidratación de sus tejidos a través de mecanismos que permitan mantener tan alto como sea posible el potencial agua; o bien, haciendo uso de diversas estrategias metabólicas que ayuden a soportar una reducción del mismo (Bray 1997). El escape a la deshidratación es un mecanismo que emplean tanto especies anuales como perennes y está asociado a una variedad de caracteres adaptativos que involucran, por un lado, minimizar la pérdida de agua y por el otro, maximizar su absorción. En este sentido, el cierre de estomas (Bell et al. 2007), reducción de la absorbancia de luz, incremento de la reflectancia y disminución del área foliar son estrategias que las plantas utilizan para minimizar la pérdida de agua (Chaves et al. 2003, Aguirrezábal et al. 2006); mientras que la modificación del patrón de crecimiento favoreciendo un mayor desarrollo radical en desmedro de la parte aérea, constituye el principal recurso para maximizar su absorción (Munns 2005).

OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES

Objetivo General:

Caracterizar las respuestas fisiológicas y de crecimiento en plantas de yerba mate sometidas a déficit hídrico bajo condiciones ambientales controladas.

Objetivo Específicos:

1. Caracterizar y evaluar el comportamiento de los parámetros hídricos foliares e intercambio gaseoso en plantas sujetas a riego permanente y restringido.
2. Estudiar la variación del crecimiento y distribución de biomasa en respuesta a déficit hídrico.

HIPÓTESIS

La habilidad para mitigar los efectos deletéreos impuestos por el déficit hídrico dependerá de las variaciones morfológicas y fisiológicas propias del genotipo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se trabajó con dos cultivares de yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) que presentan comportamientos contrastantes en respuesta a sequía. En este contexto, se trabajó con los cultivares San Isidro 49 (tolerante, Acevedo et al. 2013) y Garruchos 18 (sensible, Sansberro et al. 2004). Las plantas crecieron en recipientes conteniendo suelo laterítico ("suelo rojo"), bajo condiciones ambientales controladas. El material vegetal fue gentilmente cedido por el Establecimiento Las Marías S.A. (Ruta Nac. 14, km 739, Gdor. V. Virasoro, Corrientes). Los experimentos fueron realizados con plantas de dos años de edad en condiciones de luz (PAR: $420 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperíodo: 12 hs.), temperatura (fotoperíodo/escotoperíodo: $27\pm 2/20\pm 2^\circ\text{C}$) y humedad relativa (50-55%) controladas. Se trabajó con seis plantas por cada genotipo, obtenidas mediante el enraizamiento adventicio de estacas caulinarias. Se emplearon tres plantas por tratamiento (estrés y control en capacidad de campo). Todas estas fueron podadas al comienzo del experimento para obtener follaje de un tamaño similar (Fig. 1 A).

Condiciones de estrés

Los tratamientos iniciaron con un contenido óptimo de disponibilidad hídrica del suelo (CC, capacidad de campo) y finalizaron cuando el estado hídrico de las plantas se encontraba cerca del punto de estrés letal (entre los 20 y 24 días del inicio del experimento); incluyéndose un tratamiento de rehidratación (*re-watering*). La caracterización fisiológica se realizó cuando el suelo presentaba la máxima disponibilidad de agua (100%, capacidad de campo); o bien cuando ésta descendió hasta alcanzar ~ 40%, 10% y 0%. En el caso del tratamiento de rehidratación, la caracterización fisiológica se realizó transcurridas 48 hs de la irrigación. Las macetas se cubrieron con papel de aluminio para evitar la evaporación. Los controles fueron regados periódicamente para mantener el suelo en capacidad de campo (Fig. 1 A)

Contenido relativo de agua (CRA)

Se emplearon hojas maduras neoformadas en la fase de brotación anterior, sin síntomas aparentes de estrés oxidativo. Se extrajeron tres hojas por tratamiento y condición de estrés. A tal fin, éstas fueron inmediatamente pesadas y dispuestas en cajas de Petri conteniendo agua destilada hasta alcanzar el punto de máxima turgencia bajo condiciones de baja luminosidad. Una vez registrado el peso de saturación, éstas fueron transferidas a una estufa (105°C) hasta peso constante a fin de determinar su peso seco. El contenido relativo de agua de hojas de plantas sujeta a una determinada situación hídrica, se cuantificó mediante el empleo de la fórmula CRA: $(PF - PS) / (PSat - PS)$; donde PF, PS y PSat indican peso fresco, peso seco y peso en saturación, respectivamente (máxima turgencia).

Potencial agua, potencial osmótico y ajuste osmótico

Se utilizó una bomba de presión tipo Scholander marca PMS, modelo PMS-1000. Las mediciones se realizaron antes de iniciar el fotoperiodo (Fig. 1 F)

La medición del potencial osmótico se realizó mediante el uso de un psicrómetro marca Wescor, provisto de una termocupla modelo C-52 (Fig. 1 D). Se extrajeron muestras foliares equiparables con aquellas utilizadas para la determinación del CRA, las que fueron hidratadas hasta alcanzar turgencia máxima. Seguidamente, fueron puestas sobre papel absorbente a fin de quitar el agua excedente, puesta en jeringas de 5 ml capacidad y almacenada a -20 ° C hasta el momento de medición.

Finalmente, el ajuste osmótico se determinó calculando la diferencia de potencial osmótico entre el control (capacidad de campo) y el tratamiento de estrés.

Fotosíntesis, transpiración y conductancia estomática

Se empleó un medidor de fotosíntesis portable marca LiCor, modelo Li-6400 provisto de una fuente de luz PAR (LED) e inyector de CO₂; empleándose condiciones de luz (1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), CO₂ (400 $\mu\text{mol mol}^{-1}\cdot\text{aire}^{-1}$), flujo de aire (300 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura de la hoja (30 °C) controladas durante la medición. Éstas se realizaron al mediodía (momento de mayor demanda evaporativa), a partir de hojas maduras y sanas; efectuándose tres lecturas independientes por cada genotipo y contenido de agua del suelo (Fig. 1 B).

Contenido de clorofilas

Se extrajeron hojas con características similares a las empleadas en la determinación de los otros parámetros, coincidente con el momento de determinación de la tasa fotosintética, las que fueron inmediatamente congeladas. Posteriormente, se molió 100mg de cada una de las muestras y se agregó 10ml de acetona 80%, dejando reposar durante 1 h en heladera. Seguidamente, se traspasó la solución a tubos de ensayo, centrifugándose a 8000rpm durante 5 minutos (Fig. 1 C). La cuantificación se realizó a partir de la fracción sobrenadante sujeta a varias longitudes de onda (645 nm, 650 nm, 652 nm, 663 nm, 665 nm), mediante el empleo de un espectrofotómetro marca Multiskan GO, versión:10040,0000 (Fig. 1 H). El contenido de clorofilas se determinó mediante aplicación de las fórmulas de Vernon (1960) y Mc Kinney (1941).

$$\text{Clorofila A (mg/g de hoja)} = (11,63 \cdot A_{650} - 2,39 \cdot A_{665}) / 10$$

$$\text{Clorofila B (mg/g de hoja)} = (20,11 \cdot A_{650} - 5,18 \cdot A_{665}) / 10$$

$$\text{Clorofila total (mg/g de hoja)} = (6,45 \cdot A_{650} + 17,72 \cdot A_{665}) / 10$$

Donde, A_{650} y A_{665} son las mediciones de absorbancia a las diferentes longitudes de onda.

Determinación de los parámetros de crecimiento

El área foliar se determinó al inicio del experimento con un medidor portátil marca LiCor, modelo: Li-3000 (Fig. 1 E). A fin de realizar una medición no destructiva, se delineó el perímetro de la hoja en un papel tipo cartulina, recortándose su entorno a fin de obtener su réplica y proceder a la medición. Dado el reducido área foliar individual de las hojas de yerba mate, este procedimiento no destructivo resulta práctico y confiable,

Con el propósito de determinar la biomasa producida en el transcurso del experimento, los brotes neoformados durante el transcurso del experimento fueron colectados y secados en estufa (110°C) hasta peso constante.

El crecimiento radicular se determinó utilizando el método de capacitancia eléctrica (método no destructivo); para lo cual, previamente, se realizó una curva de crecimiento correlacionando los valores de capacitancia con el peso seco de raíces (Fig. 2). La capacitancia se determinó con un teste digital (MULTIMETER DT-980 G), introduciendo un electrodo en el suelo y el otro en el cuello de la planta. Las mediciones se realizaron en condiciones de capacidad de campo al inicio y al final del experimento (Fig. 1 G).

El *análisis estadístico* de los datos se realizó con el programa GraphPad® 6.0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tolerancia a la sequía es un carácter importante para la selección de cultivares que se desarrollarán en condiciones limitadas de recursos hídricos, siendo este un factor abiótico de gran relevancia por su efecto negativo sobre la producción agrícola (Reddy et al. 2004). En la presente tesis se evaluó el comportamiento de dos cultivares de *Ilex paraguariensis* en base a variaciones en el intercambio de gases, las relaciones hídricas y la producción de biomasa, frente a una restricción progresiva en la disponibilidad de agua del suelo.

La capacidad para mantener un alto contenido relativo de agua (CRA) en las hojas es considerada un buen indicador de tolerancia a sequía, tanto en especies herbáceas (Shaw et al. 2002) como leñosas (Karimi et al. 2012). En este sentido, pudo observarse una diferencia cuantitativa del parámetro en cuestión entre los genotipos evaluados. En respuesta al estrés, el CRA en hojas del cv San Isidro 49 descendió hasta un 62%; mientras que éste disminuyó hasta un 53% cuando las plantas del cv Garruchos 18 fueron puestas en situaciones ambientales similares. El tratamiento de rehidratación mostró una evidente recuperación del estado hídrico sin diferencias significativas con respecto al tratamiento control (Tablas 1 y 2), poniendo en evidencia el comportamiento contrastante de los cultivares estudiados en respuesta al déficit hídrico.

Al disminuir el contenido de agua del suelo, el potencial agua de la planta (Ψ) decae, con la consiguiente reducción del crecimiento vegetativo y producción de biomasa (Ismail 2010; May et al. 2011). En nuestro ensayo, pudo observarse una disminución de Ψ en brotes de ambos cultivares en correspondencia con el contenido de agua del suelo, denotándose diferencias significativas y una evidente recuperación en el tratamiento de rehidratación (Tablas 1 y 2).

Un eficiente ajuste osmótico es necesario para mantener la turgencia de las células y la integridad de los procesos metabólicos celulares (Chaves et al. 2010). La determinación del ajuste osmótico foliar ($\Delta\Psi_{\pi}^{100}$) en los cultivares estudiados muestran una respuesta diferencial frente a la disminución de la disponibilidad hídrica del suelo. En este sentido, no se observaron cambios significativos en el cv Garrucho18 respecto al tratamiento control (Tabla 1). Por su parte, pudo observarse que el genotipo tolerante recurre al ajuste osmótico en situaciones severas de estrés alcanzando -0.77 ± 0.17 MPa cuando se agotó el agua disponible del suelo (Tabla2).

En general, la variación de la actividad fotosintética es proporcional al contenido relativo de agua (CRA) y potencial hídrico de la hoja que, a su vez, afectan la apertura y cierre de los estomas y numerosos procesos metabólicos relacionados (Lawlor & Cornic, 2002). Los resultados obtenidos en el contexto de esta tesis denotan una mayor actividad fotosintética en el cultivar tolerante,

observándose que la misma disminuye 1,65 y 2,3 órdenes de magnitud cuando la disponibilidad hídrica del suelo desciende de 40% y 10% respectivamente. Al mismo tiempo pudo observarse un efecto inhibitorio más acentuado en el cultivar sensible, donde la actividad fotosintética decae 2,2 y 3,6 veces en tales condiciones hídricas. El comportamiento de la tasa fotosintética concuerda con el retraso en el cierre de estomas en el cultivar tolerante, a expensas de una mayor tasa de transpiración (E), manteniendo el ingreso de CO₂ y eliminando calor para evitar el sobrecalentamiento de la hoja (Chavez et al. 2003) (Tablas 1 y 2).

La tasa de transpiración presenta una clara tendencia a disminuir a medida que progresa el estrés en ambos cultivares; sin embargo, el cultivar tolerante no presenta diferencias significativas en la etapa temprana de estrés (40% de agua disponible), manteniendo una mayor tasa de intercambio gaseoso. A medida que la situación adversa se intensifica, se observa un comportamiento diferencial del mismo disminuyendo drásticamente la tasa de transpiración.

En este sentido también se analizaron las concentraciones de clorofila a, b y total. Para estrés moderado, se apreció un ligero incremento. A medida que éste se agudizó, las concentraciones de clorofilas disminuyeron. Tal comportamiento es comúnmente observado en respuesta a cambios deletéreos en el ambiente, especialmente bajo estrés hídrico severo (Fotovát et al. 2007; Janiak et al. 2015). En el cultivar sensible se vislumbró un descenso significativo del contenido de clorofila total en la situación más severa del estrés con respecto al tratamiento control (Tabla 1 y 2). Asimismo, el genotipo sensible evidenció variaciones considerables del contenido de clorofila en respuesta a la variación de la disponibilidad hídrica; mientras que el genotipo tolerante, mostró un comportamiento homogéneo entre tratamientos, sin observarse diferencias significativas (Fig. 3).

El control activo del flujo hídrico es un requerimiento imprescindible para evitar situaciones irreversibles en el estado hídrico presente y futuro del vegetal, el que se incorpora al modelo suelo-planta-atmosfera mediante la inclusión de una resistencia variable: la resistencia estomática. A través del grado de apertura de los estomas, la planta puede establecer cambios controlados, rápidos y reversibles en el valor de la resistencia total, alterando de una manera importante el flujo de transpiración y manteniendo dentro de unos límites críticos los valores de potencial hídrico desarrollados en cada uno de sus compartimentos (Aranda 2005). En las condiciones estudiadas, el cv Garruchos-18 disminuyó la conductancia estomática (*g*) en la fase temprana del estrés. Por su parte, el cv San Isidro-49 cierra sus estomas de una manera gradual y en respuesta al contenido de agua del suelo. En condiciones extremas de estrés, *g* disminuye tres veces respecto a la situación óptima; lo cual, le permite economizar el recurso ante esta situación extrema (Tabla 1 y Tabla 2).

La capacidad de optimización de los procesos de asimilación de carbono y transpiración determina la eficiencia en el uso del agua (EUA) de un determinado genotipo (Medrano et al. 2007). En tal sentido, el genotipo sensible, al disminuir la conductancia estomática en una fase temprana de estrés, aumenta EUA pero a costa de una disminución de la actividad fotosintética aun cuando el suelo contiene 40% de agua disponible. El genotipo tolerante incrementa su EUA en condiciones severas de estrés cuando el contenido de agua se vuelve la principal limitante. Para la máxima situación de estrés hídrico, en ambos genotipos se observa una disminución acentuada de la EUA, aunque la del cv San Isidro 49 duplica a la del cv Garruchos 18, lo cual manifiesta un mejor comportamiento ante una situación de déficit hídrico extremo (Tabla 1 y 2). Este comportamiento también ha sido observado en otros estudios, en los que una mayor eficiencia en el uso del agua, en condiciones severas de estrés, se ha indicado como un buen recurso de especies tolerantes al déficit hídrico (Aspiazú et al. 2010).

Las estrategias de conservación del agua, que en general están asociadas al cierre de los estomas y a la reducción del área foliar, limita la producción de biomasa por disminución en la actividad fotosintética. El efecto beneficioso de la reducción del crecimiento es disminuir la tasa de transpiración, con el consiguiente ahorro de agua para el ciclo de cultivo. Esto es favorable ante una situación de déficit de agua severo terminal, pero es perjudicial bajo déficit leve debido a la disminución en la fotosíntesis acumulada (Tardieu, 2012). Ambas situaciones pueden observarse en los cultivares estudiados, en el cv Garruchos 18 en un déficit leve, la tasa fotosintética disminuye significativamente respecto al control. En cambio el cv tolerante disminuye significativamente la tasa fotosintética recién en un estrés más severo (Tabla 1 y 2).

Uno de los procesos más sensibles al déficit de agua en las hojas es el crecimiento expansivo, su disminución tiene como objetivo proteger a la planta de la pérdida excesiva y la consecuente deshidratación y muerte, aunque esta estrategia de aclimatación influye en el desarrollo de la planta afectando su productividad (Vilagrosa et al. 2003; Tardieu et al. 2011). El análisis de la neoformación de brotes, deja claro este comportamiento para ambos cultivares, hallándose una reducción respecto a los tratamientos con buena hidratación. El cv sensible limitó en mayor medida su crecimiento expansivo, en cambio el cultivar tolerante manifestó diferencias menos significativas respecto al control, lo cual estaría explicado por la capacidad de mantener su tasa fotosintética en valores superiores (Tabla 3).

Por otro lado, no solo el desarrollo de la parte área se encuentra afectada bajo condiciones ecológicas que promueven bajos niveles de humedad en el suelo, si no que adquiere especial importancia la expansión del sistema radical para aumentar su capacidad exploratoria, compensando de esta manera la limitación física al movimiento del agua en el suelo mediante una búsqueda activa del recurso

(Vilagrosa 2003). Si bien, ambos genotipos incrementaron su masa radical, el cv San Isidro 49 manifestó un crecimiento significativo respecto de la condición control, lo que pone de manifiesto la utilización de los fotosintatos y sustancias de reserva en el desarrollo del sistema radical, favoreciendo la exploración en busca de agua disponible e incremento de su absorción (Shao et al. 2008). Este comportamiento diferencial del cv San Isidro 49 (Tabla 3) le otorga un carácter superior ya que contribuye a la aclimatación al déficit hídrico, y podría jugar un rol importante en el mantenimiento de la productividad bajo estas condiciones de estrés (Janiak et al. 2015).

CONCLUSIONES

✓ Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo final de graduación permiten concluir que, en respuesta al descenso del contenido de agua del suelo, el cv San Isidro 49 (tolerante) denota un mayor contenido relativo de agua en las hojas tanto en la fase inicial como final del estrés, resultante de un mayor potencial agua. En consecuencia, el ajuste osmótico inicia más tarde en este cultivar, cuando el agua disponible del suelo desciende por debajo del 40%.

✓ El mayor estado de turgencia en el cultivar tolerante retrasa el cierre de estomas respecto al cv Garruchos 18, favoreciendo la actividad fotosintética. Consecuentemente, la eficiencia en el uso del agua se incrementa en condiciones severas de estrés.

✓ El cultivar sensible disminuye su conductancia estomática en respuesta temprana al estrés; manteniéndose luego constante. El cultivar tolerante retrasa el cierre de estomas debido a un mayor estado de turgencia, variando en forma diferencial en respuesta a la disminución del contenido de agua del suelo.

✓ Los fotosintatos producidos tienen como principal destino el crecimiento del sistema radical en respuesta al estrés, principalmente en el cv San Isidro 49.

Tabla1. Variación de los parámetros fisiológicos del cultivar Garrucho 18 en respuesta a la disminución del contenido de agua en el suelo.

AGUA DISPONIBLE G18					
	100%(CC)	40%	10%	0%	100% (RH)
CRA Foliar (%)	99,39±0,25	91,36±2,54*	83,15±1,92***	53,25±5,36****	97,75±0,45
Ψ H ₂ O (MPa)	-0,45±0,06	-1,18±0,17****	-2,08±0,17****	-2,99±0,23****	-0,39±0,07
Δ Ψπ ¹⁰⁰	0±0	-0,41±0,38	-0,63±0,32	-0,8±0,61	-0,36±0,35
A (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	3,74±0,92	1,68±0,35****	1,04±0,45****	0,29±0,24****	2,93±1,16
E (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	0,76±0,27	0,26±0,09***	0,19±0,06***	0,16±0,05****	0,69±0,31
I g I (μmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	0,03±0,02	0,01±0,005**	0,01±0,004***	0,01±0,002***	0,03±0,01
EUA	5,34±2,4	7,66±4,37	4,68±2,41	1,82±1,39	4,33±0,45
Clorofila A (mg/g)	0,2±0,02	0,22±0,01	0,18±0,05	0,13±0,01	0,18±0,01
Clorofila B (mg/g)	0,29±0,02	0,32±0,02	0,26±0,07	0,2±0,01	0,27±0,02
Clorofila Total (mg/g)	1,11±0,1	1,24±0,15	0,95±0,37	0,65±0,15*	0,96±0,07

*Los datos indican valores promedios ± desvío estándar (n=3). Simple, doble, triple y cuádruple asteriscos indican diferencias significativas respecto al tratamiento control (100% de agua disponible) para P=0.05, 0.01, 0.001, 0,0001 respectivamente. CC, capacidad de campo; RH, rehidratación.

Tabla 2. Variación de los parámetros fisiológicos del cultivar San Isidro 49 en respuesta a la disminución del contenido de agua en el suelo.

AGUA DISPONIBLE SI 49					
	100%(CC)	40%	10%	0%	100% (RH)
CRA Foliar (%)	99,03±0,98	92,72±1,82**	79,18±1,14****	61,94±2,77****	98,13±0,65
Ψ H ₂ O (MPa)	-0,42±0,08	-0,97±0,09****	-1,98±0,16****	-3,1±0,14****	-0,33±0,1
$\Delta \Psi_{\pi}^{100}$	0±0	-0,08±0,06	-0,48±0,21	-0,77±0,17**	-0,67±0,04*
A (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	3,26±1,19	1,97±1,2	1,41±1,01**	0,21±0,14****	1,94±0,7
E (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	0,74±0,33	0,49±0,09	0,24±0,14***	0,09±0,07****	0,42±0,07*
I _g I (μmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	0,04±0,02	0,02±0,01*	0,01±0,01***	0,003±0,003****	0,02±0,004**
EUA	4,92±2,02	4,06±2,42	6,29±2,19	2,43±2,06	4,55±1,06
Clorofila A (mg/g)	0,18±0,01	0,14±0,05	0,17±0,01	0,16±0,01	0,15±0,03
Clorofila B (mg/g)	0,24±0,04	0,21±0,08	0,24±0,02	0,23±0,02	0,22±0,03
Clorofila Total (mg/g)	0,87±0,18	0,62±0,34	0,89±0,04	0,83±0,05	0,75±0,23

*Los datos indican valores promedios ± desvío estándar (n=3). Simple, doble, triple y cuádruple asteriscos indican diferencias significativas respecto al tratamiento control (100% de agua disponible) para P=0.05, 0.01, 0.001, 0,0001 respectivamente. CC, capacidad de campo; RH, rehidratación.

Tabla 3. Variación de los parámetros de crecimiento en respuesta a la disminución del agua disponible.

	CULTIVAR			
	Garrucho 18		San Isidro 49	
	CONTROL	ESTRES ²	CONTROL	ESTRES ²
Area Foliar (cm ²)	653,67±258,26	558,33±140,01	533,33±31,79	661±104,53
Longitud (cm) ¹	12,33±4,16	8±0,5	10,5±3,54	4,75±4,6
PS Hojas (g) ¹	2,62±0,37	0,74±0,09****	1,79±0,18	0,76±0,71*
PS Tallos (g) ¹	0,67±0,12	0,28±0,12	0,69±0,07	0,21±0,15
Δ PS raíces (g) ³	0,92±0,66	2,94±1,66	1,84±0,12	5,07±0,7**

*Los datos indican valores promedios ± desvío estándar (n=3). Simple, doble, triple y cuádruple asteriscos indican diferencias significativas respecto al tratamiento control (100% de agua disponible) para P=0.05, 0.01, 0.001, 0.0001 respectivamente.

¹Comprende los brotes neoformados durante el experimento.

²Situación de estrés: corresponde a la situación severa de estrés una vez que se consumió la totalidad del agua disponible.

³Variación del PS de raíces estimado por el método de Capacitancia.



Fig. 1 Materiales utilizados. **A)** Cámara climatizada con condiciones de luz (PAR: $420 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperiodo: 12 hs.), temperatura (fotoperiodo/escotoperiodo: $27\pm 2/20\pm 2^\circ\text{C}$) y humedad relativa (50-55%) controladas. **B)** Medidor de fotosíntesis portable marca LiCor modelo Li-6400. **C)** Extracto de clorofila en fase de acetona. **D)** Psicrómetro marca Wescor, provisto de una termocupla modelo C-52 para la determinación del potencial osmótico. **E)** Medidor de área foliar portátil marca LiCor, modelo: Li-3000. **F)** Bomba Scholander marca PMS, modelo PMS-1000 utilizada para las mediciones del potencial hídrico de la planta. **G)** Medición de Capacitancia para estimación de la masa radicular. **H)** Espectrofotómetro marca Multiskan GO, versión: 10040,0000. Utilizado para la determinación de clorofila.

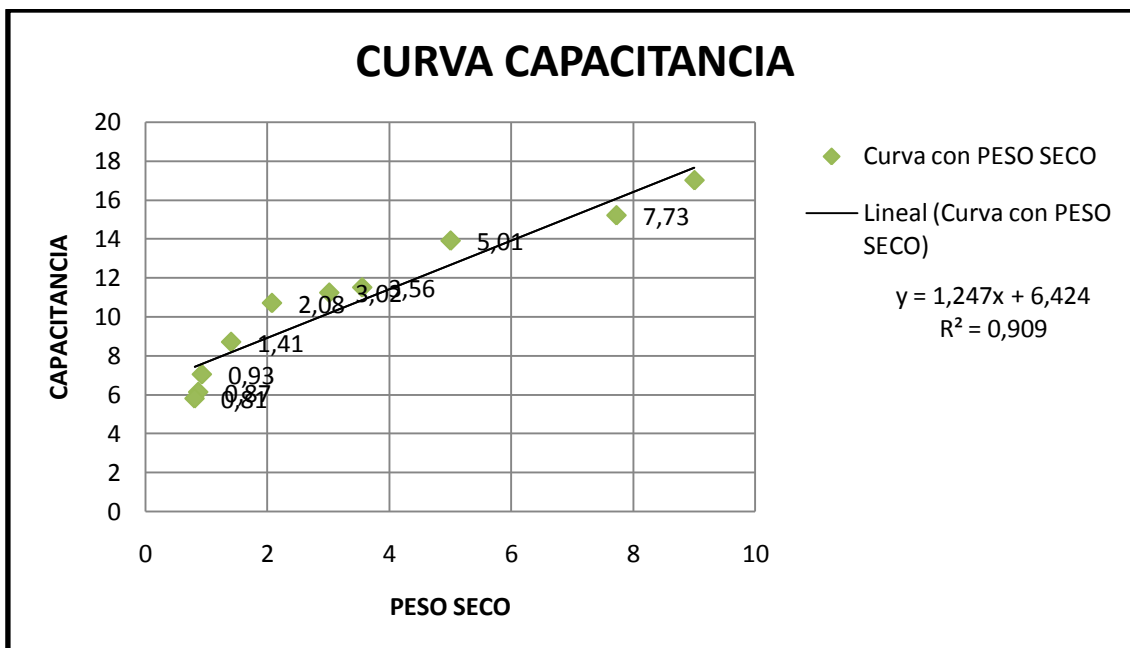


Fig. 2 Curva de Capacitancia patrón para estimar producción radicular.

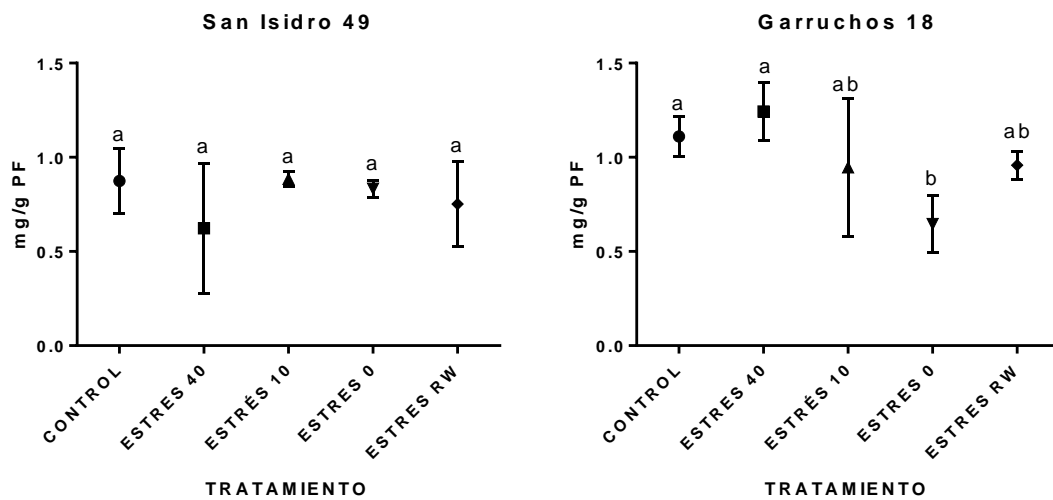


Fig. 3 Variación de Clorofila Total en hojas de yerba mate sujetas a distintas condiciones hídricas. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey ($P \leq 0.05$)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo M, Maiale S, Pessino S, Bottini R, Ruiz O, Sansberro P (2013). A succinate dehydrogenase flavoprotein subunit-like transcript is upregulated in *Ilex paraguariensis* leaves in response to water deficit and abscisic acid. *Plant Physiology and Biochemistry* 65: 48-54.
- Aguirrezábal L, Bouchier-Combaud S, Radziejewski A, Dauzat M, Cookson SJ, Granier G (2006). Plasticity to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana*: dissection of leaf development into underlying growth dynamic and cellular variables reveals invisible phenotypes. *Plant, Cell and Environment* 29:2216-2227.
- Aranda I, Gil L, Pardos J, (2005) Seasonal changes in apparent hydraulic conductance and their implications for water use of European beech (*Fagus sylvatica* L.) and sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl) in South Europe. *Plant Ecol*
- Aspiázú I, Sediya T, Ribeiro J, Silva A, Concenco G, Galon L, Ferreira E, Silva A, Borges E, Araujo W (2010) Characteristics Associated To Photosynthesis and Water Use of Weed Species. *Planta Daninha, Viçosa-MG*, v. 28, n. 1, p. 87-92
- Barnabas B, Jager K, Fecher A (2008). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell and Environment* 31:11-18.
- Bell LW, Williams AH, Ryan MH, Ewing MA (2007). Water relations and adaptations to increasing water deficit in three perennial legumes, *Medicago sativa*, *Dorycnium hirsutum* and *Dorycnium rectum*. *Plant Soil* 290:231-243.
- Bray EA (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2:48-54.
- Chaves MM, Maroco J, Pereira J (2003). Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30:239-264.
- Chaves M, O Zarrouk, R Francisco, J Costa, T Santos, A Regalado, M Rodrigues y C Lopes (2010). Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Annals of botany*. 105: 661-676.
- Crabbe J, Barnola P (1996). A new conceptual approach to bud dormancy in woody plants. En: G.A. Lang (Ed). *Plant Dormancy: Physiological, Biochemistry and Molecular Biology*. CAB International, UK: 83-113.
- Fotovát R, M Valizadeh y M Toorchi (2007). Association between water-use efficiency components and total chlorophyll content (SPAD) in wheat (*Triticum aestivum* L.) under well-watered and drought stress conditions. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 5: 225-227.
- Fuad-Hassan A, Tardieu F, Turc O (2008). Drought-induced changes in anthesis-silking interval are related to silk expansion: a spatio-temporal growth analysis in maize plants subjected to soil water deficit. *Plant, Cell and Environment* 31: 1349-1360.
- Ismail S M (2010) Influence of deficit irrigation on water use efficiency and bird pepper production (*Capsicum annum* L.). *Meteor. Environ. Arid Land Agric. Sci.* 21:29-43.
- Janiak A, Kwasniewski M, Agata D (2015). Transcriptome analysis reveals the role of the root hairs as environmental sensors to maintain plant functions under water-deficiency conditions.
- Jewell MC, Campbell BC, Godwin ID (2010). Transgenic plants for abiotic stress resistance. In: Kole C, Michler C, Abbott AG, Hall TC (eds). *Transgenic Crop Plants*, Springer, The Netherlands, 67-132.
- Karimi S, Hojati S, Eshghi S, Nazari-Moghadam R, and Jandoust S (2012). Magnetic exposure improves tolerance of fig 'Sabz' explants to drought stress induced in vitro. *SciHortic* 137:95-99.
- Lawlor, D.W.; Cornic, G. (2002) Photo-synthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environ.* 25:275-94.
- May L C, A Pérez G, E Ruiz S, A E Ic C, A García R (2011) Efecto de niveles de humedad en el crecimiento y potencial hídrico de *Capsicum chinense* Jacq. y su relación con el desarrollo de *Bemisia tabaci* Genn. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 14:1039-1045.
- Medrano H, Bota J, Cifre J, Flexas J, Ribas-Carbó M y Gulías J (2007) Eficiencia en el uso del agua por las plantas. *Investigaciones Geográficas*, nº 43 pp. 63-84 ISSN: 0213-4691 Instituto Universitario de Geografía Universidad de Alicante.
- Munns R (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* 167:645-663.

- Passioura J (2007). The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. *Journal of Experimental Botany* 58:113-117.
- Petit JR, Jouzel J, Raynaud D, Barkov NI, Barnola JM, Basile I, Bender M, CHappelaz J, Davis M, Delaygue G, Delmotte M, Kotlyakov VM, Legrand M, Lypenkov VY, Lorius C, Pepin L, Ritz C, Saltman E, Stievenard M (1999). Climate and atmospheric history from the past 420,000 years from the Vostok ice core Antarctic. *Nature* 399:429-436.
- Reddy A, Chaitanya K, Vivekanandan M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Plant Physiol.* 161:1189-1202
- Sansberro P (2000). Estudios fisiológicos acerca del control de brotación en yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. 120 pg.
- Sansberro P, Mroginski L, Bottini R (2001). In vitro morphogenetic responses of *Ilex paraguariensis* nodal segments treated with different gibberellins and Prohexadione-Ca. *Plant Growth Regulation* 34: 209-214.
- Sansberro P, Mroginski L, Bottini R (2002). Shoot growth in *Ilex paraguariensis* plants grown under varying photosynthetic active radiation is affected through gibberellins levels. *Plant Growth Regulation* 38: 231-236.
- Sansberro P, Masciarelli O, Mroginski L, Bottini R (2004). Absciscic acid promotes *Ilex paraguariensis* growth by alleviating diurnal water stress. *Plant Growth Regulation* 42:105-111.
- Shao Hong-Bo, Cheruth A, Chang-Xing Z (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*, March 2008, Pages 215–225.
- Shaw B, Thomas T, and Cooke D (2002). Responses of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) to drought and nutrient deficiency stress. *Plant Growth Regul* 37:77–83.
- Tardieu F, Granier C, Muller B (2011). Water deficit and growth. Coordinated processes without an orchestrator? *Current Opinion in Plant Biology* 14:283-289.
- Tardieu F. (2012). Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: Just design the right drought scenario. *J. Exp. Bot.* 63: 25–3
- Vilagrosa, A.; J. Bellot; V.R. Vallejo y E. Gil-Pelegrin (2003).—Cavitation, stomatal conductance, and leaf dieback in seedlings of two co-occurring Mediterranean shrubs during an intense drought. *Journal of experimental botany.* 54 (390): 2015-2024.
- Walter J, Nagy L, Hein R, Rascher U, Beierkuhnlein C, Willner E, Jentsche A (2011). Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. *Environmental and Experimental Botany* 71:34-40.