



TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

Modalidad Tesina

Título:

“Evaluación de las respuestas fisiológicas y bioquímicas involucradas en el mantenimiento del estatus hídrico del tejido radical de un clon de yerba mate tolerante a sequía frente a una situación de déficit hídrico”

Estudiante:

Srta. María José Duarte.

Asesor:

Bioq. Edgardo Hernán Avico.

Lugar de trabajo:

Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE).
Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET).
Laboratorio de Biotecnología Aplicada y Genómica Funcional.



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	5
2. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.....	8
3. HIPÓTESIS.....	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	10
4.2. Diseño de los experimentos de estrés por déficit hídrico	10
4.3. Evaluación del ajuste osmótico en el tejido radical de plantas de yerba mate	11
4.4. Determinación del contenido relativo de agua (CRA) de las raíces sometidas a condiciones estrés hídrico.....	11
4.5. Cuantificación de almidón y azúcares solubles.....	12
4.6. Contenido de prolina	12
4.7. Análisis del perfil de expresión transcripcional de genes involucrados en el metabolismo glucídico utilizando el software Mapman y KEGG Pathways.....	12
4.7.1. MapMan Software	13
4.7.2. KEGG Pathway	13
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
5.1. Estudios fisiológicos y bioquímicos.....	14
5.2. Estudios de expresión génica.....	15
6. CONCLUSIONES	18
7. TABLAS Y FIGURAS	19
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

AGRADECIMIENTOS

A Dios, que me dio la fortaleza para poder seguir a pesar de cada obstáculo.

A mis padres, que junto a mi familia me apoyaron y animaron a poder cumplir este gran sueño a lo largo de estos años.

A mi Asesor, Bioq. Edgardo Avico, por el apoyo incondicional para la realización de esta Tesina, tanto a nivel humano como académico.

A mi Director de Becas de Investigación de Pregrado, Dr. Pedro Sansberro que me dio la oportunidad y confió en mí durante estos años como becaria, y también por el apoyo brindado para llevar adelante mi tesina en el laboratorio que dirige.

A todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología Aplicada y Genómica Funcional.

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

A mis amigos y compañeros, que me dieron los mejores años y contribuyeron a mi formación como persona, sin dudas los voy a recordar siempre.

RESUMEN

La yerba mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) es un cultivo económicamente importante en la región Nordeste de Argentina. La provincia de Misiones concentra el 90% de la producción, mientras que Corrientes abarca el 10% restante. Estudios previos han demostrado que, ante episodios de sequía, el cultivo sufre fuertes mermas en su rendimiento debido a la abscisión foliar. Además, varios clones de yerba mate han sido caracterizados, mostrando el clon San Isidro 49 (SI-49) la mejor performance ante una situación de escasez hídrica.

Con el objetivo de contribuir a una comprensión integral de la respuesta del clon SI-49 al estrés por sequía, en el presente trabajo final de graduación se estudiaron algunos fenómenos fisiológicos y bioquímicos que contribuyen, a través del ajuste osmótico, a la mantención del estatus hídrico del sistema radical.

En este sentido, se diseñó un experimento bajo condiciones ambientales controladas, con plantas controles y plantas sometidas a varios niveles de estrés hídrico. Posteriormente se evaluó el ajuste osmótico y el contenido relativo de agua del tejido. Además, fueron analizadas las variaciones en el contenido de los azúcares de reserva, azúcares solubles y prolina. A nivel transcripcional, se hizo uso de la Base de Datos del Laboratorio de Biotecnología Funcional y Genómica Aplicada para realizar, mediante herramientas bioinformáticas, un análisis de la expresión diferencial de transcritos involucrados en las vías de biosíntesis de glúcidos con funciones osmoprotectoras.

Los hallazgos encontrados permitieron concluir que el ajuste osmótico realizado por el tejido radical del clon SI-49 de yerba mate, estaría mediado principalmente por azúcares solubles, oligosacáridos de la familia de la rafinosa y trehalosa, mientras que el aminoácido prolina no estaría involucrado en esta respuesta al déficit hídrico del suelo.

1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La yerba mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) es un cultivo económicamente importante en la región Nordeste de Argentina, el 90% de la producción se sitúa en Misiones y el 10% restante en Corrientes (Rodríguez, 2015). Los agricultores dedicados a ese cultivo representan, junto a sus familias, aproximadamente el 30% de la población de Misiones (Lende, 2016). Sus hojas desecadas y molidas se utilizan para la preparación, por infusión, de la bebida típica conocida como “mate” (Argentina) y chimarrão (Brasil). Además, es importante materia prima para la producción de dulces y refrescos (Oliveira, 2014). Estas bebidas están siendo introducidas rápidamente al mercado mundial para consumo directo o como ingrediente en alimentos y suplementos dietarios ya que es apreciada por su sabor peculiar, propiedades estimulantes (Heck & De Mejia, 2007), y propiedades biomédicas y farmacológicas como ser sus efectos antioxidantes, vasodilatadores y antimutagénicos entre otros (Bracesco et al., 2011).

La especie crece espontáneamente en el Nordeste de Argentina, Sur de Brasil y Sureste de Paraguay, constituyendo el sotobosque de *Araucaria angustifolia* su hábitat natural. En estas condiciones predominan la baja irradiación lumínica y alta humedad atmosférica, por lo que en los doseles de plantaciones comerciales, *Ilex paraguariensis* deberá adaptarse a las nuevas condiciones ambientales imperantes, es decir al incremento de la irradiación lumínica y el consiguiente aumento de la demanda de agua debido a la evapotranspiración (Sansberro, 2004). En este sentido, las altas temperaturas y ausencia de lluvias en verano también reducen la disponibilidad hídrica del suelo y aumentan la demanda evaporativa de la atmósfera, coincidiendo con gran parte del período potencial de crecimiento, y disminuyendo consecuentemente el rendimiento del cultivo (Sansberro et al., 2000).

En general, las plantas responden al déficit hídrico y se adaptan a las condiciones de sequía mediante modificaciones anatómicas, fisiológicas y bioquímicas (Marron et al., 2002; Recchia et al., 2013; Shao et al., 2008). La mayor parte de dichos ajustes están controlados a través de cambios en la expresión génica (López, 2017). En la naturaleza, las variaciones hídricas a las cuales están sujetas las plantas pueden presentarse ya sea de modo gradual (días, semanas a meses), o bien de manera drástica (horas a días). En el primer caso, las plantas pueden escapar a la deshidratación acortando su ciclo o aumentando la ganancia de recursos durante el prolongado período de adaptación; mientras que ante una deshidratación rápida, éstas reaccionan minimizando las pérdidas de agua o implementando diferentes procesos metabólicos que les brindan protección ante los daños deletéreos causados por la desecación 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.

Una estrategia para evitar la deshidratación de los tejidos vegetales, es a través de los mecanismos que permiten mantener tan alto como sea posible el potencial agua tisular; o bien, haciendo uso de diversas herramientas metabólicas que ayuden a soportar una reducción del mismo. En ese aspecto, el ajuste osmótico constituye uno de

los principales mecanismos con los que cuenta la planta para aclimatarse a una situación de deshidratación tisular (Akıncı & Lösel, 2012; Bray, 2000).

El ajuste osmótico es el proceso en el que se acumulan osmolitos en las células como respuesta a un descenso en el potencial hídrico celular. Éste potencial osmótico que surge de la acumulación neta de solutos como necesidad de mantenimiento de la turgencia tisular, permite que el crecimiento continúe a baja disponibilidad hídrica del suelo. El proceso es esencial en el mantenimiento de la turgencia, la cual es necesaria para la elongación y crecimiento celular. Se ha comprobado que el ajuste osmótico en raíces contribuiría a la modificación del patrón de crecimiento, favoreciendo un mayor desarrollo radical en desmedro de la parte aérea, lo que constituye un recurso primordial para maximizar la absorción hídrica (Munns & Cramer, 1996).

En este sentido, Brunner y col. (2015) mencionan que leñosas de regiones áridas y semiáridas combinan una alta concentración de solutos en las células parenquimáticas con una reducción en la conductancia estomática y baja tasa fotosintética, para soportar la escasez hídrica del suelo. En el caso particular de yerba mate, se ha demostrado que las hojas del clon San Isidro 49, tolerante a sequía, efectúan ajuste osmótico para sostener la actividad metabólica y posibilitar una rápida recuperación de la actividad fotosintética una vez superada la situación desfavorable (Acevedo et al., 2013). Por otro lado, queda aún por dilucidar cuál es la contribución del ajuste osmótico en el tejido radical de *Ilex paraguariensis* en respuesta al estrés hídrico.

El ajuste osmótico puede realizarse por incremento en las concentraciones de diversos osmolitos compatibles como ser prolina y azúcares solubles. Así, por ejemplo, se ha reportado que un incremento en el contenido de fructosa está involucrado en la disminución del potencial osmótico en las raíces de *Fagus sylvatica* en respuesta a sequía (Zang et al., 2014). Además, se han encontrado diversos y contrastantes resultados en cuanto al contenido de azúcares solubles y de almidón en raíces de plantas leñosas. El contenido de almidón en general disminuye significativamente en raíces de especies tales como *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus smithii* y *Pinus radiata*. Mientras que la concentración de los azúcares solubles como glucosa, fructosa y sacarosa disminuyen en las raíces de ambos eucaliptos, pero se incrementan en las de pino (Brunner et al., 2015).

Estos y otros resultados muestran que no es posible hacer generalizaciones sobre el comportamiento de los azúcares no estructurales en respuesta a la sequía, y que es necesario evaluar su comportamiento en cada especie de interés, y más aún evaluar el comportamiento en los genotipos tolerantes, para poder comprender su rol en respuestas efectivas al estrés hídrico.

Es importante mencionar que no solo los azúcares solubles clásicos pueden estar involucrados en el mantenimiento del estatus hídrico del tejido vegetal. Es abundante la bibliografía en donde se ha comprobado que los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (OFRs), como ser, galactinol, rafinosa, estaquiosa y verbascosa, se encuentran íntimamente involucrados en la generación del ajuste osmótico celular, en diversas plantas se ha reportado un incremento en su concentración frente al déficit hídrico (Li et al., 2014; Nishizawa et al., 2008; Sengupta et al., 2015)

En este contexto, se abordó en el presente Trabajo Final de Graduación, el estudio de las moléculas, desde los genes a los metabolitos, involucradas en el mantenimiento del estatus hídrico del tejido radical, que permiten al clon SI-49 de yerba mate optimizar la utilización del recurso hídrico disponible ante una importante disminución del potencial agua del suelo.

2 OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

Objetivo General:

Caracterizar las respuestas fisiológicas y bioquímicas involucradas en el mantenimiento del estatus hídrico del tejido radical del clon San Isidro 49 (SI-49) de yerba mate sometido a un déficit hídrico progresivo del suelo, bajo condiciones ambientales controladas.

Objetivos específicos:

1. Evaluar el ajuste osmótico y contenido relativo de agua (CRA) en raíces de plantas del clon SI-49 de yerba mate frente a una situación de déficit hídrico del suelo.
2. Determinar la variación en el contenido de almidón, azúcares solubles (glucosa, fructosa, sacarosa) y prolina en raíces de plantas del clon SI-49 de yerba mate sometidas a una situación de déficit hídrico del suelo.
3. Evaluar la expresión diferencial de genes involucrados en las rutas de biosíntesis de osmolitos compatibles en el tejido radical de plantas del clon SI-49 sujetas a riego permanente y restringido.

3 HIPÓTESIS

Los azúcares solubles y el aminoácido prolina son metabolitos involucrados en el ajuste osmótico del tejido radical del clon SI-49 de yerba mate como respuesta a una situación de déficit hídrico del suelo.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se trabajó con plantas obtenidas por cultivo *in vitro* de estacas del clon tolerante a sequía San Isidro 49 (Acevedo et al., 2013) de yerba mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.). El material vegetal fue gentilmente cedido por el Establecimiento Las Marías S.A. (Ruta Nac. 14, km 739, Gdor. V. Virasoro, Corrientes).

Las plantas crecieron en recipientes tubulares conteniendo “suelo rojo” (pH=5,88; MO=8,59%; P=32,42 ppm; Ca=12,53 mEq/100g; Mg=0,80 mEq/100g; K=0,77 mEq/100g; Dap=0,98), en condiciones de invernáculo.

4.2 Diseño de los experimentos de estrés por déficit hídrico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, en el cuál cada tratamiento contó con 3 repeticiones (tres réplicas biológicas). Los tratamientos consistieron en los distintos niveles de potencial hídrico del suelo a los que fueron sometidas las unidades experimentales. La recolección de las muestras se realizó al medio día, extrayendo todo el suelo de la maceta, y posterior disgregado manual del mismo para separación de las raíces. El sistema radical fue seccionado mediante tijeras de podar, el exceso de suelo fue eliminado mediante el uso de un pincel.

Los experimentos fueron realizados con plantas de dos años de edad y podadas a fin de uniformar su estructura y follaje. Éstas fueron introducidas una semana antes del inicio del ensayo en una cámara climatizada en condiciones de luz (PAR: $420 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperíodo: 12 h), temperatura (fotoperíodo/escotoperíodo: $27\pm 2/20\pm 2^\circ\text{C}$) y humedad relativa (50-55%) controladas. Un día antes de comenzar con el ensayo, todas las macetas fueron irrigadas hasta alcanzar capacidad de campo (CC, $\Psi_{\text{suelo}} \approx -0,04$ MPa), cubriéndose posteriormente las macetas con papel de aluminio para evitar pérdida de agua por evaporación de la superficie del suelo y provocar la disminución del potencial agua edáfico de manera lenta y progresiva, pretendiendo imitar una situación similar al estrés osmótico que la planta experimentaría en condiciones de campo.

En los tratamientos de estrés, el riego se suspendió hasta que Ψ_{suelo} alcanzó -1, -2 y/o -3 MPa, incluyéndose un tratamiento de rehidratación (Rw) una vez que Ψ_{suelo} llegó a -3 MPa. En los tratamientos sin estrés, CC y Rw, la irrigación se realizó por ascenso capilar a fin de eliminar los gases acumulados en los poros del suelo. El Ψ_{suelo} se determinó mediante el uso de termocuplas PST-55 colocadas horizontalmente en la zona de la raíz a 11 cm por debajo de la superficie del suelo, cerca del centro de la maceta.

Se llevaron a cabo dos experimentos. El primero de ellos para realizar la determinación del contenido de azúcares solubles, almidón y prolina; éste experimento incluyó dos tratamientos (CC y -2 MPa). Se recolectaron los dos tercios finales del sistema radical adventicio de cada planta, el cual fue congelado en nitrógeno líquido hasta su utilización. El segundo experimento, fue realizado para la determinación del contenido relativo de agua (CRA), ajuste osmótico (AO) y azúcares individuales; este

experimento incluyó 5 tratamientos (CC, -1, -2 y -3 MPa y Rw). En este caso antes de recolectar y congelar los dos tercios finales del sistema radical (los que se utilizaron para la determinación de azúcares individuales), se separó por planta una raíz adventicia de 13-14 cm de longitud, desarrollada directamente de la estaca con todas sus ramificaciones. Para la determinación del contenido de los azúcares individuales se utilizaron los 5 tratamientos, mientras que para CRA y AO se excluyó el tratamiento -3 MPa. Al momento de la determinación de metabolitos, los 2/3 finales del sistema radical recolectados fueron triturados en mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el cual fue utilizado para las extracciones.

Objetivo particular N° 1: Evaluar el ajuste osmótico y contenido relativo de agua (CRA) en raíces de plantas del clon SI-49 de yerba mate frente a una situación de déficit hídrico del suelo.

4.3 Evaluación del ajuste osmótico en el tejido radical de plantas de yerba mate

A fin de determinar el potencial osmótico a plena turgencia (Ψ_{π}^{100}), las raíces fueron rehidratadas hasta peso constante introduciéndolas en cajas de Petri que contenían agua destilada y luego incubadas bajo condiciones ambientales controladas. Seguidamente, éstas fueron introducidas en una jeringa de 5 mL de capacidad, congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas hasta el momento de la determinación en un freezer -80°C. Posteriormente, las jeringas fueron descongeladas hasta que las muestras alcanzaron la temperatura ambiente determinándose el Ψ_{π}^{100} del extracto xilemático con una termocupla C-52 (Wescor Inc.). El ajuste osmótico ($\Delta\Psi_{\pi}^{100}$) por imposición del estrés se calculó por diferencia de Ψ_{π}^{100} entre los tratamientos de estrés y el control sujeto a condiciones óptimas de crecimiento.

4.4 Determinación del contenido relativo de agua (CRA) de las raíces sometidas a condiciones estrés hídrico

Se determinó el peso fresco de una raíz adventicia desarrollada directamente de la estaca y sus respectivas ramificaciones (PF), luego se las dejó en agua hasta peso constante y se determinó su peso en turgencia máxima (PT), finalmente se secaron en estufa a 110°C y se determinó su peso seco (PS). El CRA se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$CRA = \frac{PF - PS}{PT - PS} \times 100$$

Objetivo particular N° 2: Determinar la variación en el contenido de almidón, azúcares solubles (glucosa, fructosa, sacarosa) y prolina en raíces del clon SI-49 de plantas de yerba mate sometidas a una situación de déficit hídrico del suelo.

4.5 Cuantificación de almidón y azúcares solubles

A partir de las muestras recolectadas en los ensayos de sequía se realizó el análisis de almidón y azúcares solubles mediante el método colorimétrico de la antrona (Loewus, 1952). Para la cuantificación de los azúcares individuales: glucosa (Glc), fructosa (Fru) y sacarosa (Sac), las muestras se remitieron liofilizadas al servicio de análisis de carbohidratos del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires), en donde las muestras fueron extraídas según las normas internacionales ISO 2103 (1998) y luego separadas y cuantificadas por HPLC-IR.

4.6 Contenido de prolina

Se utilizó el método de la ninhidrina desarrollado por Magné y Larher (1992). Se realizó una extracción acuosa en ebullición durante 30 min partiendo de una alícuota de 500 mg de muestra molida (raíces) en nitrógeno líquido y 2 mL de agua destilada. Una vez que la reacción se enfrió alcanzando la temperatura ambiente, se procedió a centrifugar a 2.000 rpm durante 10 min. Posteriormente, se retomó 500 µL del sobrenadante al que se le adicionó 500 µL de citrato de sodio 0,2 M (pH 4,6) y 2 mL de una solución de ninhidrina 1% p/v (en ácido acético:agua 60:40). La mezcla se hirvió durante 1 h, se extrajo con 2 mL de tolueno y se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 min. Finalmente, la absorbancia de la fase orgánica se determinó a 520 nm. La curva de calibración se efectuó con estándar de prolina, en las mismas condiciones de reacción que los extractos vegetales.

Objetivo particular N° 3: Evaluar la expresión diferencial de genes involucrados en las rutas de biosíntesis de osmolitos compatibles en tejido radical de plantas del clon SI-49 sujetas a riego permanente y restringido.

4.7 Análisis del perfil de expresión transcripcional de genes involucrados en el metabolismo glucídico utilizando el software MapMan y KEGG Pathways.

Con el objetivo de visualizar los cambios en la expresión génica diferencial de vías que involucran al metabolismo glucídico, se utilizaron las herramientas bioinformáticas MapMan (Thimm et al., 2004) y KEGG Pathway de la base de datos KEGG (del inglés: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Kanehisa & Goto, 2000) con datos provenientes de experimentos de ARN-Seq (Base de Datos del Laboratorio de Biotecnología Aplicada y Genómica Funcional), realizados previamente en raíces de yerba mate del clon SI-49 en situaciones contrastantes de disponibilidad hídrica.

4.7.1 MapMan Software

Para poder visualizar a través de diagramas coloreados, las vías metabólicas que involucran metabolitos osmóticamente activos, se utilizó el software MapMan. A tal fin a cada ID (identificador) correspondiente a los transcriptos diferencialmente expresados (DETs) en raíces de *I. paraguariensis*, se le asignó un *Bin code* utilizando el software Mercator (Lohse et al., 2014). La asignación del *Bin code*, se realiza mediante ortología y se basa en clasificaciones de referencia curadas manualmente que se originan a partir de tres organismos de referencia *Arabidopsis thaliana*, *Chlamydomonas* y *Oryza sativa*.

Además se realizó un archivo de mapeo personalizado en formato texto delimitado por tabulación que fusionó la información de cada ID anotado con su tasa de cambio. Esta tabla fue luego incorporada al programa MapMan y utilizada para identificar y mapear los transcriptos significativos en los distintos procesos biológicos de interés.

4.7.2 KEGG Pathway

Se utilizó la herramienta KEGG Pathway para obtener mapas de vías metabólicas en las cuales se hallan involucrados los transcriptos diferencialmente expresados. La ventaja de este software radica en que el número de especies vegetales de referencia es más amplio, llegando a 42 organismos dentro del reino vegetal.

Para visualizar las vías, primero se realizó la anotación funcional (asignación de número KO) de cada uno de los DETs mediante la herramienta KASS (del inglés: *KEGG Automatic Annotation Server*) disponible en http://www.genome.jp/kaas-bin/kaas_main?mode=partial. Como conjunto de datos de genes, mediante selección manual se utilizaron todos los organismos del reino vegetal disponibles. El método de asignación utilizado fue el BBH (del inglés: *bi-directional best hit*). Posteriormente, utilizando el set de números KO obtenidos y mediante la herramienta KEGG Mapper-Search pathway (http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway1.html), se obtuvieron las vías metabólicas involucradas.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estudios fisiológicos y bioquímicos

En estudios previos, se ha caracterizado al clon SI-49 de *I. paraguariensis*, como uno de los que manifiesta una mejor performance durante episodios de sequía (Acevedo et al, 2013). Esta caracterización se basó principalmente en el análisis de parámetros fisiológicos en la parte aérea de la planta. En este sentido, cabe destacar que es necesaria una caracterización de los fenómenos que se producen en el sistema radical teniendo en cuenta que este órgano es el primero en censar los cambios en el potencial hídrico del suelo, y en consecuencia generar y enviar señales de alerta hacia el resto del organismo (Ghosh & Xu, 2014).

Con este fin, se estudiaron procesos fisiológicos y bioquímicos desarrollados en raíces del clon SI-49 de *I. paraguariensis* en condiciones contrastantes de disponibilidad hídrica del suelo, para dilucidar los probables mecanismos involucrados en el mantenimiento del estatus hídrico del mismo. A fin de indagar el estado de hidratación de las raíces se evaluó el contenido relativo de agua y el ajuste osmótico. Además fueron analizados parámetros bioquímicos a nivel metabólico y transcripcional relacionados a las vías metabólicas que involucran osmolitos compatibles.

El Contenido Relativo de Agua (CRA) de un tejido vegetal, expresa la cantidad de agua, en porcentaje, respecto del total de agua que dicho tejido puede acumular permitiendo conocer su estado hídrico (Placide et al., 2012). En la **Figura 1** se observan los cambios en el CRA de las raíces sometidas a un déficit hídrico progresivo. A medida que el estrés progresó el CRA se redujo, mostrando una reducción significativa recién en el estrés intenso (-2MPa), en el cual alcanza su valor más bajo (53,8%). Se sabe, que uno de los mecanismos que permite mantener éste contenido de agua celular es el ajuste osmótico (AO) (Nahar et al., 2016).

En este sentido, se halló que el AO aumenta en el tejido radicular a medida que progresa el estrés (**Figura 2**), observándose diferencias significativas ya en condiciones de estrés leve (-1 MPa) y llegando a -0,83 MPa para el estrés intenso. Del análisis conjunto de las modificaciones en CRA y AO, podemos observar que el ajuste osmótico realizado por el sistema radicular en el estrés leve es suficiente para mantener el CRA sin cambios significativos. Por otro lado, si bien el AO se incrementa fuertemente en el estrés intenso, este ajuste solo basta para mantener al CRA por encima de 50%. El grupo de trabajo ha encontrado que este valor de CRA es suficiente para que el sistema radicular de *I. paraguariensis* mantenga su crecimiento durante el estrés hídrico (datos sin publicar).

Con el objetivo de indagar qué metabolitos podrían ser los responsables del ajuste osmótico observado, se propuso evaluar el contenido de almidón y azúcares solubles en condiciones de buen riego y de déficit hídrico, los resultados se presentan en la **Figura 3**. Se halló un descenso significativo en el contenido de almidón desde $61,4 \pm 1,6 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$ en las raíces no estresadas hasta $48,8 \pm 1,43 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$ en las raíces estresadas por sequía (**Figura 3a**). Esto indicaría un consumo de las reservas del tejido

radical en condiciones de estrés, probablemente debido a una disminución del transporte de azúcares desde la parte aérea de la planta por inhibición de la fotosíntesis debido al estrés hídrico, para su utilización en la generación de compuestos osmóticamente activos (Hasibeder et al., 2015). Al mismo tiempo, el contenido de azúcares solubles se incrementó también significativamente más de 2 veces en la situación de déficit hídrico con relación al tratamiento bien irrigado (**Figura 3b**).

Para comprender con mayor detalle este incremento en el contenido de azúcares solubles se analizaron los azúcares libres mayoritarios en tejidos vegetales. En la **Figura 4** se muestran las variaciones detectadas en el contenido de Sac, Glc y Fru a medida que progresa el déficit hídrico del suelo. Se observó una clara tendencia al aumento de los tres azúcares en respuesta al déficit hídrico. En el tratamiento sometido a un potencial hídrico del suelo de -3MPa, el contenido de Fru aumentó 2,5 veces, mientras que Glc y Sac presentaron un incremento superior a 1,5 veces con respecto al tratamiento control. En el tratamiento de rehidratación el contenido de los mismos fue similar al tratamiento control, observándose una recuperación en los contenidos de azúcares luego de las 72 h de irrigación. Este comportamiento, coincide con lo reportado para raíces de otras especies leñosas en condiciones de estrés osmótico como *Populus tremuloides* (Galvez et al., 2013) y *Fagus sylvatica* (Zang et al., 2014).

Un metabolito con propiedades osmoprotectoras ampliamente descrito es el aminoácido prolina (Farooq et al., 2017). Al evaluar el contenido de prolina en raíces de yerba mate, el método propuesto no ha detectado niveles medibles del aminoácido, ya sea en las condiciones control como en las estresadas. Esto concuerda con la bibliografía que señala que el aminoácido prolina no sería uno de los osmolitos más abundantes en raíces de plantas leñosas (Brunner et al., 2015).

5.2 Estudios de expresión génica

Los cambios fisiológicos y bioquímicos observados como respuesta de un tejido a una situación de estrés se hallan estrechamente vinculados al genotipo y su capacidad de respuesta a los estímulos ambientales (Buchanan et al., 2015). Con el objetivo de relacionar los hallazgos metabólicos antes descriptos con la expresión génica de este clon de yerba mate, se estudiaron a nivel transcripcional los cambios en las principales vías metabólicas que involucran a osmolitos compatibles de origen glucídico durante el estrés hídrico en el clon SI-49 de yerba mate.

En respuesta al estrés, en el metabolismo de sacarosa y almidón (**Figura 6**) se observó una represión de los transcritos que codifican para las enzimas hexoquinasas (HxK3, HxK1) y fructoquinasas (pfkBs-like), las que catalizan la conversión de glucosa a Glc-6-P y Fru-6-P, respectivamente. Además, los transcritos que codifican para las enzimas A/N-INVH (invertasas alcalinas/neutras) involucradas en la degradación de Sac, principalmente a Glc y Fru, se hallan inducidos. Es decir que a nivel transcripcional, durante el estrés hídrico, se favorece la obtención de Glc y Fru a partir de Sac, y se inhibe la conversión de éstas a sus formas fosforiladas. Esto explicaría el aumento observado a nivel metabólico durante las condiciones de déficit hídrico de los

dos monosacáridos, los que podrían comportarse como osmolitos compatibles (Singh et al., 2015).

En cuanto a la síntesis de almidón, aparentemente la primera etapa estaría inhibida a nivel génico ya que los transcritos de ADP-GlcPPases (ADP glucosa pirofosforilasas) se hallan disminuidos. Resultados que también se hallan en concordancia con el hecho que en una situación de déficit hídrico, no se estaría acumulando la Glc como almidón (reserva) sino destinándola al ajuste osmótico y crecimiento radicular.

Por otro lado, las siguientes dos etapas en la síntesis de almidón se hallarían estimuladas, ya que se observa una inducción de los genes correspondientes a GBSSI (Sintasa ligada a los gránulos de almidón I), SSI y SSIII (Sintasas de almidón I y III) y GBE1 (enzima α -1,4-glucano ramificante). Se ha descrito que la transcripción de las enzimas GBSS poseen regulación positiva de la transcripción por la presencia de sacarosa (Todaka et al., 2017; Wang et al., 2001), por lo que la inducción observada en estos transcritos podría deberse al aumento hallado del contenido de sacarosa, y no a una necesidad celular de sintetizar almidón como reserva. En este mismo sentido, la degradación del almidón a glucosa1-P y maltosa a través de las enzimas PHS1 (α -glucano fosforilasa) y BYM3 (β -amilasa 3) estaría estimulada. Al respecto, Zeeman y col. (2004) han reportado que PHS1 no es necesaria para la degradación del almidón en condiciones óptimas de crecimiento, pero que juega un papel importante en la capacidad para soportar déficits hídricos transitorios en *Arabidopsis thaliana*. Estos hallazgos concuerdan con la disminución observada en el contenido de almidón en respuesta a la sequía en raíces de *I. paraguariensis* (**Figura 3a**) y también descrita en otras especies leñosas como *Pinus radiata*, *Eucalyptus smithii* (Mitchell et al., 2013) y *Picea abies* (Hartmann et al., 2013).

Avanzando con los estudios de carbohidratos con función osmoprotectora, se estudió el metabolismo de la rafinosa y trehalosa, pertenecientes a los OFRs (oligosacáridos de la familia de la rafinosa) descritos en numerosos trabajos como glúcidos que participan en el ajuste osmótico de plantas superiores (Nishizawa et al., 2008; Rasheed, Bashir, Matsui, Tanaka, & Seki, 2016; Sengupta et al., 2015). A través del software MapMan, se halló que los genes implicados en la biosíntesis de galactinol (*GolS4/GolS2*) y rafinosa (*RS*) se vieron inducidos en el tratamiento sometido a sequía. Los transcritos codificantes para *GolS2* y *GolS4* se encuentran aumentados en raíces estresadas en niveles que varían de 6 a 12 veces respecto de las raíces control, mientras que los transcritos que codifican para *RS* se hallaron inducidos hasta 3 veces respecto del control. Estos indicios podrían indicar que tanto galactinol como rafinosa podrían ser glúcidos importantes como osmoprotectores en raíces de yerba mate.

También, mediante el análisis con el software KEGG, se encontraron inducidos dos genes que codifican para enzimas involucradas en la obtención de trehalosa libre intracelular (**Figura 7**), metabolito ampliamente documentado Glc o como osmolito compatible en vegetales (Asaf et al., 2017; Gupta & Huang, 2014).

Esto indicaría que en raíces del clon SI-49 de yerba mate el ajuste osmótico observado en respuesta al descenso del contenido de agua del suelo, estaría realizado

por un pool de metabolitos de origen glucídico como ser Glc, Fru y Sac, sumados a la potencial contribución de oligosacáridos de la familia de la rafinosa y trehalosa, mientras que el osmolito aminoacídico prolina no estaría involucrado en el ajuste osmótico de raíces de yerba mate.

6 CONCLUSIONES

✓ Los cambios observados en el Ajuste Osmótico de raíces del clon SI-49 de *I. paraguariensis* frente a un descenso del potencial hídrico del suelo serían los responsables de mantener el estatus hídrico del tejido, lo que se ve reflejado en el CRA del tejido radical en condiciones de sequía.

✓ Estos ajustes pueden ser llevados a cabo mediante procesos bioquímicos, que se hallan regulados a nivel genético. Así, el metabolismo de la sacarosa y el almidón se hallan modulados de manera tal de aumentar el contenido de los azúcares solubles mayoritarios, ampliamente descritos como osmoprotectores, a expensas de una disminución en las reservas de almidón del tejido radical.

✓ El aminoácido prolina parecería no estar involucrados en el Ajuste Osmótico radical ya que no se hallaron evidencias mensurables de su presencia en ninguno de los dos tratamientos.

✓ Los glúcidos pertenecientes a la familia de la rafinosa y el disacárido trehalosa parecerían desempeñar un rol importante en la respuesta a la sequía del tejido radical de yerba mate según la evidencia a nivel transcripcional, si bien son necesarios más estudios a nivel metabólico para confirmar su rol como osmolitos compatibles en tejido radical de la especie en estudio.

7 TABLAS Y FIGURAS

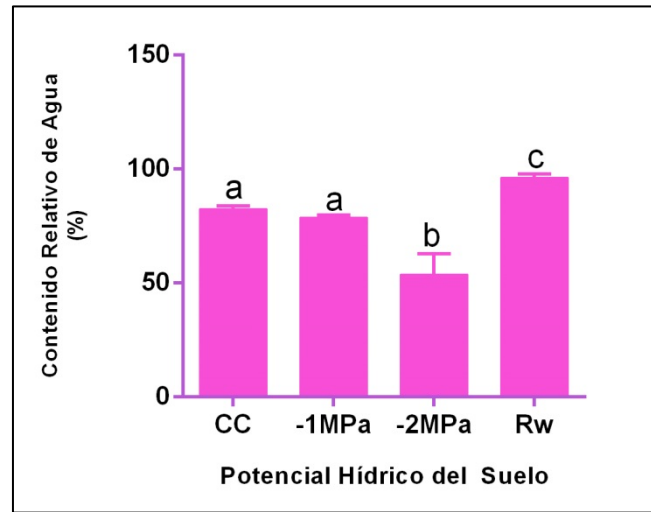


Figura 1: Contenido Relativo de Agua (CRA) del tejido radical proveniente de plantas de *I. paraguariensis* clon SI-49 expuestas a diferentes niveles de escasez hídrica del suelo. Las barras señaladas con letras diferentes indican diferencias significativas entre sí según la prueba de Dunnett ($P < 0,05$).

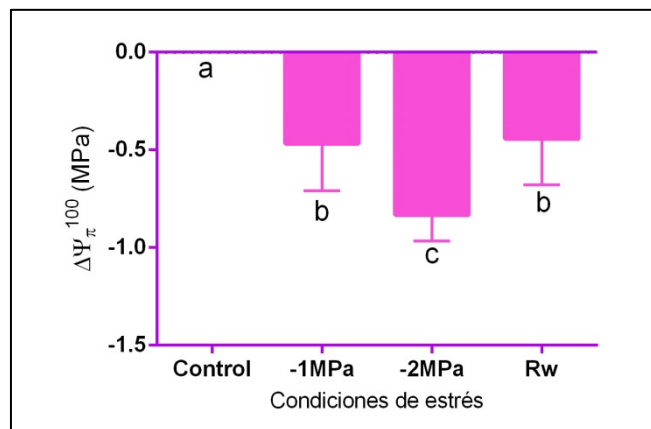


Figura 2: Ajuste Osmótico ($\Delta\Psi_{\pi}^{100}$) en raíces de plantas de *I. paraguariensis* clon SI-49 expuestas a diferentes niveles de escasez hídrica del suelo. Barras con letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Dunnett ($P < 0,05$). Rw: tratamiento rehidratación ($\Psi_{\text{suelo}} \approx -0,04$ MPa).

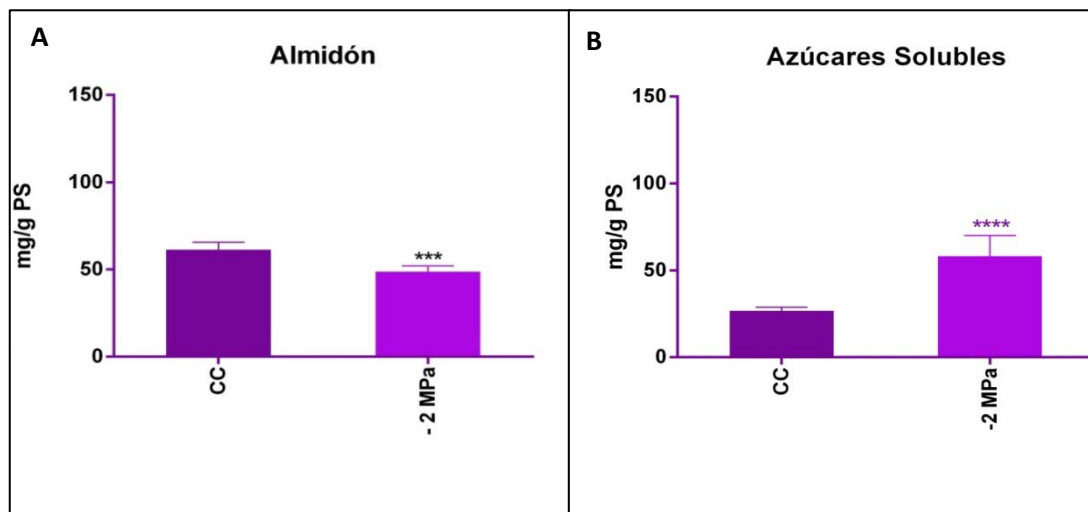


Figura 3: Variación en el contenido de almidón (A) y azúcares solubles (B) en raíces de plantas de *I. paraguariensis* sometidas a estrés por déficit hídrico y condiciones de control. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al tratamiento control según la prueba *t* de Student ($p < 0.01$). CC: tratamiento control ($\Psi_{\text{suelo}} \approx -0,04$ MPa); Rw: tratamiento rehidratación ($\Psi_{\text{suelo}} \approx -0,04$ MPa).

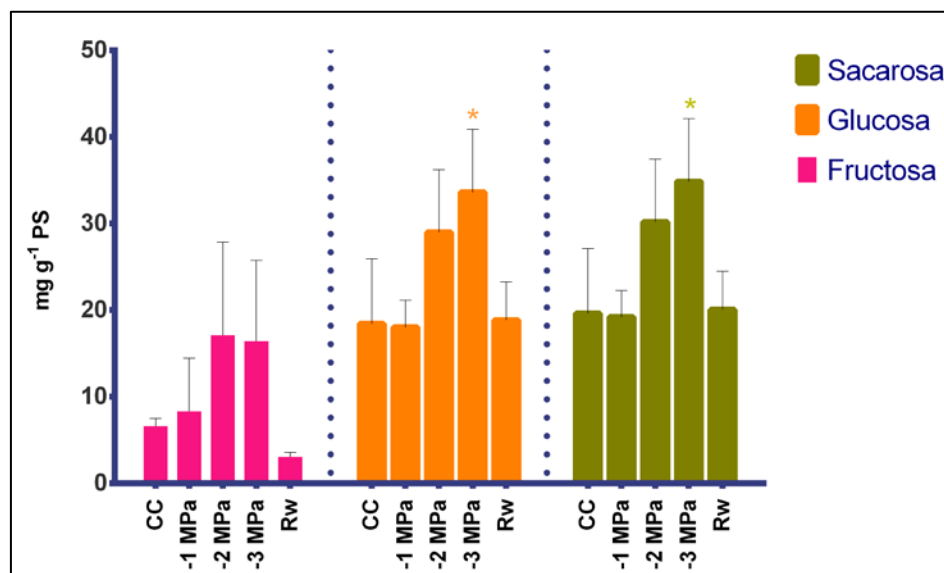


Figura 4: Variaciones en el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en raíces de plantas de *I. paraguariensis* clon SI-49 sometidas a déficit hídrico progresivo, con un tratamiento final de rehidratación. Los asteriscos indican medias que difieren significativamente respecto de su control según la prueba de Dunnett ($P < 0,05$). CC: tratamiento control ($\Psi_{\text{suelo}} \approx -0,04$ MPa); Rw: tratamiento rehidratación ($\Psi_{\text{suelo}} \approx -0,04$ MPa).

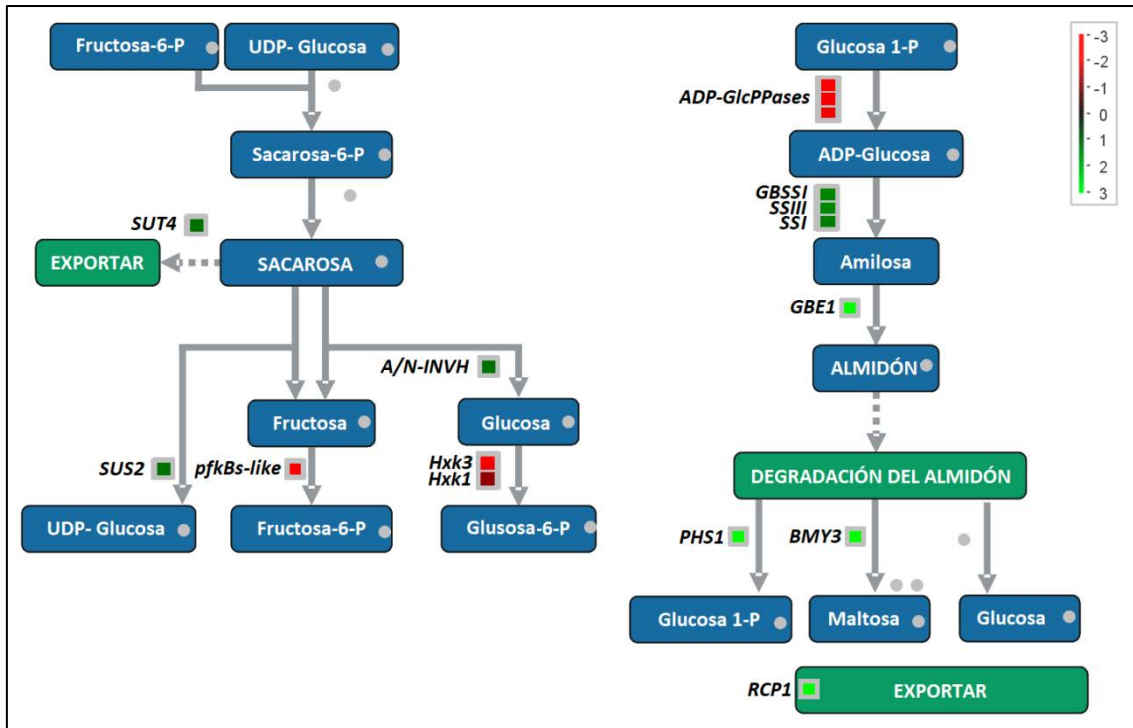


Figura 5: Rutas principales del metabolismo primario de sacarosa y almidón, obtenidas con el software MapMan. Los cuadros verdes representan a transcritos que se hallan estimulados en condiciones de estrés por sequía, mientras que los rojos representan transcritos cuya expresión ha disminuido. La intensidad del color se corresponde con el valor del log₂FC.

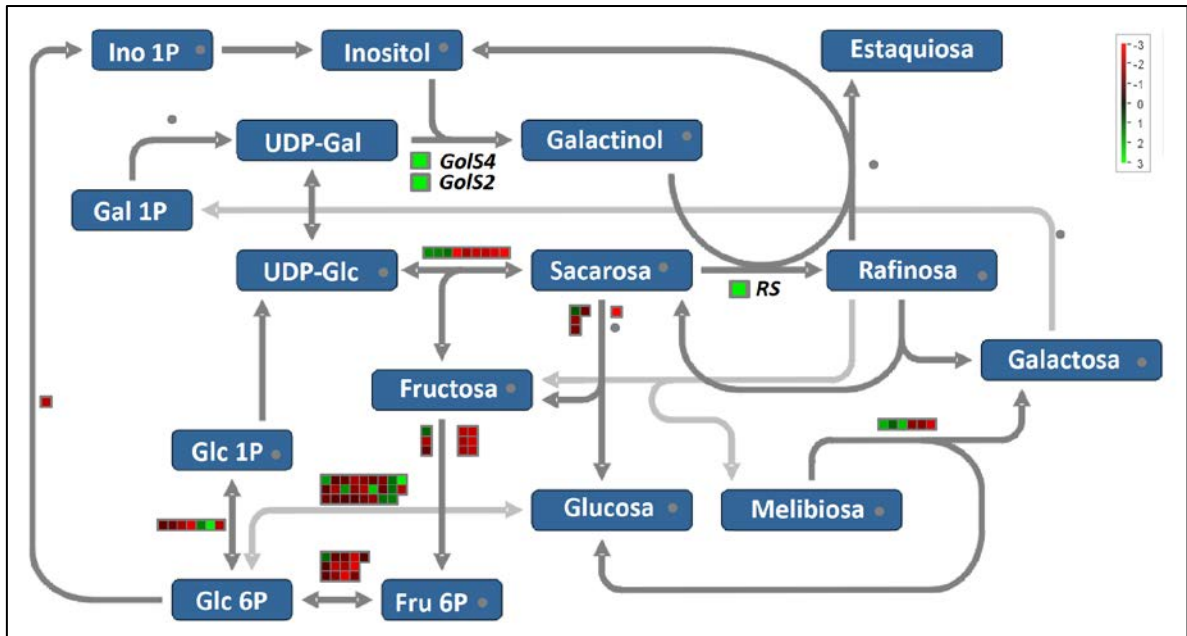


Figura 6: Ruta principal del metabolismo de los Oligosacáridos de la Familia de la rafinosa obtenidas con el software MapMan. Los cuadros verdes representan a transcritos que se hallan estimulados en condiciones de estrés por sequía, mientras que los rojos transcritos cuya expresión ha disminuido. La intensidad del color se corresponde con el valor del log₂FC.

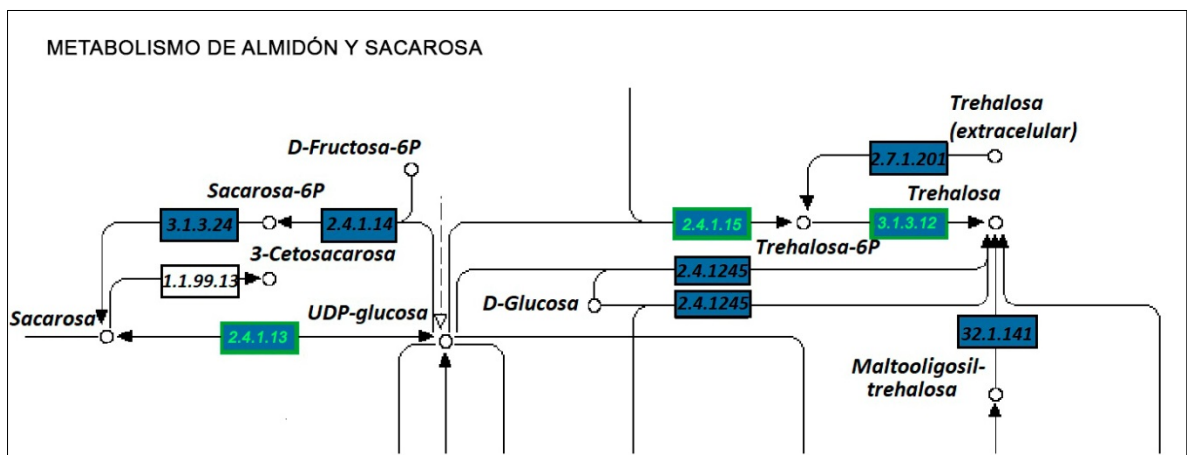


Figura 7: Se visualiza una sección de la Categoría metabolismo de almidón y sacarosa obtenida mediante KEEG Methabolic Phathway. Las cajas señaladas con verde representan a transcritos que se hallan estimulados en condiciones de estrés por sequía.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, R. M., Maiale, S. J., Pessino, S. C., Bottini, R., Ruiz, O. A., & Sansberro, P. A. (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. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.12.016>
- Akinci, Ş., & Lösel, D. M. (2012). Plant water-stress response mechanisms. In *Water stress*. InTech.
- Asaf, S., Khan, A. L., Khan, M. A., Imran, Q. M., Yun, B.-W., & Lee, I.-J. (2017). Osmoprotective functions conferred to soybean plants via inoculation with *Sphingomonas* sp. LK11 and exogenous trehalose. *Microbiological Research*, 205, 135–145.
- Bracesco, N., Sanchez, A. G., Contreras, V., Menini, T., & Gugliucci, A. (2011). Recent advances on *Ilex paraguariensis* research : Minireview. *Journal of Ethnopharmacology*, 136(3), 378–384. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.032>
- Bray, E. A. (2000). Responses to abiotic stresses. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 1158–1203.
- Brunner, I., Herzog, C., Dawes, M. A., Arend, M., & Sperisen, C. (2015). How tree roots respond to drought, 6(July). <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00547>
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., & Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought - From genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30(3), 239–264. <http://doi.org/10.1071/FP02076>
- Farooq, M., Nawaz, A., Chaudhry, M. A. M., Indrasti, R., & Rehman, A. (2017). Improving resistance against terminal drought in bread wheat by exogenous application of proline and gamma-aminobutyric acid. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 203(6), 464–472.
- Galvez, D. A., Landhäusser, S. M., & Tyree, M. T. (2013). Low root reserve accumulation during drought may lead to winter mortality in poplar seedlings. *New Phytologist*, 198(1), 139–148.
- Ghosh, D., & Xu, J. (2014). Abiotic stress responses in plant roots: a proteomics perspective. *Frontiers in Plant Science*, 5.
- Gupta, B., & Huang, B. (2014). Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *International Journal of Genomics*, 2014, 701596. <http://doi.org/10.1155/2014/701596>
- Hartmann, H., Ziegler, W., Kolle, O., & Trumbore, S. (2013). Thirst beats hunger—declining hydration during drought prevents carbon starvation in Norway spruce saplings. *New Phytologist*, 200(2), 340–349.
- Hasibeder, R., Fuchslueger, L., Richter, A., & Bahn, M. (2015). Summer drought alters carbon allocation to roots and root respiration in mountain grassland. *New Phytologist*, 205(3), 1117–1127.
- Heck, C. I., & De Mejia, E. G. (2007). Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive

- review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*, 72(9). <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30.
- Lende, S. G. (2016). Agricultura , agroindustria y territorio : crisis y reestructuración del circuito de la yerba-mate en la provincia de Misiones (Argentina) 1990-2014 e território : crise e reestruturação do circuito da erva-mate na província de Missões (Argentina) *Agr*, 25(1), 45–63. <http://doi.org/10.15446/rcdg.v25n1.44288>
- Li, S., Bai, X., Dong, M., Li, N., & Li, T. (2014). Rapid Simultaneous Analysis for Three Sugars Fraction in Enzymatic Degradation of Stachyose, 6(8), 951–955.
- Loewus, F. A. (1952). Improvement in anthrone method for determination of carbohydrates. *Analytical Chemistry*, 24(1), 219.
- Lohse, M., Nagel, A., Herter, T., May, P., Schroda, M., Zrenner, R., ... Usadel, B. (2014). Mercator: a fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data. *Plant, Cell & Environment*, 37(5), 1250–1258.
- López, P. C. C. (2017). Regulación diferencial del metabolismo de MRNAS por los complejos LSM en la tolerancia a estreses abióticos en *Arabidopsis thaliana*. Universidad Complutense de Madrid.
- Magné, C., & Larher, F. (1992). High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Analytical Biochemistry*, 200(1), 115–118.
- Marron, N., Delay, D., Petit, J.-M., Dreyer, E., Kahlem, G., Delmotte, F. M., & Brignolas, F. (2002). Physiological traits of two *Populus x euramericana* clones, Luisa Avanzo and Dorskamp, during a water stress and re-watering cycle. *Tree Physiology*, 22(12), 849–858. <http://doi.org/10.1093/treephys/22.12.849>
- Mitchell, P. J., O’Grady, A. P., Tissue, D. T., White, D. A., Ottenschlaeger, M. L., & Pinkard, E. A. (2013). Drought response strategies define the relative contributions of hydraulic dysfunction and carbohydrate depletion during tree mortality. *New Phytologist*, 197(3), 862–872.
- Munns, R., & Cramer, G. R. (1996). Is coordination of leaf and root growth mediated by abscisic acid? Opinion. *Plant and Soil*, 185(1), 33–49.
- Nahar, K., Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. (2016). Roles of osmolytes in plant adaptation to drought and salinity. In *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies* (pp. 37–68). Springer.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y., & Shigeoka, S. (2008). Galactinol and Raffinose Constitute a Novel Function to Protect Plants from Oxidative Damage. *Plant Physiology*, 147(3), 1251–1263. <http://doi.org/10.1104/pp.108.122465>
- Oliveira, S. V. de. (2014). Arranjos de coordenação em cadeias produtivas agroindustriais: contribuições analíticas com base na abordagem fuzzy.
- Placide, R., Christian, C. S., & Rony, S. (2012). Development of in vitro technique to screen for drought tolerant banana varieties by sorbitol induced osmotic stress. *African Journal of Plant Science*, 6(15), 16–425.
- Rasheed, S., Bashir, K., Matsui, A., Tanaka, M., & Seki, M. (2016). Transcriptomic Analysis of

- Soil-Grown *Arabidopsis thaliana* Roots and Shoots in Response to a Drought Stress. *Frontiers in Plant Science*, 7(February). <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.00180>
- Recchia, G. H., Caldas, D. G. G., Beraldo, A. L. A., da Silva, M. J., & Tsai, S. M. (2013). Transcriptional analysis of drought-induced genes in the roots of a tolerant genotype of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 7155–7179. <http://doi.org/10.3390/ijms14047155>
- Rodríguez, L. R. (2015). State and agrarian production. Yerba mate's plantations in national territory of Misiones, Argentina (1926 - 1953), 43–64.
- Sansberro, P. A., Mroginski, L. A., & Bottini, R. (2004). Foliar sprays with ABA promote growth of *Ilex paraguariensis* by alleviating diurnal water stress. *Plant Growth Regulation*, 42(2), 105–111. <http://doi.org/10.1023/B:GROW.0000017476.12491.02>
- Sengupta, S., Mukherjee, S., Basak, P., & Majumder, A. L. (2015). Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6(August), 1–11. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00656>
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Jaleel, C. A., & Zhao, C. X. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus - Biologies*, 331(3), 215–225. <http://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.01.002>
- Singh, M., Kumar, J., & Singh, S. (2015). Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants : a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. <http://doi.org/10.1007/s11157-015-9372-8>
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., ... Stitt, M. (2004). mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal*, 37(6), 914–939.
- Todaka, D., Zhao, Y., Yoshida, T., Kudo, M., Kidokoro, S., Mizoi, J., ... Sakakibara, H. (2017). Temporal and spatial changes in gene expression, metabolite accumulation and phytohormone content in rice seedlings grown under drought stress conditions. *The Plant Journal*, 90(1), 61–78.
- Wang, S.-J., Yeh, K.-W., & Tsai, C.-Y. (2001). Regulation of starch granule-bound starch synthase I gene expression by circadian clock and sucrose in the source tissue of sweet potato. *Plant Science*, 161(4), 635–644. [http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00449-6](http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00449-6)
- Zang, U., Goisser, M., Häberle, K., Matyssek, R., Matzner, E., & Borken, W. (2014). Effects of drought stress on photosynthesis, rhizosphere respiration, and fine-root characteristics of beech saplings: A rhizotron field study. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 177(2), 168–177.
- Zeeman, S. C., Thorncroft, D., Schupp, N., Chapple, A., Weck, M., Dunstan, H., ... Smith, S. M. (2004). Plastidial α -glucan phosphorylase is not required for starch degradation in *Arabidopsis* leaves but has a role in the tolerance of abiotic stress. *Plant Physiology*, 135(2), 849–858.