



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**EFECTO DEL DÉFICIT HÍDRICO EN LA
ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA Y EL ESTADO
HÍDRICO DE CLONES COMERCIALES DE
EUCALYPTUS GRANDIS E HÍBRIDOS
INTERESPECÍFICOS**

Matías NIÓN PERDOMO

Magíster en Ciencias Agrarias
Opción Ciencias Vegetales

Julio 2022

**EFFECTO DEL DÉFICIT HÍDRICO EN LA
ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA Y EL ESTADO
HÍDRICO DE CLONES COMERCIALES DE
EUCALYPTUS GRANDIS E HÍBRIDOS
INTERESPECÍFICOS**

Matías NIÓN PERDOMO

Magíster en Ciencias Agrarias
Opción Ciencias Vegetales

Julio 2022

Tesis aprobada por el tribunal integrado por el Ing. Agr. Dr. Jaime González Tálice, Ing. Agr. Dr. Omar Borsani, y el Ing. Agr. MSc. Juan Pedro Posse el 22 de julio de 2022. Autor: Ing. Agr. Matías Nión Perdomo. Director Ing. Agr. MSc. Luis Viega

AGRADECIMIENTOS

A mis familiares y amigos, en particular a Guido Patteta, Gabriela Álvarez, Mirna Contreras, Inés Rebollo, Franco de Benedetti, Joaquina Beltrán, Lucas Manera, Sofía Ramos y Nicolás Echeverría por su apoyo y aliento incondicional a lo largo del proceso.

A mi tutor Luis Viega y a Gastón Quero por darme herramientas y oportunidades, no solo a para llevar adelante el trabajo, sino que también para crecer en esto de hacer ciencia.

Al equipo del Laboratorio de Fisiología Vegetal de Facultad de Agronomía: Silvia Ross, José Gándara, Nicolás Glison, Nicolás Mastandrea y Yolanda Fernández, por todas sus colaboraciones e instancias de intercambio. Aprendí mucho con todos ellos.

A los Laboratorios de Bioquímica y de Botánica de Facultad de Agronomía, especialmente a Martha Sainz y Mercedes Souza por su colaboración con las actividades de medición y por su aliento constante.

A la Empresa Forestal Lumin SA por la posibilidad de llevar a cabo este trabajo de investigación al brindar todos los materiales necesarios para ejecutarlo.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y a Comisión Académica de Posgrado (CAP) por brindar la financiación necesaria para realizar el posgrado.

Con mucho cariño y agradecimiento, les dedico este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
TABLA DE CONTENIDO.....	IV
RESUMEN	VI
SUMMARY.	VII
TABLA DE CONTENIDO.....	IV
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	8
1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO FOTOSINTÉTICO	9
1.1.1 <u>Fluorescencia de clorofilas</u>	10
1.1.2 <u>Pigmentos fotosintéticos</u>	13
1.1.3 <u>Tasa de asimilación neta</u>	14
1.2 EFECTOS DEL DÉFICIT HÍDRICO SOBRE LA FOTOSÍNTESIS.....	14
1.3 RESPUESTAS DE LOS EUCALIPTOS ANTE EL DÉFICIT HÍDRICO	17
1.4 EFECTO DE LA TEMPERATURA, COMBINACIÓN CON ESTRÉS HÍDRICO	19
1.5 VARIACIÓN ESTACIONAL DE LAS RESPUESTAS.....	22
1.6 HIPÓTESIS DEL TRABAJO.....	23
1.7 OBJETIVOS	23
1.7.1 <u>Objetivo general</u>	23
1.7.2 <u>Objetivos específicos</u>	23
2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	24
2.1 MATERIAL VEGETAL Y SITIO	24
2.2 DEFINICIÓN DE TRATAMIENTOS	24
2.3 DETERMINACIÓN DE CONSUMO DE AGUA.....	27
2.4 FLUORESCENCIA DE CLOROFILAS Y PARTICIÓN DE LA ENERGÍA	27
2.5 TASA DE ASIMILACIÓN NETA Y CONDUCTANCIA	28

2.6 CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS.....	29
2.7 CRECIMIENTO	29
2.8 ANÁLISIS DE DATOS	30
3. <u>RESULTADOS</u>	32
3.1 ESTABLECIMIENTO DEL TRATAMIENTO: SUMINISTRO	32
3.2 CONDICIONES AMBIENTALES.....	33
3.3 CONSUMO Y CONDUCTANCIA	34
3.4 CRECIMIENTO	36
3.5 TASA DE ASIMILACIÓN NETA	37
3.6 FASE FOTOQUÍMICA	38
3.7 PIGMENTOS.....	40
4. <u>DISCUSIÓN</u>	43
4.1 CONDICIONES AMBIENTALES E HÍDRICAS.....	43
4.2 ASIMILACIÓN NETA Y CONDUCTANCIA.....	44
4.3 FASE FOTOQUÍMICA	46
4.4 PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS	47
4.5 EFECTO DEL DÉFICIT EN CONTEXTO DE ALTA TEMPERATURA	48
4.6 DÉFICIT HÍDRICO Y CRECIMIENTO	50
5. <u>CONCLUSIONES</u>	52
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	53
7. <u>ANEXOS</u>	62

RESUMEN

En Uruguay hay más de un millón de hectáreas forestadas y predominan especies de eucalipto. Los eventos de sequía y elevadas temperaturas son más frecuentes y afectan el crecimiento al inicio del cultivo. Así, surge la necesidad de analizar los efectos que generan dichos eventos sobre procesos que determinan el crecimiento, como la fotosíntesis. Se analizó el efecto del déficit hídrico sobre parámetros fotosintéticos en clones de *E. grandis* (g1 y g2) e híbridos colorados (gc y gt) en condiciones de invernáculo a altas temperaturas. Los clones fueron evaluados bajo dos condiciones hídricas en función del potencial mátrico del suelo, a lo largo del experimento. La condición control tuvo un valor de -0,15 MPa y la déficit, de -0,30 MPa. A los 38 y 144 días de la suspensión de riego, se midió la tasa de asimilación neta, la fluorescencia y el contenido de clorofila y carotenos. En el primer momento g1 mantuvo la tasa de asimilación neta y las conductancias entre condiciones. Sin embargo, a pesar de presentar menor conductancia en la condición déficit, los clones g2 y gc mantuvieron la tasa de asimilación, mientras que gt la incrementó. Los pigmentos y la partición de energía no se modificaron. En el segundo momento g1 presentó limitantes estomáticas en la tasa de asimilación en condición déficit. El contenido de pigmentos y los resultados de fluorescencia pueden explicar la menor tasa de asimilación de los demás clones en la condición control. Se discute el efecto antagónico entre el déficit hídrico y las temperaturas elevadas para explicar los resultados.

Palabras clave: eucalyptus, híbridos con colorado, fotosíntesis, déficit hídrico, elevadas temperaturas

EFFECT OF WATER DEFICIT ON PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY AND WATER STATUS OF COMMERCIAL CLONES OF EUCALIPTUS GRANDIS AND INTERSPECIFIC HYBRIDS

SUMMARY

More than a million hectares are forested in Uruguay, and Eucalyptus species predominate. Drought and high temperature are frequent events that affect plant growth, particularly at the early stages of the crop. The need arises to analyze their effects on processes that determine plant growth, such as photosynthesis. The work aims to analyze the effect of water deficit on photosynthetic parameters in clones of *E. grandis* (g1 and g2) and Red-Gum hybrids (*E. camaldulensis*, gc, and *E. tereticornis*, gt) under greenhouse at high-temperature conditions. Two treatments were imposed based on the soil matric potential; control averaged -0.15 MPa and deficit treatment -0.30 MPa. At 38 and 144 days after irrigation suspension, net assimilation rate, fluorescence, chlorophyll and carotene content were measured. On day 38, g1 maintained the net assimilation rate with no difference in stomatal conductance among treatments. Although g2, gc and gt had lower conductance under water deficit, g2 and gc maintained their assimilation rate, but gt showed an increase. Pigment content and energy partition were not modified significantly. On day 144 under deficit conditions, g1 had a high stomatal regulation that evidenced limitations in CO₂ assimilation. Pigment content and chlorophyll fluorescence results may explain the differences under control conditions in the assimilation rate of g2, gc, and gt. The antagonistic effects between water deficit and high temperatures are discussed, to explain the results.

Keywords: *eucalyptus*, red gum hybrid, photosynthesis, drought, heat

1. INTRODUCCIÓN

Los eucaliptos componen un género dentro de la familia Myrtaceae para el que se identifican 747 especies, la gran mayoría de origen australiano (Rejmánek y Richardson, 2011). La diversidad de ambientes en los que habitan determina su gran capacidad adaptativa, razón por la que su cultivo se ha expandido a varias regiones, incluyendo zonas áridas (Saadaoui et al., 2017). A su vez, la aptitud de la madera admite la obtención de gran cantidad de productos de calidad, lo que ha favorecido aún más el incremento de la superficie cultivada en el mundo (Brussa, 1994, Booth, 2013).

En Uruguay existen más de un millón de hectáreas forestadas en las que predominan diferentes especies de eucaliptos, lo que representa, aproximadamente, un 7 % del total de la superficie productiva. La madera se destina principalmente a la producción de pasta de celulosa y, en menor medida, a la elaboración de tableros. Las especies predominantes son *E. grandis* y *E. dunnii* (Martín, 2020). Si bien el uso de híbridos es reducido, en la actualidad se evalúa su cultivo con el fin de tener materiales más adaptados (Wingfield et al., 2013) y que presenten mejoras productivas.

En la región los eventos de sequía asociados a elevadas temperaturas son cada vez más frecuentes y esto afecta el crecimiento de los rodales (Mata et al., 2001, Linderman et al., 2013), principalmente en las etapas iniciales del cultivo (Guarnaschelli et al., 2012), lo que condiciona la instalación exitosa del rodal. Los efectos del déficit hídrico sobre el crecimiento de un vegetal pueden estudiarse en diferentes escalas de tiempo (Maseda y Fernandez, 2006). Existe suficiente información acerca de los efectos en el corto plazo; sin embargo, poco se sabe acerca de los efectos sostenidos en el tiempo y de las respuestas adaptativas a largo plazo (Zhou et al., 2016). En un cultivo

con tiempos de rotación de hasta 20 años, no solo es importante conocer las respuestas inmediatas, sino también la capacidad de aclimatación.

Por esta razón, es importante identificar clones tolerantes al déficit hídrico y que, al mismo tiempo, mantengan altas tasas de fijación de carbono (Saadaoui et al., 2017). El crecimiento como proceso global depende del intercambio gaseoso y de la capacidad de hacer fotosíntesis. Dado que el estado hídrico limita el potencial máximo de asimilación, es importante conocer cómo este influye los procesos que definen el crecimiento, lo que, a su vez, da lugar a identificar posibles marcadores morfológicos, funcionales y/o bioquímicos de tolerancia que faciliten los procesos de selección temprana (Bedon et al., 2011, Reis et al., 2021).

El objetivo general del trabajo fue caracterizar la actividad fotosintética en función del déficit hídrico mantenido en el tiempo, en plantines de clones comerciales de eucalipto crecidos en condiciones de invernáculo con altas temperaturas.

1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO FOTOSINTÉTICO

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual las plantas utilizan la energía lumínica para la síntesis de compuestos orgánicos necesarios para su crecimiento. Las reacciones ocurren en los cloroplastos, específicamente en pliegues membranosos denominados tilacoides, y en la fase acuosa llamada estroma. El proceso consta de dos etapas. La fase fotoquímica, la primera, ocurre en las membranas tilacoidales, donde la energía lumínica es captada por los fotosistemas para la síntesis de ATP y NADPH. En la segunda etapa, denominada fase bioquímica, se utilizan los productos de la primera para fijar el carbono inorgánico presente en el aire a moléculas orgánicas que pueden ser utilizadas en los diferentes procesos celulares. Dicha fijación es llevada a cabo por la enzima rubisco. Esta segunda etapa difiere según el

primer compuesto carbonado estable que se genera, derivándose en metabolismos C3, C4, CAM. Las especies leñosas, como es el caso de los eucaliptos, únicamente presentan metabolismo C3 (Buchanan et al., 2015).

Como consecuencia de la ocurrencia de dos fases, el estudio de la fotosíntesis puede darse en dos instancias. La caracterización de la fase fotoquímica permite saber cómo se administra la radiación absorbida, mientras que, al estudiar la fase bioquímica se conoce la capacidad de fijación de CO₂ por las hojas.

1.1.1. Fluorescencia de clorofilas

Cuando la molécula de clorofila se expone a un flujo de fotones, su estructura se vuelve inestable momentáneamente y, por lo tanto, no es funcional. Es por eso que debe presentar mecanismos que le permitan disipar el exceso de energía hasta retomar su estado basal (Jablonski, 1933). Las vías de atenuación son la emisión de fluorescencia, la transferencia de electrones (proceso fotoquímico) y las disipaciones térmicas (procesos no fotoquímicos), ya sea en forma regulada o no regulada (Schreiber et al., 1995).

La fluorescencia es la luz que emite la molécula de clorofila al ser iluminada, y su intensidad se ve atenuada a causa de la ocurrencia de los otros procesos disipatorios. En este sentido, el modelo propuesto por Butler (1978) sostiene que la emisión de fluorescencia puede ser monitoreada para predecir cambios durante la fase fotoquímica, lo que representa una herramienta muy útil para estudiar el desempeño en la fase (Baker, 2008). La intensidad de la fluorescencia es inversamente proporcional a la fracción de energía utilizada en la fotosíntesis (Kalaji et al., 2017) y, al mismo tiempo, es inversamente proporcional a los cambios en los mecanismos de disipación de calor (Krause y Weis, 1991).

La medición de la fluorescencia mediante el uso del método de pulso de amplitud modulada (PAM) permite conocer los mecanismos de desexcitación de la clorofila de forma simple y no destructiva (Baker, 2008). Cuando se mide la emisión de fluorescencia en el tiempo, aplicando diferentes fuentes de excitación como pulsos saturantes y luz rojo lejano, se puede realizar el análisis de *quenching* seguido por el análisis de relajación en oscuridad. El primero brinda información acerca del funcionamiento del aparato fotoquímico al exponerlo a luz actínica saturante, mientras que el segundo muestra la capacidad de recuperación del sistema y permite distinguir subparámetros de la disipación térmica regulada (Quick y Stitt, 1989, Kasajima et al., 2009).

Durante el análisis de *quenching* se utilizan dos fuentes de luz: una que estimula la fotosíntesis y otra en forma de pulsos que promueve la emisión de fluorescencia. La que estimula la fotosíntesis es luz actínica aplicada en forma continua. Los pulsos solo cuantifican fluorescencia, pero no estimulan fotosíntesis y permiten conocer el estado redox de los componentes de la cadena de transferencia con luz actínica de fondo (Bradbury y Baker, 1981).

La medición realizada de esta forma permite la obtención de valores de intensidad de fluorescencia, necesarios para el cálculo de los parámetros de la partición de la energía de la fase fotoquímica (figura 1) (Quero et al., 2019). La intensidad de cada uno de los procesos disipatorios puede ser calculada en términos de constantes o de rendimientos cuánticos. Los rendimientos cuánticos expresan la fracción de la energía destinada a cada uno de los procesos disipatorios y la suma de todos da como resultado el 100 % de la energía absorbida (Lazár, 2015).

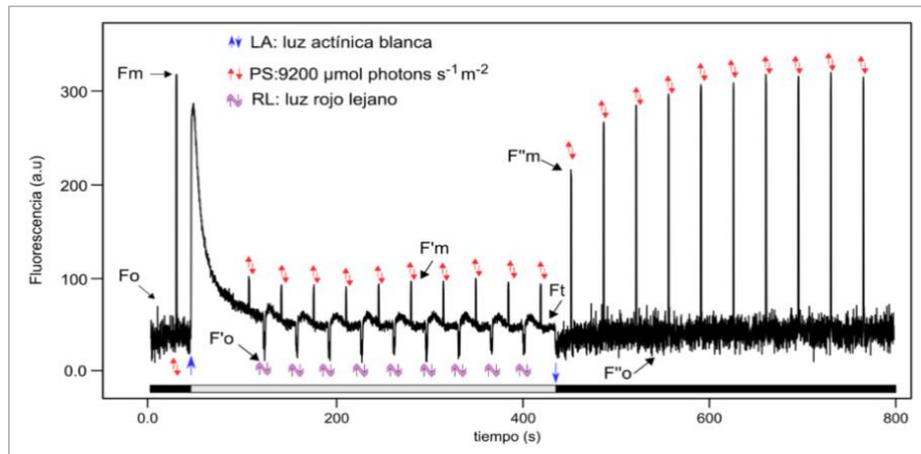


Figura 1: ejemplo de firma de fluorescencia. La barra negra de la parte inferior indica la luz actínica apagada. La barra gris se corresponde con el análisis de *quenching* y la segunda barra negra, con el análisis de relajación. Flechas hacia arriba y abajo indican encendido y apagado de luz actínica (LA), pulsos saturantes (PS) y rojo lejano (RL). F_o , $F'o$ y $F''o$, fluorescencia mínima en oscuridad, en luz y en recuperación respectivamente. F_m , $F'm$, $F''m$ fluorescencia máxima en oscuridad, en análisis quenching y máxima en análisis relajación. F_t , fluorescencia en el momento t .

La partición de la energía es una forma de representar los destinos de la energía absorbida por la clorofila. Cada uno de los parámetros se expresan en términos de rendimiento cuántico, lo que permite una comparación simple entre el desempeño de diferentes individuos. Los parámetros que la componen son Φ_{PSII} , Φ_{NPQ} y Φ_{NO} , y representan la proporción de la energía que es destinada a la transferencia de electrones, a la disipación térmica regulada y a la no regulada, respectivamente (Quero et al., 2019).

La medición de fluorescencia también puede ser utilizada para distinguir entre genotipos tolerantes y susceptibles, ya que la emisión es igual a la proporción no utilizada por el aparato fotosintético (Krause y Weis, 1991), por lo que cualquier variación en ese patrón es indicadora de algún tipo de lesión (Björkman y Powels, 1984).

1.1.2 Pigmentos fotosintéticos

En ambos fotosistemas se identifica una estructura denominada complejo antena, que se compone de un conjunto de clorofilas y carotenoides que captan la energía de la radiación solar y la concentran hacia el centro de reacción. De esta forma, cuando la energía es suficiente, el centro de reacción se oxida y deja disponibles electrones para que ocurra el proceso fotoquímico propiamente dicho. Esta agrupación de pigmentos hace que la captación y transferencia de energía sea más eficiente, ya que varias moléculas de pigmentos absorben radiación en simultáneo y, dada la proximidad entre ellos, se ve favorecido el pasaje de la energía entre sí mediante resonancia (Buchanan et al., 2015, Taiz et al., 2015).

Las clorofilas son moléculas que tienen una estructura compuesta por 5 anillos coordinados, que tienen la capacidad de ceder electrones, y una cola hidrocarbonada que permite su anclaje a las membranas tilacoidales. Las formas más abundantes en plantas son clorofila a y b, siendo la segunda más frecuente que la primera (Blankenship, 2014).

Los carotenoides son moléculas lineales con múltiples dobles enlaces conjugados, que se ubican en los fotosistemas asociados a proteínas junto con las clorofilas. En el proceso de fotosíntesis cumplen dos funciones mayores que se relacionan con la captación de energía y con la fotoprotección o *quenching* no fotoquímico (Blankenship, 2014). Si bien existen varios tipos de carotenos, hay algunos que se encuentran en forma constitutiva: β caroteno, luteína, neoxantina, violaxantina, anteraxantina zeaxantina (Demmig-Adams et al., 1996). Esta última cumple con un rol antioxidante y, además, interviene en la desexcitación de la clorofila cuando es expuesta a exceso de energía (Jahns et al., 2009).

1.1.3. Tasa de asimilación neta

Para conocer el potencial de la fase bioquímica, se puede cuantificar la tasa de asimilación neta (A_n), ya sea en forma puntual o en función de diferentes concentraciones de CO_2 o intensidades de radiación PAR_i . Cada una de ellas brinda información acerca de la capacidad de asimilación por unidad de tiempo y superficie, dada una condición de irradiancia y concentración de CO_2 (Fernández y Gyenge 2010).

En plantas C_3 se espera que la capacidad de asimilación se sature superado un flujo lumínico de $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mientras que al incrementar el CO_2 se espera que la respuesta se vuelva constante a concentraciones que superen más del doble los valores atmosféricos.

Esta etapa puede verse limitada por diferentes razones. Por un lado, una disminución a nivel de la conductancia estomática que limita el suministro de CO_2 . A su vez, problemas en la fase fotoquímica pueden resultar en una menor síntesis de ATP y NADPH, necesarios para la regeneración de la ribulosa (Farquhar y Sharkey, 1982). Estudiar este proceso en relación con los demás permite identificar aquellos puntos del proceso fotosintético que serían limitantes.

En particular, los eucaliptos son capaces de desarrollar altas tasas de fijación de carbono, debido a las altas velocidades de carboxilación y de transferencia de electrones. Sin embargo, los toques no se alcanzan debido a limitaciones nutricionales o hídricas (Whitehead y Beadle, 2004).

1.2. EFECTOS DEL DÉFICIT HÍDRICO SOBRE LA FOTOSÍNTESIS

La fotosíntesis es un proceso que depende del ambiente y en particular el estado hídrico es capaz de limitar el potencial que se puede alcanzar

(Whitehead y Beadle, 2004, Pallardy, 2008). En general, el déficit hídrico, al igual que otros factores de estrés, afecta el metabolismo de las plantas en varios puntos, dando lugar a un desbalance en la generación de especies reactivas del oxígeno, lo que impide el funcionamiento normal y deprime el desempeño en relación con una condición control (Hsiao, 1973).

Los mecanismos con los que cuentan las plantas para afrontar el estrés hídrico son diferentes dependiendo de la duración de este (Maseda y Fernandez, 2006). En el corto plazo la reducción en la tasa de asimilación neta se debe principalmente a factores de tipo estomáticos (Flexas y Medrano, 2002), aunque también ocurren otros no asociados a la conductancia estomática. En el caso de los primeros, la reducción ocurre por una disminución de la conductancia estomática, producto de la síntesis de ABA, lo que limita el suministro de CO₂ (Beardsell y Cohen, 1975). Por otro lado, los efectos de los factores de tipo no estomático se potencian en la medida en que el período de estrés sea prolongado y se relacionan con la disminución en el contenido de ribulosa 1-5 bifosfato, la afectación de la fase fotoquímica, cambios anatómicos que imprimen efecto sobre la conductancia del mesófilo (gm) y reducciones en la capacidad de fijación de la rubisco (Flexas y Medrano, 2002, Bota et al., 2004, Flexas et al., 2008, Zhou et al., 2016).

En cuanto a la fase fotoquímica, diversos estudios muestran que, en general, el PSII es altamente resistente al estrés hídrico inducido ya sea por una restricción en el suministro de agua o por la disecación de hojas en el aire (Havaux, 1992). El estudio de Utkhao y Yingjajaval (2015) en *E. camaldulensis* concluye que en una condición de estrés moderado, el PSII es poco afectado, ya que presenta un mecanismo de fotoprotección que le permite disipar el exceso de energía ante un menor suministro de CO₂. Sin embargo, en la medida en que la intensidad del estrés aumenta, la caída en la fijación de CO₂ se debe a dos tipos de limitaciones: por un lado, la

estomática ya mencionada y por el otro, a daños a nivel fotoquímico evidenciados por una caída en el cociente de fluorescencia variable y la máxima (Fv/Fm). Los trabajos de Dualde (2021) y Piazza (2021) en los clones de *E. grandis* utilizados también en este trabajo, proponen que ese mecanismo de protección tiene que ver con el incremento en la disipación térmica regulada ante disminuciones en la energía destinada a la transferencia.

En cuanto a los pigmentos, se espera una reducción en el contenido de clorofila, debido a una disminución en su biosíntesis y al aumento en la degradación (Mihailovic et al., 1997; Xue, 2011). Sin embargo, existen eucaliptos capaces no solo de mantener los niveles, sino también de aumentarlos. Algunos estudios realizados en el híbrido *E. grandis* x *E. camaldulensis*, modelo en cuanto a la tolerancia ante el déficit hídrico, concluyeron que ante la condición de estrés el contenido de clorofila incrementa (Michelozzi et al., 1995, De Araújo et al., 2016). De igual forma responden ejemplares *E. grandis*, *E. globulus*, *E. nitens* y *E. globulus* x *E. cypellocarpa*, lo que, a su vez, les permitió mantener o inclusive incrementar la eficiencia operativa del PSII (Da Silva et al., 2004, Berenguer et al., 2018). Ebrahimiyan et al. (2013) describen dicho mecanismo en festuca y proponen que la pérdida de peso de hoja después de un estrés moderado puede aumentar el incremento de clorofila, debido a que se afecta antes la tasa de crecimiento que la de síntesis y degradación de clorofila, lo que genera una acumulación. Por otro lado, Michelozzi et al. (1995) proponen que el incremento en el contenido de clorofila se debe a cambios en la concentración de solutos en el cloroplasto que permiten mantener el estado hídrico.

1.3. RESPUESTAS DE LOS EUCALIPTOS ANTE EL DÉFICIT HÍDRICO

En general, ante una condición de estrés, las plantas responden a tres escalas de acción, ya sea resistiendo, tolerando o previniéndolo (Berenguer et al., 2018), y el impacto que tienen sobre la planta depende del estado de desarrollo y de la combinación de estrategias con las que cuenta para afrontarlo (Bray, 1997, Ryan, 2011). A su vez, dicho factor de estrés debe considerarse en una escala de tiempo (Maseda y Fernandez, 2006), ya que los tipos de cambios que ocurren varían dependiendo de la duración, dando lugar a respuestas inmediatas y a procesos de aclimatación (Chaves et al., 2003, Zhou et al., 2016).

En su lugar de origen, los eucaliptos se distribuyen de forma tal que abarcan varios tipos de ambientes con diferentes regímenes de precipitaciones y de temperatura (Brussa, 1994, Whitehead y Beadle, 2004). Esta amplitud en la distribución se debe a que cuentan con un conjunto de estrategias que le confieren ventajas para manejar el estrés hídrico (Saadaoui et al., 2017). Estas habilidades son de diferente índole y abarcan modificaciones que pueden ser morfológicas, anatómicas, bioquímicas y/o funcionales. Por ejemplo, las especies *E. grandis* y *E. camaldulensis*, al igual que sus híbridos, son materiales muy utilizados en regiones áridas, tropicales y templadas, debido a las diferentes estrategias que presentan para sobrellevar el déficit (Potts, 2004).

Algunas de las estrategias de tipo morfológico tienen que ver con el cambio en el área foliar y con modificaciones en la relación entre parte aérea y raíz. El trabajo de Battaglia et al. (1998) muestra que el área foliar en eucaliptos está fuertemente influenciada por el estado hídrico, de forma tal que períodos prolongados de sequía promueven el desprendimiento de hojas. El desprendimiento es una estrategia que reduce la mortandad de los árboles (Pook, 1985). En cuanto a las raíces, estudios en *E. grandis* y *E. marginata*

muestran que en lugares en los que existen períodos de sequía, el incremento en el largo de las raíces permite alcanzar agua de capas más profundas del suelo, lo que les permite mantener altas tasas transpiratorias (Doley, 1967, Dye, 1996).

Ante una condición de déficit, existen ajustes de tipo anatómico-hidráulico que impiden que se alcancen valores de potencial hídrico asociados a daño (Whitehead y Beadle, 2004). El trabajo de Pfautsch et al. (2016) en eucaliptos distribuidos en regiones áridas de Australia, muestra que existe un patrón en cuanto a la estructura de los vasos del xilema de forma tal que a mayor déficit, menor es el calibre, la densidad aumenta y la conductividad hidráulica disminuye. La disminución en la conductividad hidráulica, mantiene la capilaridad y, por lo tanto, previene el riesgo de cavitación (Loepfe et al., 2007).

Los movimientos estomáticos contribuyen a la mantención del estado hídrico de la planta en una condición de déficit y la sensibilidad de la respuesta es dependiente de cada genotipo y de la estación del año (Whitehead y Beadle, 2004). El trabajo de Leuning (1990) sostiene que existe una relación hiperbólica entre la conductancia estomática (g_s) y el déficit de presión de vapor (DPV), de forma tal que incrementos en el DPV se asocian con disminuciones en g_s . La forma de la curva depende de cada especie y en algunos eucaliptos g_s es más determinada por el potencial hídrico base que por el DPV. Según White et al. (2000), la relación entre g_s y el DPV puede ser explicada mediante una recta cuya pendiente difiere entre especies. Según su trabajo, g_s en *E. camaldulensis* es más susceptible al potencial base que *E. platypus*.

Para mantener la turgencia y el crecimiento celular necesarios para sustentar el crecimiento, existen materiales capaces de modificar el módulo de elasticidad de sus paredes a medida que disminuye el potencial hídrico

del suelo (Myers y Neales, 1986). Esto, en combinación con otro tipo de estrategias, permite la mantención de las tasas transpiratoria y de las tasas fotosintéticas, a pesar de la disminución en el potencial hídrico base. El trabajo de Merchant (2007) con base en 6 especies diferentes de eucaliptos, en las que se incluye *E. camaldulensis*, concluye que el ajuste osmótico es una estrategia frecuente dentro del género.

1.4 EFECTO DE LA TEMPERATURA, COMBINACIÓN CON ESTRÉS HÍDRICO

En general, las plantas leñosas realizan fotosíntesis en un rango amplio de temperaturas que pueden ir desde valores próximos a los cero grados hasta los 40 grados, dependiendo de la especie, el genotipo, la edad de la planta, el origen y la estación. Dada una condición de radiación y un suministro de CO₂, la fotosíntesis aumenta con el incremento de la temperatura hasta alcanzar un óptimo tras el cual se marca una caída brusca en las tasas de asimilación neta (Pallardy, 2008). En el caso de *E. tetradonta*, los valores de asimilación caen drásticamente superados los 35 grados (Prior et al., 1997).

La inhibición por altas temperaturas ocurre porque la respiración continúa incrementando por encima de la temperatura óptima de la fotosíntesis y, a su vez, porque se inhiben algunas funciones en el cloroplasto, ya que se ve afectada la fluidez de las membranas tilacoidales, se inactivan enzimas y disminuye significativamente el contenido de proteínas solubles por desnaturalización y precipitación (Berry y Björkman, 1980). Ocurre una disminución en el contenido de rubisco activa al igual que de la rubiscoactivasa (Parry et al., 2013). El incremento de la temperatura primero genera un efecto de bloqueo del PSII y la disociación de los complejos proteicos asociados a la antena del centro de reacción. Esta disociación puede estar vinculada a la separación de lípidos de la membrana tilacoidal (Armond et al., 1980).

En plantas C3, la fotorrespiración y la respiración mitocondrial aumentan con el incremento de temperatura, lo que incrementa el punto de compensación y los requerimientos de CO₂ para alcanzar cada valor de asimilación neta (An) (Sharkey, 1988). El incremento en la fotorrespiración debido a altas temperaturas se genera por un cambio en la concentración parcial de los gases favoreciendo la actividad oxigenasa de la rubisco, lo que promueve la pérdida de CO₂ y una consecuente disminución en la asimilación neta (Taiz et al., 2015).

En cuanto a la fase fotoquímica, se conoce que el PSII es poco susceptible al déficit hídrico, aunque sí lo es a las altas temperaturas, ya que pequeñas variaciones pueden imprimir cambios notorios (Havaux, 1992). La temperatura crítica a partir de la cual se daña el fotosistema está relacionada con la temperatura óptima de crecimiento y con la composición de lípidos de la membrana, que determina el grado de fluidez (Berry y Björkman, 1980).

Por otro lado, en cuanto a los efectos del estrés térmico sobre la concentración de pigmentos, existen trabajos en tomate, trigo y vid que sostienen que ocurre una disminución en el contenido total de clorofilas, al mismo tiempo que incrementan los niveles de carotenoides, los que colaboran facilitando la disipación térmica de la energía y confieren estabilidad al PSII. En particular, las xantofilas jugarían un rol importante en la señalización y protección del PSII (Havaux y Grusecki, 1993). El trabajo de Camejo et al. (2005) con base en cultivares de tomate tolerantes y no tolerantes al estrés térmico mostró que se altera la composición de pigmentos con incrementos de temperatura, ya que aumenta el contenido de clorofilas y carotenoides en el cultivar tolerante, pero aún más el de carotenoides, si se lo compara con su condición control.

Las plantas presentan óptimos de crecimiento de acuerdo a su sitio de origen. *Eucalyptus grandis* es una especie adaptada a la franja costera, que

crece con temperaturas máximas menores en comparación a la de las especies adaptadas a zonas áridas como *E. camaldulensis*. *E. grandis* crece con máximos entre 24 y 30 grados, *E. camaldulensis*, de 27 y 40 y *E. tereticornis*, entre 24 y 36 grados (Brussa, 1994).

En general, la ocurrencia de algún tipo de estrés abiótico se da en simultáneo con otro, rara vez se dan en forma aislada. Las plantas responden de manera específica ante la combinación y los efectos pueden ser sinérgicos, antagónicos o sin interacción (Mittler, 2006). Los trabajos de Cui et al. (2015), Zsófi et al. (2009), Camejo et al. (2005) y Havaux (1992) con base en especies herbáceas y leñosas C3 proponen modelos de efectos antagónicos en los que las plantas rustifican sus fotosistemas ante una situación de déficit, lo que les confiere cierto grado de tolerancia ante eventos de estrés térmico. En general, los fotosistemas son muy adaptados a la sequía; sin embargo, la capacidad fotosintética se ve comprometida por la temperatura. El trabajo de Zsófi et al. (2009) muestra que los viñedos crecidos en condiciones de déficit aclimatan PSII en altas temperaturas, ya que incrementen el valor de F_v/F_m .

Una posible explicación plantea que se induce a la síntesis de lípidos con ácidos grasos saturados que disminuyen la fluidez de la membrana (Nievola et al., 2017), lo que confiere cierta tolerancia a las altas temperaturas. Estos cambios generan un incremento en los valores de temperatura de inactivación del PSII, lo que mejora el rendimiento fotoquímico en dicha condición respecto al control (Downton et al., 1984). El trabajo de Havaux (1992) es un ejemplo de interacción antagónica entre el estrés hídrico superpuesto con térmico. Sus datos muestran que se puede subir en 5 grados la resistencia del PSII si se lo impone a un estrés hídrico previo.

1.5. VARIACIÓN ESTACIONAL DE LAS RESPUESTAS

La estacionalidad puede definirse como la variación en las respuestas de las plantas a lo largo de las estaciones siguiendo un patrón. Dichos cambios pueden darse a nivel fisiológico, bioquímico y/o morfológico. En ese sentido, existen diferentes trabajos que reportan los cambios en función de la variación de la temperatura y de la demanda atmosférica.

A nivel morfológico, el trabajo de Sprecht y Brower (1975) sostienen que, si no hay deficiencias hídricas, los eucaliptos presentan máximos de crecimiento de área foliar en primavera y otoño. Por otro lado, es mínima en invierno cuando la irradiancia es menor, y en verano cuando las temperaturas superan el óptimo.

En cuanto a la fotosíntesis, el estudio de Pereira (1985) en *Eucalyptus globulus* propone que a lo largo de las estaciones An se modifica de forma tal que se obtienen valores mínimos en verano e invierno, mientras que la capacidad máxima se logra en la primavera. Dicha variación responde a los cambios en la disponibilidad hídrica en el suelo y a la temperatura. Por otro lado, Porcar-Castell et al. (2008) sostienen que en una leñosa como es *Pinus sylvestris* la capacidad de transferencia de electrones y la disipación térmica de la energía en el PSII se aclimata según las estaciones, aumentando la transferencia en función del aumento de la temperatura.

Los ajustes bioquímicos implican una escala de tiempo mayor y tienen que ver con modificaciones en los contenidos de clorofilas, carotenoides y proteínas asociadas al PSII (Öquist y Hunter, 2003).

1.6. HIPÓTESIS DEL TRABAJO

El déficit hídrico afecta en forma diferencial el proceso fotosintético en clones de *Eucalyptus* spp.

El déficit hídrico promueve la ocurrencia de mecanismos de evasión, al mismo tiempo que se activan otros de aclimatación.

1.7. OBJETIVOS

1.7.1. Objetivo general

Caracterizar la actividad fotosintética en clones comerciales de *Eucalyptus* spp. en función del déficit hídrico, y sus relaciones con atributos funcionales.

1.7.2. Objetivos específicos

- a. Determinar el intervalo de potencial hídrico de suelo que establezca una condición de déficit hídrico respecto al control.
- b. Determinar los cambios en la tasa de asimilación neta y en la fase fotoquímica de la fotosíntesis en distintas etapas del período de déficit hídrico en distintos clones de eucalipto.
- c. Analizar cambios en el contenido de pigmentos fotosintéticos en distintas etapas del período del déficit hídrico en distintos clones de eucalipto.
- d. Cuantificar el efecto del déficit hídrico sobre el crecimiento en distintos clones de eucalipto.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL Y SITIO

Se seleccionaron plantines de dos clones de *Eucalyptus grandis* (g1 y g2) y de dos híbridos interespecíficos *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus camaldulensis* (gc) y *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis* (gt) del vivero de I+D de la empresa forestal Lumin. El ensayo se instaló en setiembre de 2019 en el invernáculo norte de Facultad de Agronomía (34° 50'S, 56° 13'W). Se utilizaron macetas a las que se le agregó 16,2 kg de sustrato seco de arena:tierra (1:1) y se suplementaron con 5 g de fertilizante de liberación lenta (15 – 9 – 12). La superficie de las macetas fue cubierta con una placa de policarbonato para minimizar las pérdidas de agua por evaporación. Las plantas crecieron con riegos suficientes durante 42 días para promover su adaptación al sitio.

Para conocer la demanda atmosférica se tomaron registros de humedad y temperatura con 3 sensores (RHT10 USB Datalogger, Extech Instruments Corporation, MA, EE.UU.) ubicados a 1,70 m de la superficie del invernáculo. A partir de ellos se calculó el déficit de presión de vapor (DPV) utilizando el método propuesto por Allen et al. (1998).

2.2 DEFINICIÓN DE TRATAMIENTOS

Los tratamientos se definieron teniendo en cuenta el potencial mátrico del sustrato. Para ello se modeló con el programa OriginPro (Origin Lab, 2022) la curva de retención hídrica Ψ_w (HP %). Se tomaron 4 muestras y se dividieron cada una en 15 placas de partes iguales, de forma tal que se conoce el peso de placa y del sustrato seco. A cada una se le agregó cantidades crecientes de agua destilada de 0 a 1,2 ml. Siguiendo la recomendación de Meter Group Inc, las placas con el sustrato hidratado se

almacenaron por un día a 20 °C para facilitar que la temperatura del equipo y de las muestras se igualaran. Posteriormente se midió el potencial hídrico (Ψ_w) de cada placa con un equipo WP4C (Decagon Devices, Pullman, WA, EE. UU.). Tras la medición se registró el peso fresco para obtener el valor de peso de agua por placa y así calcular el porcentaje de agua en peso seco de sustrato (HP%).

Por otro lado, al momento de la plantación se generaron 6 macetas con iguales características que las utilizadas para plantar los clones. De cada maceta se determinó el valor del peso del envase (M), del sustrato seco (S) y de la tapa de policarbonato (T) que la cubría. Estas se regaron a saturación por única vez y se las dejó escurrir. En los días consecutivos se registró la evolución del peso del sistema maceta-sustrato-tapa (MST) hasta que este se volvió constante. En este punto se obtuvo un aproximado del valor de peso de capacidad de campo, ya que no existen pérdidas significativas por escurrimiento. Al peso estable se le restó el peso del sistema MST para obtener el peso del agua en esa condición. De esta forma se aproximó el valor de HP % del sustrato a capacidad de campo. Este valor se comparó con la curva de retención y se obtuvo el estimado del valor de potencial mátrico asociado.

Se establecieron 2 condiciones hídricas. La condición control (CC) se obtuvo teniendo como referencia el peso constante de MST y alcanzó un valor de 17,38 % HP, lo que representa una retención de -0,15 MPa o 2,8 kg de agua en el sistema. Por otro lado, la condición déficit (CD) se definió duplicando el valor de potencial hídrico, lo que resultó en un HP % de 7 %, o 1,2 kg de agua y una succión de -0,3 MPa. Dicha condición se ubica próxima al incremento exponencial del modelo ajustado, teniendo en cuenta el contenido de agua más restrictivo posible sin llegar al punto de marchitez permanente.

Ambos tratamientos se mantuvieron durante 129 días a partir de T0 (figura 2) mediante el control del peso de las macetas registrado día por medio. Las dosis de riego se mantuvieron mediante riego automático al que se le sumaba reposición manual al valor de la condición hídrica asignada como tratamiento.

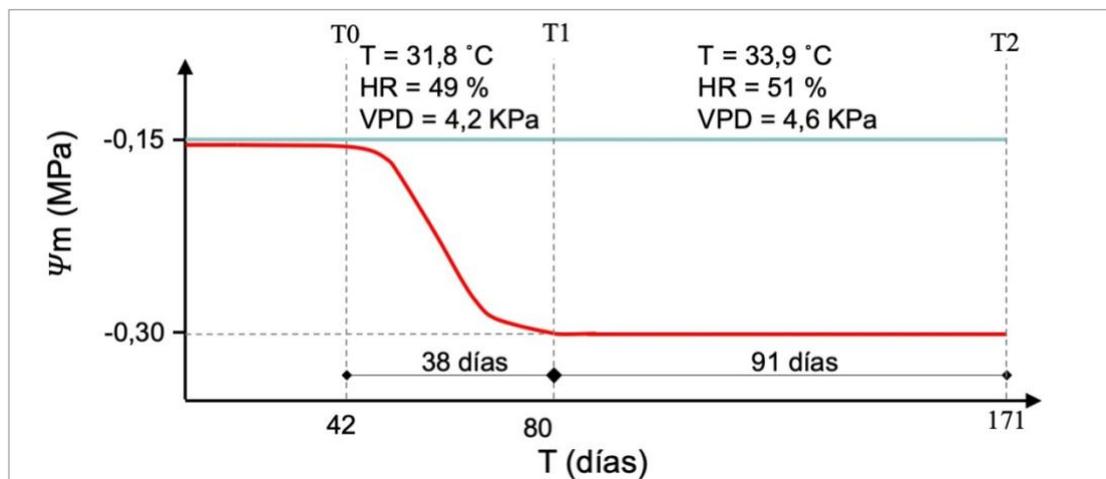


Figura 2: estrategia experimental implementada para evaluar el desempeño de clones de eucalipto bajo diferentes condiciones hídricas. Verde condición control, rojo condición déficit. T0 momento de imposición de los tratamientos, T1 y T2 momentos de medición de parámetros fotosintético y colecta de muestras.

Durante el experimento (figura2) se definieron dos momentos para los que se tomaron las mediciones de fluorescencia, de tasa de asimilación neta y la colección de muestras para la extracción de pigmentos. El primero (T1) se ubicó en el mes de diciembre a 38 días de la imposición de los tratamientos (T0). El segundo (T2) fue en el mes de marzo a 129 días de impuestas las condiciones.

2.3 DETERMINACIÓN DE CONSUMO DE AGUA

El consumo de agua se calculó a partir de la diferencia de peso entre las macetas. Cada dos días se registró el peso de las macetas a las 7 am (P_i) y se repuso hasta el nivel de tratamiento objetivo (P_f). Dado que el nivel de riego se encuentra levemente por debajo del de capacidad de campo, no se esperaron pérdidas por escurrimiento. A su vez, al tapar con policarbonato la superficie de la maceta, se minimizaron las pérdidas por evaporación. En este sentido, la diferencia entre P_f y P_i se debió principalmente a la transpiración o consumo de la planta.

2.4 FLUORESCENCIA DE CLOROFILAS Y PARTICIÓN DE LA ENERGÍA

Para calcular la partición de la energía en la fase fotoquímica, se midió fluorescencia de clorofilas mediante análisis de *quenching* y de relajación, siguiendo la metodología propuesta por Quero et al. (2019). Previo a la medición se sombreó una hoja por planta por un período no menor a 20 minutos para promover el estado estacionario de los fotosistemas. La medición se realizó en vivo en hojas del tercio superior de la copa, utilizando un fluorómetro PAM (FMS1, Hasantech, Kings Lynn, UK). Para el análisis de *quenching*, se utilizó luz actínica blanca de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fotones. El valor de flujo lumínico se obtuvo a partir de las curvas $An(\text{PAR}_i)$, en las que se identificó el valor de irradiancia que hace máxima An .

A partir de las firmas de fluorescencia generadas se obtuvieron los valores de fluorescencia máxima (F_m), fluorescencia máxima con luz actínica de fondo (F_m') y fluorescencia en el tiempo t (F_t), necesarios para el cálculo de los parámetros de la partición de la energía en términos de rendimientos cuánticos. Los parámetros se definieron de la siguiente forma:

$$\Phi_{PSII} = \frac{F_m' - F_t}{F_m'} \qquad \Phi_{NPQ} = F_t \left(\frac{1}{F_m'} - \frac{1}{F_m} \right)$$

2.5 TASA DE ASIMILACIÓN NETA Y CONDUCTANCIA

La medición de tasa de asimilación neta (A_n) y de la conductancia (g_s) se realizó en las hojas del mismo brote de la medición de fluorescencia, utilizando un equipo IRGA portable (LI-6400, Li-Cor Inc., Lincoln, NE, EE. UU.). Previo a cada medición se aclimató la hoja por 20 minutos en cámara para estabilizar el intercambio gaseoso. Se fijó la temperatura (T_{leaf}) en 25 °C, CO_2 de referencia (CO_2R) en $400 \mu mol CO_2 (mol \text{ aire})^{-1}$ y el flujo lumínico (PAR_i) en $1200 \mu mol \text{ fotones } m^{-2} s^{-1}$. Una vez terminado el período, se procedió con la medición de A_n para la construcción de curvas $A_n(PAR_i)$. Teniendo en cuenta los trabajos de Fernández y Gyenge (2010) y de Zhou et al. (2016), se definió la siguiente secuencia de PAR_i : 0, 200, 400, 600, 800, 1000, $1200 \mu mol \text{ fotones } m^{-2} s^{-1}$. La concentración de CO_2 se mantuvo en $400 \mu mol CO_2 (mol \text{ aire})^{-1}$. En función de los resultados se definió el valor de flujo lumínico saturante (PAR_{sat}) utilizado en las mediciones de fluorescencia. Los valores de g_s ($mol H_2O m^{-2} s^{-1}$), se tomaron a $400 \mu mol CO_2 (mol \text{ aire})^{-1}$ y a un flujo lumínico de $1000 \mu mol \text{ fotones } m^{-2} s^{-1}$.

Para aproximarse al punto de compensación lumínica (PSL) se tomó el valor de radiación con el que se alcanzó la tasa de asimilación neta máxima. Para obtener un aproximado del punto de compensación lumínica (PCL) se determinó la ecuación de la recta que pasa por los puntos de asimilación neta con un flujo de 0 y otro de $200 \mu mol$ de fotones $m^{-2} s^{-1}$. La raíz de la misma se aproxima al PCL.

2.6 CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

La extracción de pigmentos se realizó agregando 1 ml de acetona PPA a 1 g de tejido macerado en nitrógeno líquido. Se centrifugó dos veces a 10000 g durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se filtró con filtros de celulosa regenerada (poro 0,45 μ y diámetros 25 mm, Millipore ®). Posteriormente se almacenó en oscuridad a -20 °C hasta la cuantificación.

Los extractos fueron analizados en un equipo HPLC (Shimadzu ®) con una columna C18 (5 μ m 250 x 4,6 mm, Restek ®) mantenida a 25 °C. Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetonitrilo-mentanol (85:15 v/v) a un flujo de 2 mL min⁻¹ y se verificó que la presión se mantuviese estable durante la corrida. Los diferentes pigmentos separados por la columna fueron detectados midiendo su absorbancia a 445 nm utilizando un detector de arreglo de fotodiodos (Shimadzu ®). Para la asignación de pigmentos a los picos se tuvo como referencia el trabajo De Azevedo y Rodriguez (2009), quienes utilizaron una fase móvil muy similar. Los pigmentos a identificar fueron neoxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, 3 isómeros de zeaxantina, β -caroteno, clorofila a, clorofila b y pheophitina a. Una vez identificado cada uno, teniendo en cuenta su espectro de absorción en dicha fase, se los clasificó en carotenoides y clorofilas totales. Los resultados se expresan en términos de porcentaje de pigmento en la totalidad de la extracción.

2.7 CRECIMIENTO

Se midió la altura total de las plantas a partir de la imposición de los tratamientos hasta la culminación del experimento con una frecuencia quincenal. Las medidas se tomaron en el tallo principal con cinta métrica desde el cuello de la planta hasta el extremo superior. Los datos se

graficaron a partir de las medias ajustadas con los errores estándar correspondientes.

2.8 ANÁLISIS DE DATOS

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) (figura 3), con 2 tratamientos (control, déficit), 4 clones (g1, g2, gc, gt) y 3 repeticiones por cada nivel de factor. Para el análisis de las variables se ajustó un modelo lineal general con arreglos factoriales, de forma tal que:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + CH_j + (CH \times G)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

- Y_{ijk} variable de respuesta (Φ PSII, Φ NPQ, Clor a+b, Carot total, gs)
- μ media general
- G_i es el efecto del i-ésimo genotipo (g1, g2, gc, gt)
- CH_j es el efecto del j-ésimo nivel de tratamiento (Control, Déficit)
- $(CH \times G)_{ij}$ es la interacción entre el i-ésimo nivel de G y el j-ésimo nivel de CH
- ε_{ijk} error experimental

Para evaluar la significancia de cada una de las fuentes de variación sobre la variable de respuesta se realizó el ANAVA mediante el paquete R Stats package (R Core Team, 2017). Previo al análisis de diferencias de medias se verificaron los supuestos de homogeneidad y de normalidad. Para el análisis de diferencias entre medias, se realizaron contrastes ortogonales con el paquete emmeans R package (Russell, 2018).

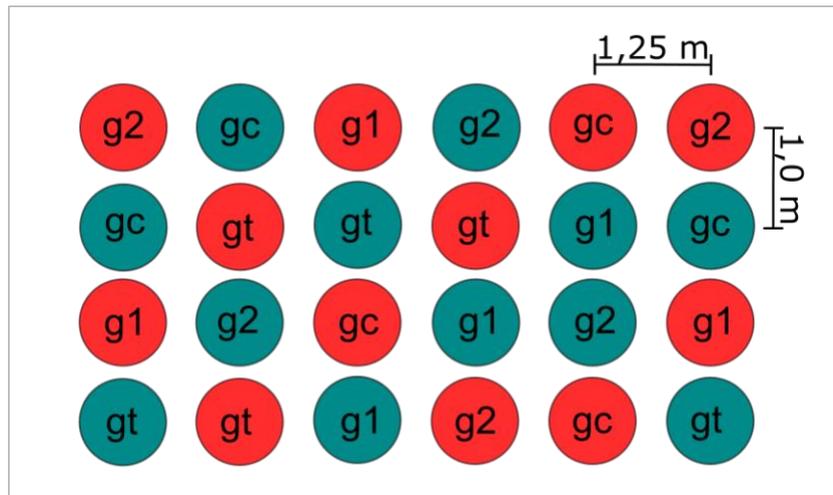


Figura 3: distribución de plantas y aleatorización del tratamiento. g1 y g2: clones de *Eucalyptus grandis*. gt: clon híbrido *E. grandis* x *E. tereticornis*. gc: clon híbrido *E. grandis* x *E. camaldulensis*. En rojo, condición déficit; en verde, condición control.

3. RESULTADOS

3.1 ESTABLECIMIENTO DEL TRATAMIENTO: SUMINISTRO

Para la curva de retención hídrica Ψ_w (HP%) se ajustó un modelo exponencial (figura 4), con la siguiente forma:

$$\Psi_w = \alpha \times e^{\frac{-HP\%}{k}} + \beta$$

Donde,

$$\beta \ 0,12651 \pm 0,02144$$

$$\alpha \ 2,12996 \pm 0,31207$$

$$k \ 3,04691 \pm 0,37824$$

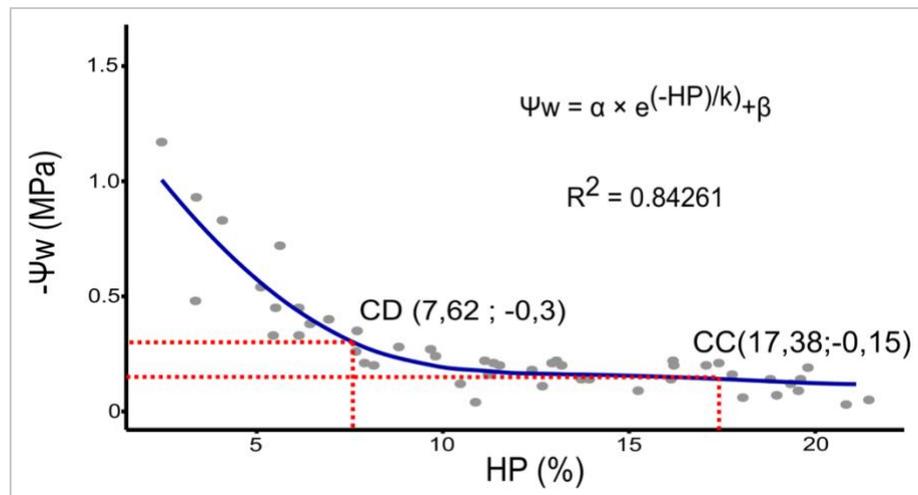


Figura 4: curva de retención hídrica para el sustrato utilizado. CD punto de la curva para condición déficit, CC punto de la curva para condición control, HP (%) porcentaje de agua en peso seco del sustrato, Ψ_w (MPa) potencial hídrico del sustrato.

Por otro lado, a partir del seguimiento del peso de 6 macetas se obtuvo el valor estimado de peso de capacidad de campo. Este fue de 19 Kg por maceta, lo que representa un 17,38 % de agua en peso seco, que se asocia

con un potencial mátrico de -0,15 MPa según la curva de retención. Como ya se mencionó, CD se definió multiplicando al doble el valor de potencial mátrico de la CC.

Los tratamientos se mantuvieron estables en la HP% durante la totalidad de días de duración del experimento, A su vez las condiciones hídricas se diferenciaron en todo el período (figura 5), con valores de HP% de $17,38 \pm 1,54$ y $2,8 \pm 0,25$ kg de agua para CC y para CD, $HP\% = 7,62 \pm 0,7$ y kg de agua = $1,2 \pm 0,11$ para la condición control y déficit, respectivamente.

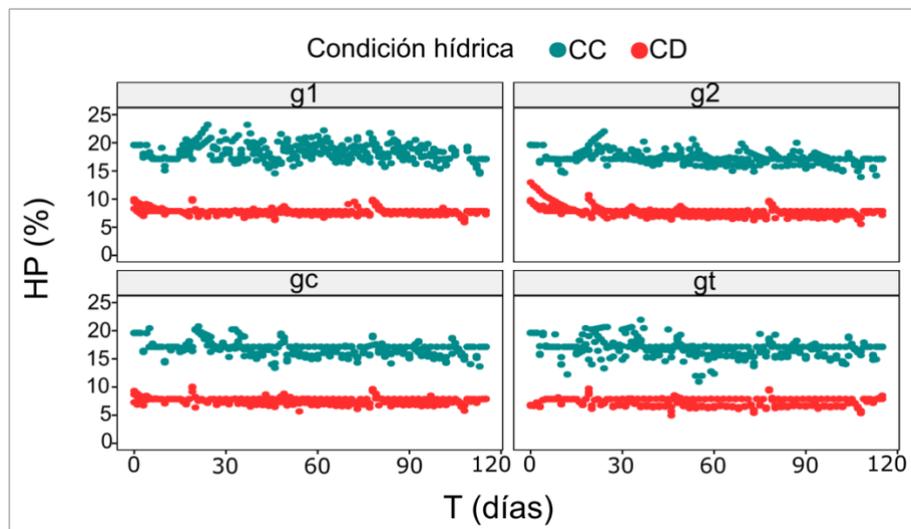


Figura 5: evolución del contenido de agua en el sustrato para *E. grandis* (g1 y g2), *E. grandis* x *E. camaldulensis* (gc) y *E. grandis* x *E. tereticornis* (gt) en condición hídrica control (CC) y déficit (CD). HP% porcentaje de agua en peso seco del sustrato, T (días) días desde la imposición de las condiciones hídricas.

3.2 CONDICIONES AMBIENTALES

La figura 6A muestra la evolución de las temperaturas máxima, mínima y media, calculadas como $(T_{max} + T_{min}) / 2$ en forma diaria. A lo largo de todo

el experimento, las plantas crecieron en un ambiente con temperaturas medias de entre 20 y 40 grados, con máximas que superaron los 50 grados.

Asociada a la temperatura, la figura 6B muestra la evolución de la demanda atmosférica. Los valores alcanzados superaron los 2 KPa a lo largo del todo el experimento. Los dos factores ambientales evidencian una condición de elevada temperatura y demanda atmosférica según la clasificación de Amitrano et al. (2019).

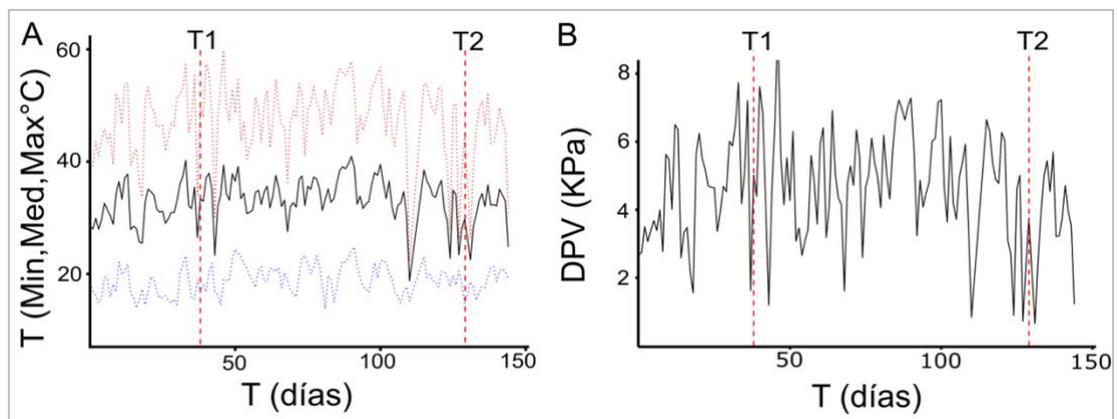


Figura 6: A: evolución de la temperatura máxima (rojo), temperatura mínima (azul) y media (negro). B: evolución del DPV. T (días) días a partir de la imposición de los tratamientos. T1 (38) y T2 (129) días de impuestas las condiciones hídricas.

3.3 CONSUMO Y CONDUCTANCIA

El consumo de agua (E) durante todo el experimento fue diferente según el clon (figura 7). Por un lado, g2, gc y gt presentaron mayores E en CC que en CD. A su vez, en CC fue más dispersa que en CD, que fue significativamente menor y más estable a lo largo de todo el experimento. Por su parte, g1, si bien muestra niveles de consumo mayores en la CC, estos no se diferencian marcadamente de los alcanzados en CD.

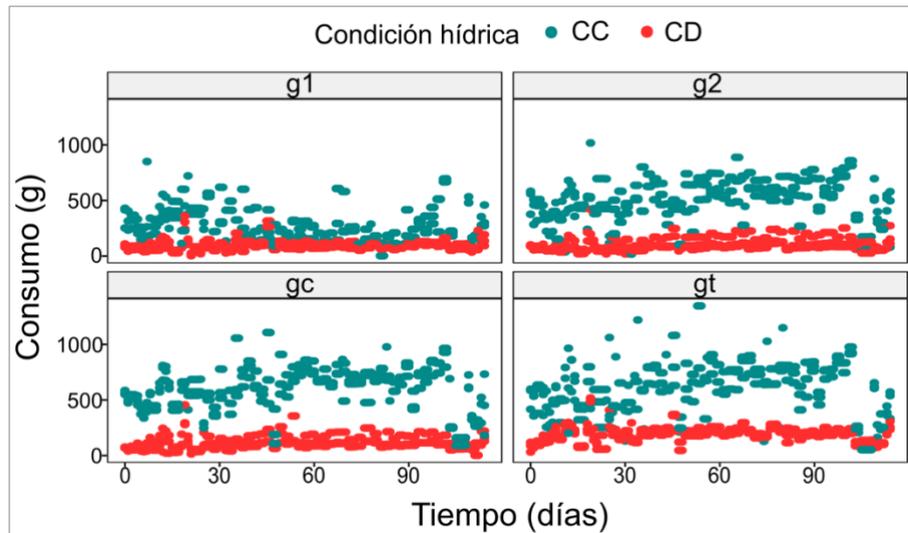


Figura 7: evolución del consumo de agua en gramos para *E. grandis* (g1 y g2), *E. grandis* x *E. camaldulensis* (gc) y *E. grandis* x *E. tereticornis* (gt) en condición control (CC) y déficit (CD). Tiempo (días), tiempo de impuestas las condiciones hídricas.

El ANOVA para los valores de conductancia (gs) a un flujo de $1000 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 400 ppm CO_2 (cuadro 1) indica que hubo efecto significativo para la interacción G x CH en ambos momentos de medición (pValor T1 = $2,3 \times 10^{-8}$ y pValor T2 = 0,002). En T1 los clones híbridos y g2 desarrollaron conductancias mayores en CC, mientras que g1 mantuvo igual conductancia en ambas condiciones hídricas. En T2 el único clon que igualó las conductancias fue gt, mientras que las demás tomaron valores de gs mayores en CC.

Cuadro 1: medias de la conductancia estomática gs ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a saturación de luz y 400 ppm CO_2 para *E. grandis* (g1 y g2), *E. grandis* x *E. camaldulensis* (gc) y *E. grandis* x *E. tereticornis* (gt) en condición hídrica control (CC) y déficit (CD) tomadas a los 38 (T1) y a los 129 (T2) días de impuestas las condiciones.

Clon	T1		T2	
	CC	CD	CC	CD
g1	0,131 a	0,135 a	0,205 b	0,068 a
g2	0,289 b	0,056 a	0,119 b	0,053 a
gc	0,372 b	0,137 a	0,141 b	0,086 a
gt	0,290 b	0,167 a	0,087 a	0,074 a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre columnas para cada T con un pValor < 0,05.

3.4 CRECIMIENTO

El gráfico de evolución de altura total (figura 8) muestra que en CC todos los clones desarrollaron alturas mayores. Sin embargo, las diferencias se registraron en diferentes momentos. Los clones g2 y gc diferenciaron su altura entre tratamientos a partir del primer mes, mientras que g1 y gt recién a partir de los 45 días. Por otro lado, gc fue el clon que presentó la diferencia de altura mayor entre condiciones hídricas al finalizar el experimento.

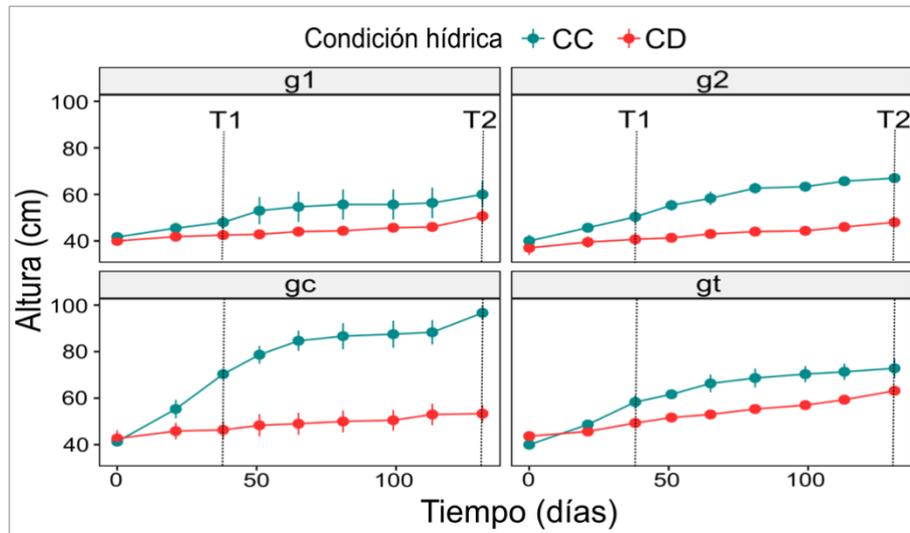


Figura 8: curva de crecimiento para los clones g1, g2, gc y gt en cada condición hídrica. Cada punto indica la media de altura y la barra, el error estándar. T1 y T2 son los momentos de medición de variables fotosintéticas. CC condición control. CD condición déficit.

3.5 TASA DE ASIMILACIÓN NETA

Las curvas $An(PAR_i)$ (figura 9) muestran que la capacidad de asimilación se modificó en función del tratamiento dependiendo del clon y el momento. En T1, las An alcanzadas por g1 y gc fueron iguales, g2 presentó diferencias entre tratamientos a partir de los $400 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y gt la disminuyó en CC a partir de los $400 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En T2, g2 mantuvo la An en ambas condiciones hídricas, mientras que g1 la disminuyó en CD a partir de los $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. En ese momento, ambos híbridos presentaron tasas mayores en CD a valores bajos de radiación con $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En cuanto a los puntos de compensación y de saturación aproximados, el ANOVA no detecta diferencias debido al tratamiento. Los puntos de saturación tomaron valores con un rango entre 1000 y 1200 $\mu\text{mol de fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que los de compensación, entre 21 y 59 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

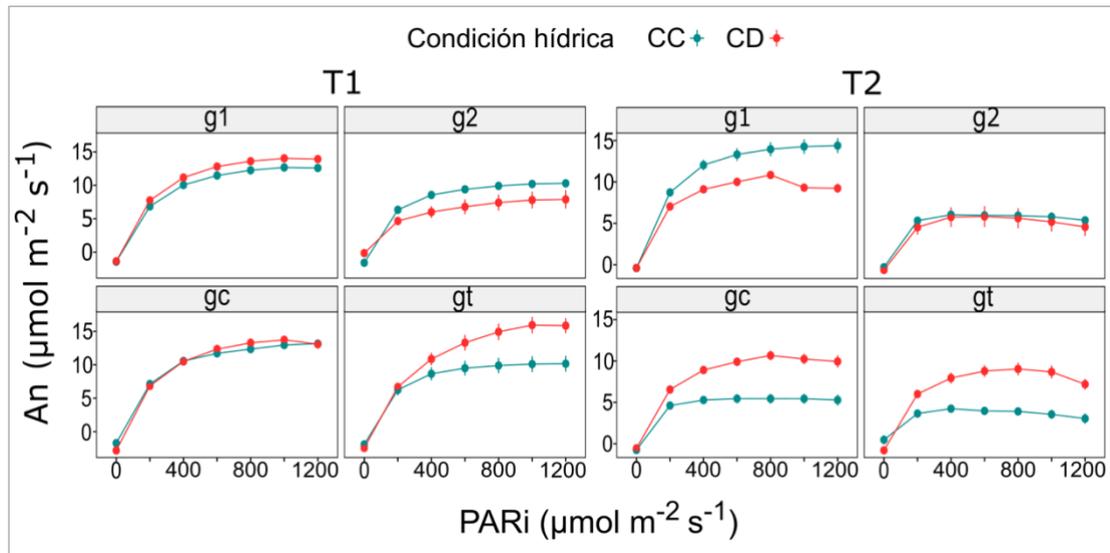


Figura 9: curvas $An(PAR_i)$ a 400 ppm de CO_2 para *E. grandis* (g1 y g2) *E. grandis* x *E. camaldulensis* (gc) y *E. grandis* x *E. tereticornis* (gt), realizadas a los 38 (T1) y 129 (T2) días de impuestas las condiciones. Los puntos indican la media de An y las barras el error estándar asociado. CC: condición control. CD: condición déficit.

3.6 FASE FOTOQUÍMICA

El análisis de varianza identifica que en T1 para $\Phi PSII$ los efectos de genotipo (G) como la interacción Genotipo x Condición Hídrica (G x CH) fueron significativos con un pValor = 0,00017 y pValor = 0,003, respectivamente. En ese sentido, el boxplot con el análisis de contrastes muestra que en T1 los clones de *E. grandis* modificaron $\Phi PSII$, mientras que los híbridos mantuvieron el mismo resultado. El clon g1 disminuyó el valor en CD (pValor = 0,003), mientras que en g2 el valor fue menor en CC (pValor = 0,02). En T2, únicamente hubo efecto significativo de la condición hídrica, por lo que solo se puede afirmar que la media para CC fue menor que la media de CD.

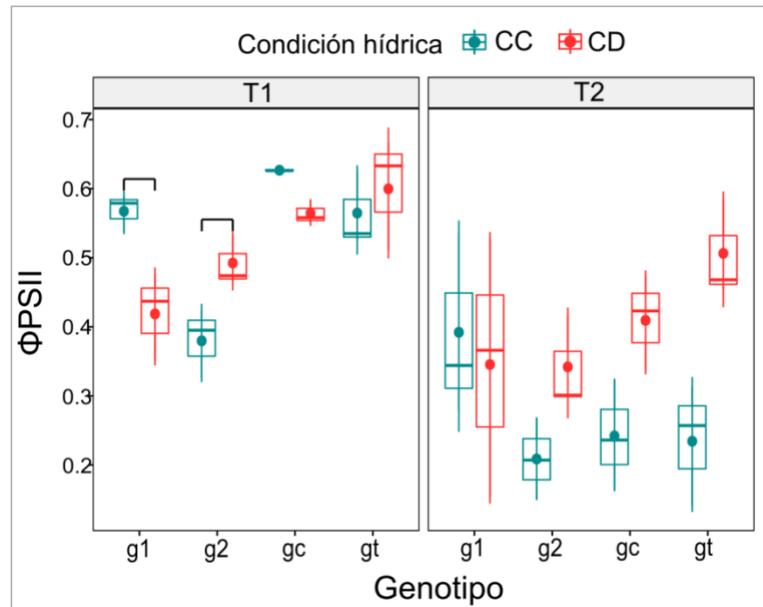


Figura 10: *boxplot* de Φ PSII para *E. grandis* (g1 y g2), *E. grandis* x *E. camaldulensis* (gc) y *E. grandis* x *E. tereticornis* (gt) en condición hídrica control (CC) y déficit (CD) medidas a los 38 (T1) y a los 129 (T2) días. Se compara el efecto de la condición hídrica en cada genotipo. Las llaves negras indican diferencias significativas para un pValor < 0,05

Para la disipación térmica regulada (Φ NPQ) se obtuvo el mismo resultado que para Φ PSII. Es decir que en T1 nuevamente fueron significativos los efectos de G (pValor = 0,001) y de G x CH (pValor = 0,01). Teniendo en cuenta G x CH y los contrastes ortogonales asociados, se sabe que ambos híbridos no modificaron el nivel de disipación, mientras que los clones de *E. grandis* lo hicieron de forma tal que en CC g1 disminuyó (pValor = 0,004), mientras que g2 lo incrementó (pValor = 0,008). En T2 únicamente fue significativo el efecto de CH (pValor = 0,001), por lo que nuevamente solo hay evidencia para afirmar que la disipación térmica regulada fue mayor en CC que en CD.

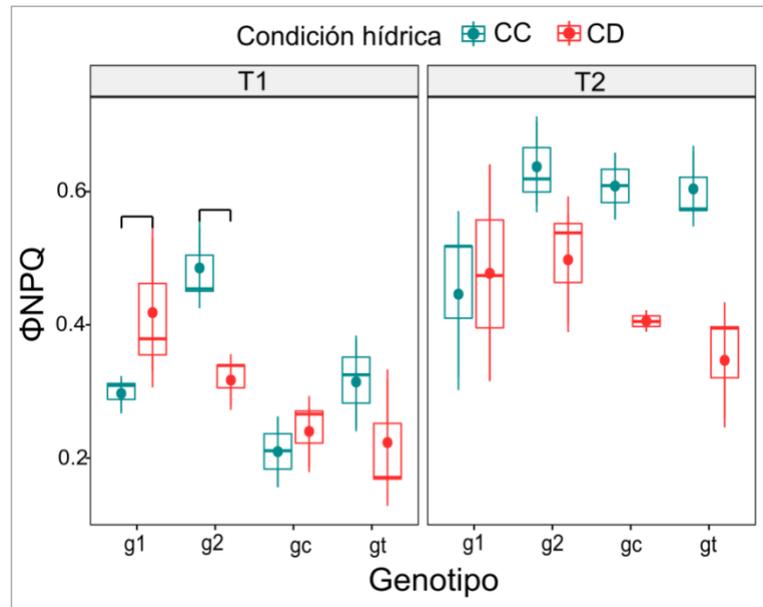


Figura 11: *boxplot* de Φ NPQ para *E. grandis* (g1 y g2), *E. grandis* x *E. camaldulensis* (gc) y *E. grandis* x *E. tereticornis* (gt) en condición hídrica control (CC) y déficit (CD) medidas a los 38 (T1) y a los 129 (T2) días. Se compara el efecto de la condición hídrica en cada genotipo. Las llaves negras indican diferencias significativas para un pValor < 0,05

3.7 PIGMENTOS

En T1, no hubo efecto significativo en el contenido de clorofila para ninguna de las fuentes de variación, por lo que no se puede afirmar que existan diferencias ni entre tratamientos ni entre clones. Sin embargo, en T2 sí son significativos los efectos del G (pValor = 0,00001), CH (pValor = 0,000004) y la interacción GxCH (pValor = 0,01).

Teniendo en cuenta la interacción significativa, los contrastes muestran que para g2 (pValor = 0,01), gc (pValor = 0,00007) y gt (pValor = 0,0001) el contenido de clorofila fue menor en CC. El clon g1 no modificó su concentración.

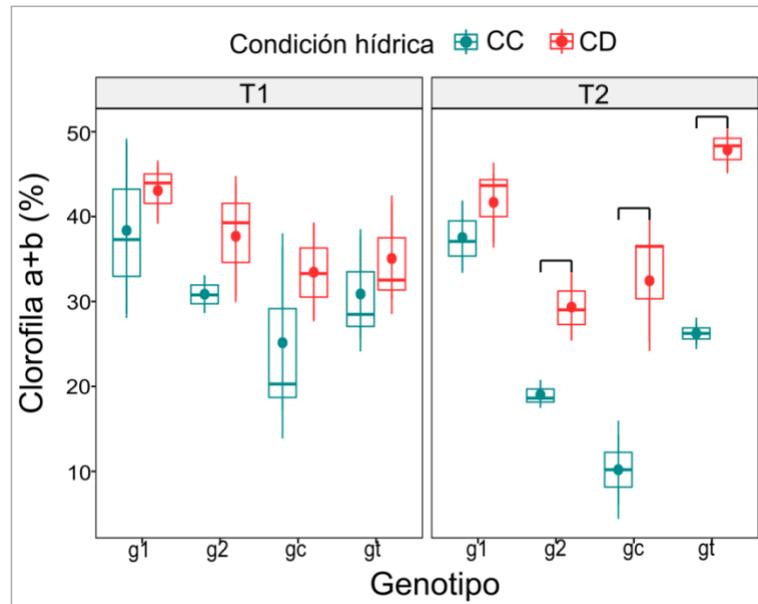


Figura 12: *boxplot* para el contenido de clorofilas a + b en % de la totalidad de la extracción para *E. grandis* (g1 y g2), *E. grandis* x *E. camaldulensis* (gc) y *E. grandis* x *E. tereticornis* (gt) en condición hídrica control (CC) y déficit (CD) medidas a los 38 (T1) y 129 (T2) días. Se compara el efecto de la condición hídrica en cada genotipo. Las llaves negras indican diferencias significativas para un pValor < 0,05.

En cuanto a los carotenoides, el comportamiento fue igual al de las clorofilas. El ANOVA muestra que en T1 no hubo efectos significativos para ninguna de las fuentes de variación, mientras que en T2 los efectos principales y el de la interacción sí fueron significativos (pValor < 0,05).

En virtud de la interacción G x CH, los contrastes ortogonales indican que todos los clones, salvo g1, modificaron el contenido de carotenoides, de forma tal que la concentración fue mayor en la concentración control. Los pValor de los contrastes para g2, gc y gt fueron 0,004, 0,00005 y 0,0002, respectivamente.

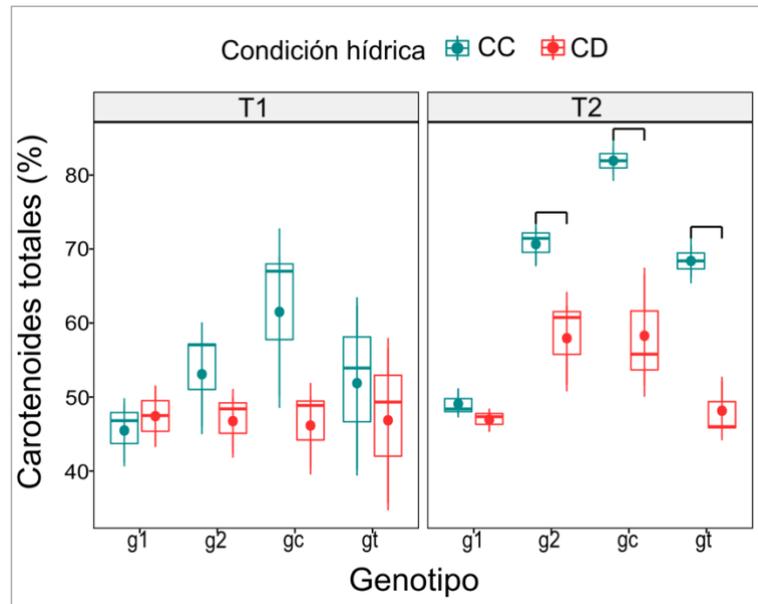


Figura 13: *boxplot* para el contenido carotenoides en % de la totalidad de la extracción para *E. grandis* (g1 y g2), *E. grandis* x *E. camaldulensis* (gc) y *E. grandis* x *E. tereticornis* (gt) en condición hídrica control (CC) y déficit (CD) medidas a los 38 (T1) y 129 (T2) días. Se compara el efecto de la condición hídrica en cada genotipo. Las llaves negras indican diferencias significativas para un pValor < 0,05.

4. DISCUSIÓN

4.1 CONDICIONES AMBIENTALES E HÍDRICAS

Para establecer una condición de déficit hídrico no solo se debe tener en cuenta la disponibilidad de agua, sino también la demanda atmosférica, ya que una condición de bajo suministro, pero de poca demanda, no necesariamente establecerá la condición de déficit. A su vez, teniendo en cuenta que existe un continuo entre el sistema suelo-planta-atmósfera, las características del vegetal para responder tanto a la demanda como al suministro también determinan si efectivamente hubo una condición de estrés.

Expresar los tratamientos en términos de potencial mátrico permite conocer en qué medida se encuentra retenida el agua por el suelo de forma tal que con valores menores al de marchitez permanente (-1,5MPa) el agua no se encuentra disponible para la planta. Los resultados muestran que los tratamientos fueron diferentes a lo largo de todo el período y que el más limitante (CD) se encontró próximo al incremento exponencial de potencial mátrico sin llegar al punto de marchitez permanente, por lo que existieron condiciones de suministro capaces de establecer una situación de déficit hídrico.

Por otro lado, teniendo en cuenta los resultados de temperatura y DPV, se puede caracterizar el estado de demanda. Los registros de temperatura indican que en todo momento hubo valores medios entre 20 y 40 grados; sin embargo, las máximas superan los 40 grados y llegan a superar los 50 grados en algunos momentos. El DPV en todo momento tomó valores por encima de los 2 KPa, por lo que, teniendo en cuenta el trabajo de Amitrano et al. (2019), se espera que este imponga efectos negativos sobre el metabolismo general de la planta.

Finalmente, los materiales presentaron signos de déficit hídrico a través del consumo y la conductancia. El consumo de agua a lo largo del período fue menor y más estable en la CD en todos los clones menos g1. En el mismo sentido se comportaron los valores de conductancia en T1. En T2 g1 presentó conductancias diferentes según el tratamiento, mientras que gt las igualó. El menor consumo asociado a valores de conductancia bajos es evidencia de que existe regulación estomática, como proponen Beardsell y Cohen (1975). Teniendo en cuenta las variables en conjunto, se puede afirmar que hay condiciones fisiológicas en la planta que denotan una condición de déficit hídrico en todos los clones, menos en g1, en la primera medición. Mientras que, al cambiar a la segunda, gt es el único que iguala las variables de intercambio gaseoso, por lo que el clon muestra indicios de aclimatación en el tiempo.

La evolución de la altura por condición hídrica permite reafirmar lo dicho, ya que, teniendo en cuenta que se trata de una variable de crecimiento y que se ve afectada por la falta de turgencia (Myers y Neales, 1986), menor altura denota menor turgencia.

4.2 ASIMILACIÓN NETA Y CONDUCTANCIA

La capacidad de asimilar CO_2 se vio afectada de manera diferente dependiendo del clon y del momento. En T1, se identificaron dos comportamientos. Por un lado, g1, g2 y gc mantuvieron su capacidad de asimilación independientemente de la condición hídrica, mientras que gt presentó mayor A_n en CD, lo cual se aleja de lo esperado. En este último caso, gs también fue menor, por lo que gt alcanzó su máxima capacidad de asimilación con menor suministro de CO_2 y menos suministro de agua. Los clones g2 y gc presentaron valores de conductancia mayores en CC. Es decir que a pesar de que el suministro de CO_2 fue menos restringido, las tasas de asimilación fueron iguales o muy similares, lo que nuevamente se

aleja de lo esperado, dado que en C3 mayor suministro se traduce en mayor asimilación. Finalmente, g1 no varió ni su conductancia ni An, por lo que no muestra síntomas de estrés en estas variables y es el único clon que muestra coordinación entre An y gs y que se comporta como se espera.

En la T2, g1 disminuyó An en CD. En este caso también se registra una disminución en los valores de gs, lo que permite explicar el descenso en An. Por otro lado, g2 repitió el comportamiento de T1, es decir que en CC no alcanzó tasas de asimilación mayores dada una gs mayor. Los híbridos desarrollaron tasas significativamente mayores de asimilación en la condición déficit. Se diferencian en las gs asociadas, ya que gt las igualó, mientras que gc tuvo menor gs en déficit. Nuevamente ocurren en g2, gc y gt respuestas que se alejan de lo esperado para una condición de déficit hídrico.

En virtud de los resultados se pueden plantear dos escenarios. Por un lado, en el caso de g1, el desempeño en An parece estar gobernado por gs, ya que ambas variables se mueven en el mismo sentido. En este caso, el proceso la tasa de asimilación parece estar gobernada por factores de tipo estomático y se alinea con los trabajos de Flexas y Medrano (2002), Zhou et al. (2016) y Berenguer et al. (2018). Para el resto de los clones no se identifica una asociación directa entre gs y An, y, a su vez, sobresale el hecho de que a pesar de presentar gs mayores en CC, no se desarrollen An mayores. En este sentido, las limitantes a la asimilación no son de tipo estomático. Una posible aproximación para tratar de explicar dicha descoordinación es mediante el estudio del efecto del tratamiento en la fase fotoquímica y evaluar si es en este punto en que hubo alguna clase de daño, que explique las diferencias en An.

4.3 FASE FOTOQUÍMICA

Para comprender el resultado a nivel de tasa de asimilación neta se pueden estudiar aquellos factores no estomáticos que definen el potencial fotosintético. El estudio de la partición de la energía permite saber si existen diferencias en cuanto a la administración de la radiación que puedan limitar la fase bioquímica.

En T1 el tratamiento tuvo efecto significativo sobre Φ PSII en g1 y g2, pero en diferente sentido, ya que g1 incrementó Φ PSII en CC y g2 la disminuyó. El cambio en g1 no pareciera afectar mayormente lo ocurrido a nivel de An ya que, de ser así, se esperaría una disminución mayor de An en la condición déficit. Por otro lado, en el caso de g2, Φ PSII fue menor en CC, lo que puede ayudar a comprender por qué dicho clon no desarrolló mayor An a pesar de que gs fue mayor. Son pocos los trabajos que identifican mayor valor de Φ PSII en una condición déficit, como es el caso de Berenguer et al. (2018) que trabajan con el híbrido *E. globulus* x *E. cypelloarpa* y lo asocian a incrementos en el contenido de carotenoides y su rol protector en contra de las especies reactivas del oxígeno.

El clon gc no alteró Φ PSII, por lo que el desempeño de la fase fotoquímica no explica por qué en CC no se alcanza mayor An a pesar de la mayor gs. Finalmente, con gt ocurre algo similar, ya que tampoco modificó Φ PSII; sin embargo, desarrolló An significativamente menores en CC. En ambos casos necesariamente tiene que existir algún factor de otra índole como pueden ser cambios en la difusión de CO₂ o daños enzimáticos que limiten el potencial de asimilación en CC.

En T2 el análisis de varianza únicamente capta el efecto significativo de la condición hídrica, por lo que solo se puede afirmar que la media de Φ PSII de la condición control fue significativamente menor que la media de la

condición déficit. En este caso, no es posible analizar la condición particular de cada clon como sí habilita la significancia en la interacción G x CH, lo que no permite captar que en el caso particular de g1 las medias parecen ser iguales. Sin embargo, a pesar de no poder hacer el análisis caso a caso, los datos indican que en la condición control existe algún factor que hace que Φ PSII caiga, lo cual nuevamente se aleja de lo esperado en una condición únicamente de déficit hídrico.

En ambos momentos, los mecanismos de disipación térmica en forma regulada (Φ NPQ) responden en forma inversa a Φ PSII, por lo que las hojas cuentan con un mecanismo de fotoprotección que les permite disipar el exceso de energía, como es de esperar en las especies de eucalipto y reafirma lo ocurrido en los trabajos de Piazza (2021) y Duhalde (2021).

4.4 PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

Dado que lo ocurrido a nivel de fluorescencia tiene correlato con la composición de pigmentos del PSII, mediante el estudio de las clorofilas y los carotenos se puede dar sustento a los resultados de Φ PSII y Φ NPQ (Blankenship, 2014).

En T1, el contenido de clorofilas no se vio afectado significativamente por ninguna fuente de variación, lo que permite explicar los resultados en gc, gt y g2 que, si bien el último obtuvo diferentes Φ PSII, no fueron marcados. El clon g1 mantuvo el contenido; sin embargo, las diferencias entre Φ PSII sí fueron marcadas.

En T2 ambos híbridos y g2 presentan mayor contenido de clorofila en la CD, por lo que se explica el incremento en Φ PSII. Sin embargo, no se espera que una planta presente mayor clorofila en dicha condición (Hsiao, 1973; Mihailovic et al., 1997; Xue, 2011), a menos que presente alguna

estrategia de tolerancia (Michelozzi et al., 1995, De Araújo et al., 2016). El clon g1 tampoco modificó esta vez el contenido de clorofila, lo que también aporta a la idea de que las medias de Φ_{PSII} son iguales y que la ausencia de la interacción G x CH en Φ_{PSII} se debe principalmente a la dispersión en los datos.

De forma inversa responden los carotenoides que incrementan su contenido en la condición control, salvo en el caso de g1 que nuevamente no modifica el resultado. Lo ocurrido en T2, permite comprender el aumento Φ_{NPQ} para los clones en CC.

En síntesis, la cuantificación de los pigmentos permite explicar, en la mayoría de los casos, los resultados a nivel de la partición de la energía, por lo que hay coherencia interna entre diferentes puntos del proceso fotosintético como lo son la fase fotoquímica y el contenido de pigmentos. El cambio en las respuestas entre momentos de medición puede ser consecuencia de la intensidad del factor de estrés, como proponen Maseda y Fernandez (2006) o como muestran los resultados de Zhou et al. (2016). Considerando la tasa de asimilación neta, salvo en g1, los demás clones presentaron menor clorofila asociada a menor An en la condición control, lo que puede aportar a entender qué puntos del proceso fueron limitantes.

4.5 EFECTO DEL DÉFICIT EN CONTEXTO DE ALTA TEMPERATURA

En vista de los resultados se puede afirmar que existieron condiciones para establecer una condición de déficit hídrico. Sin embargo, las respuestas obtenidas no coinciden con lo esperado, ya que los efectos deprimidos ocurrieron en condición control. Tal es el caso de los híbridos y g2, que diferentes variables fotosintéticas medias presentaron un desempeño inferior en la condición control, que no pudo ser explicado por medio de gs ni por una condición de déficit hídrico como único factor de estrés. En este sentido,

se plantea considerar la temperatura en la que crecieron las plantas en el invernáculo como posible factor de estrés.

Existen diversos estudios que analizan los efectos de la ocurrencia simultánea de diferentes factores de estrés. En su trabajo, Mittler (2006) sostiene que, en condiciones normales, los diferentes tipos de estrés no ocurren en forma aislada, sino que interactúan entre ellos imprimiendo efectos antagónicos o sinérgicos. Es por ello que deben estudiarse en combinación y no aislados. Diversos autores como Havaux (1992), Camejo et al. (2005), Sainz (2009), Zsófi et al. (2009) y Cui et al. (2015) proponen que existen evidencias en cultivos de papa, tomate, morrón, trigo, alfalfa y vid que muestran que puede existir interacción antagónica entre el déficit hídrico y las elevadas temperaturas, de modo tal que el déficit induce cambios que le otorgan a las plantas ventajas frente a las elevadas temperaturas. Las estrategias tienen que ver con modificaciones en la conformación de los ácidos grasos de los fosfolípidos o ajustes de tipo osmótico a nivel de los cloroplastos que ayudan a mantener la integridad de las membranas (Havaux, 1992, Nievola et al., 2017).

Los registros de temperatura indicaron que los valores superaron los óptimos de temperatura para los eucaliptos utilizados, por lo que esta condición pudo haber generado efectos adversos sobre la fotosíntesis de las plantas (Amitrano, 2019, Pallardy, 2008, Brussa, 1994). Los resultados en T1 indicaron que g2, gc y gt en condición control dieron indicios de limitantes de tipo no estomáticas, ya que no alcanzaron mayores tasas dada la mayor conductancia. En el caso de g2, la limitante se podría asociar a la disminución en valor de Φ_{PSII} . En gc y gt la menor A_n no se explica desde la fase fotoquímica, por lo que se puede plantear la ocurrencia de problemas a nivel enzimático en la fase bioquímica, lo que es de esperar que ocurra en plantas que no sean termotolerantes (Berry y Björkman, 1980).

En T2 los mismos clones presentaron limitantes de tipo no estomático y su comportamiento se acentuó en la medida en que incrementó la intensidad de ambos factores de estrés en el tiempo. Ninguno de los tres clones en condición control alcanzó las tasas de asimilación esperadas dada la mayor conductancia. En estos casos, la partición de la energía se desplazó hacia el incremento en la disipación térmica regulada y la disminución en la energía destinada a transferir electrones, al mismo tiempo que incrementó los niveles de carotenoides y redujeron los de clorofilas. Todas estas respuestas coinciden con lo esperable en plantas no termo tolerantes.

En ambos momentos de medición, g_2 , g_c y g_t en condición control presentaron un comportamiento sin indicios de déficit hídrico, aunque con efectos que se asemejan al estrés térmico. Por lo que hay evidencias para proponer la ocurrencia de efectos antagónicos entre los factores de estrés. En este sentido, las plantas en condición control presentaron un desempeño inferior al esperado, posiblemente porque no pasaron los procesos de rusificación que induce el déficit hídrico previo y, por lo tanto, no adquirieron termotolerancia.

4.6 DÉFICIT HÍDRICO Y CRECIMIENTO

En CC las plantas siguen un patrón de crecimiento que se ajusta a lo propuesto para la variación estacional del crecimiento, ya que, en la medida en que la demanda atmosférica incrementa en el verano como consecuencia del aumento de la temperatura, ocurren dos fenómenos. Por un lado, se intensifica la condición de déficit y, por el otro, las temperaturas se alejan aún más de los óptimos de las especies. Las plantas en déficit no respondieron a la estacionalidad en el crecimiento, posiblemente por ver afectada la dinámica estomática y por la falta de turgencia.

Si bien en la CD se desarrollaron mayores o iguales A_n , el crecimiento no respondió de la misma forma. Tal es el caso de los híbridos, que desarrollaron iguales o mayores tasas con riego restringido; sin embargo, la altura de las plantas en la condición control fue significativamente mayor. En el caso de g2, su A_n se mantuvo igual en ambas condiciones, mientras que la altura CC fue mayor, por lo que, nuevamente, queda en evidencia que entre el desempeño fotosintético y el crecimiento existen otros procesos como puede ser cambios en la eficiencia en el uso del agua que pueden interferir en una relación más directa. También se podría plantear que el estudio de la fotosíntesis con base en la hoja no permite trasladar las respuestas a un proceso mayor como lo es el crecimiento.

El clon g1 desarrolló alturas diferentes entre condiciones hídricas, aunque dicho cambio no ocurrió en el mismo grado que en el resto de los materiales. En este caso en particular, los diferentes aspectos de la fotosíntesis tampoco presentaron grandes diferencias. Se podría plantear que tanto los efectos del tratamiento como los de la temperatura no fueron lo suficientemente severos como para acentuar las diferencias entre tratamientos. El nivel de estrés al que se indujo a este clon fue menor que en el resto de los clones.

5. CONCLUSIONES

- 1) La condición hídrica de $-0,30$ MPa establece una condición de déficit hídrico en todos los clones en diferentes momentos y magnitud.
- 2) Los clones de *Eucalyptus spp.* presentaron diferentes estrategias de respuesta al déficit hídrico asociado a elevadas temperaturas. El clon g1 presentó limitantes de tipo estomáticas, mientras que g2, gc y gt presentaron limitantes en la fase fotoquímica de la fotosíntesis. Los tipos de respuestas depende de la duración del tratamiento y de la intensidad del tratamiento.
- 3) Existen marcadores que permiten identificar mecanismos de tolerancia. El contenido de pigmentos y la tasa de asimilación neta se modificaron de la misma forma en el largo plazo.
- 4) El déficit hídrico limitó el crecimiento de todos los clones y no tuvo relación directa con los cambios en la tasa de asimilación neta.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Allen RG, Pereira LS, Raes D, Smith M. 1998. Crop evapotranspiration – Guidelines for computing crop water requirements. FAO Irrigation and drainage paper 56. FAO. 300(9)
- Amitrano C, Arena C, Roupael Y, De Pascale S, De Micco V. 2019. Vapour pressure deficit: The hidden driver behind plant morphofunctional traits in controlled environments. *Annals of Applied Biology*, 175(3): 313-325.
- Armond P, Björkman O, Staehelin L. 1980. Dissociation of supramolecular complexes in chloroplast membranes. A manifestation of heat damage to the photosynthetic apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 601: 433-442.
- Baker N. 2008. Chlorophyll Fluorescence: a probe of Photosynthesis in vivo. *Plant Biology*. 59: 89-113.
- Battaglia M, Cherry M, Beadle C, Sands P, Hingston A. 1998. Prediction of leaf area index in eucalypt plantations: effects of water stress and temperature. *Tree Physiology*, 18(8-9): 521-528.
- Beardsell M, Cohen D. 1975. Relationships between leaf water status, abscisic acid levels, and stomatal resistance in maize and sorghum. *Plant Physiology*. 56(2): 207-212.
- Bedon F, Majada J, Feito I, Chaumeil P, Dupuy JW, Lomenech AM, Barre A, Gion J, Plomion C. 2011. Interaction between environmental factors affects the accumulation of root proteins in hydroponically grown *Eucalyptus globulus* (Labill.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(1): 69-76.
- Berenguer HD, Alves A, Amaral J, Leal L, Monteiro P, De Jesus C, Pinto G. 2018. Differential physiological performance of two *Eucalyptus* species and one hybrid under different imposed water availability scenarios. *Trees*. 32(2): 415-427.
- Berry J, Björkman O. 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review Plant Physiology*. 31: 491 – 543.

- Björkman O, Powles SB. 1984. Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. *Planta*. (161):490-504.
- Blankenship R. 2014. *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. 2nd ed. Chichester, Wiley. 312 p.
- Booth TH. 2013. Eucalypt plantations and climate change. *Forest Ecology and Management*. 301: 28-34. [SEP]
- Bota J, Medrano H, Flexas J. 2004. Is photosynthesis limited by decreased rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New phytologist*, 162(3): 671-68
- Bradbury M, Baker NR. 1981. Analysis of the slow phases of the in vivo chlorophyll fluorescence induction curve. Changes in the redox state of photosystem II electron acceptors and fluorescence emission from photosystems I and II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 635(3): 542-551.
- Bray EA. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in plant science*. 2(2): 48-54.
- Brussa A. 1994. *Eucalyptus: especies de cultivo más frecuentes en Uruguay y regiones de clima templado*. Montevideo, Hemisferio Sur. 328 p.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. 2015. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 3rd ed. Oxford, UK, John Wiley. 1264 p.
- Butler WL. 1978. Energy distribution in the photochemical apparatus of Photosynthesis. *Annual Review Plant Physiology*. (29): 345-378.
- Camejo D, Rodriguez P, Morales MA, Dell'Ámico JM, Torrecillas A, Alarcón, JJ. 2005. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *Journal of Plant Physiology*. 162: 281-289.
- Cui Y, Tian Z, Zhang X, Muhammad A, Han H, Jiang D, Cao W, Dai T. 2015. Effect of water deficit during vegetative growth periods on post-anthesis photosynthetic capacity and grain yield in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) *Acta Physiologiae Plantarum*. 37: 196-205.

- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. 2003. Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239–264. DOI: 10.1071/FP02076
- Da Silva MR, Klar AE, Passos JR. 2004. Efeitos do manejo hídrico e da aplicação de potássio nas características morfofisiológicas de mudas de *Eucalyptus grandis* W. (Hill ex. Maiden). *Irriga*. 9(1): 31-40.
- De Araújo IM, Rocha MW, Pinto AC, de Sousa LP, dos Santos RV, Barbosa J, Titon M, Fernandes R, de Laia ML. 2016. Determination of parameters for selection of *Eucalyptus* clones tolerant to drought. *African Journal of Agricultural Research*. 11(40): 3940-3949. doi.org/10.5897/AJAR2016.11325
- De Azevedo C, Rodriguez D. 2009. Qualitative and quantitative differences in the carotenoid composition of yellow and red peppers determined by HPLC-DAD-MS. *Journal of Separation Science*. 32: 3652- 3658. doi.org/10.1002/jssc.200900311
- Demmig-Adams B, Gilmore AM, lii WA. 1996. In vivo functions of carotenoids in higher plants. *The FASEB Journal*. 10(4): 403-412
- Doley D. 1967. Water relations of *Eucalyptus Marginata* SM. Under natural conditions. *Journal of Ecology*. 55(3): 597-614.
- Downton WJ, Berry JA, Seemann JR. 1984. Tolerance of photosynthesis to high temperature in desert plants. *Plant Physiology*. 74(4): 786- 790.
- Duhalde J. 2021. Análisis de la respuesta fotosintética en clones de *Eucalyptus grandis* sometidos a cambios en la radiación lumínica. Tesis Ing. Agr. Montevideo. Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 51 p.
- Dye PJ. 1996. Response of *Eucalyptus grandis* trees to soil water deficits. *Tree Physiology*. 16(1-2): 233-238.
- Ebrahimiyan M, Majidi MM, Mirlohi A, Noroozi, A. 2013. Physiological traits related to drought tolerance in tall fescue. *Euphytica*. 190(3): 401-414. doi.org/10.1007/s10681-012-0808-8

- Farquhar GD, Sharkey TD. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*. 33: 317-345.
- Fernández ME, Gyenge JE. (eds.) 2010. Técnicas en medición en ecofisiología vegetal: conceptos y procedimientos. Buenos Aires, INTA. Pp. 119-128.
- Flexas J, Medrano H. 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany*. 89(2): 183-189.
- Flexas J, Ribas-Carbó M, Diaz-Espejo A, Galmés J. 2008. Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. *Plant, cell and environment*. 31:606-621.
- Guarnaschelli A, Garau A, Lemcoff J. 2012. Water stress and afforestation: a contribution to ameliorate forest seedling performance during the establishment. In: Mofizur Rahman HH, Ismail Md (eds.) *Water stress*, 1st ed. Rijeka, InTech, Croatia, pp. 74-110
- Havaux M. 1992. Stress tolerance of Photosystem II in vivo. Antagonistic effects of water, heat and Photoinhibition stresses. *Plant Physiology*. 100: 424-432. doi.org/10.1104/pp.100.1.424
- Havaux M, Gruszecki WI. 1993. Heat-and light-induced chlorophyll a fluorescence changes in potato leaves containing high or low levels of the carotenoid zeaxanthin: Indications of a regulatory effect of zeaxanthin on thylakoid membrane fluidity. *Photochemistry and Photobiology*. 58(4): 607-614.
- Hsiao T. 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review Plant Physiology*. 24: 519-570.
- Jablonski A. 1933. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature*. 131: 839-840
- Jahns P, Latowski D, Strzalka K. 2009. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1787(1): 3-14
- Kalaji HM, Schansker G, Brestic M, Bussotti F, Calatayud A, Ferroni L, Goltsev V, Guidi L, Jajoo A, Li P, Losciale P, Mishra VK, Misra AN, Nebauer SG, Pancaldi S, Penella C, Pollastrini M, Suresh K, Tambussi E, Yanniccari M,

- Zivcak M, Cetner MD, Samborska IA, Stirbet A, Olsovska K, Kunderlikova K, Shelonzek H, Rusinowski S, Baba W. 2017. Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynthesis Research*. 132: 13-66.
- Kasajima I, Takahara K, Kawai-Yamada M, Uchimiya H. 2009. Estimation of the relative sizes of rate constants for chlorophyll de-excitation processes through comparison of inverse fluorescence intensities. *Plant Cell Physiology*. 50(9): 1600-1616.
- Krause GH, Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42: 313-349.
- Lazár D. 2015. Parameters of photosynthetic energy partitioning. *Journal of Plant Physiology*. 175: 131-147.
- Leuning R. 1990. Modelling stomatal behaviour and photosynthesis of *Eucalyptus grandis*. *Australian Journal of Plant Physiology*. 17: 154-175.
- Linderman T, Plata V, Sancho D, Oyhantcabal W. 2013. *Clima de cambios*. W. Oyhantcabal, D. Sancho, & M. Galván (eds.). Montevideo, Uruguay: FAO, Ministerio Ganadería, Agricultura y Pesca, República Oriental del Uruguay. [En línea]. 9 de junio 2018. Disponible en: <https://www.fao.org/climatechange/3980504fd4a450820d64c555478e4a0939a555.pdf>
- Loepfe L, Martinez-Vilalta J, Piñol J, Mencuccini, M. 2007. The relevance of xylem network structure for plant hydraulic efficiency and safety. *Journal of Theoretical Biology*: 247(4): 788-803
- Martín D. 2020. Producción vegetal: forestación. *Anuario estadístico agropecuario DIEA*. 2017: 117-121.
- Maseda P, Fernandez R. 2006. Stay wet or else: three ways in which plants can adjust hydraulically to their environment. *Journal of Experimental Botany*. 57: 3963-3977.
- Mata LJ, Campos M, Basso E, Compagnucci R, Fearnside P, Magrin G, Villers L. 2001. Impacts of Climate Change In Latin America-wide reports, Working

- Group II: Impacts, Adaptation and Vulnerability, Intergovernmental Panel of Climate Changeanel of Climate Change. 694-734.
- Merchant A, Callister A, Arndt S, Tausz M, Adams M. 2007. Contrasting physiological responses of six Eucalyptus species to water deficit. *Annals of Botany*. 100(7): 1507-1515.
- Meter. Tools and tips for measuring the full soil moisture release curve. [en línea]. 25 de mayo 2022. Disponible en: <http://manuals.decagon.com/Application%20Guides/18189%20Soil%20Moisture%20Release%20Curve.pdf>
- Michelozzi M, Johnson J, Warrag, E. 1995. Response of ethylene and chlorophyll in two eucalyptus clones during drought. *New Forest*. 9: 197-204
- Mihailovic N, Lazarevic M, Dzeletovic Z, Vuckovic M, Durdevic M. 1997. Chlorophyllase activity in wheat, *Triticum aestivum* L. leaves during drought and its dependence on the nitrogen ion form applied. *Plant Science* 129: 141-146. doi:10.1016/S0168-9452(97)00189-1
- Mittler R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*. 11(1): 15-19.
- Myers BA, Neales TF. 1986. Osmotic adjustment, induced by drought, in seedlings of three Eucalyptus species. *Functional Plant Biology*. 13(5): 597-603.
- Nievola CC, Carvalho CP, Carvalho V, Rodrigues E. 2017. Rapid responses of plants to temperature changes. *Temperature*, 4(4): 371-405. doi: 10.1080/23328940.2017.1377812
- Öquist G, Hunter NP. 2003. Photosynthesis of overwintering evergreen plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1): 329-355.
- Pallardy SG. 2008. *Physiology of Woody Plants*. 14th ed. Amsterdam, Elsevier. 454 p.
- Parry MA, Andralojc PJ, Scales JC, Salvucci ME, Carmo-Silva AE, Alonso H, Whitney SM. 2013. Rubisco activity and regulation as targets for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*. 64(3): 717-730.
- Pereira J, Tenhunen O, Lange O, Beyschlag W, Meyer A, David M. 1985. Seasonal and diurnal pattern in leaf gas Exchange of *Eucalyptus globulus*

- trees growing in Portugal. *Canadian Journal of Forest Research*. 16: 177-184.
- Pfautsch S, Harbusch M, Wesolowski A, Smith R, Macfarlane C, Tjoelker MG, Reich P, Adams MA. 2016. Climate determines vascular traits in the ecologically diverse genus *Eucalyptus*. *Ecology Letters*, 19(3): 240-248.
- Piazza S. 2021. Análisis de la respuesta fotosintética en clones de *Eucalyptus* frente a cambios en ambientes lumínicos. Tesis Ing. Agr. Montevideo. Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 51 p.
- Pook E. 1985. Canopy dynamics of *Eucalyptus maculata* Hook. III Effects of Drought. *Australian Journal of Botany*. 33(1): 65-79.
- Porcar-Castell A, Juurola E, Nikinmaa E, Berninger F, Ensminger I, Hari P. 2008. Seasonal acclimation of photosystem II in *Pinus sylvestris*. I. Estimating the rate constants of sustained thermal energy dissipation and photochemistry. *Tree Physiology*. 28: 1475-1482.
- Potts BM. 2004. Genetic improvement of eucalypts, in *Encyclopedia of forest sciences*. Elsevier, Oxford, UK, pp. 1480-1490.
- Prior L, Eamus D, Duff G. 1997. Seasonal and diurnal patterns of carbon assimilation, stomatal conductance and leaf water potential in *Eucalyptus tetrodonta* samplings in a wet-dry savanna in northern Australia. *Australian Journal of Botany*. 45: 241-258.
- Quero G, Bonnacarrre V, Fernández S, Silva P, Simondi S, Borsani O. 2019. Light-use efficiency and energy partitioning in rice is cultivar dependent. *Photosynthesis Research*. 140(1): 51-63. doi.org/10.1007/s11120-018-0605-x
- Quick WP, Stitt M. 1989. An examination of factors contributing to non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 977(3): 287-296.
- R Core Team. 2017. R: a language and environment for statistical computing. The R Foundation. [En línea]. 5 de junio 2018. Disponible en: <https://www.R-project.org>.

- Reis LA, De Oliveira JA, Dos Santos Farnese F, Rosado AM, Reis LA. 2021. Chlorophyll fluorescence and water content parameters are good biomarkers for selecting drought tolerant eucalyptus clones. *Forest Ecology and Management*, 481, 118682. doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118682
- Rejmánek M, Richardson DM. 2011 Eucalypts. In: *Encyclopedia of Biological Invasions*. Simberloff, D. and Rejmánek, M. (eds.). Berkeley, CA: University of California Press, pp. 203.
- Russell L. 2018. Emmeans: estimated marginal means, aka least-squares means. R package version 1.2.1. [En línea] 9 junio 2022. Disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/index.html>.
- Ryan M. 2011. Tree responses to drought. *Tree Physiology*. 31: 237–239. doi.org/10.1093/treephys/tpr022
- Saadaoui E, Yahia K, Dhahri S, Jamaa ML, Khouja ML. 2017. An overview of adaptative responses to drought stress in *Eucalyptus* spp. *Forestry Studies*. 67: 86-96.
- Sainz M. 2009. El fotosistema II como blanco del estrés abiótico en *Lotus* sp. Tesis Maestría. Montevideo. Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 82 p.
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C. 1995. Chlorophyll Fluorescence as a Noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In Schulze, E; Caldwell, M.; Martyn, M. *Ecophysiology of Photosynthesis*. 49-70.
- Sharkey TD. 1988 Estimating the rate of photorespiration in leaves. *Physiologia Plantarum* 73: 147-152.
- Sprecht R, Brouwer Y. 1975. Seasonal shoot growth of *Eucalyptus* spp. in the Brisbane area of Queensland (with notes on shoot growth and litter fall in other areas of Australia). *Australian Journal of Botany*. 23: 459-474.
- Taiz L, Zeiger E, Moller I, Murphy A. 2015. *Plant Physiology and Development*. 6th ed. Sunderland, Sinauer Associates. 761 p.
- Utkhao W, Yingjajaval S. 2015. Changes in leaf gas exchange and biomass of *Eucalyptus camaldulensis* in response to increasing drought stress induced

- by polyethyleneglicol. *Trees*. 29: 1581-1592.
- White A, Turner N, Galbraith H. 2000. Leaf water relations and stomatal behavior of four allopatric *Eucalyptus* species planted in Mediterranean southwestern Australia. *Tree Physiology*. 20: 1157-1165
- Whitehead D, Beadle CL. 2004. Physiological regulation of productivity and water use in *Eucalyptus*: a review. *Forest Ecology and Management*. 193: 113-140.
- Wingfield MJ, Roux J, Slippers B, Hurley B, Garnas J, Myburgh AA, Winnefeld BD. 2013. Established and new technologies reduce increasing pest and pathogen threats to *Eucalypt* plantations. *Forest Ecology and Management*. 301: 35-42
- Xue LL, Anjum SA, Wang LC, Saleem MF, Liu XJ, Ijaz MF, Bilal MF. 2011. Influence of straw mulch on yield, chlorophyll contents, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities of soybean under drought stress. *Journal of Food and Agriculture. Environment*. 9: 699-704.
- Zhou S, Medlyn BE, Prentice CI. 2016. Long-term water stress leads to acclimation of drought sensitivity of photosynthetic capacity in xeric but not riparian *Eucalyptus* species. *Annals of Botany*. 117: 133-144.
- Zsófi Z, Váradi G, Bálo B, Marschall M, Nagy Z, Dulai S. 2009. Heat acclimation of grapevine leaf photosynthesis: mezo- and macroclimatic aspects. *Functional Plant Biology*. 36: 310- 322.

7. ANEXOS

A continuación, se presenta un artículo científico como parte de los requisitos para obtener el título de magíster en Ciencias Agrarias (Facultad de Agronomía, UdelaR). El formato elegido corresponde a la revista *Agrociencia* (Chile) y las instrucciones para autores se encuentran disponibles en: <http://agro-ciencia.cl/web/instruccion-para-los-auto>

