

## Tolerancia de *Cedrela lilloi* C.DC. a bajas temperaturas: cambios metabólicos

*Tolerante to low temperature in Cedrela lilloi C.DC.: metabolic changes*

Meloni, D. A.<sup>1,2</sup>; L. Fornés<sup>3</sup>; M. R. Gulotta<sup>2</sup> y D. Moura Silva<sup>4</sup>

### RESUMEN

El cedro (*Cedrela lilloi* C.DC.) es una especie de alto valor comercial, nativa de la selva Tucumano Oranense. En la delimitación de áreas potenciales para la realización de plantaciones con esta especie, resulta esencial evaluar su tolerancia a estreses ambientales (principalmente hídrico y térmico). El objetivo de este trabajo fue determinar la tolerancia de *C. lilloi* C.DC. al estrés producido por bajas temperaturas, y sus bases bioquímicas. Se ensayaron tres tratamientos: un testigo (temperatura continua de 25°C) y dos niveles de estrés: moderado (15°C durante el día y 10°C durante la noche), y severo (10°C durante el día y 5°C nocturnos). Se determinó la pérdida de solutos a través de las membranas, se estimó la peroxidación de lípidos mediante la determinación de la concentración de malondialdehído, y se cuantificó la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, involucradas en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 4 repeticiones, y los datos se analizaron con ANOVA y test de Tukey. Mientras que el estrés moderado no afectó la pérdida de solutos a través de las membranas, el estrés severo produjo un incremento superior al 50%. Tanto el estrés moderado, como el severo, produjeron un incremento en la actividad de la SOD. La actividad de la CAT no fue afectada por el estrés moderado, pero fue inhibida por el estrés severo. Se concluye que en los primeros estadios de su desarrollo, *C. lilloi* C.DC. proveniente de El Cadillal, Tucumán, es sensible al estrés térmico severo, ya que no cuenta con un eficiente sistema de enzimas detoxificadoras de ROS, en estas condiciones ambientales

**Palabras clave:** Estrés térmico; *Cedrela lilloi*; Estrés oxidativo.

### ABSTRACT

*Cedrela lilloi* C.DC. is a high commercial-valued species, native to the Tucuman-Oran jungle. When delimiting potential areas for planting this species, testing its tolerance to environmental stresses (mainly water and cold stresses) becomes essential. This paper was aimed at determining *C. lilloi* C.DC. seedlings low-temperature stress tolerance together with its biochemical bases. Three different treatments were tested: one blank (at continuous 25°C) and two under different stress level: moderate (at 15°C daylong and 10°C nightlong), and severe (at 10°C daylong and 5°C nightlong). Solute losses across (membranes) were determined; lipid peroxidation was estimated by determining malondialdehyde concentration; and the activities of the superoxidismutase and catalase enzymes involved in detoxifying reactive oxygen species (ROS) were quantified. A fully randomized experimental design was used with 4 repetitions; data collected were analyzed using ANOVA and the Tukey test. While the moderate stress did not affect solute losses through membranes, the severe one made them increase up to more than 50%. Both the moderate and the severe stresses increased the superoxidismutase enzyme activity. The moderate stress did not affect CAT activity though the severe one inhibited it. It is concluded that *C. lilloi* C.DC. seedlings are sensitive to severe cold stress since they do not count on an efficient reactive-to-oxygen species (ROS) detoxifying enzymes system in these environmental settings

**Keywords:** Cold stress; *Cedrela lilloi*; Oxidative stress.

<sup>1</sup> Instituto para el Desarrollo de Zonas Áridas y Semiáridas (INDEAS), Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Santiago del Estero. Av Belgrano (s) 1912. 4200 Santiago del Estero, Argentina. E-mail: dmeloni@unse.edu.ar

<sup>2</sup> Laboratorio de Fisiología Vegetal, Instituto de Silvicultura y Manejo de Bosques (INSIMA). Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Nacional de Santiago del Estero. Av Belgrano (s) 1912. 4200 Santiago del Estero, Argentina.

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Famallá, Tucumán, Argentina

<sup>4</sup> Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, ES, Brasil

## 1. INTRODUCCION

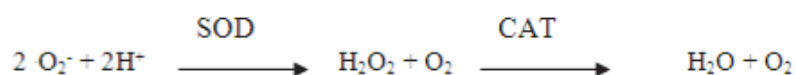
La selva Tucumano Oranense o Yungas, constituye una región fitogeográfica caracterizada por su gran biodiversidad y alto grado de degradación ambiental (Terán y Vargas, 2008). En ella, el cedro (*Cedrela lilloi* C.DC.) es la especie más codiciada por su elevado valor en el mercado de productos forestales. Su madera es muy apreciada por las propiedades tecnológicas que la tornan apta para la fabricación de muebles finos, aberturas, chapas y terciados, molduras, revestimientos y remanufactura de piezas para postigones y persianas (Grau, 2000). En grandes extensiones de selva los ejemplares con alto valor comercial han prácticamente desaparecido, observándose en los sitios más accesibles individuos malformados y en deficientes condiciones sanitarias. Según Pinazo y Gasparri (2003) el aprovechamiento forestal actual incrementa la degradación del recurso maderero regional, existiendo el riesgo de agotamiento.

Para realizar repoblaciones, resulta esencial conocer las características ecofisiológicas de la especie, tales como su tolerancia a estrés térmico producido por bajas temperaturas. Esto permitiría delimitar áreas potenciales para la realización de plantaciones forestales.

Muchos trabajos han mostrado las bases moleculares y bioquímicas del daño producido en los vegetales por las bajas temperaturas (Suzuki y Mittler, 2006), sin embargo éstos se realizaron en plantas herbáceas, y leñosas del hemisferio norte, por lo que no existen referencias que involucren especies de importancia forestal nativas del hemisferio sur.

La homeostasis celular se logra mediante un delicado balance entre varias rutas metabólicas, que tienen lugar en diferentes organelas. Esta coordinación, puede ser alterada debido al estrés térmico, ya que cada ruta metabólica posee una temperatura óptima. Por ejemplo, debido a las propiedades físicas de las membranas, los procesos asociados a ellas, tales como la fotosíntesis y la respiración, son más sensibles al estrés térmico, en comparación con procesos en los que intervienen enzimas solubles. Cuando estas rutas metabólicas se desacoplan, se transfieren al oxígeno molecular ( $O_2$ ) electrones con un alto estado de energía, formándose especies reactivas de oxígeno (ROS, Mittler, 2002). Las ROS, tales como  $^1O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ , y  $OH$ . son moléculas tóxicas, capaces de producir daño oxidativo a proteínas, ADN y lípidos (Apel y Hirt, 2004). Bajo condiciones óptimas de crecimiento, ellas se producen principalmente en cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. Sin embargo, en condiciones de estrés, su tasa de producción se incrementa drásticamente. En cloroplastos, la principal causa de producción de ROS es la limitación en la fijación del  $CO_2$ , acoplada a una elevada sobrerreducción de la cadena transportadora de electrones. La sobre-reducción de la cadena transportadora de electrones es también el principal mecanismo de producción de ROS en mitocondrias durante el estrés (Davidson y Schiestl, 2001). Por otra parte, en peroxisomas, se produce  $H_2O_2$ , cuando el glicolato se oxida a glioxilato, durante la fotorrespiración (Mittler *et al.*, 2004).

Los vegetales han desarrollado mecanismos que les permiten disminuir el daño producido por las ROS, que incluyen enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), localizada en cloroplastos, mitocondrias y citosol, que convierte el radical  $O_2^-$  en  $H_2O_2$  (Suzuki y Mittler, 2006). El  $H_2O_2$  generado en glioxisomas y peroxisomas, es detoxificado a  $H_2O$  por la catalasa (CAT; EC 1.11.1.6), mientras que en otros compartimentos subcelulares, la reacción, es catalizada por la ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11) (Ushimaru *et al.* 2000) (Figura 1).



**Figura 1.** Una de las rutas metabólicas involucradas en la detoxificación de ROS en plantas superiores.

El estrés térmico, producido por altas o bajas temperaturas, es una de las principales causas de la reducción en la producción vegetal (Boyer, 1982), y las ROS generadas por estos estreses, producen daños en las membranas celulares y proteínas (Larkindale y Huang, 2004). De este modo, las especies o ecotipos que poseen mayor actividad de enzimas antioxidantes, son más tolerantes al estrés (Hodges *et al.* 1996).

El objetivo de este trabajo fue determinar la tolerancia al estrés producido por bajas temperaturas en *Cedrela Lilloi* C.DC., y sus bases bioquímicas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. Para la realización de los ensayos, se recolectaron frutos de *C. lilloi* C.DC. provenientes de 15 árboles (bulk), en la Reserva Provincial Aguas Chiquitas (26° 36' 13" S - 65° 9' 40" W, 700 m.s.n.m.), ubicada a 3 km de la localidad de El Cadillal, Tucumán, Argentina. Dicha reserva posee una superficie de 3165 ha y presenta vegetación característica de la región Fitogeográfica de la selva Tucumano Oranense. La misma fue seleccionada para la recolección de germoplasma, por poseer poblaciones de *C. lilloi* C.DC., con madera de excelente calidad, la que se extrajo activamente, hasta el momento en que pasó a ser área protegida. En la tabla I se presentan las temperaturas registradas en la región durante el período 1961-1990.

**Tabla 1.** Valores de temperatura máxima media, máxima absoluta, mínima media, mínima absoluta y media en el área de de estudio, durante el período 1961-1990.

Temperatura		ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SET	OCT	NOV	DIC
Máxima media	°C	30,3	28,9	27,0	23,7	21,1	18,1	18,4	21,6	23,7	27,3	28,4	30,0
Máxima absoluta	°C	40,6	39,5	37,4	34,9	31,5	28,4	39,1	38,0	39,0	40,7	40,3	42,2
Mínima media	°C	19,7	18,9	18,1	14,6	11,4	7,8	6,4	8,1	10,9	14,5	17,0	19,0
Mínima absoluta	°C	10,4	9,1	7,4	2,8	0,1	-2,8	-3,0	-2,8	-0,4	4,7	6,8	9,8
Media	°C	25,0	23,9	22,5	19,1	16,3	12,9	12,4	14,9	17,1	20,9	22,7	24,5

### Material vegetal

Los frutos se recogieron durante el mes de junio del año 2007, encontrándose las cápsulas cerradas, aunque con un cambio de color manifiesto. Posteriormente se dejaron secar en laboratorio, a temperatura ambiente, permitiendo la apertura de las mismas. Luego se seleccionaron semillas de tamaño y color homogéneo, y se almacenaron en bolsas de papel, en cámara fría a 2°C, previa desecación con sílica gel. Los ensayos se realizaron 4 meses después de la cosecha.

Las semillas se sembraron en macetas plásticas conteniendo perlita, que se dispusieron en invernáculo, a temperatura y humedad ambiente, y se irrigaron cada dos días con solución nutritiva de Hoagland al 50%. Durante esta etapa, se registraron temperaturas medias de 25°C y 16°C durante el día y la noche, respectivamente, e irradiancias de 6 MJ m<sup>2</sup>.

Posteriormente, plantas de 60 días de edad, se llevaron a cámara de crecimiento, bajo condiciones controladas de luz (350  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), humedad relativa (55± 2%) y temperatura. Se

ensayaron 3 tratamientos: un testigo (temperatura continua de 25°C) y dos niveles de estrés térmico: moderado (15°C durante el día y 10°C durante la noche), y severo (10 °C durante el día y 5 °C nocturnos). Los ensayos se repitieron dos veces.

### Mediciones y determinaciones bioquímicas.

Luego de 14 días de ensayo se evaluó la pérdida de solutos a través de las membranas, mediante el método de Lutts *et al.* (1996). Para ello extrajeron discos foliares, que luego de ser lavados con agua destilada, se incubaron en tubos de ensayo conteniendo 10 mL de agua destilada a 25°C, bajo agitación continua a 100 rpm, durante una hora. Posteriormente se midió la conductividad eléctrica del agua de incubación ( $EC_1$ ) y se llevó el material a tubos conteniendo agua destilada en ebullición, durante 5 minutos. Dichos tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente, durante 1 hora y luego se midió la conductividad eléctrica ( $CE_2$ ). La pérdida de electrolitos se calculó como el cociente  $CE_1/CE_2$  y expresó como porcentaje.

Debido a que el daño sobre las membranas suele ser ocasionado por radicales libres que producen peroxidación de lípidos (estrés oxidativo), se determinó la concentración de malondialdehído en hojas (el producto de la peroxidación de lípidos), según la técnica de Hendry *et al.* (1993).

Se determinó la actividad de la enzima superóxido dismutasa, (SOD; EC 1.15.1.1) a través de las técnicas de Giannopolitis y Ries (1971) con algunas modificaciones. Se utilizó una mezcla de reacción conteniendo 50 mM de HEPES (pH 7,6), 0,1 mM de EDTA, 50 mM de  $Na_2CO_3$  (pH 10), 13 mM de metionina, 0,025% (v/v) de metionina, Triton X-100, 63  $\mu$ M NBT, 1,3  $\mu$ M riboflavina y una alícuota apropiada de extracto enzimático. Las mezclas de reacción se iluminaron durante 15 minutos con lámpara de intensidad luminosa de 380  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Se consideró una unidad de actividad SOD como aquella cantidad de enzima necesaria para causar un 50% de inhibición en la reducción del NBT, a 560 nm.

La actividad catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) se determinó de acuerdo al método de Badiani *et al.* (1990), monitoreando el consumo de  $H_2O_2$  (coeficiente de extinción de 39,4 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) a 240 nm durante 3 minutos.

### Diseño experimental y análisis estadístico.

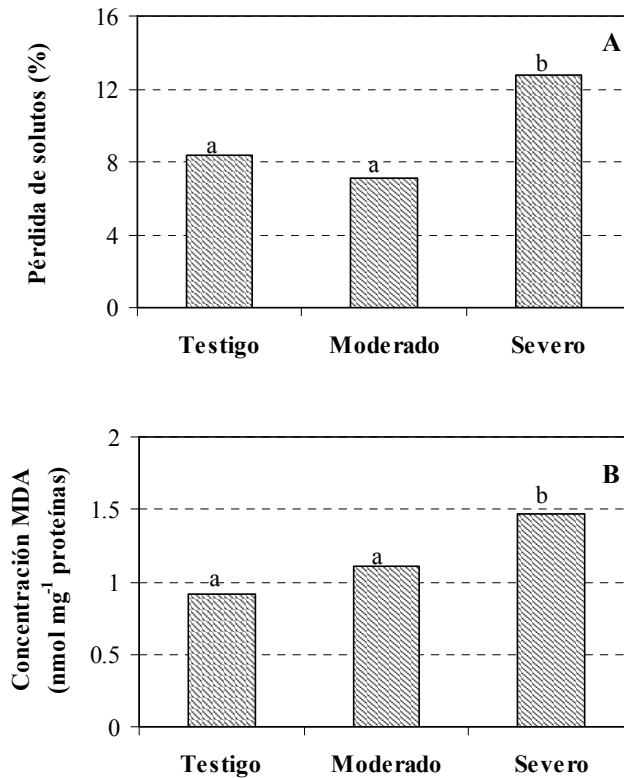
Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 4 repeticiones. La unidad experimental estaba constituida por una maceta conteniendo dos plantas. De cada planta se tomaron tres muestras foliares para realizar las determinaciones químicas. Los datos se analizaron con ANOVA y test de Tukey.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mientras que el estrés moderado no afectó la pérdida de solutos a través de las membranas, el estrés severo produjo un incremento superior al 50% (Figura 2A). Bajas temperaturas, superiores a 0°C, son perjudiciales para muchas especies de regiones tropicales y subtropicales, que no pueden aclimatare a estas condiciones. Este tipo de daño, es conocido frecuentemente como “chilling”, y suele estar asociado a la pérdida de funciones de las membranas, con importante disminución en su fluidez e inactivación de las bombas transportadoras de iones, asociadas a ellas (Beck *et al.* 2004). Coincidiendo con este resultado, el estrés severo produjo un incremento de aproximadamente 40% en la concentración de malondialdehído, con respecto al testigo (Figura 2B), lo que demuestra un aumento significativo en la peroxidación de lípidos. Esto indica que se ha alterado la permeabilidad de las membranas, como consecuencia del estrés

oxidativo. Dicha observación también sugiere una alteración en el metabolismo de las enzimas involucradas en la detoxificación de las ROS producidas en los tratamientos con temperaturas subóptimas.

La temperatura también afectó la actividad de las enzimas detoxificadoras de ROS. El estrés moderado produjo un incremento del 75% en la actividad de la SOD (Figura 3A), y el estrés severo del 94%.



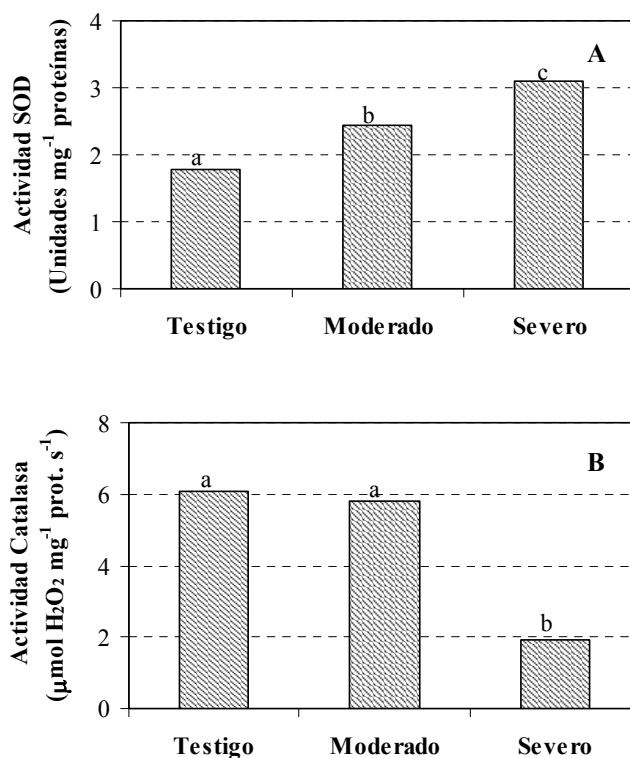
**Figura 2.** Pérdida de solutos (A) y concentración de malondialdehído (B) en hojas de *C. lilloi* C.DC. sometidas a estrés térmico. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos al 5% por el Test de Tukey.

Una tendencia similar fue observada por Tao y Jin en coníferas (1992), quienes observaron un incremento significativo en la actividad SOD durante el otoño e invierno, bajo condiciones naturales.

La actividad de la CAT no fue afectada por el estrés moderado, pero fue inhibida por el estrés severo. Así, mientras en el testigo se obtuvieron actividades de  $6 \mu\text{mol} \cdot \text{mg} \text{proteína}^{-1} \cdot \text{minuto}^{-1}$ , al cabo de 14 días de tratamiento, se cuantificó una fuerte inhibición, con valores medios de  $1,9 \mu\text{mol} \cdot \text{mg} \text{proteína}^{-1} \cdot \text{minuto}^{-1}$  (Figura 3B). Resultados similares fueron reportados por Rivero *et al.* (2002), en plántulas de *Citrullus lanatus* [Thomb.] Mnsf. cv Dulce maravilla, quienes observaron un incremento en la actividad SOD, en plántulas crecidas en condiciones de temperatura subóptimas, y una inhibición en actividad CAT. Estos autores atribuyen ese efecto a la inactivación de la enzima a bajas temperaturas. Rivero *et al.* (2003) también observaron un incremento en la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en hojas de melón y tomate, cultivadas en temperaturas subóptimas de  $10^\circ\text{C}$ , y una disminución en la actividad CAT. Davis y Swanson (2001) reportaron una disminución del 25% en la actividad CAT en plantas de *Secale cereale* L, sometidas a estrés hídrico y térmico, por altas y bajas temperaturas, y citan una posible fotoinactivación, bajo dichas condiciones. Hodges *et al.* (1996) y Pinhero *et al.*

(1997) por el contrario, reportaron aumento en la actividad CAT en plantas de maíz tratadas con bajas temperaturas.

De este modo, al daño producido sobre las membranas, debido a la elevada peroxidación de lípidos, se suman los efectos tóxicos sobre el metabolismo, por la acumulación de  $H_2O_2$ , causada por una baja actividad CAT. Esta alteración podría limitar el crecimiento de *C. lilloi* C.DC. a bajas temperaturas, aunque debe tenerse en cuenta que el daño producido depende de muchos factores, tales como el estado de desarrollo, la duración y la intensidad del estrés, y la velocidad de enfriamiento (y posterior incremento de la temperatura) (Welti *et al.* 2002).



**Figura 3.** Actividad de las enzimas superóxido dismutasa (A) y catalasa (B) en hojas de *C. lilloi* C.DC. sometidas a estrés térmico. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos al 5% por el Test de Tukey.

Considerando los resultados obtenidos y la amplia variación altitudinal que muestra *C. lilloi* C.DC. en Argentina (entre 700 y 1700 m.s.n.m.), es importante realizar futuros ensayos incluyendo material genético de otros orígenes de esta especie, de manera de estudiar el comportamiento de materiales provenientes de mayores altitudes que se encuentran sometidos a menores temperaturas

#### 4. CONCLUSIONES

Se concluye que en los primeros estadios de su desarrollo, *C. lilloi* C.DC. proveniente de El Cadillal, Tucumán, es sensible al estrés térmico severo, ya que no cuenta con un eficiente sistema de enzimas detoxificadoras de ROS, en estas condiciones ambientales.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Apel, K. and H. Hirt. 2004. "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction". *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55:373-399
- Badiani, M.; M. G. de Biasi; M. Felici. 1990. "Soluble peroxidase from winter wheat seedlings with phenoloxidase-like activity". *Plant Physiol.*, 93:489-494.
- Beck, E.; R. Heim; J. Hansen. 2004. "Plant resistance to cold stress: mechanisms and environmental signal triggering frost hardening and dehardening". *J. Biosci.*, 29:449-459.
- Boyer, J. S. 1982. "Plant productivity and environment". *Science*, 218:443-448.
- Davidson, P. A. and R. H. Schiestl. 2001. "Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Cell Biol.*, 21: 8483-8489.
- Davis, D. G. and H. Swanson. 2001. "Activity of stress-related enzymes in the perennial weed leafy spurge (*Euphorbia esula* L)". *Env. Exp. Bot.*, 46:95-108.
- Giannopolitis, N. and S. K. Ries. 1977. "Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants". *Plant Physiol.*, 59: 309-314.
- Grau, H. R. 2000. "Regeneration patterns of *Cedrela lilloi* (Meliaceae) in northwestern Argentina subtropical montane forests". *J. Trop. Ecol.*, 16:227-242.
- Hendry, G. A. F.; P. C. Thorpe and M. N. Merzlyak. 1993. "Stress indicators- lipid peroxidation, in: G.A.F. Hendry, J.P. Grime (Eds.), *Methods in Comparative Plant Ecology*, Chapman and Hall, London, pp.154-156..
- Hodges, D. M.; C. J. Andrews; D. A. Johnson and R. I. Hamilton. 1996. "Antioxidant enzyme and compound responses to chilling stress and their combining abilities in differentially sensitive maize hybrids". *Crop Science* 37:857-863.
- Larkindale, J. and B. Huang. 2004. "Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene". *J plant Physiol.* 161: 405-413.
- Lutts, S.; J. M. Kinet and J. Bouharmont. 1996. "NaCl- induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance". *Ann. Bot.*, 78: 389-398.
- Mittler, R. 2002. "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance". *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.
- Mittler, R.; S. Vanderauwera; M. Gollery and F. Van Breusegem. 2004. "Reactive oxygen gene network of plants". *Trends Plant Sci.*, 9: 490-498.
- Pinazo, M. A. y N. I. Gasparri. 2003. "Cambios estructurales causados por el aprovechamiento selectivo en el Bosque Montano del norte de Salta, Argentina". *Ecología Austral*, 13:160-172.
- Pinheiro, R. G.; M. V. Rao; G. Paliyath; D. P. Murr. and R. A. Fletcher. 1997. "Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings". *Plant Physiol.*, 114:695-704.
- Rivero, R. M.; J. M. Ruiz; P. C. García; L. R. López- Lefebvre; E. Sánchez and L. Romero. 2002. "Response of oxidative metabolism in watermelon plants subjected to cold stress. *Funct*". *Plant Biol.*, 29:643-648.
- Rivero, R. M.; E. Sánchez; J. Ruiz and L. Romero. 2003. "Influence of temperature on biomass, iron metabolism and some related bioindicators in tomato and watermelon plants". *J. Plant Physiol.*, 160:1065-1071.
- Suzuki, N. and R. Mittler. 2006. "Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction". *Physiol. Plant.*, 126:45-51.
- Tao, D. L. and Y. H. Jin. 1992. "Organic free radicals and free-radical scavengers in overwintering conifer needles". *Sci. Silvae Sin.*, 28:194-197.
- Terán, M. y M. Vargas. 2008. "Herbario y xiloteca de especies arbóreas nativas de la Provincia de Salta". *Quebracho*, 15:80-83.

- Ushimaru, T.; S. Kanazawa; S. Sano and T. Koshiba. 2000. "Changes in antioxidative enzymes in cucumber cotyledons during natural senescence: comparison with those during dark-induced senescence". *Physiol. Plant.*, 10: 211-216.
- Welti, R; W. Li; M. Li; Y. Sang; H. Biesiada; H. Zhou; C. B. Rajashekar; T. D. Williams and X. Wang 2002. "Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D $\alpha$  in freezing induced lipid changes in Arabidopsis". *J. Biol. Chem.*, 277: 31994-32002.

