

ACLIMATACIÓN AL FRÍO EN DIFERENTES CLONES DE *EUCALYPTUS GLOBULUS* LABILL DURANTE EL RÉGIMEN NATURAL DE ENDURECIMIENTO.

Gallino, J.P.^{1,2}, Fernández, M.^{1*}, Tapias, R.¹, Alcuña, M.M.¹, Cañas, I.²

¹ Universidad de Huelva. Departamento de Ciencias Agroforestales. Escuela Politécnica Superior.

21819, Palos de la Frontera, Huelva, España.

² Grupo Empresarial ENCE, S.A. Centro de Investigación y Tecnología.
Carretera Madrid-Huelva, Km. 630. Apartado 223. 21080 Huelva, España.

*Autores para la correspondencia: manuel.fernandez@dcaf.uhu.es.

Boletín del CIDEU 4: 77-83 (2007)

ISSN 1885-5237

Resumen

En la región mediterránea la principal limitación de la expansión de las plantaciones de *Eucalyptus* es la ocurrencia periódica de temperaturas bajas durante los meses de invierno (-5 a -10 oC). Por esta razón es crucial implementar un programa para mejorar la resistencia al frío en las especies utilizadas de este género. *E. globulus*, la especie más extendida en la península ibérica es considerada una especie moderadamente susceptible al frío. Se testaron 16 clones a los cuales se les realizó un seguimiento durante el régimen natural de endurecimiento y la salida del mismo para el periodo 2005-2006. La tolerancia al frío fue evaluada en tejido foliar desarrollado, tanto en hojas pecioladas maduras como en hojas sentadas juveniles, simulando condiciones de helada en ambiente controlado. De esta forma se demostró que existe un proceso de aclimatación de las plantas a las bajas temperaturas a medida que se acumulan las horas de frío y una desaclimatación de las mismas a medida que acaba el invierno. En todos los clones se determinó un máximo de tolerancia para la segunda quincena de enero, lo que corresponde con un total acumulado de 415 horas de frío por debajo de los 7 oC (HF7). Por otra parte se observó un cambio significativo en el umbral de temperaturas que causan un daño al 50% de la superficie del tejido foliar (TL50), siendo el valor medio de éstas -4,5 °C antes de comenzar la temporada de frío y de -6,5 °C una vez alcanzado el máximo de endurecimiento.

Summary

Acclimation to cold weather of various *Eucalyptus globulus* Labill clones during natural hardening

The greatest constraint on the expansion of *Eucalyptus* plantations in the Mediterranean region is the periodic occurrence of low temperatures (-5 to -10 oC) during winter. This has raised the need to launch a programme aimed at increasing the tolerance to cold weather of *Eucalyptus* species in the region. *Eucalyptus globulus*, which is the most widespread *Eucalyptus* species in the Iberian peninsula, is moderately vulnerable to cold. In this work, a total of 16 clones of this species were monitored during their natural hardening regime and at its end over the period 2005-06. Tolerance to cold was evaluated in well-developed tissue of both mature petiolate leaves and seated young leaves by mimicking freezing conditions in a controlled environment. The plants were found to gradually acclimate to low temperatures as the number of cold hours increased and to de-acclimate as the winter neared its end. Tolerance in all clones peaked in the second half of January, after an overall 415 cold hours at temperatures below 7 oC (HF7). Also, the temperature threshold below which at least 50% of leaf surface tissue was damaged (TL50) varied markedly, from an average -4.5 oC at the beginning of the cold season to an average -6.5 oC at the point of maximum hardening.

Introducción

Eucalyptus globulus es una especie ampliamente utilizada en plantaciones exóticas de carácter productivo, pero la expansión de estas plantaciones se encuentra limitada por la ocurrencia de bajas temperaturas (-5 °C aproximadamente) durante los meses de invierno (Ruiz de la Torre 1979, Scarascia-Mugnozza *et al.*, 1989, Pita y Pardos 2001, Whitehead and Beadle 2004). El régimen de temperaturas invernales puede llegar a ser determinante del grado de endurecimiento alcanzado las plantas durante la época fría (Boorse *et al.*, 1998, Mollá *et al.*, 2003, Pardos *et al.*, 2003) y de la viabilidad futura de las plantaciones. Durante el proceso de endurecimiento al frío tienen lugar una serie de cambios morfológicos y fisiológicos que permitirán a las plantas aclimatarse a las nuevas condiciones atmosféricas y sobrevivir durante el invierno. Concretamente, para *Eucalyptus spp.*, se han llevado a cabo algunos estudios sobre los efectos de las bajas temperaturas en el proceso de endurecimiento y en la reacción experimentada por las plantas. (Scarascia-Mugnozza 1989, Valentini *et al.*, 1990, Leborgne *et al.*, 1995, Almeida *et al.*, 1994, Hovenden and Warren 1998, Close *et al.*, 2003a y b). En particular, *Eucalyptus globulus* suele mostrar baja capacidad de tolerancia al frío, nula capacidad de respuesta a un régimen de endurecimiento aunque una modesta capacidad de soportar la formación de hielo extracelular (Scarascia-Mugnozza 1989). No obstante, otros estudios con esta especie sí que obtuvieron cierta capacidad de aclimatación al frío, diferenciándose la respuesta en función de la familia o del clon (Almeida *et al.* 1994, Fernández *et al.*, 2004), posiblemente ligada a la capacidad de ajuste osmótico. Por ello, en los programas

de selección y mejora de la especie conviene insistir en la variabilidad intraespecífica de la tolerancia al frío, la capacidad de endurecimiento de la especie y el patrón de evolución estacional. En este estudio se examinó la evolución estacional en la respuesta al frío de 16 clones de *E. globulus* Labill.

Material y métodos

Se evaluaron 16 clones de *Eucalyptus globulus* Labill., escogidos aleatoriamente, pertenecientes al programa de mejora genética de ENCE. El material vegetal utilizado consistió en hojas, juveniles y maduras, de plantas de 3 años de edad (un año en vivero más dos en campo) transplantadas a la parcela de prácticas de la Universidad de Huelva (La Rábida, Huelva). Las mediciones se realizaron en siete fechas, entre el 30 de noviembre de 2005 y el 6 de abril de 2006, correspondiendo aproximadamente con el inicio y el final de la estación fría.

Para evaluar la tolerancia al frío se simularon condiciones de helada en ambiente controlado utilizando un arcón congelador convencional al cual se le ha acoplado un programador de temperatura (West® 4400, ISE Inc., Clevelan, OH, USA) y dos ventiladores interiores para remover el aire. Las temperaturas mínimas fijadas para cada fecha de medición fueron -4, -5, -6, -7 y -8 °C (cinco tests de frío por clon y fecha). Para ello se tomaban 4 hojas/clon en cada fecha, se introducían en tubos de vidrio de 2.2 cm de diámetro y 15 cm de longitud y se colocaban en el congelador. El test de frío partía de 15 °C, a partir de ahí la temperatura se hacía descender lenta y progresivamente hasta la mínima prefijada en cada test. Una vez conseguida ésta se mantenía durante 3 horas y volvía a subir lentamente hasta temperatura ambiente (un ciclo completo

duraba 14-16 h). Posteriormente se sacaban las hojas del arcón, se añadía agua destilada ($< 2 \text{ cm}^3$) hasta que quedase cubierta la sección de corte del pecíolo y se mantenían durante un día en cámara de cultivo a 25/17 °C (día/noche), 14 h de fotoperíodo y alta humedad relativa. Al día siguiente se evaluaba el daño sufrido, que consistía en una estimación visual de la superficie foliar afectada por el frío. Para estimar la susceptibilidad al frío se calculó el parámetro TL50, siendo éste la temperatura a la cual la superficie foliar presenta un 50 % de daño. Asimismo se llevó un seguimiento de las horas-frío por debajo de 7 °C (HF7 = número de horas con temperatura $\leq 7 \text{ °C}$) acumuladas en cada fecha de medición (figura 1). Asimismo se determinaron las concentraciones de

nutrientes minerales (N, P, K) y carbohidratos no estructurales (azúcares solubles y almidón) por métodos analíticos convencionales. El N se determinó mediante análisis elemental, con un Analizador Elemental (EA FLASH 1112 CHNS, CE Instruments Ltd., UK). Método colorimétrico por el azul de molibdato para el P y fotometría de llama para el K (Flame photometer 410, Corning Ltd, Essex, England). Extracción hidroalcohólica y colorimetría con antrona para azúcares solubles (Spiro 1966), e hidrólisis ácida seguida de colorimetría con antrona para almidón (Rose *et al.*, 1991). El espectrofotómetro utilizado para las determinaciones de P, azúcares solubles y almidón fue UV-1601 (Shimadzu®, Tokio, Japón).

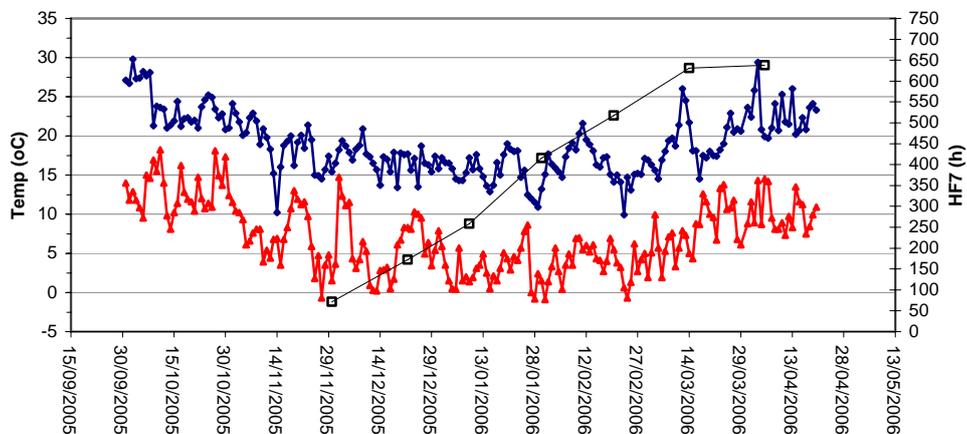


Figura 1: Temperaturas registradas durante el ensayo (máxima en azul y mínima en rojo) y horas de frío acumuladas por debajo de 7 °C (HF7) en cada fecha de medición (□).

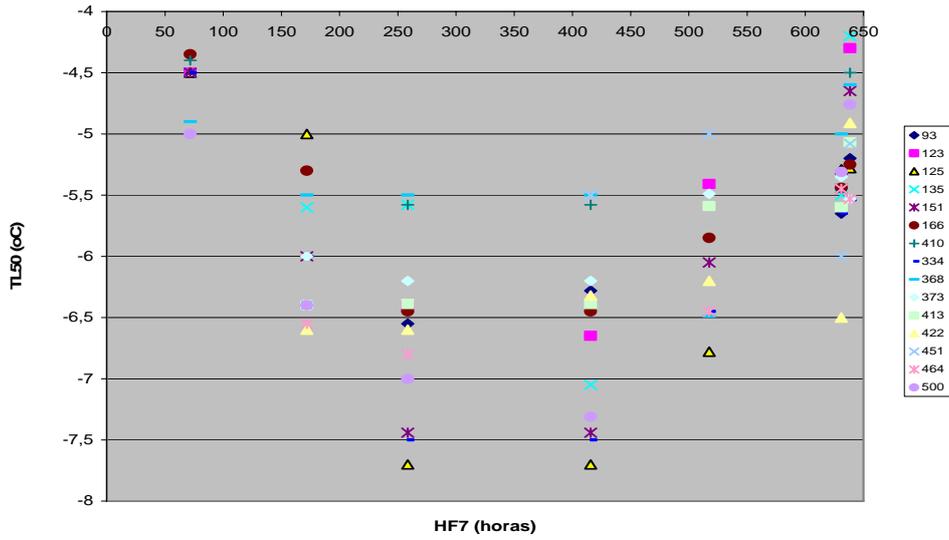


Figura 2: Evolución de TL50 de las hojas juveniles de todos los clones evaluados en el estudio

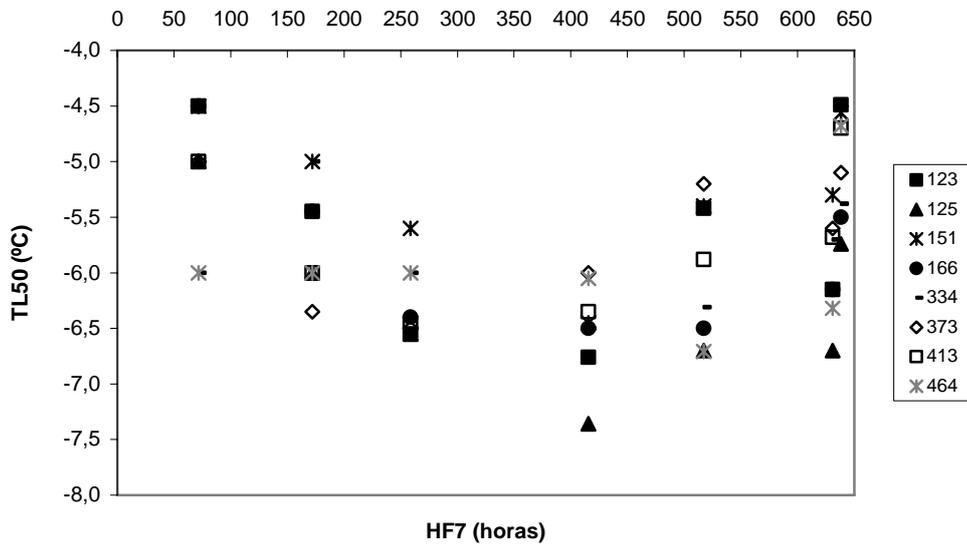


Figura 3: Evolución de TL50 de las hojas maduras pecioladas de los clones en estudio.

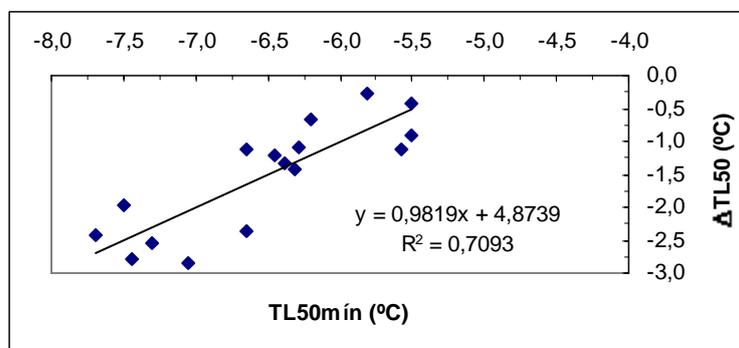


Figura 4: Relación existente entre TL50mín (fecha de máxima tolerancia al frío) y $\Delta TL50$ (variación entre el inicio del ensayo y la fecha de máxima tolerancia). Cada punto representa el valor medio por clon.

Resultados

A medida que avanzaba el período frío el daño observado en las hojas, para una misma temperatura mínima, disminuía como resultado del endurecimiento natural de las plantas, reflejándose en un descenso de TL50 para todos los clones (figuras 2 y 3). El valor medio aproximado del descenso de TL50 fue de 2,0 °C, desde -4,5 °C (al inicio del ensayo) hasta -6,5 °C (en la fecha de máxima tolerancia). Por otra parte también se observó una desaclimatación de las mismas a medida que subían las temperaturas al final de la época fría.

Para todos los clones, tanto en hoja juvenil como adulta, a finales de enero (con 415 HF7 acumuladas) se observó un máximo de tolerancia al frío. No obstante, las hojas juveniles alcanzaron su grado máximo de tolerancia antes que las adultas, cuando habían acumulado 260 HF7 (a principios de enero). Si bien todos los clones fueron capaces de responder a las bajas temperaturas del período frío y aumentar su tolerancia al frío, hubieron diferencias significativas entre ellos tanto en el patrón de evolución como en los valores absolutos alcanzados ($p < 0,001$). Si consideramos las hojas juveniles, cabe mencionar que la época en la que se discriminó más entre clones fue la correspondiente al máximo de tolerancia al frío, siendo más tolerantes los clones 125, 151 y 334 (por debajo del 30 % de daño a -7 °C), seguidos del 135 y 500 (entre el 30 y el 50 % de daño) y luego el resto de clones estudiados (68-100 % de daño). En la figura 4 se puede observar que, salvo alguna excepción, por lo general los clones que soportaron mejor el frío una vez endurecidos ($TL50 < 7.0$ °C) son los de mayor plasticidad respecto a esta propiedad ($\Delta TL50 \geq 2.0$ °C).

Sin embargo, si consideramos ahora las hojas adultas, si bien se mantuvo más o

menos el ranking entre clones en cuanto a capacidad de tolerancia al frío, la menor plasticidad de estas hojas respecto de las juveniles (menor rango de variación de $\Delta TL50$, entre 0,9 y 2,3 °C) dio lugar a una menor capacidad de discriminación entre clones (sólo se diferenció el 125 del resto de clones). Por otro lado, el análisis de correlación lineal, tanto para hojas juveniles como para adultas, entre TL50, concentración de nutrientes minerales y concentración de carbohidratos no estructurales, no reveló relaciones significativas a destacar.

Discusión

Los clones estudiados de *Eucalyptus globulus* mostraron cierta capacidad de endurecimiento durante la época fría (entre 0.5 y 3.0 °C dependiendo del clon) inducida por las bajas temperaturas. No es demasiada pero es suficiente como para discriminar entre clones más y menos tolerantes al frío. Esta capacidad de endurecimiento de la especie contrasta con los resultados obtenidos por Scarascia-Mugnozza *et al.*, (1989), pero coinciden con los mostrados por otros autores (Almeida *et al.*, 1994, Fernández *et al.*, 2004) tanto en el orden de magnitud como en la variabilidad intraespecífica. Asimismo son coincidentes con el tipo de respuesta propio de otras especies de eucaliptos, pudiendo estar relacionada esta capacidad de endurecimiento con fenómenos de ajuste osmótico (Scarascia-Mugnozza *et al.*, 1989, Valentini *et al.*, 1990, Almeida *et al.*, 1994, Leborgne *et al.*, 1995) o al estado hídrico de los tejidos (Harwood 1982).

En nuestro estudio, los clones más plásticos (esto es, con mayor variación estacional de TL50) son los que alcanzaron el mayor grado de tolerancia, pero sin estar relacionada con la acumulación de azúcares solubles o las concentraciones de nutrientes

minerales (N, K) en hojas. Quizás pueda ser el grado de humedad de los tejidos foliares, como apuntaba Harwood (1982), el principal factor que explique la variación en la tolerancia al frío en esta especie. El patrón estacional, bien marcado, fue similar para todos los clones, pero con distinto grado de variación entre los clones. El máximo de tolerancia se obtuvo en enero, que se correspondía con más de 260 HF7 para las hojas juveniles. En cuanto a las hojas pecioladas adultas, mostraron una

capacidad de discriminación entre clones menor que las hojas juveniles, con menor variación estacional de TL50 que aquellas y necesitando más de 400 HF7 para alcanzar su máximo nivel de tolerancia al frío.

Agradecimientos

Al Grupo Empresarial ENCE, SA. por la financiación de este ensayo y por el suministro del material clonal necesario para su realización.

Referencias bibliográficas:

- Almeida, M.H., Chaves, M.M., Silva, J.C., 1994. Cold acclimation in eucalypt hybrids. *Tree Physiol.* 14: 921-932.
- Boorse, G.C., Ewers, F.W., Davis, S.D., 1998. Response of chaparral shrubs to belowfreezing temperatures: acclimation, ecotypes, seedlings vs. adults. *Am. J. Bot.* 85(9): 1224-1230.
- Close, D.C., Beadle, C.L., Holz, G.K., Ravenwood, I.C. 1999. A photobleaching event at the North Forest Products Somerset nursery reduces growth of *Eucalyptus globulus* seedlings. *Tasforests* 11:59-68.
- Close, D.C., Brown, P.H., Hovenden, M.J., Beadle, C.L., 2003. Eucalypt seedling hardiness to low temperature: a synthesis. *Combined Proceedings International Plant Propagator´ Society*, Vol. 53: 116-119.
- Fernández, M., Ruiz, S., Tapias, R., Soria, F., 2004. Mineral nutrition affects cold hardening development of rooted cuttings *Eucalyptus globulus* Labill. clones. In Borralho, N.M.G., Pereira, J.S., Marques, C., Coutinho, J., Madeira, M., Tomé, M. (eds.). "Eucalyptus in a changing world". *Proc. IUFRO Conf.*, Aveiro, 11-15 oct. (RAIZ, Instituto Investigação da Floresta e Papel, Portugal).
- Harwood, C.E., 1982. Frost resistance of subalpine Eucalyptus species. I. Experiments using a radiation frost room. *Aust. J. Bot.* 28: 587-599.
- Hovenden, M.J., Warren, C.R., 1998. Photochemistry, energy dissipation and cold hardening in *Eucalyptus nitens* and *E. pauciflora*.. *Aust. J. Plant Physiol.* 25: 581-589.
- Leborgne, N., Teulieres, C. Cauvin, B., Travert, S., Boudet, A.M., 1995. Carbohydrate content of *Eucalyptus gunnii* leaves along a annual cycle in the field and during induced frost-hardening in controlled conditions. *Trees: Structure and Function*, 10: 2, 86-93.
- Mollá, S., Villar-Salvador, P., García-Fayos, P., Peñuelas, J. L., 2003. Influencia de la localización del vivero sobre la resistencia a la helada y el desarrollo en campo de *Quercus ilex* spp. *ballota* L. *Montes*, 74: 23-30.
- Pardos, M., Royo, A., Gil, L., Pardos, J.A., 2003. Effect of nursery location and outplanting date on field performance of *Pinus halepensis* and *Quercus ilex* seedlings. *Forestry*, 76(1): 67-81.
- Pita, P., Pardos, J.A., 2001. Growth, leaf morphology, water use and tissue water relations of Eucalyptus globules clones in response to water deficit. *Tree Physiol.* 21: 599-607.
- Rose, R.W., Rose, C.L., Omi, S.K., Forry, K.R., Durall, D.M., Bigg, W.L., 1991. Starch determination by perchloric acid vs. enzymes: evaluating the accuracy and precision of six colorimetric methods. *J. Agric. Food. Chem.* 39: 2-11.
- Ruiz De La Torre, J., 1979. Árboles y arbustos de la España peninsular. E.T.S. Ingenieros de Montes. UPM. Madrid. 512 p.
- Scarascia-Mugnozza, G., Valentiny, E., Kuzminski, E., Giordano, E., 1989. Freezing mechanisms, acclimation processes and cold injury in Eucalyptus especies planted in the Mediterranean region. *For. Ecol. Manage.* 29: 81-94.
- Spiro R.G., 1966. Analysis of sugars found in glycoproteins, in: Neufeld E.F., Ginsburg V. (Eds.), *Methods in ezymology*. Vol. VIII, Complex carbohydrates, Academic Press, New York, pp. 3-26.
- Valentini, R., Scarascia-Mugnozza, G., Giordano, E., Kuzminsky, E., 1990. Influence of cold hardening on water relations of three Eucalyptus species. *Tree Physiol.* 6: 1-10.
- Whitehead, D., Beadle, C.L., 2004. Physiological regulation of productivity and water use in Eucalyptus: a review. *For. Ecol. Manage.* 193: 113-140.