

DISCRIMINACIÓN PRECOZ DE $\delta^{13}\text{C}$ Y DETERMINACIÓN DE EFICIENCIA INSTANTÁNEA DE USO DE AGUA EN PLÁNTULAS DE *EUCALYPTUS GLOBULUS*

² R. ASTORGA; ¹ A. CASARES Y ¹ J. MAJADA

(1) Dpto. Biología de Organismos y Sistemas, C/ Catedrático Rodrigo Uria s/n, Universidad de Oviedo, E-3.3071 Oviedo, Asturias, Spain (jmajada@correo.uniovi.es)
(2) Astorga, R; Celulosas de Asturias S.A. (ENCE, Armental s/n, Navia, Spain)

RESUMEN

En este trabajo se ha utilizado un sistema experimental definido para el estudio de la variación precoz en el desarrollo de plántulas en contenedor, en el cual se ha determinado la discriminación del isótopo ^{13}C en progenies seleccionadas. La discriminación del isótopo ^{13}C se ha comparado contra la estimación de la eficiencia instantánea de uso de agua (iWUE) bajo condiciones de agua saturantes y limitantes. La disponibilidad de agua fue controlada automáticamente por tensiómetros con transductores de presión durante la germinación y crecimiento de plántulas de *Eucalyptus globulus*. Los resultados obtenidos revelaron que hay un efecto significativo del tamaño de la semilla y de los tratamientos de riego en la asignación de la materia seca y composición de isótopo de carbono. La composición de carbono de hoja fue alterada por limitaciones de agua, observándose que el $\delta^{13}\text{C}$ aumentó un 1.56% en -3.3 kPa y un -1.34% en 6.3 kPa; respecto a las cantidades observadas en los tratamientos mantenidos a 1.8 kPa. Además, las diferencias de tamaño de semilla influyen en los valores de conductancia estomática (gs), fotosíntesis (A) y transpiración (E).

P.C.: discriminación de isótopo de carbono, asignación de biomasa, *Eucalyptus globulus*, eficiencia instantánea de uso de agua, tensiómetros.

SUMMARY

We have determined the early genetic variation in isotope discrimination within a selected provenance, calibrating these data against estimated of actual whole-plant instantaneous water-use-efficiency (WUE) under well-watered and several water-limited conditions. The availability of water was automatically controlled by tensiometers with pressure transducers, being stabled during the germination of seedlings and during growth of the seedlings at (-1.8, -3.3 and -6.3kPa). The obtained results revealed that there was a significant effect of the seed size by watering treatments interaction on dry matter allocation and carbon isotope composition. Leaf carbon composition was altered by water limitations $\delta^{13}\text{C}$ increase 1.56% in 3.3 kPa and 1.34 % in 6.3 kPa as compared to the well-watered control (1.8 kPa). Moreover, seed size differences were influencing the values of the stomatal conductance (gs), photosynthesis rate (A) and transpiration rate (E). The larger seed sizes providing seedlings with higher gs, A and E. Discussion about both high WUE and early high productivity, regardless of water treatment has been considered.

K.W.: carbon isotope discrimination, biomass allocation, *Eucalyptus globulus*, instantaneous water-use-efficiency, stress, tensiometers, watering control.

INTRODUCCIÓN, MATERIAL Y MÉTODOS:

Disponer de métodos de selección precoz para caracteres de interés en progenies seleccionadas sería de gran interés en programas de mejora forestal. En plantas C3, la composición del isótopo ^{13}C varía dentro del rango -22 a -32‰. Esto se debe a la discriminación (-27‰) contra $^{13}\text{CO}_2$ por ribulosa difosfato carboxilasa. En los últimos años, la relación entre $\delta^{13}\text{C}$, acumulación de masa seca y eficiencia de uso de agua se ha estudiado en arbustos y árboles. La correlación negativa entre $\delta^{13}\text{C}$ de hojas y la altura del árbol se ha demostrado en clones comerciales de *E. grandis* lo que implica que árboles más eficientes son los más productivos. Además la eficiencia de uso de agua y la $\delta^{13}\text{C}$ correlaciona positivamente en clones de *E. globulus* (Osorio y Pereira, 1994). Recientemente, Osorio et al., (1998) han confirmado la robustez de la relación entre la discriminación de isótopo de carbono y eficacia del transpiración para tratamientos de riego en diversos clones de *E. globulus*; y Macfarlane y Adams, (1998) la utilidad de $\delta^{13}\text{C}$ como un indicador precoz de estrés hídrico en plantaciones de *E. globulus*

El objetivo de este trabajo es diseñar y validar una herramienta para identificación de los potenciales matriciales en sustratos de cultivo en contenedor, que puedan facilitar una selección más eficaz de plántulas frente a la eficiencia de uso de agua. Para este propósito hemos estudiado: (1) la variación individual en una procedencia seleccionada de *E. globulus* en la acumulación de biomasa, eficiencia instantánea de uso de agua y $\delta^{13}\text{C}$ bajo varios tratamientos de riego; (2), la relación entre $\delta^{13}\text{C}$, (WUE) y la partición de biomasa.

Material vegetal y sistema experimental

Se emplearon semillas de *E. globulus* de una procedencia seleccionada (Flinder Island, Australia) almacenadas con silicagel en oscuridad a 4 °C hasta su uso. Las semillas se sembraron en recipientes 28A el 29/01/99, usando una sembradora automática según los procedimientos operacionales de CEASA (ENCE, Navia). Los alveolos de cada contenedor (200 cm³/alveolo) se llenaron con una mezcla previamente humedecida de turba N4 (Humin Substrat, Klasmann-Delmann GmbH) y corteza de pino (7:3; v/v) y fertilizada con ®Osmocote (15:11:13) a una concentración de 1,5 g l⁻¹. Los contenedores se trasladaron al invernadero experimental del Laboratorio de Fisiología Vegetal, (Universidad de Oviedo). Este trabajo se ha desarrollado sobre un diseño completamente aleatorio (4 x 4) para una procedencia de *E. globulus*; correspondiendo el factor tamaño de la semilla a los tamaños 1.25, 1.50, 1.75 y 2.00 mm, y el factor humedad del contenedor a cuatro tensiones de humedad establecidas en el sustrato. Cada bandeja fue considerada como una unidad experimental con 56 réplicas (dos contenedores, 56 semillas). Las condiciones de concentración CO₂ y fotoperíodo no se controlaron; la temperatura se mantuvo entre 18 y 28 °C (López et al., 2000).

Control de la humedad del sustrato mediante tensiómetros electrónicos

El dispositivo se ha descrito en Humara et al., (2001) y está compuesto por bandejas de polipropileno independientes (1200 cm * 1200 cm * 10 cm). Cada bandeja tiene un depósito de agua para subirrigación. Al mismo tiempo, una válvula neumática permite regar automáticamente a través del control establecido por tensiómetros. Al inicio del experimento el sustrato tenía un potencial matricial (-3 a -4 kPa). Los tratamientos de riego automáticos se establecieron en -1.8, -3.3 y -6.3 kPa; (tratamientos 1, 2 y 3 respectivamente). Un cuarto tratamiento denominado curva de humedad se estableció con -2 hasta -3 kPa durante las primeras cuatro semanas y de -2.5 hasta -4 kPa a partir de la quinta semana y hasta el final del experimento. Los datos de temperatura, humedad relativa y tensión de humedad, se registraron con software ®Ambitrol 500 instalado en un PC que actúa como interface entre el PLC y las diferentes sondas.

Parámetros morfológicos y evaluación de biomasa

Se analizaron 9 plántulas por cada tratamiento y se midieron altura, parámetros de hoja (longitud, anchura y área), así como la partición de biomasa al período final de producción de la planta (90 días). Cada plántula fue extraída y cortada en el cuello de la raíz. Una vez lavadas las raíces todas las partes de la plantas se pesaron después ser secadas en horno durante 4 días a 70°C.

Discriminación del isótopo

La composición de isótopo de carbono se determinó en hojas totalmente expandidas de nueve plantas por tratamiento y recogidas aleatoriamente. Las muestras secas y trituradas se analizaron en un analizador elemental Carlo Erba Instruments EA 1108 CHNS/O, conectado a un Espectrómetro de Masas Isotópico DELTAplus con una interface ConFlo II. La relación del isótopo se calculó de las cantidades relativas de moléculas con composición del isótopo diferente. La discriminación del isótopo ($\delta^{13}\text{C}$) se estimó según Farquhar et al., (1989), asumiendo que la composición de isótopo estable de carbono en aire es del 8‰.

Determinaciones fisiológicas

Se realizaron estudios fisiológicos en los tratamientos de -1.8 y -6.3 kPa. Las plantas de 90 días se dispusieron en un Fitotrón a 25°C efectuándose las medidas bajo ambiente con humedad baja (40%) y un PFD de 750 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La conductancia (gs) y fotosíntesis (A) se analizó en nueve plantas por tratamiento, para lo cual se seleccionaron las hojas más altas totalmente expandidas. Se empleó un analizador de infrarrojos portátil (LCA-IV, Instrumentos de ®ADC Cambridge, UK).

Análisis de los datos

Los datos se analizaron con análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías. Se determinó la normalidad y homogeneidad de varianza y se realizaron transformaciones para ajustarse a las asunciones estadísticas subyacentes de ANOVA. Todas las comparaciones de pares individuales

fueron realizadas la prueba de Mínimas Diferencias Significativas. Las diferencias fueron consideradas significativas a $P < 0.05$.

RESULTADOS

En análisis de la varianza de dos vías muestra que el tamaño de la semilla afecta a la partición de biomasa y composición de isótopos de carbono (Tabla 1). La composición de carbono en hoja fue alterada por limitaciones de agua ($\delta^{13}\text{C}$ aumentó 1.56% en -3.3 kPa y 1.34% en -6.3 kPa) respecto al tratamiento de -1.8 kPa. La discriminación de carbono se modifica ligeramente entre los tamaños de la semilla y es más bajo para el tamaño de la semilla 1.25 mm (Tabla 1).

Cuando los datos para cada tratamiento del riego fueron analizados sin tener en cuenta el tamaño de la semilla, el peso seco total correspondiente a raíces, tallo y hojas mostraron diferencias significativas entre diferentes disponibilidades de agua (Tabla 1). La proporción de materia seca asignada a las raíces fue menor en semillas 1.5 mm y 2 mm. La producción de biomasa se reduce a medida que se incrementa la limitación de agua en todos los tamaños de la semilla. Así, con -3.3 y -6.3 kPa las plantas muestran como promedio entre 35 y 60% de la acumulación de peso seco total de las plantas bien regadas. El porcentaje de disminución en peso seco se puede relacionar con el tamaño de la semilla. Aunque la asignación de la biomasa se reduce por limitaciones de agua, principalmente en -3.3 kPa y -6.3 kPa. Sorprendentemente, la composición de carbono de hoja se altera menos por limitaciones de agua para el tamaño de la semilla 1.25 mm (Tabla 1, principalmente a -3.3 kPa).

Se ha encontrado una correlación positiva entre la producción de materia seca y $\delta^{13}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$ se volvió menos negativo al aumentar la producción de masa seca), lo que sugiere que el tamaño de la semilla afecta a la WUE debido a una A más elevada (Tabla 2). La composición de isótopo de carbono correlaciona positivamente con la eficacia de intercambio de gas intrínseca (A/g,) para todos los tamaños de semilla y los tratamientos de riego. Sin embargo, la sensibilidad de $\delta^{13}\text{C}$ a los cambios en biomasa es mayor en los tratamientos con una mayor limitación de agua (-6.3 kPa).

Aunque A y gs disminuyen en plantas sujetas a limitaciones hídricas, la gs se redujo comparativamente en un mayor grado y como consecuencia la eficacia de uso de agua instantánea (relación A/g) es superior en plantas sometidas a estrés que en plantas bien regadas (-1.8 kPa). Las plántulas sometidas a limitaciones hídricas mostraron una iWUE superior respecto a los tratamientos mejor regados ($\delta^{13}\text{C} = -0.012 \text{ A/g} - 32.017$; $r=0.98$). El valor de A/g refleja el compromiso entre la fotosíntesis neta y transpiración en el momento de medida. Sin embargo, el sistema de subirrigación empleado en nuestro dispositivo experimental, dificulta el cálculo de la eficiencia de uso del agua a largo plazo.

DISCUSIÓN

Aunque algunos autores han descrito que el contenido de isótopos estables de carbono puede variar considerablemente entre individuos de una especie y dentro de una sola planta (Damesin et al., 1997; Garten y Taylor, 1992), en este trabajo hemos observado que las diferencias observadas eran consistentes entre tamaños de semillas dentro de la procedencia estudiada. Las cantidades de $\delta^{13}\text{C}$ medidas son similares a las obtenidos para otras plantas C3 (Farquhar et al., 1989; Menzier, 1990), estando además en el rango de los encontrados en otros trabajos del Eucalipto en plantas de mayor edad (Osorio y Pereira, 1994; Le Roux et al., 1996).

Nuestros resultados indican que en estadios tempranos del desarrollo de plántulas $\delta^{13}\text{C}$ podría usarse como criterio de medida para la eficiencia de uso agua a largo plazo en un programa de selección de *E. globulus* para tolerancia a estrés hídrico. Debido a que la A de cada tamaño de semilla no fue afectada significativamente por distintas disponibilidades de agua, podemos asumir que la mayoría de los cambios observados en A/g con déficit de agua son consecuencia de regulación estomática.

CONCLUSIONES

La variación genotípica en $\delta^{13}\text{C}$ puede proceder de cambios en la conductancia estomática, de las diferencias en capacidad fotosintética o a ambos (Farquhar et al., 1989). Nuestros resultados indican que $\delta^{13}\text{C}$ podría usarse como criterio de medida para la eficiencia de uso agua a largo plazo en un programa de selección de *E. globulus* para tolerancia a estrés hídrico. Para ello asumimos que el aumento de $\delta^{13}\text{C}$ con déficit de agua se ha producido principalmente por una reducción de la transpiración, concomitante con una reducción del crecimiento. Si el análisis en árboles de $\delta^{13}\text{C}$ parece proporcionar información sobre la prioridad del uso de recursos de carbono bajo las situaciones de estrés estacional y circunstancias del sitio; nosotros proponemos utilizar el control del aporte agua/oxígeno en contenedor en un intento por identificar criterios para la selección temprana de nuevos clones en programas de mejora.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto FC-97-PA-REC97-02 del II Plan Regional de Investigación del Principado de Asturias (España) y por Celulosas de Asturias S.A. (ENCE, Navia, España). Agradecemos al Dr. Maestro, M.A. de SXAIN (Universidade Coruña, España) su ayuda con el análisis de isótopo de carbono.

BIBLIOGRAFÍA

- DAMESIN, C.; RAMBAL, S. & JOFFRE, R.; (1997). Between-tree variations in leaf VC of *Quercus pubescens* and *Quercus ilex* among Mediterranean habitats with different water availability. *Oecologia* 111:26-35.
- LE ROUX, D.J.; STOCK, W.D.; BOND, W.J. & MAPHANGA, D.; (1996). Dry mass allocation, water use efficiency, ^{13}C in clones of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus grandis* X *nitens* grown at two soil water regimes. *Tree Physiol.* 16: 497-502
- FARQUHAR, G.D.; EHLERINGER, J & HUBICK, K.T.; (1989). Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.* 40:503-537.
- HUMARA, J.M.; CASARES, A. & MAJADA, J.; (2001). Effect of seed size and growing media water availability on early seedling growth in *Eucalyptus globulus*. *For. Ecol. Man.* (In press)
- LOPEZ, M.; HUMARA, J.M.; CASARES, A. & MAJADA, J.; (2000). Sensitivity of *Eucalyptus globulus* Labill. germination to temperature and water stress. *Ann. Sci. For.* 57:245-250.
- GARTEN, C.T. & TAYLOR, G. E. JR.; (1992). Foliar $\delta^{13}\text{C}$ within a temperate deciduous forest: spatial, temporal, and species sources of variation. *Oecologia* 90:1-7.
- MACFARLANE, C. & ADAMS, M.A.; (1998). $\delta^{13}\text{C}$ of wood in growth-rings indicates cambial activity of drought-stresses trees of *Eucalyptus globulus*. *Functional Ecology* 12:655-664.
- MENZIER, F.C.; GOLDSTEIN, G. & GRANTZ, D.A.; (1990). Carbon isotope discrimination in coffee genotypes grown under limited water supply. *Plant Physiol* 92:130-135.
- OSORIO J. & PEREIRA, J.S.; (1994). Genotypic differences in water use efficiency and ^{13}C discrimination in *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiol.* 14:871-882.
- OSORIO, J.; OSORIO, M.L.; CHAVES, M.M. & PEREIRA, J.S.; (1998). Effects of water deficits on ^{13}C discrimination and transpiration efficiency of *Eucalyptus globulus* clones. *Aust. J. Plant Physiol.* 25:645-653.

Tabla 1. Particiones de biomasa de raíz, tallo y hojas bajo distintos tratamientos de riego. Cada valor corresponde a nueve plantas \pm error estándar. Dentro de cada factor letras distintas indican diferencias significativas $P < 0.05$. La probabilidad para las diferencias entre los parámetros morfológicos entre plántulas de *E. globulus* procedentes de semillas de distinto tamaño y con diferentes programas de riego se determinó mediante un análisis de la varianza de dos vías.

		Raíz:Total	Tallo:Total	Hojas:Total	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
Tratamientos de riego por tamaño de semilla					
1.25	-1.8 kPa	0.15 \pm 0.01a	0.37 \pm 0.01a	0.48 \pm 0.01a	31.34 \pm 0.08a
	-3.3 kPa	0.16 \pm 0.01a	0.28 \pm 0.01b	0.56 \pm 0.01b	30.67 \pm 0.19ba
	-6.3 kPa	0.16 \pm 0.01a	0.32 \pm 0.01c	0.52 \pm 0.01b	29.31 \pm 0.09bc
1.50-	-1.8 kPa	0.14 \pm 0.01a	0.33 \pm 0.01a	0.52 \pm 0.01a	-----
	-3.3 kPa	0.13 \pm 0.01a	0.30 \pm 0.01bc	0.57 \pm 0.01b	-----
	-6.3 kPa	0.13 \pm 0.01a	0.32 \pm 0.01ac	0.55 \pm 0.01b	-----
1.75	-1.8 kPa	0.17 \pm 0.03a	0.30 \pm 0.02a	0.53 \pm 0.02a	30.78 \pm 0.22a
	-3.3 kPa	0.14 \pm 0.01b	0.30 \pm 0.01a	0.56 \pm 0.01a	29.69 \pm 0.14ba
	-6.3 kPa	0.15 \pm 0.01b	0.25 \pm 0.01b	0.60 \pm 0.02b	29.62 \pm 0.26bc
2.00	-1.8 kPa	0.14 \pm 0.01a	0.34 \pm 0.01a	0.52 \pm 0.01a	31.10 \pm 0.23a
	-3.3 kPa	0.14 \pm 0.01a	0.30 \pm 0.01b	0.55 \pm 0.01a	29.52 \pm 0.34b
	-6.3 kPa	0.13 \pm 0.02a	0.23 \pm 0.01c	0.64 \pm 0.02b	28.91 \pm 0.16c
Tamaño semilla					
	1.25	0.16 \pm .00a	0.31 \pm 0.01a	0.53 \pm 0.01a	30.44 \pm 0.18a
	1.50	0.14 \pm .00a	0.30 \pm 0.01a	0.57 \pm 0.01b	-----
	1.75	0.16 \pm .01a	0.27 \pm 0.01b	0.57 \pm 0.01b	30.03 \pm 0.16a
	2.00	0.14 \pm .01a	0.28 \pm 0.01b	0.58 \pm 0.01b	29.84 \pm 0.23a
Tratamientos de riego					
	1.00	0.15 \pm 0.01a	0.33 \pm 0.01a	0.51 \pm 0.01a	31.07 \pm 0.11a
	2.00	0.15 \pm 0.00a	0.29 \pm 0.01b	0.56 \pm 0.01b	29.51 \pm 0.13b
	3.00	0.14 \pm 0.01a	0.28 \pm 0.01b	0.58 \pm 0.01bc	29.73 \pm 0.18b
	4.00	0.15 \pm 0.01a	0.26 \pm 0.01c	0.59 \pm 0.01c	-----
ANOVA de dos vías (valores p)					
Tamaño semilla (T)		0.014	<0.001	<0.001	0.002
Tratamientos de riego (R)		0.499	<0.001	<0.001	<0.001
T x R		0.809	<0.001	<0.001	<0.001

Tabla 2. Análisis de intercambio de gases en plántulas obtenidas de cuatro tamaños de semillas de *E. globulus* bajo dos condiciones de riego -1.8 kPa y -6.3 kPa. gs. Conductancia; E. transpiración; A. Tasa fotosintética; A/g. eficiencia instantánea de uso de agua.

		g_s ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	A ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	A/g ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Tratamientos de riego por tamaño de semilla					
1.25	-1.8 kPa	0.15±0.04a	1.74±0.20a	5.36±0.55a	54.29±12.47b
	-6.3 kPa	0.03±0.01b	0.66±0.15b	6.44±0.72a	293.10±73.90a
1.50	-1.8 kPa	0.05±0.02a	0.84±0.17a	4.03±0.63a	129.02±35.21b
	-6.3 kPa	0.01±0.01b	0.41±0.11b	3.66±0.79a	312.55±85.22a
1.75	-1.8 kPa	0.03±0.01a	0.62±0.13a	2.76±0.82b	89.98±34.81b
	-6.3 kPa	0.04±0.01a	0.71±0.09a	4.68±0.97a	172.06±47.55a
2.00	-1.8 kPa	0.02±0.00a	0.42±0.03a	0.65±0.86a	85.93±25.49b
	-6.3 kPa	0.01±0.00a	0.32±0.05b	1.19±0.73a	153.25±79.26a
Tamaño semilla					
	1.25	0.09±0.02a	1.20±0.18a	5.90±0.46a	158.77±44.02ab
	1.50	0.03±0.01b	0.62±0.11b	3.84±0.49b	190.19±49.06a
	1.75	0.03±0.01b	0.67±0.08b	3.67±0.66b	133.76±31.06ab
	2.00	0.01±0.00c	0.37±0.03c	0.93±0.55c	110.41±43.64b
Tratamientos de riego					
	-1.8 kPa	0.06±0.01a	0.90±0.11a	3.27±0.45a	88.78±13.98a
	-6.3 kPa	0.02±0.00b	0.53±0.06b	3.97±0.50a	230.06±39.55b
ANOVA de dos vías (valores p)					
Tamaño semilla (T)		<0.001	<0.001	<0.001	0.286
Tratamientos de riego (R)		<0.001	<0.001	0.146	<0.001
T x R		<0.001	<0.001	0.500	0.304