

EVALUACIÓN PRECOZ DE LA RESISTENCIA A LA SEQUÍA INDUCIDA CON POLIETILÉNGLICOL EN CULTIVOS HIDROPÓNICOS DE ESPECIES FORESTALES

Rosana López Rodríguez¹, Martín Venturas¹, Ismael Aranda García² y Luis Gil Sánchez^{1*}

¹U.D. Anatomía, Fisiología y Genética vegetal. ETSI Montes. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria. 28040-MADRID (España).

²CIFOR. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Ctra. A Coruña km 7,5. 28040-MADRID (España).

*Autor para correspondencia: Correo electrónico: luis.gil@upm.es

Resumen

El estadio juvenil supone una de las fases más críticas para todas las plantas. Uno de los factores que inciden de manera determinante en la supervivencia durante las primeras etapas de desarrollo en áreas con clima mediterráneo es la sequía. Con objeto de profundizar en el conocimiento del comportamiento adaptativo de los distintos materiales de base de pinos mediterráneos, se han puesto a punto técnicas para la evaluación precoz bajo condiciones de estrés hídrico en cultivo hidropónico utilizando PEG-8000. En el presente estudio se evaluó la respuesta de dos procedencias de *Pinus canariensis* y una de *Pinus pinaster* a tres tratamientos: control, estrés moderado (-1 MPa) y estrés fuerte (-2 Mpa). Se encontraron diferencias significativas en el reparto de biomasa entre las plantas no sometidas a estrés y las plantas estresadas, destinando estas últimas mayor porcentaje de biomasa a las raíces que al sistema aéreo. El potencial osmótico de *Pinus pinaster* se mantuvo más elevado durante todo el tratamiento que en las dos procedencias de *Pinus canariensis*, indicando mayor capacidad de ajuste osmótico de las procedencias canarias en condiciones prolongadas de estrés hídrico. Las diferencias en contenido hídrico relativo se detectaron sólo los últimos días del ensayo. Las plántulas de pino canario de ambas procedencias sometidas al mayor nivel de estrés absorbieron su médula, presentando tallos huecos en la cosecha final.

Palabras clave: Reparto de biomasa, Contenido hídrico relativo, Ajuste osmótico, *Pinus canariensis*, *Pinus pinaster*

INTRODUCCIÓN

La adaptación de las distintas poblaciones a diferentes localidades, entendiendo esa adaptación como eficacia reproductiva (*fitness*), puede medirse casi directamente en plantas anuales o de ciclos reproductivos cortos (SULTAN, 2000). Sin embargo, los árboles forestales son longevos

y alcanzan tarde la madurez reproductiva. Además, el porcentaje de plántulas que sobrevive y alcanza la fase reproductiva es muy pequeño, siendo los primeros años de desarrollo los más críticos para el establecimiento del regenerado. El clima mediterráneo impone a las plántulas no sólo un periodo de sequía a veces superior a los siete meses anuales sino también la irregu-

laridad de las precipitaciones. Esta doble adversidad se verá incrementada si tenemos en cuenta los modelos de cambio climático actualmente aceptados en latitudes similares a las nuestras en las que se prevé un ascenso de las temperaturas y la disminución de las precipitaciones (CASTRO et al., 2005). Las plantas muestran ante el estrés hídrico dos tipos de respuestas, o bien tienden a evitarlo o bien han desarrollado mecanismos que les permiten resistirlo. El conocimiento de estos mecanismos adaptativos permiten por un lado comprender los procesos evolutivos implicados en la adaptación de las plantas y por otro predecir la respuesta de determinadas poblaciones o especies ante la modificación de las condiciones ambientales. Encontrar genotipos resistentes a la sequía constituiría un material forestal de gran ayuda en las repoblaciones en lugares áridos y escarpados. Se han hallado diferencias significativas entre procedencias de pinos mediterráneos en cuanto a su resistencia a la sequía en ensayos de campo (ALÍA et al., 1997; ATZMON et al., 2004; LÓPEZ et al., 2007). En el presente trabajo se estudia la posibilidad de desarrollar técnicas más rápidas de evaluación de esta resistencia mediante el uso de cultivos hidropónicos y la adición de polietilenglicol (PEG) 8000, polímero de peso molecular elevado capaz de inducir estrés hídrico. La ventaja de esta técnica respecto a la de controlar el agua suministrada a la planta en riegos sucesivos es la posibilidad de variar con mayor rapidez el estatus hídrico del ambiente en el que se desarrollan las raíces de tal manera que la sequía inducida es más rápida y homogénea con la consiguiente obtención precoz de resultados. Para validar esta metodología hemos utilizado dos procedencias de *Pinus canariensis*, una de Gran Canaria, Arguineguín y otra de Tenerife, Arico, y una de *Pinus pinaster*, Oria en Almería.

Las condiciones extremadamente áridas en las que ha evolucionado la masa de Arguineguín

hacen pensar en posibles adaptaciones a la sequía de sus genotipos. Las procedencias de Arico y Oria han mostrado estar bien adaptadas a la dureza de su medio local. Esta buena adaptación no sólo se ha comprobado en términos de supervivencia, sino también en crecimiento (FERNÁNDEZ et al., 1999; CLIMENT et al., 2006). Los objetivos de este trabajo son por una parte, como ya se ha comentado, validar el uso de cultivos hidropónicos para evaluar resistencia al estrés hídrico y por otra determinar si la estrategia de adaptación a la sequía varía entre ambas especies y, en el caso del pino canario, además entre las dos procedencias.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron semillas de dos procedencias de pino canario, Arguineguín y Arico, y una de pino marítimo, Oria (Tabla 1). Una vez germinadas las semillas se trasladaron a un cultivo hidropónico con solución nutritiva Hoagland durante cuatro meses. La concentración de nutrientes se aumentó gradualmente cada vez que se renovaba la solución (2 veces por semana) hasta alcanzar la concentración de la fórmula completa. El fotoperíodo aplicado fue de 16 horas con temperaturas de 25/20°C y 60/80% de humedad relativa, durante el día y la noche respectivamente. Al comenzar el quinto mes en el cultivo se inició la imposición de estrés hídrico mediante la adición de PEG-8000. Cada dos días se disminuyó el potencial hídrico de la solución -0,5 MPa hasta llegar a -1 MPa (t1) y -2 MPa (t2) manteniendo una solución control sin PEG durante todo el experimento (t0). La duración total del ensayo de estrés fue de 14 días. En seis plantas por procedencia y tratamiento se calculó en seis fechas de medición el contenido hídrico relativo. Para ello se pesaron las acículas inmediatamente después de la cosecha (PF = peso

Procedencia	Alt (m)	T (°C)	P (mm)	Pseq
Oria	1150	15,8	357	6
Arico	1600	11,4	420,1	4,9
Arguineguín	300	20,5	144	9,5

Tabla 1. Caracterización ecológica de las procedencias estudiadas. Alt: altitud, T: temperatura media anual, P: precipitación anual, Pseq: periodo seco

fresco), posteriormente se introdujeron en agua destilada a 5 °C durante 24 horas para determinar el peso hidratado (PH) y finalmente se obtuvo el peso seco (PS) tras secado en estufa a 70°C durante 48 horas. El contenido hídrico relativo se calculó como $CHR = (PF-PS)/(PH-PS)$. En las mismas fechas de medición y en las mismas plántulas, se recolectaron tres acículas para calcular el potencial osmótico (ψ_{π}). Tras recogerlas se congelaron con nitrógeno líquido y una vez descongeladas se midió el ψ_{π} con un psicrómetro (microvoltímetro modelo HR-33T, Wescor, Logan, UT). La capacidad de ajuste osmótico se determinó mediante gráficos del $\ln CHR$ frente a $-\ln(-\psi_{\pi})$ (MORGAN, 1980; NGUYEN-QUEYRENS & BOUCHET-LANNAT, 2003) en las distintas fechas de medición, a medida que aumentaba el estrés hídrico. La primera fase de las rectas de regresión corresponde a un cambio en el potencial osmótico manteniéndose el CHR constante (sin pérdida de agua): esta acumulación de solutos se denomina ajuste osmótico absoluto. Durante la segunda fase, segunda recta de regresión, se produce pérdida de agua y ajuste osmótico activo. Este mecanismo permite mantener un alto potencial de turgencia, aun con un descenso en el potencial hídrico.

El último día de medición se calculó en diez plantas por procedencia y tratamiento el porcentaje de biomasa seca en raíces, tallo y acículas tras secado en estufa a 70°C durante una semana.

Para estudiar las diferencias entre tratamientos y procedencias se llevaron a cabo análisis de la varianza para cada día de medición utilizando como factores los tres niveles de tratamiento, las tres procedencias y las interacciones entre ambos. El modelo utilizado fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + P_j + T_i \times P_j + \varepsilon_{ij}$$

donde Y_{ij} es el valor estimado de la procedencia j -ésima (P) con el tratamiento i -ésimo (T), μ es la media general y ε_{ij} el error experimental. Todos los factores fueron considerados fijos. Para evaluar el

porcentaje de la varianza explicada por cada factor se consideraron todos los factores como aleatorios. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con SAS (SAS INSTITUTE, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras dos meses en el cultivo hidropónico las acículas de los pinos de las tres procedencias empezaron a amarillear. Se incrementaron las dosis de algunos micronutrientes y de hierro apreciándose a la semana sólo una leve mejoría en algunas plántulas, descartándose pues un déficit nutricional en la solución. El pH de la solución se mantuvo durante todo el experimento ligeramente ácido, desechándolo también como motivo del amarilleamiento. Se sugieren dos causas posibles que no han podido comprobarse en este ensayo, hipoxia del medio donde se desarrollan las raíces debido a una aireación de la solución insuficiente o déficit lumínico que provocaría un crecimiento descompensado de los sistemas aéreo y radical.

En todas las variables medidas, el tratamiento ha sido siempre el factor más significativo. El porcentaje de la varianza explicada por este factor del contenido hídrico relativo varió entre el 4 y el 18% en las distintas fechas de medición (Tabla 2). A partir del cuarto día de medición (día 9 del calendario de imposición de estrés) se produjo un descenso brusco del CHR en las plántulas de todos los tratamientos, incluido el control (Figura 1a). Sólo se apreciaron diferencias significativas entre procedencias el día 11 (Figura 1b), momento en que la procedencia de Arico mostró un 70% más de CHR que la de Arguineguín en el t2. La rápida imposición de estrés puede haber impedido la puesta en funcionamiento adecuada de todos los mecanismos de resistencia a la sequía y por ello no haberse detectado variación entre procedencias en cuanto a este parámetro.

	CHR3	CHR5	CHR7	CHR9	CHR11	CHR14
Especie	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	13.93 **	n.s.
Tratamiento	n.s.	13,50 *	17,57 *	4.40 *	18.02 *	9.97 *
Especie x Tratamiento	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabla 2. Significación y porcentaje de la varianza explicado por los distintos factores para el contenido hídrico relativo (CHR) los 6 días de medición (n.s. no significativo, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

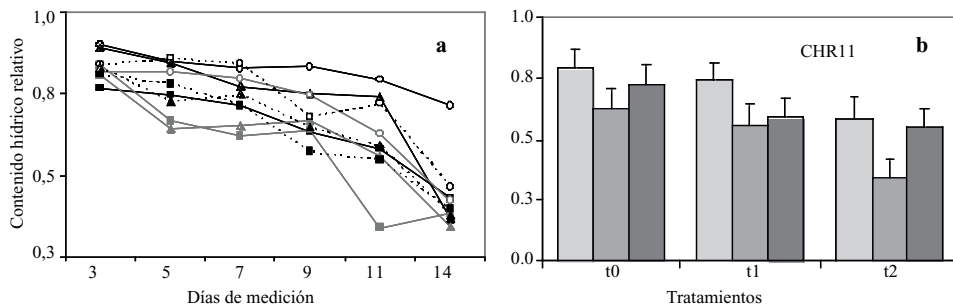


Figura 1. a) Evolución del contenido hídrico relativo (CHR) de las plántulas de las tres procedencias de los tres tratamientos durante el ensayo. En el eje de abscisas los días de medición. t0 (control): -○- Arico, -○- Arguineguín, --○-- Oria. t1 (-1MPa): -▲- Arico, -▲- Arguineguín, --▲-- Oria. t2 (-2MPa): -■- Arico, -■- Arguineguín, --■-- Oria. b) Contenido hídrico relativo tras 11 días de estrés. ■ Arico, ■ Arguineguín, ■ Oria

El ψ_{π} fue diferente entre procedencias todos los días de medición, explicando este factor alrededor del 20% (Tabla 3) de la variación salvo en el último día, cuando las diferencias entre procedencias decrecieron. Durante todo el ensayo las plántulas de Arguineguín mostraron los ψ_{π} más bajos, alcanzándose el valor de -6 Mpa al finalizar el ensayo. El menor valor de ψ_{π} de esta procedencia bajo tratamientos de estrés puede indicar una mayor habilidad para mantener el turgor celular cuando desciende el potencial hídrico de la planta. Excepto en los días 3 y 5, el tratamiento fue también siempre significativo incrementándose la cantidad de varianza expli-

cada por este factor paulatinamente desde el 30% el día 7 hasta el 65% el día 14.

Cuando se compararon las pendientes de las líneas de regresión de los gráficos elaborados para evaluar el ajuste osmótico (Figura 2) se constataron valores menores para las dos procedencias canarias, evidenciando su mayor capacidad de ajuste osmótico activo, si bien las tres procedencias ante situaciones moderadas de sequía ponen en marcha mecanismos de ajuste osmótico para combatir el déficit hídrico.

Tanto la biomasa absoluta como relativa destinada a las raíces fue mayor en los tratamientos de estrés que en el control en ambas especies

	Ψ_{π} 3	Ψ_{π} 5	Ψ_{π} 7	Ψ_{π} 9	Ψ_{π} 11	Ψ_{π} 14
Especie	28,63*	n.s.	22,17 *	15,00 *	18,66 ***	9,63 *
Tratamiento	n.s.	n.s.	30,15 **	43,14 ***	51,80 ***	65,52***
Especie x Tratamiento	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabla 3. Significación y porcentaje de la varianza explicado por los distintos factores para el potencial osmótico (Ψ_{π}) los 6 días de medición (n.s. no significativo, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

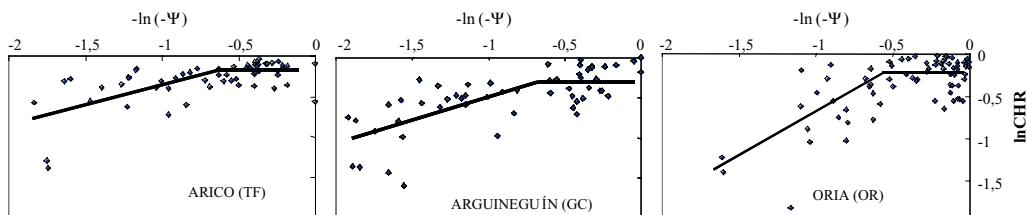


Figura 2. Líneas de regresión ajustadas del $\ln CHR = f(-\ln(-\Psi_{\pi}))$ de las acículas de las tres procedencias para calcular el ajuste osmótico

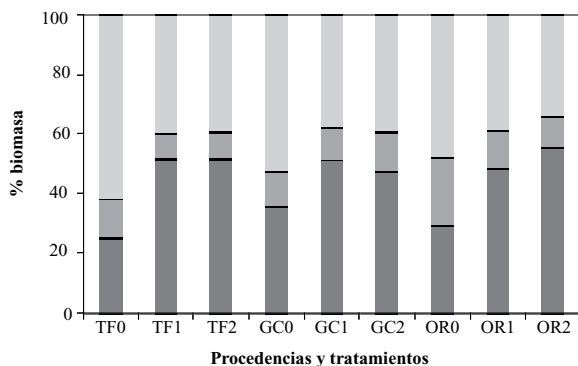


Figura 3. Porcentaje de biomasa destinado a raíz (■), tallo (■) y hojas (■) medidos en la cosecha final, día 14, de las plántulas de todas las procedencias y tratamientos (TF: Arico, GC: Arguineguín, OR: Oria, 0: t0, 1: t1, 2: t2)

(Figura 3). Esta tendencia parece ser común en plantas que se desarrollan en condiciones áridas, las cuales invierten mayor cantidad de recursos en el desarrollo radical en detrimento del crecimiento de la parte aérea (BONGARTEN & TESKEY, 1987). El crecimiento en altura de la procedencia de Arico fue dos veces mayor que la de Oria y tres que la de Arguineguín en todos los tratamientos. Las plántulas de Oria no sometidas a estrés destinaron más biomasa al tallo y menos a las acículas que las de las dos procedencias canarias.

Las plántulas de pino canario de ambas procedencias sometidas al mayor nivel de estrés absorbieron su médula, presentando tallos huecos en la cosecha final. Este comportamiento puede ser debido a la acumulación de reservas en el tallo del pino canario necesarias para rebrotar. Sugerimos que, en una situación de estrés elevado como la del t2, la plántula moviliza todas sus reservas para sobrevivir, llegando incluso a quedarse sin médula.

Agradecimientos

El presente trabajo se comenzó a realizar en la Universidad Hebrea de Jerusalem durante una estancia corta de Rosana López dentro del programa de becas FPU del ministerio de Educación y Ciencia. Nuestro agradecimiento a los servicios forestales de los Cabildos de Tenerife y Gran Canaria por el suministro de las semillas de pino canario y al INIA por las de la procedencia Oria de pino marítimo.

BIBLIOGRAFÍA

- ATZMON, N.; MOSHE, Y. & SCHILLER, G.; 2004. Ecophysiological response to severe drought in *Pinus halepensis* Mill. trees of two provenances. *Plant Ecol.* 171(1-2): 15-22.
- ALÍA, R.; MORO, J. & DENIS, J.B.; 1997. Performance of *Pinus pinaster* provenances in Spain: interpretation of the genotype by environment interaction. *Can. J. For. Res.* 27(10): 1548-1559.
- BONGARTEN, B.C. & TESKEY, R.O.; 1987. Dry weight partitioning and its relationship to productivity in loblolly pine seedlings from seven sources. *For. Sci.* 33: 255-267.
- CASTRO, M.; MARTÍN-VIDE, J. Y ALONSO, S.; 2005. El Clima de España: pasado, presente y escenarios de clima para el siglo XXI. En: J.M. Moreno (coord.), *Evaluación Preliminar de los impactos en España por efecto del Cambio Climático*: 399-435. Centro de Publicaciones del Ministerio de Medio Ambiente. Madrid.
- CLIMENT, J.; CHAMBEL, M.R.; LÓPEZ, R.; MUTKE, S.; ALÍA, R. & GIL, L.; 2006. Population divergence for heteroblasty in the Canary Island pine (*Pinus canariensis*, Pinaceae). *Am. J. Bot.* 93: 840-848.
- FERNÁNDEZ, M.; GIL, L. & PARDOS, A.; 1999. Response of *Pinus pinaster* Ait. provenances at early age to water supply. I. Water relation parameters. *Ann. For. Sci.* 56: 179-187.
- LÓPEZ, R.; ZEHAVI, A.; CLIMENT, J. & GIL, L.; 2007. Contrasting ecotypic differentiation

- for growth and survival in *Pinus canariensis*. *Aust. J. Bot.* 55: 1-11.
- MORGAN, J.M.; 1980. Osmotic adjustment in the spikelets and leaves of wheat. *J. Exp. Bot.* 31: 655-665.
- NGUYEN-QUEYRENS, A. & BOUCHET-LANNAT, F.; 2003. Osmotic adjustment in three-year-old seedlings of five provenances of maritime pine (*Pinus pinaster*) in response to drought. *Tree Physiol.* 23: 397-404.
- SAS INSTITUTE (1999) *SAS/STAT User's guide, Version 8*. SAS Institute. Cary, North Carolina.
- SULTAN, S.; 2000. Phenotypic plasticity for fitness components in polygonum species of contrasting ecological breath. *Ecology* 82(2): 328-343.