

CONTROL DEL ESTRÉS HÍDRICO MEDIANTE TDR Y SU APLICACIÓN EN PROGRAMAS DE MEJORA GENÉTICA

Tania Velasco-Conde ^{1*}, Ismael Aranda García ², Isabel Feito Díaz ¹, Unai Ortega Lausen ¹, Ricardo Alía Miranda ² y Juan Majada Guijo ¹

¹ SERIDA. Planta Experimental “La Mata”. Apdo.13. 33820-GRADO (Asturias, España). Correo electrónico: tania@serida.org

² CIFOR INIA. Carretera de la Coruña km 7,5. 28040-MADRID (España)

Resumen

En este trabajo se ha definido una metodología de aplicación de estrés a través de medidas de la humedad en sustrato mediante reflectometría de dominio temporal (TDR). Para validar el sistema experimental hemos evaluado durante 60 días y bajo distintos niveles de estrés hídrico, el comportamiento de plantas de *Pinus pinaster* Ait. Se aplicaron tres niveles de estrés manteniendo distintos contenidos volumétricos de agua (niveles de potencial hídrico) sobre dos procedencias de *P. pinaster* de zonas extremas en el rango de distribución natural de la especie (Landas, Francia; y Oria, Almería). La respuesta morfológica y funcional al estrés hídrico se ha evaluado mediante la caracterización del sistema radicular, parámetros relacionados con el intercambio gaseoso y el potencial hídrico de las plantas. Los resultados obtenidos permiten asegurar diferencias significativas entre los niveles de estrés aplicados mediante TDR, aunque se constatan elevados niveles de variación dentro de cada tratamiento, asociados a un efecto acumulativo basado en el consumo diferencial de agua por parte de cada genotipo. Los resultados obtenidos pueden cuestionar el empleo de sistemas experimentales basados en la reposición media de agua evapotranspirada sobre plantas cultivadas en contenedores individuales cuando se pretenden evaluar diferencias entre procedencias. No obstante, las dos procedencias utilizadas en el ensayo nos han permitido constatar la existencia de al menos dos modelos de respuesta frente al déficit hídrico en *P. pinaster*. La procedencia Oria presentaría un tipo de respuesta recurso/dependiente, mientras que Landas podría clasificarse como un modelo recurso/independiente, basado probablemente en mecanismos de tolerancia como el ajuste osmótico.

Palabras clave: *Coficiente de variación, Estrés hídrico, Pinus pinaster, Sequía, TDR, Time Domain Reflectometry*

INTRODUCCIÓN

Actualmente, el conocimiento de los mecanismos de tolerancia a estrés hídrico es un tema de especial interés, dado que la sequía es uno de los factores ambientales que más afectan a la supervivencia y crecimiento de las especies forestales (ASPELMEIER & LEUSCHNER, 2006). El

grado de variabilidad genética mostrado frente a la sequía, incluyendo genotipos adaptados a diferentes hábitat u otros que presentan cierta plasticidad fenotípica, se refleja en la amplia disponibilidad de fenotipos existentes en la naturaleza (GREGORIUS & KLEINSCHMIT, 1999).

Conocer el contenido de agua en el suelo es fundamental para explicar toda una serie de pro-

cesos de diversa índole implicados en la respuesta de una formación forestal a la disponibilidad edáfica de agua. Desde hace unos años la necesidad de monitorizar el estado hídrico de las plantas y del suelo ha fomentado el desarrollo de diversas técnicas entre las que cabe destacar el uso de la técnica de reflectometría de dominio temporal (Time Domain Reflectometry, *TDR*), que presenta algunas ventajas frente a otras técnicas destructivas, como la gravimetría, o no destructivas como la sonda de neutrones, resistividad eléctrica, bloques de yeso u otros. La técnica consiste en medir el volumen de agua a partir de las propiedades eléctricas del suelo con distinto grado de humedad (medida de la constante dieléctrica del suelo) (TOPP & DAVIS, 1985). Los valores obtenidos con TDR muestran una gran relación con el contenido volumétrico de agua líquida en suelos no saturados; así como la práctica independencia de otros factores como la textura, la densidad, la temperatura o el contenido de sales. La precisión de las medidas, la rapidez y facilidad de uso, así como la posibilidad de hacer medidas bastante localizadas por lo reducido del volumen de medida son sus principales ventajas.

En ensayos previos sobre tolerancia a estrés realizados en invernadero (datos no mostrados), se pudo constatar que la existencia de distintas tasas de crecimiento dentro de un mismo tratamiento, puede en ocasiones ser el resultado de la aplicación de diferentes niveles de estrés hídrico real, y motivados por las particularidades fisiológicas de cada genotipo que implicarían un consumo de agua muy diferente aún bajo un mismo régimen de riego. Estandarizar y cuantificar la cantidad de estrés al que deseamos someter a un determinado genotipo, es por tanto uno de los principales problemas a la hora de realizar este tipo de estudios, tanto en campo como en condiciones controladas en invernadero.

El objetivo de este trabajo es corroborar la eficacia de los TDRs como instrumento para cuantificar y homogeneizar la aplicación de distintos grados de estrés hídrico al que se someten las plantas cuando se presupone una variabilidad grande en los materiales vegetales y en su respuesta. Para ello, se evaluó el comportamiento de dos procedencias de zonas extremas en el rango natural de distribución de *P. pinaster* Ait.

MATERIAL Y METODOS

Estandarización del uso de TDR para cuantificar potencial hídrico en sustratos

En un ensayo previo a este estudio se definió la relación entre el volumen de agua y el potencial hídrico en un sustrato de cultivo. Para ello se evaluaron los potenciales y los porcentajes de agua mediante el uso de minitensiometros con transductores de presión (VAN DER PLOEG et al., 2005) y sondas TDR (HERKELRATH et al., 1991), respectivamente. Se evaluó el efecto de adicionar paulatinamente volúmenes crecientes de agua hasta alcanzar la capacidad de campo.

Material vegetal y diseño del ensayo con las dos procedencias

Para validar el sistema experimental se eligieron dos procedencias de *P. pinaster*: Oria (Almería, España) y Landas (Francia), seleccionadas por las características bioclimáticas de los lugares de origen de sus semillas (Tabla 1). Las semillas de la procedencia Oria fueron suministradas por el CIFOR-INIA y Landas procede del huerto semillero de Mimizán.

Las semillas de ambas procedencias se conservaron a 4°C durante dos meses, se sembraron en bandejas multialveolares de 0.2 l que contenían fibra de coco como sustrato, y se cultivaron tres meses en invernadero (Grado-Asturias, 43°

Procedencia	Semilla Zona	Latitud Longitud	Altitud (m)	Precipitación media (mm)	Temperatura anual media (°C)
Landas	Francia	45° 08' N	10 a 40	1280	13,5
	Aquitania	1° 00' W			
Oria	España	37° 29' N	1025	381	18,7
	Almería	2° 17' W			

Tabla 1. Características bioclimáticas de las zonas de procedencia de *P. pinaster* seleccionadas

32° N y 7° 00' W, 65 m), con temperatura y humedad controladas ($70\% \pm 10\%$ y $25 \pm 2^\circ\text{C}$). Se regó diariamente con 8,5 ml por alveolo incluyéndose una fertilización por semana (100:50:75 N:P:K mg/planta). Posteriormente se transplantaron a contenedores individuales de 0,4 l que contenían el mismo sustrato, tras lo cual y transcurrido un período de aclimatación se comenzó a aplicar el estrés. Durante este período las plantas fueron regadas regularmente hasta capacidad de campo y fertilizadas a intervalos de una vez por semana (90:41:72 N:P:K, mg/planta y por aplicación).

Se fijaron 4 niveles de aporte hídrico que corresponden a los potenciales medios del sustrato: -4,5 KPa (control = 28%), -17,7 KPa (11%), -23 KPa (8%) y -28,1 KPa (5%). Se realizó un diseño anidado (*split plot* completo) en el que el factor principal fue el riego, con 4 repeticiones, y el secundario la procedencia, con 22 plantas por bloque y tratamiento. En cada bloque o repetición los distintos aportes hídricos se distribuyeron de forma que cada nivel ocupase todas las posiciones dentro del cuadrado que conformaban los cuatro tratamientos. En cuanto a las plantas, se alternaron las 2 procedencias de forma que cada una estuviese rodeada solo por ejemplares de la otra procedencia.

En agosto comenzó el tratamiento de sequía que duró 13 semanas. El control continuo del contenido de agua en cada nivel de estrés se realizó con sondas TDR (*Time Domain Reflectometry probe*, Trime®IT IMKO, Alemania). Las lecturas se realizaron cada 2 días con TDR colocados en plantas seleccionadas por presentar un comportamiento medio en crecimiento en altura dentro de cada procedencia y tratamiento de estrés. Se efectuaron dos cosechas, una a principios de septiembre y otra a finales de octubre, realizándose tanto medidas alométricas como fisiológicas.

Se midió el potencial hídrico al amanecer en el tallo principal mediante una cámara de presión Scholander (*PMS Instrument Co.*, Corvallis, OR) y siguiendo la metodología de SCHOLANDER *et al.* (1965) y TURNER (1988). Las tasas de intercambio gaseoso se evaluaron mediante un equipo portátil de análisis de gas por infrarrojo (LCA-IV, ®ADC Instruments Cambridge, UK) con el que también se midió la radiación fotosintéticamente activa (PAR) y la

temperatura del aire durante las medidas. En ambas cosechas se tomaron al azar 4 plantas por tratamiento y bloque, evaluándose la biomasa por separado en raíz, tallo y cinco acículas.

Para determinar el área foliar y radicular, las raíces y las acículas fueron analizadas con un escáner gráfico y las imágenes digitalizadas procesadas mediante *software* de análisis imagen (*WinRhizo Pro*, *Régent Instruments Inc.*, Québec, Canadá). Tanto las raíces como las hojas se escanearon en fresco colocándolas directamente en la cubeta del analizador.

Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó con la aplicación informática SPSS (SPSS Inc.® Win™, versión 12.0, Richmond, CA). Las diferencias e interacciones entre procedencias y tratamientos, fueron determinados mediante análisis de la varianza (ANOVA de dos factores). La comparación de medias se realizó utilizando el “*test a posteriori*” de Mínimas Diferencias Significativas (MDS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se representa el potencial hídrico frente al porcentaje de agua, obtenidos como resultado de las medidas realizadas con TDR y minitensiometros sobre sustrato de fibra de coco con diferente contenido en agua. La relación entre ambas variables se ajusta a un modelo exponencial representado por la ecuación $y = 451,55 e^{-0,083x}$ con un coeficiente de determinación (r^2) de 0,93 ($p < 0,0001$), modelos similares fueron obtenidos por otros autores como CUEVAS *et al.* (2005). La bondad de ajuste obtenida en el modelo permite extrapolar las lecturas de TDR a potenciales hídricos que ofrecen una idea más intuitiva del agua disponible para las plantas. La utilización de TDRs para ensayos de estrés resulta más práctica que la obtenida de minitensiometros, pues ofrecen una mayor fiabilidad en las medidas cuando el contenido de agua en el sustrato es muy bajo.

En la figura 2 se recogen las lecturas de las sondas tomadas en días alternos a lo largo del período de estrés con las dos procedencias y los 4 aportes hídricos. Como se puede observar con

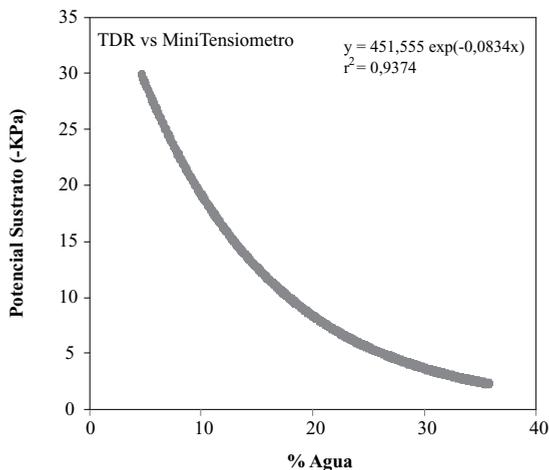


Figura 1. Resultado de la calibración de los TDR en fibra de coco. Relación entre porcentaje de agua presente en el sustrato, medido con TDR, y el potencial hídrico, medido con los minitensiometros

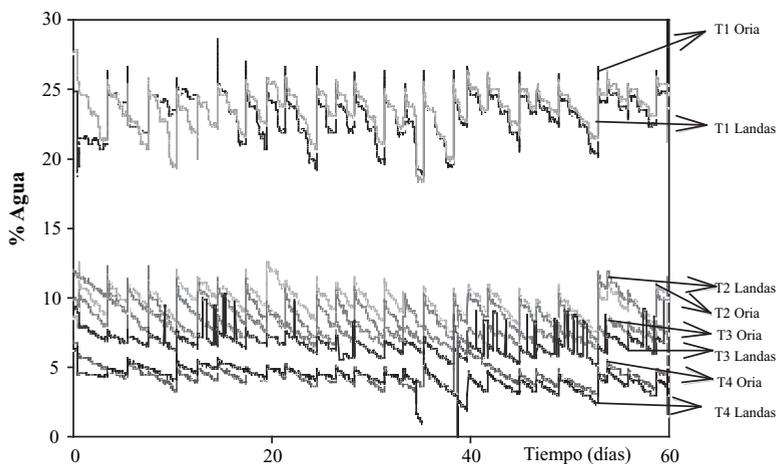


Figura 2. Porcentaje de agua presente en sustrato por tratamiento y procedencia. T1: 28%; T2: 11%; T3: 8%; T4: 5%

los datos obtenidos con este sistema de control se puede mantener un aporte hídrico sin grandes oscilaciones que hace factible fijar a priori los distintos niveles de estrés aplicados, y conseguir que éstos permanezcan a lo largo del ensayo de forma más o menos constante (HERKELRATH et al., 1991; JONES, 2004).

Por otro lado, dado que la reposición de agua se realiza, a partir de las lecturas de los TDRs, y de forma individualizada para cada procedencia y tratamiento, se puede calcular el agua consumi-

da en cada tratamiento. En la figura 3 se representan los consumos acumulados en cada procedencia y tratamiento. En términos generales, el consumo es dependiente de la disponibilidad, dado que las curvas que representan estos consumos no se cruzan en la mayoría de los casos. Esto confirmaría nuestras anteriores sospechas sobre el grado de estrés al que sometemos cada planta cuando hay diversidad de respuesta.

El estudio comparativo de las dos procedencias muestra que Oria, procedencia con una pre-

visible adaptación a la sequía, presenta un consumo más bajo de agua cuando ésta es limitante (Figura 3). Por el contrario, cuando hay suficiente aporte de agua (tratamiento control) su consumo acumulado es superior al de Landas. Este hecho parece indicar que Oria presenta una estrategia de reducción de consumo cuando el recurso es limitante, tal y como sugiere JONES (2007), y que por tanto este comportamiento puede considerarse un valor adaptativo dado que en su lugar de origen son frecuentes los períodos de sequía.

Por el contrario, la procedencia Landas presenta un consumo de agua más similar entre tratamientos, lo cual hace que su consumo sea

menor que el de Oria en el tratamiento control y superior en los tratamientos de estrés. Este hecho parece indicar que esta procedencia sigue una estrategia de aprovechamiento máximo de recursos que podría conducirla a la muerte en un período breve de tiempo ante la escasez de agua. Este modelo, que podríamos denominar recurso/independiente, viene quizá derivado del hecho de que en su lugar de origen esta procedencia no está sometida a unas restricciones hídricas realmente limitantes.

La medida del potencial hídrico al amanecer Ψ_{pd} (Figura 4) tras uno y tres meses de cultivo, corrobora la validez de la metodología aplicada

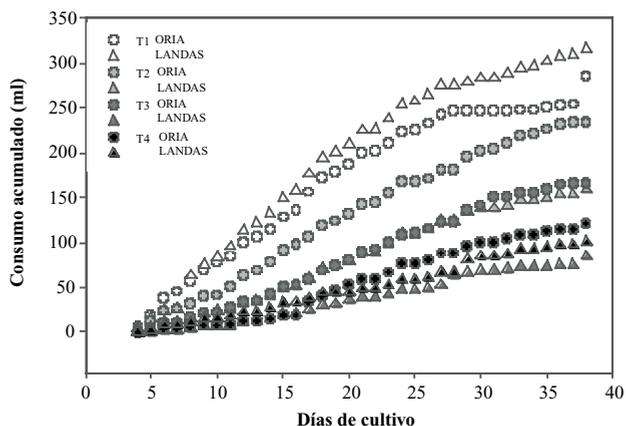


Figura 3. Control del consumo de agua acumulado a lo largo del experimento. T1: Control; T2: estrés leve; T3: estrés medio; T4: estrés fuerte

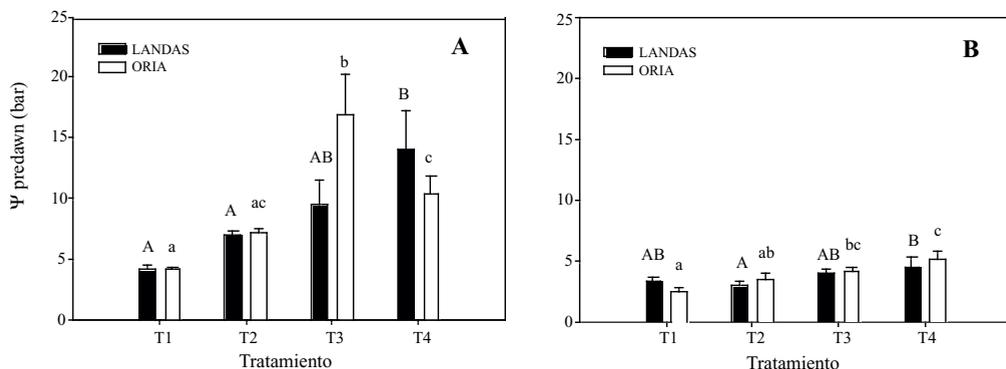


Figura 4. Potencial hídrico al amanecer medido con cámara de presión Scholander en las dos cosechas realizadas a lo largo del experimento (A: cosecha de septiembre y B: cosecha de octubre). T1: Control; T2: estrés leve; T3: estrés medio; T4: estrés fuerte. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en las dos procedencias (test DMS, $p < 0.05$)

en el control de la disponibilidad hídrica mediante TDR. Se observó en las dos fechas una diferencia en Ψ_{pd} acorde a los cuatro niveles de riego aplicados. En los datos obtenidos, por análisis de imagen, se ha seleccionado el máximo nivel de estrés como tratamiento contrastante por ser el único que ha presentado diferencias significativas claras en ambas procedencias que se pudieran interpretar como distintas respuestas adaptativas. Los resultados obtenidos, al representar superficie radicular de ambas procedencias, en el tratamiento control y en el de máximo estrés, frente al porcentaje de agua que presentaba el sustrato, muestran la existencia de una cierta correlación entre ambos factores, de forma que la raíz tiende a desarrollarse en mayor grado cuando existe una limitación en el aporte hídrico tal y como se ha observado en otros trabajos (NGUYEN-QUEYRENS et al., 2003). Este hecho, que es frecuente en el reino vegetal como estrategia para incrementar la absorción de agua cuando es limitante, debemos tenerlo en cuenta a la hora de emplear este tipo de sistemas experimentales basados en la reposición de agua sobre un número limitado de plantas pues se convierte en un factor que puede introducir fuentes de error adicionales a medida que progresa el ensayo y se producen modificaciones en la biomasa de las plantas.

Además, los resultados obtenidos muestran que la sensibilidad de las dos procedencias a la disponibilidad del recurso fue diferente. Analizando el comportamiento de las plantas dentro de cada tratamiento, se puede observar una correlación positiva significativa en Oria entre el porcentaje de agua que mantiene el sustrato en cada genotipo y el tamaño de su raíz ($p=0,036$; $r^2 = 0,37$) en el tratamiento control, en el cual la disponibilidad de agua se mantuvo entre 10% y 35%, aproximadamente. En la procedencia Landas (Control, $p=0,108$, $r^2 = 0,24$; Estrés fuerte, $p=0,09$), por el contrario, no lo fue

en ningún caso, si bien se obtuvieron valores más próximos a la linealidad cuando se sometieron a un estrés fuerte ($r^2 = 0,51$) en el que el agua disponible estaba por debajo del 12%. En el caso de la procedencia Oria sometida a estrés fuerte no se observa correlación ($r^2 = 0,14$; $p=0,228$), lo cual quizá sea debido a la inhibición del desarrollo que muestra esta procedencia cuando las condiciones son ya muy limitantes.

Por lo que respecta a la conductancia estomática los resultados obtenidos son justamente los contrarios. En este caso la única correlación significativa que se obtuvo fue para la procedencia Landas en el tratamiento control ($p=0,011$, $r^2 = 0,49$) en el que la conductancia se incrementa linealmente con la disponibilidad de agua, aspecto que también fue descrito por NGUYEN-QUEYRENS et al. (2003), para esta procedencia. En ocasiones, el ajuste osmótico puede retrasar el cierre estomático durante la sequía como se ha observado en otras especies forestales (TAN & BLAKE, 1997; WHITE et al., 2000; PITA & PARDOS, 2001). En *P. pinaster* se ve apoyado por resultados obtenidos, tanto en plántulas como en individuos adultos (GUYON & KREMER, 1982; GUEHL et al., 1994; ANDRÉ, 1999), mostrando la tendencia de procedencias de zonas áridas, como Oria, a mantener la apertura estomática bajo condiciones de déficit hídrico (NGUYEN-QUEYRENS et al., 2003).

Dada la alta variabilidad de respuesta intratratamiento, se han seleccionado dos variables representativas para mostrar los niveles de variación dentro de cada nivel de estrés: área radicular y volumen de agua disponible en sustrato. En la tabla 2 se muestran los valores del coeficiente de variación obtenidos para el tratamiento control y el máximo estrés. Aunque al trabajar con procedencias era esperable observar altos niveles de variación genética, y de plasticidad fenotípica, resulta interesante resaltar que existen mayores niveles de variación en el contenido hídrico

COEFICIENTE DE VARIACIÓN	TRATAMIENTO	PROC. LANDAS	PROC. ORIA
TDR	CONTROL	50,52	26,08
	MAYOR ESTRÉS	115,85	70,45
AREA RADICULAR	CONTROL	40,66	17,80
	MAYOR ESTRÉS	55,61	29,22

Tabla 2. Coeficiente de variación (%) entre los tratamientos control y el nivel de estrés fuerte (-28,1 Kpa y -4,5 KPa), en ambas procedencias para la disponibilidad de agua en sustrato y el desarrollo del área proyectada

en el tratamiento de estrés. Además, se puede observar que la procedencia Landas presenta mayores niveles de variación que los observados en la procedencia Oria, tanto respecto al uso del agua como al desarrollo del sistema radicular. Este hecho concuerda con la presumible mayor adaptación de los materiales de Oria a situaciones de estrés hídrico, demostrando como procedencias provenientes de zonas áridas responden más rápida y uniformemente, a periodos de sequía o baja disponibilidad hídrica (DESTREMAU *et al.*, 1974; GUYON & KREMER, 1982).

CONCLUSIONES

El TDR es un método útil para la medida del contenido de agua en sustrato en ensayos de sequía; siendo la rapidez, la precisión, la reproducibilidad y la inmediata interpretación de las medidas algunas de sus ventajas. Para estudios de estrés medio- largo plazo el uso de TDR presenta algunas limitaciones en el caso de emplear materiales genéticos con una alta variabilidad en la respuesta, excepto que se disponga de un número de plantas y de sondas muy similar, ya que, la adquisición automática de datos hace posible disponer de una alta densidad de medidas que reducen la dispersión de los mismos. Este método sería altamente recomendable en el caso de trabajar con materiales con baja variabilidad o con clones.

Por otro lado, la validación del sistema experimental con las dos procedencias estudiadas, nos ha permitido definir dos modelos de respuesta a sequía dentro de *P. pinaster*. Por un lado, la procedencia Oria, parece mostrar una adaptación recurso/dependiente que le permite responder de forma rápida al déficit hídrico, mientras que la procedencia Landas tarda más tiempo en adaptarse, y parece hacerlo a través mecanismos como el ajuste osmótico. Si bien este último aspecto será concretado en futuros experimentos.

BIBLIOGRAFIA

ANDRE, C.; 1999. *Rèponse stomatique du pin maritime au déficit de pression de vapeur de l'air : impacts sur la transpiration, l'assimilation du CO₂ et l'efficience de l'eau.*

Mèmoire de fin d'études. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse. Toulouse.

- ASPELMEIER, S. & LEUSCHNER, C.; 2006. Genotypic variation in drought response of silver birch (*Betula pendula* Roth): leaf and root morphology and carbon partitioning. *Trees* 20: 42-52.
- CUEVAS, E.; BAEZA, P. & LISSARRAGUE, J.R.; 2006. Variation in stomatal behaviour and gas exchange between mid-morning and mid-afternoon of north-south oriented grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo) at different levels of soil water availability. *Sci. Hort.* 108: 173-180.
- DESTREMAU, D.X.; 1974. Précisions sur les aires naturelles des principaux conifères marocains en vue de l'individualisation de provenances. *Ann. Recherche For. Maroc.* 14: 5-90.
- GREGORIUS, H.R. & KLEINSCHMIT, J.R.G.; 1999. The environmental dichotomy of adaption and the role of genetic diversity. *Silvae Genet.* 48(3-4): 193-199.
- GUEHL, J.M. ; NGUYEN-QUEYRENS, A.; LOUSTAU, D. & FERHI, A.; 1994. Genetic and environmental determinants of water-use efficiency and carbon isotope discrimination in forest trees. *In: INRA-EUROSILVA (eds.), Contribution to For. Tree Physiol.*: 297-321. Colloq. INRA No. 76. Dourdan, France.
- GUYON, J.P. & KREMER, A.; 1982. Stabilité phénotypique de la croissance en hauteur et cinétique journalière de pression de sève et de la transpiration chez le pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.). *Can. J. For. Res.* 12: 936-946.
- HERKELRATH, W.N.; HAMBURG, S.P. & MURPHY, F.; 1991. Automatic, real-time monitoring of soil moisture in a remote field area with time domain reflectometry. *Water Resour. Res.* 27(5): 857-864.
- JONES, H.G.; 2004. Irrigation scheduling: advantages and pitfalls of plant-based methods. *J. Exp. Bot.* 55: 2427-2436.
- JONES, H.G.; 2007. Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. *J. Exp. Bot.* 58(2): 119-130.
- 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.
- PITA, P. & PARDOS, J.A.; 2001. Growth, leaf morphology, water use and tissue water relations of *Eucalyptus globulus* clones in response to water deficit. *Tree Physiol.* 21: 599-607.
- SCHOLANDER, P.F.; HAMMEL, H.T.; BRADSTREET, E.D. & HEMMINGSEN, E.A.; 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339-346.
- TAN, W. & BLAKE, T.J.; 1997. Gas exchange and water relations responses to drought of fast and slow growing black spruce families. *Can. J. Bot.* 75:1700-1706.
- TOPP, G.C. & DAVIS, J.L.; 1985. Measurement of soil water content using time-domain reflectometry (TDR): A field evaluation. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49: 19-24.
- TURNER, N.C.; 1988. Measurements of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrigation Sci.* 9: 289-308.
- VAN DER PLOEG, M.J.; GOOREN, H.P.A.; HOOGENDAM, C.W.; BAKKER, G.; HUISKES, C.; DE ROOIJ, G.H.; KOOPAL, L.K. & KRUIDHOF, H.; 2005. Osmotic tensiometers: Performance under laboratory conditions. *Geophys. Res. Abstracts* 7.
- WHITE, D.A.; TURNER, N.C. & GALBRAITH, J.H.; 2000. Leaf water relations and stomatal behavior of four allopatric *Eucalyptus* species planted in Mediterranean southwestern Australia. *Tree Physiol.* 20: 1157-1165.