

## **Efecto de diferentes niveles de endurecimiento por estrés hídrico en el contenido de nutrientes y la resistencia a la desecación de plántulas de *Pinus halepensis* Mill.**

Pedro Villar Salvador, Luis Ocaña Bueno, Juan L. Peñuelas Rubira, Inmaculada Carrasco Manzano, Susana Domínguez Lerena

Centro Nacional de Mejora Forestal "El Serranillo", Ministerio de Medio Ambiente, Apdo. 249, 19080 Guadalajara. España [serranillo@dgcnmma.es](mailto:serranillo@dgcnmma.es)

### **Resumen**

El objetivo de este trabajo es conocer el efecto de diferentes niveles de endurecimiento por estrés hídrico sobre el contenido de nutrientes y la resistencia a la desecación de plántulas de *Pinus halepensis*. Los niveles de endurecimiento aplicados fueron un testigo, un nivel A de estrés hídrico en donde las plantas alcanzaron valores de potencial hídrico de madrugada de -1.2 MPa y unos niveles B y C con potenciales hídricos de madrugada de -1.8 MPa y -2.2 MPa, respectivamente. Las diferencias en la resistencia a la desecación se evaluaron a través de la transpiración residual o cuticular y el grado de liberación de electrolitos de las acículas a un nivel concreto de estrés hídrico. Los nutrientes analizados fueron nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K) y sodio (Na) en la parte aérea. Los tratamientos que mayor nivel de estrés hídrico recibieron (B y C), presentaron una menor transpiración cuticular que los tratamientos de menor nivel de endurecimiento. No hubo diferencias importantes en el grado de liberación de electrolitos, si bien el tratamiento B presentó una tendencia a liberar menos electrolitos que los otros tratamientos. Los tres niveles de endurecimiento presentaron mayores contenidos de Na que el testigo, siendo el tratamiento A el que mayor contenido de N presentó y el testigo el de mayor concentración de P. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en el contenido de K.

P.C.: liberación de electrolitos, precondicionamiento, transpiración residual, vivero

### **Summary**

The effect of different water stress preconditioning levels on the nutrient content and the resistance to drought in *Pinus halepensis* seedlings was analysed. Three water stress treatments (A, B, C; plants dried to xylem predawn water potentials of -1.2, -1.8 and 2.2 MPa, respectively) together with a control were studied. Desiccation resistance of the treatments was assessed by the shoots residual or cuticular transpiration and the electrolyte leakage of needles at a specific drought level. Studied nutrients were shoot nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K) and sodium (Na). The two higher moisture stress treatments (B and C) showed a significant lower residual transpiration than the lower water stress treatment (A) and control. Differences in electrolyte leakage among treatments were small when compared at the same desiccation level, although treatment B presented a lower leakage than the other preconditioning levels. The three drought treatments concentrated more Na than control plants. Treatment A and control plants exhibited the highest N and P contents respectively, no differences existing in K content among treatments .

K.W.: electrolyte leakage, nursery, residual transpiration, water stress preconditioning

## **Introducción**

El estrés hídrico es uno de los factores que más limitan el éxito de las repoblaciones forestales. Dicho condicionante no solamente aparece debido a la falta de precipitaciones en determinados momentos del año o a la irregularidad en su distribución, tal como sucede en áreas de clima mediterráneo, sino que también puede ocurrir en suelos hidratados debido a un inadecuado contacto entre el cepellón y el suelo o a bajas temperaturas que dificultan la absorción de agua por las raíces (BURDETT, 1990). La superación de dichos momentos críticos va a depender de la capacidad de las plantas de resistir situaciones de estrés hídrico, lo cual puede ser conseguido a través de dos mecanismos. Por un lado, evitando la desecación por medio de un crecimiento rápido y extenso de las raíces, reduciendo la proporción de la parte aérea con respecto de la subterránea, desarrollando un rápido y eficaz cierre estomático y presentando reducidas pérdidas de agua a través de las paredes epidérmicas. Por otro lado, la resistencia al estrés hídrico se puede conseguir desarrollando tolerancia a la desecación, a través de mecanismos capaces de mantener la turgencia de los tejidos a pesar de sufrir pérdidas importantes de agua, como son ajustes osmóticos o aumento de la elasticidad de las paredes celulares, o bien simplemente incrementando la tolerancia de las células a desecarse sin que sus membranas celulares pierdan su viabilidad (TURNER, 1986).

Algunas de las características funcionales de las plantas relacionadas con la resistencia al estrés hídrico pueden ser predeterminadas por las condiciones de cultivo en el vivero (VAN DEN DRIESSCHE, 1992). No obstante, VILLAR-SALVADOR *et al.* (1996) observaron que el preacondicionamiento por estrés hídrico de plántulas de *Pinus halepensis* en las últimas fases del cultivo en vivero no induce ajustes osmóticos ni cambios en el módulo de elasticidad de las paredes celulares, ni tampoco incrementa su capacidad de formación de nuevas raíces. En este trabajo se presentan nuevos resultados sobre el efecto de diferentes niveles de estrés hídrico en la transpiración residual o cuticular de plántulas de *P. halepensis*, así como su resistencia celular a la desecación. Igualmente se ha examinado si el preacondicionamiento por estrés hídrico, efectuado en las últimas fase del cultivo, afecta el contenido de nutrientes en las plantas

## **Material y métodos**

Las semillas utilizadas para producir la planta proceden de un lote de Levante interior. La siembra se realizó a finales de marzo de 1995 en contenedores del tipo ®Forest Pot-300, siendo el sustrato empleado una mezcla de turba y vermiculita (80-20%). La fertilización aplicada durante el crecimiento de las plantas fue de 2,26 mg de N, 0,76 mg de P y 2,15 mg de K por planta dos veces por semana. Hasta el comienzo del ensayo de endurecimiento el riego fue diario.

Unos días antes de comenzar el endurecimiento, se repartieron 1500 plantas en cuatro grupos, cada uno representando un nivel de desecación diferente. Para aplicar los diferentes niveles de estrés hídrico se sometió a las plantas a ciclos repetidos de sequía, controlándose sus niveles de desecación a través del potencial hídrico de madrugada. Los tratamientos de estrés hídrico

establecidos fueron un tratamiento A, con un nivel bajo de estrés hídrico (-1.2 MPa), uno B con un nivel moderado de estrés (-1.8 MPa) y uno C con un nivel fuerte de estrés hídrico (-2.2 MPa). Se estableció un tratamiento testigo que consistió en el régimen de riego que tradicionalmente se aplica en el Centro de Mejora Forestal "El Serranillo" durante la fase de endurecimiento, y que se caracteriza por el bajo nivel de sequía (media de - 0.78 MPa) al que es sometido el cultivo.

El ensayo comenzó el día 14 de septiembre y finalizó el 10 de noviembre. Las plantas fueron dejadas al aire libre, solo tapándose con un plástico opaco o trasladadas a un invernadero durante los episodios de lluvia. La medida del potencial hídrico de madrugada en los diferentes tratamientos fue hecha con una cámara de Scholander, empleándose las ramas laterales de cinco plantas por tratamiento. Una vez que cada tratamiento alcanzaba su potencial hídrico correspondiente, las plantas se regaban hasta empapar sus cepellones, comenzando entonces un nuevo ciclo de sequía. Durante el ensayo solamente se fertilizó (fertilización de endurecimiento) una vez cada tratamiento, después de que cada uno de ellos concluyera su primer ciclo de sequía.

Para la determinación de la tasa de transpiración cuticular de cada tratamiento se utilizaron 10 plantas por tratamiento. Las partes aéreas, previamente resaturadas, fueron dejadas desecar a oscuras en una habitación en donde la temperatura y el déficit de presión de vapor de agua entre la planta y la atmósfera fueron de  $16.6 \pm 0.07$  °C y  $0.910 \pm 0.001$  kPa (media  $\pm$  un error estándar), respectivamente. A intervalos regulares de aproximadamente 1 hora se procedió a pesar cada planta, hasta obtenerse una curva de pérdida de peso en función del tiempo. La tasa de pérdida en la fase lineal representa la transpiración cuticular.

La tolerancia de las células al estrés hídrico ha sido evaluada por medio de la estabilidad y viabilidad de las membranas celulares frente a la desecación. Para ello se ha determinado el grado de liberación de electrolitos del interior de las células a lo largo de un ciclo intenso de desecación. Se eligieron 70 plantas/tratamiento, de altura semejante, que fueron regadas hasta saturación y dejadas desecar paulatinamente. Periódicamente se muestreó 10 individuos/tratamiento y a partir de ramas laterales se midió el potencial hídrico de madrugada y su contenido hídrico (CH). El CH se define como:  $P_{Fi} / P_{S} * 100$ , siendo  $P_{Fi}$  el peso fresco de la muestra en el momento de muestreo y  $P_{S}$  su peso seco. A partir de cada una de las plantas cuyo estado hídrico era determinado, se cortaron trozos de acículas a lo largo del tallo, evitando acículas tiernas de zonas apicales. Las acículas eran posteriormente lavadas dos veces en agua destilada durante 30 minutos y posteriormente introducidas en tubos de ensayos con 20 ml de agua destilada. Transcurrido 24 h, la conductividad eléctrica del agua de los tubos fue medida ( $CE_i$ ) pasándose los tubos, a continuación, a un autoclave donde se les sometió a 100 °C y 11 MPa durante 10 minutos con el fin de provocar la lisis de todas las células. La conductividad eléctrica del agua después del autoclave ( $CE_f$ ) fue nuevamente medida, definiéndose la conductividad eléctrica relativa (CER) como:  $CE_i / CE_f * 100$  la cual representa una medida de la liberación de electrolitos del tejido y, por tanto, del grado de daño celular (EARNSHAW, 1993).

El análisis de nutriente se realizó a partir de 2-3 réplicas por tratamiento. El nitrógeno (N) fue determinado por el método estándar de Kjeldahl, el fósforo por colorimetría con vanadato molibdénico y el potasio (K) y el sodio (Na) por fotometría de llama.

Los datos de transpiración cuticular y de nutrientes fueron analizados por medio de análisis de la varianza, siendo  $\alpha=0.05$  y  $\alpha=0.01$ , respectivamente, los límites de rechazo de las hipótesis nulas. Las comparaciones entre medias se realizaron a través de la prueba de "la menor diferencia significativa de Fisher" (Fisher's LSD). Para comparar las diferencias de liberación de electrolitos entre tratamientos, se estableció para cada tratamiento un modelo predictivo entre la CER (variable dependiente) y potenciales del contenido hídrico de las plantas (variable independiente) (Figura 2). Los modelos que ajustaron significativamente fueron de segundo orden salvo en el caso del tratamiento B, que fue un modelo cúbico. La comparación del grado de liberación de electrolitos entre tratamientos se realizó calculando el valor predicho de CER y su intervalo de confianza al 95% a un contenido hídrico del 200% (Figura 2)

## Resultados

La liberación de electrolitos en los diferentes tratamientos, medido como la CER, permaneció inicialmente constante hasta valores de CH del 250%, a partir del cual aumentó progresivamente (Figura 1). Dicho valor de contenido hídrico corresponde a valores de potencial hídrico de madrugada ( $\Psi_b$ ) de -2.6 MPa. Por debajo de valore de CH del 200% ( $\Psi_b = -3,7$  MPa) empezaron a aparecer individuos muertos. Cuando se compararon entre sí las CER de los tratamientos a un CH del 200%, no se observaron grandes diferencias entre los tratamientos ensayados (Figura 2), siendo el tratamiento B el que presentó una menor CER (40.6 %) y el tratamiento A el que mostró los valores más altos (48.2 %).

Los tratamientos testigo y A exhibieron tasas de transpiración cuticular prácticamente iguales, pero significativamente mayores que los tratamientos B y C (Figura 3), los cuales mostraron unas tasas de un 25 y un 28%, respectivamente, menores que el testigo.

Los tratamientos de endurecimiento concentraron mayor cantidad de Na que las plantas testigo (Tabla 1). El contenido de N más alto fue observado en el tratamiento A no detectándose diferencias significativas entre los demás tratamientos. En cuanto al P, el tratamiento C registró un menor contenido que en los demás tratamientos. No se registraron diferencias significativas entre tratamientos en las concentraciones de K (Tabla 1).

## Discusión

Los resultados de este trabajo demuestran que el sometimiento de las plántulas de *P. halepensis* a estrés hídrico en las últimas fase de cultivo en vivero inducen modificaciones que pueden incrementar su resistencia al estrés hídrico. La respuesta más clara ha sido la disminución de la transpiración cuticular en los tratamientos de mayor endurecimiento, un resultado que también ha sido observado en *Pinus radiata* al ser sometido a endurecimiento por estrés hídrico (ROOK, 1973) y que contrasta con lo observado en *Chamaecyparis nootkatensis*, que no presentó ninguna variación en la transpiración cuticular al ser sometido a potenciales de madrugada de -1.8 MPa (ARNOTT *et al.*, 1993). La disminución de la transpiración cuticular en los tratamientos de mayor estrés hídrico podría relacionarse con un incremento en el espesor de las capas de la pared celular externa (BAIG y TRANQUILLINI, 1976). Una reducción de la transpiración cuticular puede incrementar las posibilidades de supervivencia de las plantas ante situaciones de fuerte estrés hídrico, como las que a menudo

se dan durante las fase post-transplante (KAUSHAL y AUSSENAC, 1989), ya que ante un completo cierre de los estomas, los individuos de menor transpiración cuticular serán capaces de mantener sus reservas hídricas durante un mayor tiempo.

Algunos autores han demostrado que las plantas preacondicionadas a estrés hídrico desarrollan una mayor tolerancia celular a la desecación (SCHERBAKOVA y KACPERSKA-PALCZ, 1980). Nuestros resultados indican que las plántulas de *P. halepensis* empiezan a morir a partir de  $\Psi_b = -3.7$  MPa, un dato que es semejante al registrado por ARNOTT *et al.* (1993) en *Ch. nootkatensis* ( $\Psi_b = -3.8$  MPa). Ante un mismo nivel de desecación, el tratamiento B fue el que menor liberación de electrolitos presentó, lo que significa que un nivel de endurecimiento por estrés hídrico entorno a  $-1.8$  MPa incrementa ligeramente la tolerancia de las plántulas a la desecación.

Aunque existen muchos estudios que demuestran un efecto negativo del estrés hídrico en el contenido de nutrientes, las plantas testigo solo presentaron mayor concentración de P. Los tratamientos de moderado estrés hídrico (A y B) presentaron los mayores contenidos de nutrientes, en concreto de N (tratamiento A) y de Na y K (tratamiento B) lo que indica que dichos niveles de endurecimiento no reducen el contenido de nutrientes en plántulas de *P. halepensis*, pudiendo incluso incrementarlos. Este aumento de nutrientes también ha sido observado en otras coníferas (PHARIS y KRAMER, 1964; TIMMER y MILLER, 1991), habiéndose atribuido dicha respuesta al mayor efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento que sobre la absorción de nutrientes lo que conduce a su concentración (CHAPIN, 1991).

### Referencias bibliográficas

ARNOTT, J.T.; GROSSNICKLE, S.C.; PUTTONEN, P.; MITCHELL y FOLK, R.S. (1993). Influence of nursery culture on growth, cold hardiness, and drought resistance of yellow cypress. *Can. J. For. Res.* 23:2537-2547.

BAIG Y TRANQUILLINI (1976). Studies on the upper timberline: morphology and anatomy of Norway spruce (*Picea abies*) and stone pine (*Pinus cembra*) needles from various habitat conditions. *Can J. Bot.* 54:1622-1632.

BURDETT, A.N. (1990). Physiological processes in plantation establishment and the development of specifications for forest planting. *Can. J. For. Res.* 20: 415-427.

CHAPIN, F.S., III (1991). Effects of multiple environmental stresses on nutrient availability and use. In: H.A. MOONEY; W.E. WINNER y E.J. PELL (Eds.) *Response of plants to multiple stresses*: 67-88. Academic Press, San Diego.

EARNSHAW, M.J. (1993). Stress indicators: electrolyte leakage. In: G.A.F. HENDRY y J.P. GRIME (Eds.) *Methods in comparative plant ecology. A laboratory manual*: 152-154 Chapman & Hall. London.

KAUSHAL, P. y AUSSENAC, G. (1989). Transplanting shock in corsican pine and cedar of Atlas seedlings: Internal water deficits, growth and root regeneration. *For. Ecol. Manage.* 27:29-40.

PHARIS, R.P. y KRAMER, P.J. (1964). The effects of nitrogen and drought on loblolly pine seedlings. I Growth and composition. *For. Sci.* 10:143-150

ROOK, DA. (1973). Conditioning radiata pine seedlings to transplanting by restricted watering. *N. Z. J. For. Sci.* 3:54-69.

SCHERBAKOVA, A. y KACPERSKA-PALCZ, A. (1980). Modification of stress tolerance to dehydration pretreatment in winter rape hypotyls. *Physiol. Plant.* 48:560-563.

TIMMER, V.R. y MILLER, B.D. (1991). Effects of contrasting fertilisation and moisture regimes on biomass, nutrients, and water relations of container grown red pine seedlings. *New Forests* 5: 335-348.

TURNER, N.C. (1986). Adpatation to water deficits: A changing perspective. *Aust. J. Plant Physiol.* 13:175-190

VAN DEN DRIESSCHE, R. (1992). Changes in drought resistance and root growth capacity of container seedlings in response to nursery drought, nitrogen, and potassium teatments. *Can. J. For. Res.* 22:740-749.

VILLAR-SALVADOR, P.; OCAÑA, L.; PEÑUELAS, J.; CARRASCO, I.; DOMÍNGUEZ, S. y REVILLA, I. (1996). Relaciones hídricas y potencial de formación de raíces en plántulas de *Pinus halepensis* Mill. sometidas a diferentes niveles de endurecimiento por estrés hídrico. Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales 4: 81-92

Tabla 1. Contenido de nutrientes (mg g<sup>-1</sup>) en partes aéreas de plántulas de *P. halepensis* sometidos a diferentes niveles de endurecimiento por estrés hídrico.

Tratamiento	N	P	K	Na
Testigo	11.0±0.06 <sup>a</sup>	5.63±0.02 <sup>b</sup>	12.8±0.01 <sup>a</sup>	1.40±0.01 <sup>a</sup>
A (-1.2 MPa)	11.7±0.09 <sup>b</sup>	5.53±0.03 <sup>b</sup>	12.8±0.05 <sup>a</sup>	1.80±0.01 <sup>b</sup>
B (-1.8 MPa)	11.3±0.04 <sup>a</sup>	5.44±0.02 <sup>b</sup>	13.2±0.10 <sup>a</sup>	2.0±0.01 <sup>b</sup>
C (-2.2 MPa)	11.1±0.02 <sup>a</sup>	5.17±0.01 <sup>a</sup>	12.5±0.20 <sup>a</sup>	1.95±0.05 <sup>b</sup>

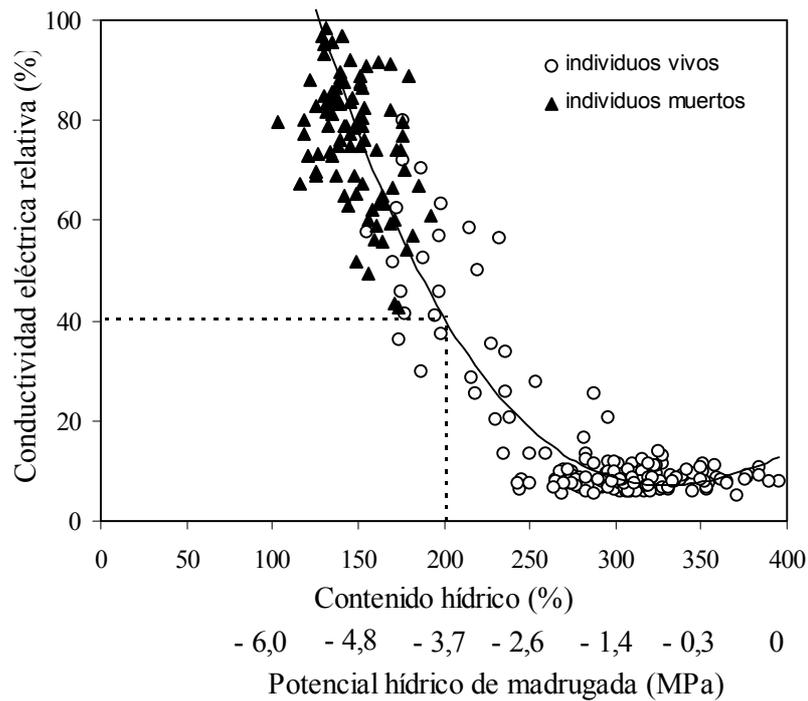


Figura 1. Relación entre la liberación de electrolitos, expresado como conductividad eléctrica relativa, y el contenido hídrico (peso fresco/ peso seco x 100) de plántulas de *P. halepensis*. La figura se ha construido con los datos conjuntos de los tratamientos. Las líneas discontinuas representan predicción de la conductividad eléctrica relativa para un contenido hídrico del 200%.

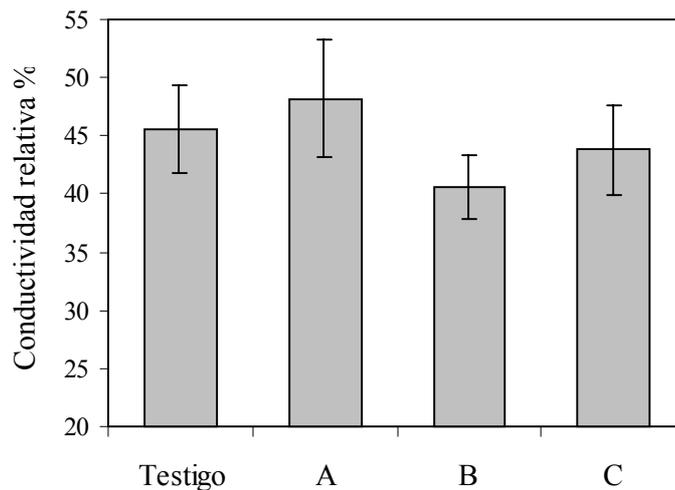


Figura 2. Conductividad eléctrica relativa estimada para un contenido hídrico del 200% en plántulas de *Pinus halepensis* sometidas a diferentes niveles de endurecimiento por estrés hídrico. Las barras verticales representan intervalos de confianza a un 95%. A= -1.2 MPa; B= -1.8 MPa; C= -2.2 MPa.

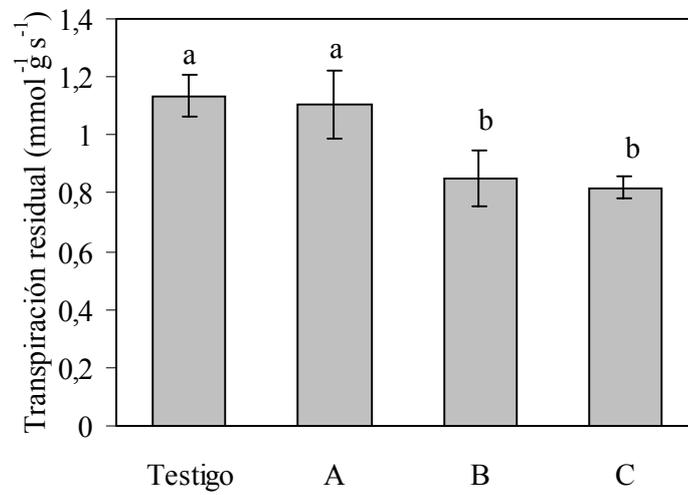


Figura 3. Transpiración residual en plántulas de *Pinus halepensis* sometidos a diferentes niveles de endurecimiento por estrés hídrico. A= -1.2 MPa; B= -1.8 MPa; C= - 2.2 MPa. Las barras verticales representan el error estándar.