

FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA EN CINCO PROCEDENCIAS DE *PINUS HALEPENSIS* MILL Y SU RESPUESTA A ESTRÉS HÍDRICO

Chlorophyll fluorescence in five procedences *Pinus halepensis* Mill to quantify response to water stress

R. M^a Navarro Cerrillo¹, R. Maldonado-Rodríguez² y D. Ariza Mateos¹

¹ E.T.S. Ingenieros Agrónomos y de Montes. Dpto. Ingeniería Rural. Apdo. 3048. 14080 CÓRDOBA (Spain). Correo electrónico: ir1nacer@uco.es

² Laboratorio de Bioenergética. Universidad de Ginebra. Estación de Botánica. 10, Chemin des Embrouchis. CH-1254 JUSSY (Ginebra-Suiza)

Resumen

En este trabajo se estudia la utilidad de las medidas de la cinética de inducción de fluorescencia de la clorofila en acículas para detectar la respuesta temprana a estrés hídrico moderado de cinco procedencias *Pinus halepensis* Mill. Las plantas se sometieron a un ciclo de sequías de 21 días en una cámara de cultivo. Se han encontrado diferencias significativas de supervivencia entre las procedencias en la última medición. La variación en la fluorescencia ha mostrado que la eficiencia del fotosistema II de las plantas sometidas a un estrés hídrico moderado es menor conforme aumenta el nivel de estrés (medido en potencial hídrico) y que esta diferencia varía entre procedencias. El valor de F_v/F_m no parece ser un buen indicador de estrés hídrico temprano. El índice de eficiencia fotosintética obtenido a partir de una doble normalización del PI se ha mostrado como un indicador más sensible de estrés hídrico temprano, por lo que puede representar una medida indirecta del nivel de estrés en etapas previas a la aparición de pérdidas generales de supervivencia.

Palabras claves: *Fluorescencia de la clorofila, Índice de eficiencia fotosintética, Biolyzer, Estrés hídrico, Pinus halepensis*

Abstract

The chlorophyll fluorescence can be used to quantify the response of plants to water stress. The maximum quantum efficiency of primary photochemistry of photosystem II (PSII) (F_v/F_m) has been evaluated in five provenances of *Pinus halepensis* exposed to moderate drought stress. There were found significant differences in the maximal efficiency response of PSII among the studied provenances. However, the Photosynthetic Performance Index showed to be a more sensitive indicator of the vitality of the plant during screening for drought tolerance of *Pinus halepensis* provenances.

Key words: *Chlorophyll fluorescence, Performance Index, Biolyzer, Water stress, Pinus halepensis*

INTRODUCCIÓN

Las repoblaciones forestales en áreas mediterráneas están condicionadas principalmente por el déficit hídrico, el cual aparece asociado a otros factores limitantes como las altas temperaturas, el déficit de presión de vapor o las elevadas raditaciones que deben soportar las plantas (VILAGROSA, 2002). El estrés hídrico modifica el proceso fotosintético disminuyendo la capacidad fotosintética global, lo que provoca reducciones en la supervivencia (KRAMER & BOYER, 1995). En este sentido, la capacidad de una especie para el adecuado mantenimiento del aparato fotosintético es un indicador de su tolerancia al estrés hídrico (SCHEUERMANN et al., 1991). La combinación de medida de fluorescencia de la clorofila esta considerada una herramienta útil para distinguir los efectos estomáticos y no estomáticos en la limitación de la fotosíntesis (MAXWELL & JONHSON, 2000).

La fluorescencia de la clorofila es una medida no destructiva, de fácil manejo y rápida respuesta. Esta técnica suministra información acerca de la identidad de varios pigmentos, su organización, y sobre diversas reacciones de transferencias de electrones específicas del fotosistema II (PSII). La medición de la fluorescencia de clorofila puede ser un método para la valoración de la tolerancia de las plantas a condiciones medioambientales específicas o inducidas. Se consideran tres periodos en la cinética de la fluorescencia emitida por la clorofila, en este trabajo analizamos el primer periodo o cinética rápida, cuando se alcanza el valor máximo (Fm), expresando los resultados mediante la relación con la fluorescencia variable (Fv). La razón Fv/Fm es proporcional a la máxima eficiencia fotoquímica primaria de las hojas (DEMMING-ADAMS & ADAMS, 1992), y es una de las variables de fluorescencia mas estudiada por numerosos autores (BJÖKMAN & DEMMING, 1987), que han encontrado buenas correlaciones entre este parámetro y el estrés hídrico (FILILLA et al., 1998).

El objetivo de este trabajo es evaluar la utilidad de las medidas de la cinética de inducción de fluorescencia de la clorofila en acículas para detectar la respuesta temprana a estrés hídrico moderado de cinco procedencias *Pinus halepensis* Mill.

MATERIAL Y MÉTODOS

La planta utilizada en este ensayo corresponde a cinco procedencias de *Pinus halepensis* Mill.: Región 6 Monegros-Depresión del Ebro (Ph6), Región 7 Alcarria (Ph7), Región 9 Maestrazgo-Los Serranos (Ph9), Región 10 Levante Interior (Ph10) y Región 13 Sudeste (Ph13) (GIL et al., 1996). El cultivo de la planta se realizó en el vivero de Genforsa (Cuenca) en contenedor forestal de 300 cm³, sobre un sustrato de turba-perlita (3:1 en volumen) y con fertilización estándar para todas las procedencias.

El diseño experimental del ensayo está realizado para evaluar la respuesta de la planta en supervivencia, por lo que se ha realizado un ensayo factorial que comprende un factor: procedencia (5 niveles). La unidad experimental ha sido la bandeja de cultivo, que se ha dividido en tres bloques completos al azar con 18 plantas. En cada bloque se ha mantenido además 2 plantas (6 plantas por procedencia) regadas a saturación cada dos días.

La planta fue colocada en una cámara climatizada de cultivo, y se la sometió a un ciclo de sequía de 21 días bajo condiciones controladas de temperatura (21°C±1°C), humedad relativa (60%±5%), radiación fotosintéticamente activa de 200 µmoles de fotones m⁻² s⁻¹, fotoperiodo de 12 horas, y aireación forzada. La fluorescencia de la clorofila se determino utilizando un fluorímetro *Plant Efficiency Analyser* (PEA, Hansatech Instruments, Reino Unido) en cuatro plantas por tratamiento. Las mediciones se realizaron en acículas prendidas al tallo, y la fluorescencia fue inducida mediante la excitación con un pulso de un segundo de luz roja (640 nm), suministrado por un rayo de luz emitido por 6 diodos (600 Wm⁻² o 3500 mmol) localizado en un área de 4 mm de diámetro (STRASSER et al., 1995). La fluorescencia fue detectada utilizando un fotodiodo PIN, despues de haber atravesado un filtro (50% transmisión a 750 nm). Todas las plantas fueron medidas bajo las mismas condiciones.

A lo largo del ensayo se realizaron cuatro medidas (día 0, día 7, día 14, y el día 21). Simultáneamente a las mediciones de fluorescencia se midió el potencial hídrico antes del inicio del periodo de iluminación (Ψ_{pd}) mediante una cámara de Scholander (SKPM 1400, Skye

Instruments), así como la supervivencia en cada uno de los bloques.

La eficacia máxima fotoquímica fue determinada como la relación entre la fluorescencia variable (F_v) y la fluorescencia máxima (F_m) por la fórmula $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$. Las curvas de cinética rápida de fluorescencia de clorofila fueron analizadas aplicando el JIP test (STRASSER et al., 1995; 2000) a partir de la señal de fluorescencia medida al tiempo 50 ms después de iniciada la iluminación como el valor inicial de fluorescencia F_o . El programa de análisis empleado ha sido BioLyzer (MALDONADO-RODRÍGUEZ, 1999). Los parámetros F_v/F_m y el índice de eficiencia fotosintética fueron calculados de acuerdo a STRASSER et al. (2000).

RESULTADOS

La supervivencia de las procedencias ensayadas ha sido del 100% hasta la cuarta medida, donde se han obtenido diferencias significativas entre procedencias (Tabla 1). Los valores de fluorescencia variable (F_v/F_m) oscilaron entre valores próximos 0,7 para todas las procedencias en la primera medición, cuando las plantas estaban plenamente hidratadas (Tabla 1), hasta valores en el intervalo 0,19-0,61 en la cuarta medida. La planta mostró un periodo de adaptación inicial a las condiciones de la cámara, al pasar del almacenamiento al exterior (enero-marzo), donde posiblemente presentaba un ligero estrés por bajas temperaturas, a las condiciones favorables de la cámara de cultivo. El día 7 después de la rehidratación, se alcanzaron los valores máximos para la planta no regada, y a partir de los 14 días se observó una disminución del valor de F_v/F_m a medida que las condiciones

de déficit hídrico se fueron acentuando, en el intervalo entre -0,7 y -1,13 Mpa, donde se empieza a observar una diferente respuesta por procedencias. En la tercera y cuarta medida la diferencia entre los valores de F_v/F_m ha sido significativa, manteniéndose en valores próximos a 0,60 para todas las procedencias salvo la procedencia Sudeste (Ph13) y Alcarria (Ph7) que alcanzaron los valores más bajos (Tabla 1).

Los datos de la relación F_v/F_m normalizados presentan diferencias significativas al final del ensayo (Figura 1). Asimismo, el valor del índice de potencial fotosintético (obtenido a partir de una doble normalización), ha mostrado una mayor diferencia entre procedencias (Figura 2). Los valores del índice de potencial fotosintético relativo de las procedencias Alcarria, Sudeste y Maestrazgo indican bajo rendimiento fotosintético el día 7. La procedencia Levante interior presenta un máximo al día 7, y la procedencia Maestrazgo presenta un máximo en el índice de potencial fotosintético relativo el día 14. La procedencia Monegros presenta valores más estables del índice de potencial fotosintético y F_v/F_m . Finalmente, las procedencias Sudeste, Alcarria y Levante presentan al final del experimento los valores más bajos del índice de potencial fotosintético.

DISCUSIÓN

Una de las causas de la disminución de la eficiencia del PSII es la existencia de déficit hídrico (Cornic, 1994). En este trabajo hasta potenciales de -0,8 Mpa, el valor de la relación F_v/F_m alcanzó los valores máximos, próximos a 0,75 para casi todas las procedencias. Estos valores fueron algo inferiores a 0,83, un valor

Procedencia	0 días			7 días			14 días			21 días		
	S(%)	F_v/F_m	ψ_{pd}	S(%)	F_v/F_m	ψ_{pd}	S(%)	F_v/F_m	ψ_{pd}	S(%)	F_v/F_m	ψ_{pd}
Ph6	100	0,74 a	-0,80a	100	0,78 a	-0,84a	100	0,71 b	-1,02a	100 a	0,61 b	-1,30a
Ph7	100	0,73 a	-0,90a	100	0,78 a	-0,96a	100	0,22 a	-1,13a	98,3 a	0,19 a	-1,40a
Ph9	100	0,70 a	-0,49a	100	0,77 a	-0,60a	100	0,53ab	0,78a	95,0ab	0,57 b	-1,16a
Ph10	100	0,74 a	-0,55a	100	0,74 a	-0,62a	100	0,48ab	-0,74a	86,6 b	0,60 b	-0,82a
Ph13	100	0,72 a	-0,50a	100	0,78 a	-0,94a	100	0,50ab	-1,08a	100 a	0,44ab	-1,16a

Tabla 1. Supervivencia (%), relación entre la fluorescencia variable y máxima (F_v/F_m) y Potencial hídrico antes del ciclo de iluminación (ψ_{pd} Mpa) para las cinco procedencias estudiadas durante el ciclo de sequía (21 días). Los valores seguidos de distinta letra en la misma columna difieren significativamente (n.s. = 0,05, test de Tukey)

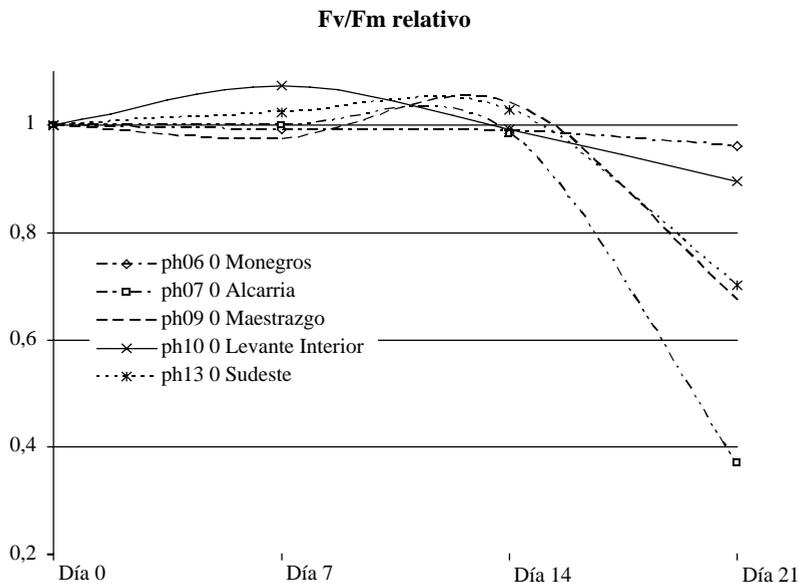


Figura 2. Evolución de los valores de F_v/F_m normalizado con el valor del control del día de medición a lo largo del ciclo de sequía (21 días)

considerado como óptimo para un gran número de especies (BJÖRKMAN & DEMMING, 1987). Sin embargo, otros trabajos realizados con otras especies en el área mediterránea durante el periodo estival muestran valores más próximos a los obtenidos en este estudio (VILAGROSA, 2001). La falta de agua en las hojas puede provocar fenómenos de fotoinhibición (BJÖRKMAN & POWLES, 1984), ya que los procesos fotosintéticos pueden verse limitados por causas no estomáticas debido al déficit hídrico y a la falta de radiación (CORNIC, 1994). A medida que el potencial hídrico decrece se produce el cierre estomático y la tasa fotosintética disminuye, y a valores de potencial hídrico al amanecer próximos a -2 Mpa, parece más evidente la reducción de la eficiencia fotoquímica del PSII en algunas procedencias, indicando que hasta ese valor de estrés la reducción de la fotosíntesis puede ser debida principalmente a una limitación estomática en la difusión del CO_2 (ABRIL & HANANO, 1998). Sin embargo, no parece clara la relación de los valores de fluorescencia con la supervivencia en las procedencias ensayadas.

El índice de eficacia fotosintética (STRASSER et al., 2000), si parece presentar una mayor sensibilidad al estrés hídrico temprano, al presentar las distintas procedencias valores máximos en momentos bien diferenciados. La expresión F_v/F_m toma en cuenta solo las reacciones fotoquímicas primarias mientras que el IEF refleja 3 procesos importantes, las reacciones fotoquímicas primarias, la eficiencia de la conversión de energía en la fase oscura y la densidad de centros de reacción activos en la clorofila (STRASSER et al., 2000). Sin embargo, tampoco en este caso parece existir una relación clara entre los valores observados y los datos de supervivencia. En principio, podemos pensar que aquellas procedencias con valores del índice elevados en las primeras mediciones presentan una mejor adaptación a condiciones de humedad relativamente elevadas (procedencias Levante interior y Maestrazgo). Por el contrario, las procedencias con valores más estables (procedencias Monegros, Alcarria y Sudeste) están mejor adaptadas a condiciones de aridez, sin que en este ensayo se haya podido comprobar claramente esta suposición, lo cual coincide con la supervivencia al final del ensayo. No

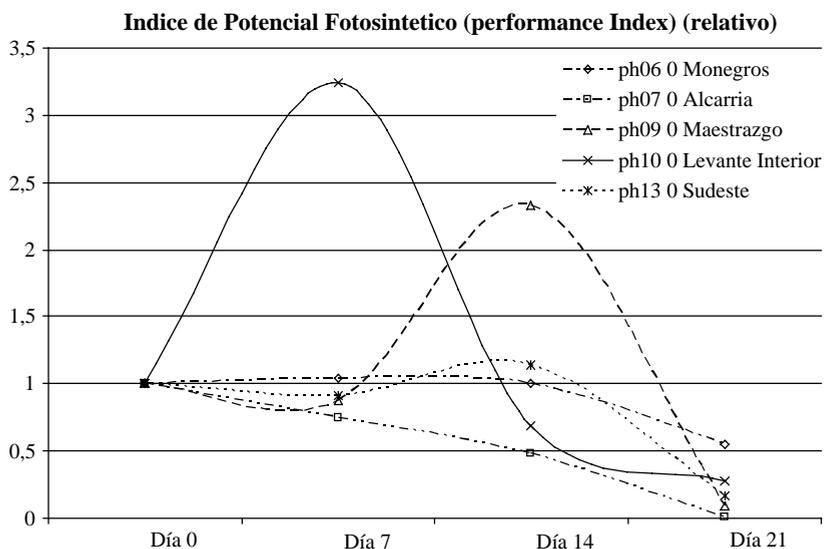


Figura 3. Evolución de los valores del Índice de Potencial Fotosintético (PI_{abs}) relativo normalizado con el control del día de medición y el control del día 0 (doble normalización) para las procedencias estudiadas y los controles regados a lo largo del ciclo de sequía (21 días).

obstante, se considera que la fluorescencia de clorofila utilizada mediante los análisis de normalización y doble normalización es una técnica de interés como indicadora del estrés hídrico, ya que es un método no destructivo y su manejo es sencillo, y se puede aplicar para apreciar diferencias cuando las plantas están en un estado de estrés hídrico moderado.

BIBLIOGRAFÍA

- ABRIL, M. & HANANO, R.; 1998. Ecophysiological responses of three evergreen woody Mediterranean species to water stress. *Acta Oecol.* 19: 377-387.
- BJÖRKMAN, O. & DEMMIG, B.; 1987. Photon yield of O_2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504.
- CORNIC, G.; 1994. Drought stress and high light effects on leaf photosynthesis. In: N. Baker & J. Bowyer (eds.), *Photoinhibition of photosynthesis. From molecular mechanisms to the field*: 293-313. Bios Scientific Publishers. Oxford.
- DEMMIG-ADAMS, B. & ADAMS, W.; 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Ann. Rev. Plant Physiology. Plant Mol. Biol.* 43: 599-626.
- FILELLA, I.; LLUVIA, J.; PIÑOL, J. & PEÑUELAS, J.; 1998. Leaf gas Exchange and fluorescence of *Phillyrea latifolia*, *Pistacia lentiscus* and *Quercus ilex* sapling in severe drought and high temperature conditions. *Env. Exp. Bot.* 39: 213-220.
- GIL, L. et al. 1996. *Regiones de procedencia de Pinus halepensis Mill.* Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Madrid.
- KRAMER, P. & BOYER, J.; 1995. *Water relations of plants and soils.* Academic Press. San Diego. London.
- MALDONADO-RODRÍGUEZ, R.; 1999. *BioLyzer Software.* Laboratory of Bioenergetics. University of Geneva. Ch. Des Embouchis 10, CH 1254 Geneva. Switzerland.
- MAXWELL, K. & JOHNSON, G.; 2000. Chlorophyll fluorescence. A practical guide. *J. Exp. Bot.* 51: 659-668.

- SCHEUERMANN, R.; BIEHLER, K.; STUHLFAUTH, T. & FOCK, H.; 1991. Simultaneous gas exchange and fluorescence measurements indicate differences in the response of sunflowers, bean, and maize to water stress. *Photosynth. Res.* 27: 189-197.
- STRASSER, R. ; SRIVASTAVA, A. & TSIMILLI-MICHAEL, M. ; 2000. The fluorescence transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples. In: M. Junus, U. Pathre & P. Mohantriy (eds.), *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation*: 445-483. Taylor and Francis LTD. London and New York.
- STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A. & GOVINDJEE; 1995. The polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology* 61: 32-42
- VILAGROSA, A.; 2002. *Estrategias de resistencia al déficit hídrico en Pistacia lentiscus L. y Quercus coccifera L. Implicaciones en la repoblación forestal*. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante. Alicante.