

Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia
Unitat d' Ecologia

y
Centre de Recerca Ecològica i Aplicacions Forestals
(CREAF)

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

EFFECTOS DEL DIÓXIDO DE AZUFRE Y DEL OZONO EN *Pinus halepensis* Mill. EN CÁMARAS ABIERTAS (*Open-top Chambers*)

TESIS DOCTORAL



OLIVIA BARRANTES DÍAZ

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas
por la Universitat Autònoma de Barcelona

Director de la Tesis: Dr. Carlos A. Gracia Alonso
Tutor de la Tesis: Dr. Ferran Rodà de Llançà

Bellaterra
Noviembre de 2000

*A mis padres,
a mis adorables sobrinos
y a Daniel*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincera gratitud a las personas y las Instituciones que han participado, de una u otra manera, en la realización de este trabajo.

Agradezco al Director de la Tesis, el Dr. Carlos Gracia, el haber afrontado y asumido los riesgos del proyecto con firmeza así como su asesoramiento certero en cada fase del mismo. Agradezco también su estímulo y dedicación que han permitido concluir hoy esta importante etapa.

Agradezco al CREAM su respaldo institucional y los medios que ha puesto a mi disposición. A su director durante la mayor parte del proyecto, el Dr. Jaume Terradas, agradezco el apoyo y confianza en nosotros para llevarlo a cabo.

Al Dr. Ferran Rodà le agradezco su interés en el proyecto y el haber aceptado tutelar esta Tesis. También agradezco su inteligente revisión del manuscrito, que sin duda mejoró la calidad final del mismo.

A M^a Antonia Abad, verdadera artífice e inspiradora del proyecto, le agradezco su voluntad y férrea perseverancia, sin las que no habría sido posible sacarlo adelante. Asimismo, agradezco su confianza en nosotros para llevarlo a buen puerto.

Mi estancia en Andorra, adonde llegué una mañana de mayo de 1991, ha sido una experiencia profesional y humana que recordaré siempre con enorme cariño. Agradezco a todo el personal de la Central Térmica Teruel su ayuda continua y su capacidad de cálida acogida para todo el equipo del CREAM durante nuestra estancia allí. A Concha Dueñas le agradezco además muy especialmente su implicación próxima y cotidiana en cuantos problemas surgieron y su disposición para facilitarnos todo lo necesario en el desarrollo de nuestro trabajo.

La construcción y puesta a punto de la instalación fue toda una aventura, que implicó a un buen número de profesionales y a media docena de empresas, a las que menciono a lo largo de esta Memoria. A todos ellos mi agradecimiento por su gran profesionalidad, desde el albañil hasta el instrumentista. Gracias también al buen hacer de Antonio García y su equipo. A los buenos consejos que me proporcionaron Diego García, Charles Mouches y Hans J. Weigel. A la información que nos suministró Benjamín Sánchez. Y a la colaboración indispensable de Lluís Prieto.

De mis incondicionales compañeros, Esmeralda Moliner, Mercedes Plaza, Lluís Prieto y, en los primeros años, Marc Codina, no puedo sino decir que una gran parte de esta Tesis les pertenece: gracias a su capacidad de trabajo ordenado, su rigor y buen criterio, su entrega sin reservas tanto en el mantenimiento de la instalación, en las tareas de campo y de laboratorio como en el tratamiento de datos y la elaboración de informes. Es un deseo que los interesantes resultados de las experimentaciones coordinadas por Esmeralda salgan pronto a la luz, en forma de Tesis Doctoral y otras publicaciones científicas.

Gracias también a Mari Carmen de Gracia, Sonia Martínez, Vivian Gómez y Ricardo Álvarez que se incorporaron al equipo en los últimos tiempos; gracias por su ilusión y sus ganas, por su esfuerzo y su gran aportación al proyecto. Y a los becarios,

contratados y demás habitantes del “zulo”, Anita, Eva, Enrique, Joaquín y muchos otros, gracias por su compañía y su ayuda en mil cosas, pequeñas y grandes. Guardo en mi corazón un recuerdo emocionado para Sonia Martínez y Diego García.

Gran parte de los análisis de laboratorio se realizaron en el Servei Científic-Tècnic de la Universitat de Barcelona. Agradezco a su personal la colaboración en dicha tarea.

Agradezco al Dr. Miguel Alfonso las meticulosas y rigurosas correcciones del manuscrito que ayudaron enormemente a su redacción. A él y al Dr. José M^a Merino les agradezco sus ánimos continuados en la fase de escritura de la Memoria. A la Dra. Anunciación Abadía le agradezco la documentación sobre fluorescencia.

Al personal administrativo y de laboratorio del CREAM le agradezco su colaboración. A Josep M^a Espelta sus respuestas a mis inquisiciones metodológicas de “tercer grado”. Muy especialmente agradezco a Montse Vilà y a Joanjo Ibàñez su apoyo en momentos muy duros para mí.

Agradezco al Instituto Pirenaico de Ecología y a su personal su hospitalidad, ayuda y ánimos en estos últimos meses. A la Dra. Carmen Pérez le agradezco además sus correcciones tipográficas y sus “punteaduras” de la bibliografía.

Finalmente, pero no en último lugar, gracias a mis amigos y hermanos Mariví, Miguel, Esme, Charo, Antonio, Mari, Kike, Miren, Nono, Merche, Augus, M^a Eugenia, María, Ché, Gloria, Montse, Menchu, Cruz, ... entre todos habéis tejido esa mágica red que me ha amparado durante todo este tiempo ...

Este trabajo fue financiado por OCIDE y por Endesa en el marco del Proyecto P.I.E. 131.103.

ÍNDICE

Agradecimientos

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA: LA INSTALACIÓN DE CÁMARAS ABIERTAS. DISEÑO EXPERIMENTAL

- 2.1. Introducción
- 2.2. Descripción de la instalación
 - Cámaras de fumigación OTCs y equipos de ventilación y filtración
 - Sistema de dosificación de gases
 - Sistema de muestreo de aire
 - Sistema de dosificación y muestreo
 - Medida de parámetros climáticos
 - Sistema de riego por goteo
 - Instalaciones auxiliares
- 2.3. Diseño experimental
- 2.4. Material vegetal y sustrato
- 2.5. Tratamiento estadístico general

CAPÍTULO 3. RÉGIMEN DE EXPOSICIÓN A SO₂ Y A O₃ VARIABLES CLIMÁTICAS.

- 3.1. Introducción
- 3.2. Material y métodos
- 3.3. Resultados y discusión
 - Régimen de exposición a SO₂
 - Régimen de exposición a O₃
 - Variables climáticas

CAPÍTULO 4. EFECTOS DEL SO₂ Y DEL O₃ SOBRE LA CONCENTRACIÓN FOLIAR DE NUTRIENTES

- 4.1. Introducción
- 4.2. Material y métodos

- 4.3. Resultados
 - Efectos del SO₂
 - Efectos sobre la concentración foliar de azufre y de cationes*
 - Efectos sobre la concentración foliar de nitrógeno*
 - Efectos del O₃ y del SO₂+O₃
 - Efecto de cámara
- 4.4. Discusión

CAPÍTULO 5. EFECTOS DEL SO₂ Y DEL O₃ SOBRE LA CONCENTRACIÓN FOLIAR DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

- 5.1. Introducción
- 5.2. Material y métodos
- 5.3. Resultados
 - Variaciones estacionales
 - Efectos del SO₂
 - Efectos del O₃ y del SO₂+O₃
 - Efecto de cámara
- 5.4. Discusión

CAPÍTULO 6. EFECTOS DEL SO₂ Y DEL O₃ SOBRE LA INDUCCIÓN DE FLUORESCENCIA

- 6.1. Introducción
- 6.2. Material y métodos
- 6.3. Resultados
 - Variaciones estacionales y diarias
 - Efectos del SO₂
 - Efectos del O₃ y del SO₂+O₃
 - Efecto de la humedad del sustrato
 - Efecto de cámara
- 6.4. Discusión

CAPÍTULO 7. EFECTOS DEL SO₂ Y DEL O₃ SOBRE LAS TASAS DE INTERCAMBIO GASEOSO Y DE CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA

- 7.1. Introducción
- 7.2. Material y métodos
- 7.3. Resultados
 - Variaciones estacionales y diarias
 - Efectos del SO₂
 - Efectos del O₃ y del SO₂+O₃
 - Efecto de cámara
- 7.4. Discusión

CAPÍTULO 8. EFECTOS DEL SO₂ Y DEL O₃ SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA BIOMASA

- 8.1. Introducción
- 8.2. Material y métodos
- 8.3. Resultados
 - Efectos del SO₂
 - Efectos del O₃ y del SO₂+O₃
 - Efecto de cámara
- 8.4. Discusión

CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN GENERALES

BIBLIOGRAFÍA

1. INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

Desde los años 70 se han venido detectando daños en bosques europeos y norteamericanos, que se han atribuido a factores ambientales -climáticos y nutricionales- y a contaminantes atmosféricos. La mayor parte de los estudios encaminados a determinar las causas de tales daños (fenómeno conocido como “declive de los bosques”, *forest decline*) se ha centrado en los efectos de gases individuales. Sin embargo, los bosques europeos están mayoritariamente expuestos a un "ambiente contaminado" dinámico y complejo, formado por combinaciones de varios contaminantes.

Dentro de ese conjunto de contaminantes, el **ozono** es potencialmente un fotooxidante muy importante. Su concentración en la troposfera se ha doblado en los últimos 100 años y se predice un aumento anual de entre un 0.3 y un 1 % para los próximos 50 años (Thompson, 1992). A pesar de las Directivas Europeas encaminadas a la disminución de sus precursores fundamentales, los óxidos de nitrógeno y los compuestos orgánicos volátiles, la situación es más grave en el Sur de Europa que en otros países, debido a una mayor insolación (Lorenzini, 1993) y a la existencia de una gran cantidad de fuentes móviles y tráfico turístico adicional en los meses de verano (Seufert, 1994). En efecto, en la costa Este española se han detectado masas de aire altamente enriquecido en ozono que penetran tierra adentro, superando los límites establecidos en las Directivas Europeas para la protección de la vegetación durante varios meses al año (Martín *et al.*, 1991; Millán *et al.*, 1991; Gimeno *et al.*, 1995; Sanz y Millán, 2000). El ozono se considera uno de los contaminantes fitotóxicos más importantes en cultivos (Krupa y Manning, 1988; Adaros *et al.*, 1991a) y un factor de contribución al declive de los bosques (McLaughlin, 1985; Krause *et al.*, 1986; Skarby *et al.*, 1998; Busotti, 1999; McLaughlin y Percy, 1999) aunque el fallo a la hora de reproducir experimentalmente los síntomas observados en campo ha llevado a algunos autores a cuestionar ese papel, al menos en algunas coníferas (Melhorn *et al.*, 1986; Arndt *et al.*, 1990). Por otra parte, la relación entre los síntomas visibles de daño y las pérdidas de crecimiento debido al O₃ aún no se han validado completamente (Chappelka y Samuelson, 1998).

Debido a la firma y aplicación del Protocolo del Azufre por los países miembros de la Unión Europea (Anónimo, 1985) las emisiones de **dióxido de azufre** están disminuyendo paulatinamente (Bull y Fenech, 2000). No obstante, el SO₂ sigue

siendo un contaminante a tener en cuenta en nuestra región y en zonas del Este de Europa (Dauert y Friche, 1992; González-Arias *et al.*, 1998; Materna, 1999; Oleksyn *et al.*, 2000; Vancura *et al.*, 2000), asociado fundamentalmente a focos fijos de emisión, aunque con patrones que han derivado a formas mucho más difusas que en décadas anteriores. Por otra parte, a pesar de ser un contaminante clásicamente estudiado, presenta **mecanismos de fitotoxicidad** aún sin resolver (Tausz *et al.*, 1996) y puede interaccionar con otros tipos de estrés (Maier-Maerker y Koch, 1986; Ashmore *et al.*, 1990; Schweizer y Arndt, 1990) y con otros contaminantes (Darrall, 1989; Van Hove *et al.*, 1992; Pérez-Soba *et al.*, 1994).

La gran mayoría de los estudios de los efectos de los contaminantes sobre la vegetación se ha realizado en experimentaciones con altas dosis de contaminantes y a corto plazo. Sin embargo, ese tipo de aproximaciones predice de manera muy pobre la respuesta a niveles bajos y a largo plazo (Garsed y Rutter, 1982; Darrall, 1989) que suelen ocurrir en condiciones naturales. Los efectos sobre las especies forestales responden por tanto a un daño crónico, cuya interpretación se complica debido a **procesos de aclimatación** de la propia planta (Kronfuss *et al.*, 1998) y a la modulación de la respuesta por la incidencia de otros tipos de estrés, como heladas y, de mayor importancia en el ámbito mediterráneo como limitante del crecimiento, la **sequía** (Gerant *et al.*, 1996; Wellburn *et al.*, 1996; Pääkkönen *et al.*, 1998; Maier-Maerker, 1999). De ahí la necesidad de experimentaciones con simulación de regímenes de contaminación realistas en condiciones lo más similares posible a las naturales.

En los últimos años se ha estudiado una gran variedad de aspectos bioquímicos y fisiológicos sobre los que el SO₂ y el O₃ pueden tener efecto. Por ejemplo, la **actividad fotosintética** puede verse disminuída por la incidencia de los contaminantes (Darrall, 1989; Führer *et al.*, 1990; Wedler *et al.*, 1995) mediante el deterioro de **pigmentos** (Bermandinger *et al.*, 1990), la alteración de los **fotosistemas** (Brecht y Schulz, 1988; Tausz *et al.*, 1996) o de la funcionalidad de otras fases de la fotosíntesis (Reichenhauer *et al.*, 1997). A su vez, el comportamiento **estomático** también puede verse afectado, con sus implicaciones en la transpiración de la planta y en la fotosíntesis (Guderian, 1985; Wedler *et al.*, 1995). Los contaminantes pueden también alterar la disponibilidad, la captación y la asimilación de **nutrientes** en la planta (Tjoelker y Luxmoore, 1991; Slovik *et al.*, 1996a), pudiendo contribuir a generar desequilibrios nutricionales. El **crecimiento** puede finalmente verse afectado si el balance entre las alteraciones de esos u otros procesos y los mecanismos de detoxificación y reparación de daños es negativo (Miller, 1989; Taylor, 1994; Reinert *et al.*, 1996; Heath, 1999).

Los **efectos combinados del SO₂ y del O₃**, de una complejidad en las plantas bien documentada desde los estudios pioneros de Dochinger *et al.* (1970) (Yang *et al.*, 1982), se conocen con mucha menor profundidad que los efectos de los contaminantes por separado. En algunos trabajos se han detectado efectos sinérgicos -interacción mayor que aditiva- (Bermandinger *et al.*, 1990; Hampp *et al.*, 1990; Schweitzer y Arndt, 1990; Díaz *et al.*, 1996; Krupa y Legge, 1999), mientras que en otros estudios se ha encontrado una respuesta antagónica -menor que aditiva- (Guderian, 1985; Darrall, 1989) o ausencia de interacción -efecto aditivo- (Arndt, 1990; Holland *et al.*, 1995). Los resultados obtenidos por diversos autores no están, tanto en el caso de las mezclas de SO₂ y de O₃ como en el caso de sus efectos independientes, exentos de datos que resultan contradictorios cuando se analizan distintas condiciones experimentales, dosis de contaminantes y especies. La variación interespecífica -y en muchos casos en los que se han analizado diferentes clones o ecotipos, también intraespecífica- es un factor clave en la modulación de la respuesta a los contaminantes.

La extrapolación de estudios sobre la respuesta de especies boreales -utilizadas en la mayor parte de los análisis a los que hemos hecho referencia- puede ser inapropiada a la hora de predecir la respuesta de la **vegetación mediterránea** a los contaminantes. Este hecho aconseja analizar las respuestas de la vegetación específicamente mediterránea a los contaminantes y a sus posibles efectos interactivos. Juegan por otra parte un papel importante otros tipos de factores como el **estrés hídrico**, episodio regular en verano en regiones mediterráneas, lo que añade la posibilidad de interacciones con los contaminantes y por tanto una **modulación de la respuesta** de la vegetación.

El **pino carrasco** (*Pinus halepensis* Mill.) es una especie muy ampliamente distribuida en extensas áreas de la región Mediterránea, donde en general crece en suelos de escasa profundidad con una limitada disponibilidad de agua y de nutrientes, particularmente de fósforo y de nitrógeno. Diversos estudios han mostrado la existencia de síntomas de daño en la especie causados por O₃ y por posibles interacciones de ese contaminante con bajos niveles de SO₂ en Attica, Grecia (Velissariou *et al.*, 1992). De manera similar se han encontrado también síntomas de daño producidos por O₃ en áreas específicas de España (Sánchez *et al.*, 1992; Sanz *et al.*, 2000) y alteraciones en su funcionamiento debido al contaminante en experimentos con cámaras abiertas (Elvira *et al.*, 1995, 1998; Fontaine *et al.*, 1999) y cámaras de cultivo (Scalet *et al.*, 1995; Anttonen *et al.*, 1998). En experimentos previos de invernadero con SO₂ y O₃ observamos efectos sinérgicamente negativos (Barrantes *et al.*, 1993, 1994; Díaz *et al.*, 1996).

El estudio que se presenta a continuación se ha llevado a cabo en cámaras abiertas (*Open-Top Chambers*, OTCs, Heagle *et al.*, 1973), dispositivo experimental que reúne las ventajas de una buena repetitividad de los tratamientos experimentales y de una exposición razonablemente aproximada a la climatología natural. Una descripción detallada de la experimentación se expone en los Capítulos 2 y 3.

OBJETIVOS

El objetivo general del estudio que se presenta fue incrementar el conocimiento de la respuesta de una especie mediterránea, *Pinus halepensis*, a la presencia de niveles realistas de SO₂ y O₃ en la atmósfera, independientemente y en mezcla.

Los **objetivos particulares** fueron:

1. Cuantificar los efectos de cada uno de los contaminantes sobre la concentración foliar de los **macronutrientes** S, N, K, Mg, Ca y P.
2. Cuantificar los efectos de cada uno de los contaminantes sobre la concentración foliar de **pigmentos fotosintéticos**, particularmente de la clorofila *a*, *b*, carotenoides totales y sus proporciones relativas.
3. Cuantificar los efectos de cada uno de los contaminantes sobre la evolución diaria de la actividad fotosintética de las hojas, desde el punto de vista de alteraciones en las **tasas fotosintéticas**, y de la **eficiencia fotoquímica del fotosistema II**.
4. Cuantificar los efectos de cada uno de los contaminantes sobre la evolución diaria de las **tasas de conductancia estomática**, transpiración y la eficiencia en el uso del agua.
5. Cuantificar los efectos de cada uno de los contaminantes sobre **el crecimiento y acumulación de biomasa**, con especial atención a la relación entre el peso seco asignado a la parte subterránea y el peso seco asignado a la parte aérea de las plantas.
6. Sugerir posibles **mecanismos de acción** implicados en los efectos de cada uno de los contaminantes en los puntos anteriores.

7. Evaluar la posible interacción de episodios estivales **de limitación de la humedad del suelo** con la copresencia de los contaminantes en lo que respecta a los ciclos diarios de intercambio gaseoso y emisión de fluorescencia.
8. Determinar los posibles **efectos interactivos entre ambos contaminantes** y sus efectos sobre cada uno de los puntos anteriores.
9. Analizar del **efecto de la propia cámara abierta** en los puntos anteriores.
10. Coordinar la **construcción del área experimental de cámaras OTC** donde se realizó la experimentación, dotada de un sistema automatizado de dosificación de SO₂ y O₃, y de monitorización de contaminantes en las cámaras y en el aire ambiente.

Los contenidos de este trabajo se organizan en 9 capítulos:

- en el **capítulo 1** se introduce brevemente la problemática y los **antecedentes** que han dado lugar a la realización del estudio y se exponen los principales objetivos de éste.
- en los **capítulos 2 y 3** se describen la **instalación de cámaras abiertas, el diseño experimental** y las condiciones de la experimentación con los niveles y **dosis de los contaminantes** y las variables climáticas registradas a lo largo del estudio.
- en los **capítulos 4 y 5** se estudia la respuesta de la planta a los contaminantes desde un punto de vista fitoquímico, con el análisis de la **concentración foliar de nutrientes** y de **pigmentos fotosintéticos**.
- los **capítulos 6 y 7** abordan el estudio de la respuesta de la planta a los contaminantes desde una aproximación más fisiológica, a través del análisis de la **emisión de fluorescencia, intercambio de gases**, y de la conductancia estomática y otras variables relacionadas.
- el **capítulo 8** estudia el **crecimiento** global de la planta, tratando de sintetizar los aspectos desarrollados en el resto del estudio.
- en el **capítulo 9** se resumen las principales **conclusiones** extraídas a partir de los resultados obtenidos en el estudio y se discute la experimentación en el contexto más amplio de los posibles efectos de los contaminantes en condiciones naturales.