

7.4. DISCUSIÓN

Variaciones estacionales y diarias

Las tasas de intercambio gaseoso y de conductancia estomática registrados a lo largo del experimento estuvieron dentro del rango de las referencias que proporcionan otros autores para especies esclerófilas mediterráneas (Field y Mooney, 1986; Lange *et al.*, 1987a; Tenhunen *et al.*, 1987, 1990; Castell *et al.*, 1994; Faria *et al.*, 1996; Gucci *et al.*, 1997; Faria *et al.*, 1998; Fleck *et al.*, 1998) y para *Pinus halepensis* en particular (Melzack *et al.*, 1985; Elvira *et al.*, 1995; Elvira, 1996; Espelta, 1996; Wellburn *et al.*, 1996; Inclán *et al.*, 1998).

Tal y como ha sido señalado en numerosos estudios realizados con especies mediterráneas en condiciones naturales (Lange *et al.*, 1987a; Tenhunen *et al.*, 1990; García Plazaola *et al.*, 1997; Pereira y Chaves, 1997), con plantas en maceta (Elvira *et al.*, 1995) u OTCs (Scarascia-Mugnozza *et al.*, 1996), se observaron variaciones estacionales de las tasas de intercambio gaseoso y de conductancia estomática, con valores máximos en primavera y mínimos en verano. Es sabido que el patrón cíclico de la actividad vegetativa de las plantas está causado en el mediterráneo por las variaciones en la demanda evaporativa del aire (VPD), la temperatura del aire y la radiación solar por una parte, y por otra parte por la disponibilidad de agua en el suelo. El déficit hídrico atmosférico y el déficit hídrico en el suelo son máximos en verano, originando estrés hídrico en esa época. En nuestro estudio, incluso a pesar de mejorar el estado hídrico de las plantas mediante riego, se observó en efecto una disminución de las tasas de intercambio gaseoso en verano respecto a la primavera. Otros autores han señalado en especies esclerófilas un estricto control estomático de la transpiración, con disminución de la asimilación en verano incluso en ausencia de limitaciones hídricas en el suelo (Tenhunen *et al.*, 1987; Espelta, 1996; López *et al.*, 1997).

Las tasas de intercambio gaseoso y de la conductancia estomática en condiciones típicamente estivales mostraron un máximo por la mañana seguido de una depresión en las horas centrales del día con una ausencia general de recuperación por la tarde de los valores alcanzados durante la mañana. Ese patrón de comportamiento en verano se ha descrito para especies mediterráneas por numerosos autores (Lange *et al.*, 1987a,b; Tenhunen *et al.*, 1987, 1990; Sala, 1992; Castell *et al.*, 1994; Pereira y Chaves, 1995, 1997; Faria *et al.*, 1996, 1998; Elvira *et al.*, 1995) y

está ligado a los cambios de la demanda evaporativa del aire, temperatura y radiación luminosa, así como del potencial hídrico de las hojas a lo largo del día.

La depresión de las tasas fotosintéticas en verano a mediodía tiene varias componentes, una de limitación estomática a través de la disminución de la concentración de CO₂ en los espacios intercelulares y una no estomática, relacionada con procesos que ocurren en los cloroplastos. Las causas del cierre estomático a mediodía, a pesar de la gran cantidad de estudios realizados sobre el tema, no se conocen del todo: es claro que el cierre estomático ocurre como respuesta a un incremento de la VPD (Schulze y Hall, 1982), pero también parecen concurrir otros procesos como la respuesta del estoma al aumento de ácido abscísico y la interacción de esa señal fitohormonal con la disminución del potencial hídrico de las hojas (Da Costa *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1987; Gowing *et al.*, 1993; Tardieu *et al.*, 1993). Tampoco se descartan mecanismos hidroactivos relacionados con un efecto directo de la disminución del contenido hídrico de las hojas sobre la turgencia de las células guarda (Lange, 1988), ni la existencia de ritmos diarios endógenos del cierre estomático (Snaith y Mansfield, 1986; Hagemeyer y Waisel, 1987). El control estomático sobre las pérdidas de agua en la economía hídrica de plantas adaptadas a largos períodos recurrentes de sequía, incluso a expensas de la disminución de la asimilación de carbono, tiene una importancia ecológica señalada por multitud de autores (p.e., Lange *et al.*, 1987a; Tenhunen *et al.*, 1987).

Las causas no estomáticas de la disminución de las tasas de fotosíntesis a mediodía y en general durante el estrés hídrico también han sido profusamente estudiadas, aunque sus causas no están completamente aclaradas. La constancia e incluso aumento de la concentración del CO₂ intercelular ante valores decrecientes de conductancia observado en muchos casos de depresión a mediodía sugieren que existen otros procesos afectados (Lange *et al.*, 1987a).

El estudio de la respuesta de la fotosíntesis a concentraciones crecientes de CO₂ intercelular para PAR saturante (curvas A/Ci) apunta a una disminución de la eficiencia de la carboxilación ante el estrés hídrico, con varias posibilidades no excluyentes (Freer-Smith y Dobson, 1989; Lange *et al.*, 1987a):

(a) disminución de la actividad y/o concentración de la ribulosa bi-fosfato carboxilasa (Rubisco)

(b) disminución de la capacidad de regeneración de la ribulosa bi-fosfato, que determina a su vez la capacidad del transporte electrónico.

luminosa para C_i saturante (curvas A/PAR) indica una disminución del rendimiento cuántico de la fotosíntesis en condiciones de estrés hídrico. La reducción de la eficiencia fotoquímica del PSII, acoplada a mecanismos de interconversión de las xantofilas, potenciación del sistema antioxidante e incremento de la fotorrespiración, explicarían la disminución del rendimiento cuántico de la fotosíntesis (Demmig-Adams *et al.*, 1989; Faria *et al.*, 1996; Scarascia-Mugnozza *et al.*, 1996; Pereira y Chaves, 1997; Fleck *et al.*, 1998). A ese respecto, como se ha mencionado anteriormente (capítulo 6.4), hay un consenso creciente acerca de la importancia del exceso de energía luminosa que la actividad fotosintética no puede canalizar, a la hora de determinar la respuesta fotosintética de las plantas y la aparición de mecanismos de fotoprotección, particularmente en el verano mediterráneo.

En nuestro experimento, las tasas fotosintéticas decrecieron a mediodía en paralelo con las tasas de conductancia estomática y en general ambos parámetros estuvieron muy relacionados a lo largo del tiempo (esta relación se puede observar en la figura 7.10 para el tratamiento de control, AF, y en las figuras 7.1 a 7.8). Por tanto, la depresión de la fotosíntesis a mediodía tuvo una componente estomática muy importante. Numerosos autores señalan las limitaciones estomáticas como causa fundamental de la disminución de la fotosíntesis a mediodía y en general bajo condiciones de estrés hídrico (Tenhunen *et al.*, 1987, 1990; Faria *et al.*, 1996; Scarascia-Mugnozza *et al.*, 1996).

Ahora bien, simultáneamente a la depresión de la fotosíntesis a mediodía, se observó una reducción más o menos importante de la eficiencia fotoquímica del PSII, como se muestra en la figura 7.9, lo que apoya la idea señalada por otros autores respecto a un mecanismo común subyacente a ambos procesos (Faria *et al.*, 1996; Scarascia-Mugnozza *et al.*, 1996; García-Plazaola *et al.*, 1997). La reducción de F_v/F_m explicaría, al menos en parte, la disminución del rendimiento cuántico de la fotosíntesis. Sin embargo, la relación entre ambas variables, A y F_v/F_m , no fue estricta y cambió para cada fecha de muestreo (incluso se registró una disminución ligera de F_v/F_m a pesar del suave aumento de A durante el día 27/08/96), lo que

indica la complejidad de dicha relación. En ello posiblemente influyeron factores climáticos, estado nutricional y fisiológico de las plantas, o cohorte de hojas sobre la que se realizaron los muestreos.

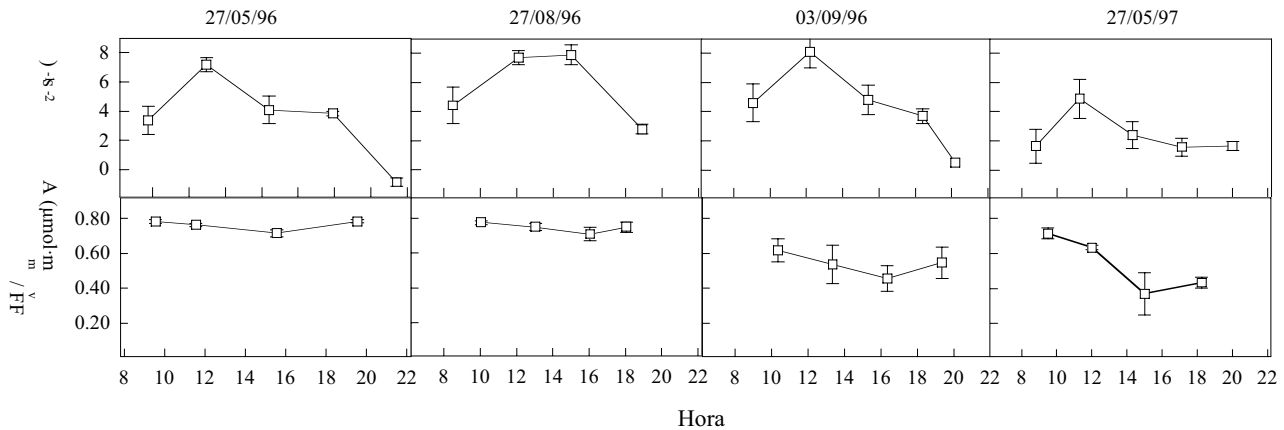


Figura 7.9. Comparación entre el ciclo diario de las tasas fotosintéticas y el del índice Fv/Fm para diversas fechas de muestreo, en el tratamiento de control (AF).

Los valores de intercambio gaseoso y de conductancia estomática disminuyeron en los muestreos de 1997 respecto a los del año anterior. De nuevo factores climáticos pueden explicar ese descenso, puesto que la VPD y las temperaturas máximas fueron mayores durante el segundo año que durante el primero, representando posiblemente condiciones más limitantes para la fotosíntesis en esos días de muestreo de 1997. Sin embargo, la reducción de la *WUE* en el segundo año respecto al primero impide descartar otros factores, como el estado nutricional de las acículas empleadas en los muestreos. En ese sentido, cabe destacar que la concentración de N de las acículas de 1996 (sobre las que se realizaron los muestreos de intercambio gaseoso en 1997) fue, para períodos comparables, inferior en un 24% respecto a las acículas de 1995 (sobre las que se realizaron los muestreos de intercambio gaseoso en 1996) (ver capítulo 4). Es bien conocido el papel del nitrógeno en la fotosíntesis a través de su participación en los complejos pigmento-proteína captadores de luz y en los enzimas de la fase oscura de la fotosíntesis, particularmente en la Rubisco (Field y Mooney, 1986; Evans, 1989; Ellsworth y Reich, 1992).

Efectos del SO₂

Los resultados de 1996 indican un claro efecto del SO₂ sobre la disminución de las tasas fotosintéticas. El descenso de las tasas de fijación diaria de CO₂ fue de hasta un 34 % en el SO₂ respecto al tratamiento de aire filtrado (AF). El efecto del SO₂ sobre la disminución de las tasas fotosintéticas, revisado por Darrall en 1989, ha sido observado por numerosos autores en una gran variedad de especies y condiciones de experimentación (Adams *et al.*, 1989; Bennet *et al.*, 1990; Gerini *et al.*, 1990; Schweizer y Arndt, 1990; Van Hove *et al.*, 1992; Führer *et al.*, 1993; Pfanzen y Beyschlag, 1993; Wedler *et al.*, 1995; García *et al.*, 1998).

El SO₂ influye en la fijación de CO₂ mediante cambios en el ajuste estomático, cambios en la capacidad fotosintética de los cloroplastos, o mediante ambos tipos de mecanismos (Winner *et al.*, 1985; Wedler *et al.*, 1995).

En nuestro experimento, la disminución de las tasas fotosintéticas por efecto del SO₂ estuvo asociada a una reducción de la conductancia estomática. Dicha relación se puede observar en la figura 7.10. Para unas determinadas tasas fotosintéticas, la concentración de CO₂ intercelular (C_i) es superior en el tratamiento de AF que en el SO₂, lo que se puede atribuir a una mayor conductancia estomática en el primer tratamiento (figuras a y a'). El efecto del SO₂ sobre la conductancia estomática se ha estudiado ampliamente por numerosos autores, con resultados muy diversos en función de la concentración del SO₂, el tiempo de dosificación y la especie (p.e., Black y Unsworth, 1980; Norby y Kozlowsky, 1981; Carlson, 1983), pero los resultados en experimentos a largo plazo muestran en general una disminución de la conductancia estomática (Darrall, 1989; Van Hove *et al.*, 1992; Wedler *et al.*, 1995).

Ahora bien, para unas determinadas tasas de conductancia la fotosíntesis tiende a ser menor y la C_i mayor en el tratamiento con SO₂ (figuras b, b', c y c'). Por otra parte, también se observó en el tratamiento con SO₂ una tendencia a presentar mayor C_i durante los ciclos diarios de medida (figuras 7.1 a 7.5 para plantas bien irrigadas) respecto al AF. Todo ello indica que hubo una menor actividad fotosintética en el mesófilo. La disminución de la fijación de CO₂ aumentaría la concentración intercelular de CO₂, lo que a su vez pudo determinar un incremento en el cierre estomático (Brenninger y Tranquilini, 1983), sin descartar un posible efecto directo del SO₂ sobre las células guarda de los estomas (Gupta *et al.*, 1991b).

La disminución de la actividad fotosintética en el mesófilo por efecto del SO₂ se ha atribuido a diversos factores como el daño en el PSII y en general en el proceso de captación de la luz, efectos sobre la fotofosforilación u otras fases del transporte electrónico, y efectos sobre la Rubisco. Los efectos sobre la fotofosforilación (Cerovicz *et al.*, 1983; Van Hove *et al.*, 1992) se producirían debido a competencia del sulfito con los sitios de acción del fosfato en la formación de ATP (Wellburn, 1988), con limitación de la producción de ATP, necesario en la fijación del CO₂.

Los efectos sobre la Rubisco parecen estar mediados por una acidificación intracelular por efecto del SO₂ (Adams *et al.*, 1989; Van Hove *et al.*, 1992) y con la disminución de su forma activa (Wedler *et al.*, 1995) debido a que ese contaminante puede oxidar los puentes disulfuro de la enzima, modificando o destruyendo así su estructura terciaria (Anderson y Duggan 1977). Sin embargo, la hipótesis de la acidificación es muy controvertida: según Pfanz y Beyschlag, (1993) no existe disminución del pH intracelular (excepto en las acículas muy jóvenes), debido a que los cambios de pH se amortiguan mediante una serie de reacciones, entre ellas la acumulación de cationes. Nuestros resultados apoyan esta última hipótesis, ya que tal y como se discute en el capítulo 4.4, el aumento de cationes en el tratamiento con SO₂ se interpreta en el sentido de un balance anio-catiónico y por tanto del mantenimiento del pH intracelular.

Sin descartar posibles efectos directos del SO₂ en la actividad Rubisco, en nuestro estudio se observó una disminución de la concentración foliar de nitrógeno en las acículas más maduras de las plantas sometidas al SO₂ (ver capítulo 4), lo que pudo estar también relacionado, a través de un descenso de la concentración de Rubisco y otros enzimas del ciclo de Calvin, con la disminución de las tasas fotosintéticas en ese tratamiento.

Por otra parte, en consonancia con los resultados obtenidos por otros autores (Adams *et al.*, 1989; Van Hove *et al.*, 1992) nuestros resultados no apoyan un daño del SO₂ sobre el PSII, como se ha discutido en el capítulo 6.4.

En resumen, nuestros resultados apoyan la existencia de una disminución de las tasas fotosintéticas por efecto del SO₂, debido fundamentalmente a limitaciones estomáticas y/o a modificaciones de la cantidad (proceso quizás mediado al menos en parte por la disminución de la concentración de nitrógeno en las hojas) o la actividad de la Rubisco, efectos sobre la fotofosforilación u otra fase del transporte

el incremento de la resistencia estomática hallado en el tratamiento con SO₂.

Finalmente, la importancia relativa de las diferencias entre el tratamiento con SO₂ y de control fue menor en los días con menor PAR, menores temperaturas y VPD, lo que indica que las variaciones climáticas pueden modular el efecto del contaminante.

Los efectos del SO₂ en 1997 son mucho menos claros que durante el año anterior. En primavera de 1997 la disminución de las tasas fotosintéticas siguió siendo cuantitativamente importante (por ejemplo, la tasa diaria de fijación de CO₂ fue un 38 % inferior en el tratamiento con SO₂ respecto al AF) pero no fueron estadísticamente significativas. En verano de 1997 esas diferencias desaparecieron casi por completo. En ambas épocas del año el efecto del SO₂ sobre la conductancia estomática fue además diferente del año anterior, puesto que hubo una tendencia a su aumento (aunque no significativo) en esos tratamientos. Por tanto, por una parte no existió durante ese año una disminución de las tasas fotosintéticas capaz de desencadenar, como en 1996, un cierre estomático ni desde luego hubo una limitación estomática a la fotosíntesis por efecto del contaminante.

La diferente respuesta al SO₂ entre ambos años puede deberse a diversos factores: (a) la cohorte de hojas sobre la que se realizaron las medidas, (b) factores nutricionales y (c) factores climáticos.

(a) En 1997 las medidas se realizaron en las acículas de 1996, mientras que durante el año anterior se realizaron en las de 1995. Según nuestros resultados, la cohorte de 1995, que ya estaba desarrollada cuando se iniciaron las fumigaciones con SO₂ en mayo de 1996, fue más sensible al tratamiento que la cohorte de 1996. Otros autores han encontrado similares resultados con fumigaciones con O₃, señalando que las hojas formadas en presencia del contaminante tienen una mayor capacidad de adaptación al estrés originado por éste (Wammsley *et al.*, 1980; Pääkkönen *et al.*, 1995).

(b) Esa mayor aclimatación se pudo producir en las acículas de 1996 mediante cambios en su área específica (SLA) y en su concentración de nitrógeno. Mientras que en las acículas de 1995 la concentración de N fue inferior en el tratamiento con SO₂ y los cambios en el SLA de las hojas acrecentaron esas diferencias, en las acículas de 1996 la concentración de N en base a área foliar fue similar en ambos tratamientos e incluso ligeramente superior en el tratamiento con SO₂, a través de una disminución en el SLA inducido por el contaminante (capítulo

4, figura 4.5). Como se ha mencionado anteriormente, la disminución de la concentración de N puede ser un factor implicado en el descenso de las tasas fotosintéticas.

(c) Durante los días de medida de 1997, las condiciones climáticas fueron más restrictivas para la fotosíntesis que en los días de medida de 1996, con un aumento de la temperatura y del VPD del aire. Esas condiciones pudieron determinar un estrés hídrico de origen atmosférico, responsable de un fuerte control estomático sobre las pérdidas de agua. Bajo tales condiciones, la fotosíntesis estuvo seriamente limitada en todos los tratamientos, pudiendo enmascarar cualquier otro efecto potencial.

Por tanto, la componente climática pudo ser importante a la hora de explicar la ausencia de efectos significativos del SO₂ en 1997, pero también se observó un cambio en la redistribución de recursos, potenciándose en el conjunto de la planta a las acículas con mayor capacidad de respuesta al estrés generado por el contaminante. Aunque resulta difícil establecer la naturaleza de esos cambios, es indudable la importancia de procesos de aclimatación en las plantas a situaciones de estrés. Otros autores han indicado que los tejidos más jóvenes de plantas tratadas con O₃ muestran efectos fisiológicos compensatorios que mejoran, hasta cierto punto, los efectos negativos del contaminante sobre los tejidos más maduros (Beyers *et al.*, 1992; Barnes *et al.*, 1995; Kellomäky y Wang, 1997). Por otra parte autores como Espelta (1996) atribuyen una gran flexibilidad a *Pinus halepensis* en lo que respecta a la asignación de N a unas o a otras funciones en la planta.

Efectos del tratamiento con SO₂ en combinación con la limitación de la disponibilidad hídrica en el suelo

Nuestros resultados no sugieren la existencia de una interacción entre la exposición a SO₂ y la limitación hídrica en el suelo. Es decir, el SO₂ no modificó la respuesta de la planta a un estrés hídrico incrementado, lo que contrasta con los estudios de otros autores (Maier-Maercker y Koch, 1986; Cornic, 1987; Schweizer y Arndt, 1990). Dichos autores registraron un aumento de la transpiración (y una disminución de la capacidad fotosintética de las hojas en el caso del segundo autor) proporcionalmente más elevado tras la supresión del riego durante varios días en plantas previamente tratadas con SO₂, efecto que atribuyeron a una pérdida del control estomático incrementada por el estrés hídrico. Neighbour *et al.* (1988) también señalaron que los mecanismos normales de conservación del agua durante la

bien, esos trabajos se realizaron con *Picea abies* y *Betula pubescens*, especies boreales con una economía hídrica muy diferente a la de especies mediterráneas.

En nuestro caso se observaron incluso mayores efectos del SO₂ sobre las tasas fotosintéticas en los individuos bien irrigados que en los no regados (aunque el efecto antagonista entre ambos tratamientos, SO₂ y riego, no fue significativo). Esos resultados junto con la ausencia de efectos importantes del SO₂ durante el segundo año de medidas apuntan a que parece existir un umbral de estrés hídrico (sea de origen atmosférico, de origen edáfico, o ambos) a partir del cual el control estomático es tan fuerte que la actividad fotosintética se ve muy limitada independientemente del tratamiento contaminante. Es decir, el estrés hídrico severo se superpondría a otros tipos de estrés, enmascarando cualquier otro efecto potencial. Tal efecto podría ser importante en especies leñosas mediterráneas con una estrategia de “tolerancia” a la sequía, que restringen las pérdidas de agua mediante un fuerte control estomático (como *Pinus halepensis*, Espelta, 1996). Inclán *et al.* (1998) observaron en *Pinus halepensis* un efecto antagónico de la limitación de la disponibilidad hídrica en el suelo y de la exposición a O₃, lo que parece apoyar la hipótesis.

Efectos del O₃ y del SO₂+O₃

Los efectos del O₃ en las tasas de intercambio gaseoso y de conductancia estomática fueron mucho menores que los debidos al SO₂. Aunque en primavera se registraron una disminución de *A* y un aumento de *g* y *E* puntuales, no se observaron diferencias significativas en el conjunto de los resultados. Otros autores han obtenido resultados similares en una gran variedad de especies y condiciones de experimentación. Así, no se observaron efectos del O₃ en plantas jóvenes de *Abies alba* (Schweizer y Arndt, 1990), en *Quercus rubra* (Farage, 1996; Wullschlegel *et al.*, 1996), *Picea abies* (Keller y Häsler, 1987), *Picea rubens* (Thornton *et al.*, 1990; Fincher y Alscher, 1992; Laurence *et al.*, 1996), *Liriodendron tulipifera* (Jensen y Patton, 1990; Tjoelker y Luxmoore, 1991), *Pinus sylvestris* (Pérez-Soba *et al.*, 1995) y *Pinus ponderosa* (Momen *et al.*, 1999). En coníferas se observaron efectos cuando la dosis de ozono fue superior a la empleada en nuestro experimento, p.e.: 150 ppb durante 16 semanas en *Pinus densiflora* (Shan *et al.*, 1997); 10 a 90 ppb durante 5 años consecutivos en *Picea abies* (Schweizer y Arndt, 1990); 213 ppb durante 2 años en *Pinus ponderosa* (Takemoto *et al.*, 1997); AOT40 a partir de 100 ppm·h en *Pinus taeda* (Dizengremel *et al.*, 1994); 100 ppb durante un año en *Larix decidua*, *Picea abies* y *Pinus cembra* (Wieser, 1999), mientras que con dosis similares o inferiores se registraron efectos en especies planifolias como *Fagus sylvatica* (Mikkelsen,

1995; Zeuthen *et al.*, 1997), *Populus nigra* (Clark *et al.*, 1996; Reichenhauer *et al.*, 1997) y *Betula pendula* (Matyssek *et al.*, 1991).

En *Pinus halepensis*, otros autores como Inclán *et al.* (1998) observaron una disminución de las tasas fotosintéticas tras una exposición acumulada (AOT40) de 103 ppm·h. Elvira (1996) encontró también una disminución después de una exposición AOT40 próxima a 54 ppm·h pero observó una estimulación de las tasas fotosintéticas tras una AOT40 cercana a 31 ppm·h. En nuestro caso, no observamos efectos del O₃ para una AOT40 de 39 ppm·h, intermedias entre los valores antes mencionados, lo que indica que podemos estar, aunque próximos, por debajo de los umbrales de daño para esta especie.

Nuestros resultados indican una tolerancia de *Pinus halepensis* para dosis a las que otras especies fueron sensibles, lo que confirma los trabajos de Reich (1987). Dicho autor señala que las coníferas de hojas xerofíticas, caracterizadas por una baja capacidad fotosintética y una baja conductancia pueden captar menos contaminante y ser menos susceptibles al daño que especies con mayor capacidad fotosintética y conductancia. Otros autores también señalan la existencia de una relación entre la sensibilidad de especies leñosas al ozono, la morfología de las hojas (Ferdinand *et al.*, 2000) y la captación de O₃ (Pell *et al.*, 1999).

En nuestro experimento se observó una ligera tendencia al aumento de la conductancia estomática y de la transpiración por efecto del ozono en plantas bien irrigadas. Pero cuando se incrementó el estrés hídrico de las plantas al limitar el riego en verano esa tendencia fue más importante y significativa. Posiblemente el incremento de la conductancia fue responsable del aumento (aunque no fue estadísticamente significativo) de las tasas fotosintéticas en esas condiciones. Aunque los resultados son insuficientes para concluir que existe una desregulación estomática inducida por el O₃ en combinación con el estrés hídrico, algunos autores han observado también ese efecto en *Picea abies* (Karlsson *et al.*, 1997). En apoyo de dicha hipótesis, según Prinz *et al.* (1987), el O₃ fue un factor de contribución del declive de bosques de *Picea abies* al causar un incremento de la transpiración durante períodos secos. Maier-Maerker (1989, 1999) también señala una pérdida de control de los estomas bajo tratamiento con O₃, que se expresa en condiciones de estrés hídrico.

Los resultados de primavera y verano en días de medida con una buena disponibilidad hídrica en el suelo no pusieron de manifiesto interacciones entre los

observado efectos sinérgicos del SO₂ y del O₃ sobre la fotosíntesis en algunas especies cuando los efectos por separado eran ligeros a moderados (Carlson, 1979; Darrall, 1989), pero en los experimentos realizados o revisados por dichos autores las concentraciones de los gases fueron elevadas (entre 100 y 500 ppb) y la duración de la fumigación muy corta (hasta 7 días). Con concentraciones realistas de contaminantes y a largo plazo, Wedler *et al.* (1995) no observaron un efecto claro de sinergia en *Picea abies*, y Schweizer y Arndt (1990) solamente encontraron un efecto mayor que aditivo de la mezcla en la misma especie en las acículas más maduras de la planta (2 años de edad).

En nuestra experimentación, solamente cuando en verano de 1997 se limitó la disponibilidad hídrica en el suelo mediante la supresión del riego el SO₂ y el O₃ actuaron sinérgicamente sobre la disminución de la asimilación de CO₂ y en la eficiencia en el uso del agua a lo largo del día ($A_{\text{día}}$ y $WUE_{\text{día}}$). Aparentemente, la disminución sinérgica de la WUE se produjo debido a que el SO₂ acentuó el aumento de la conductancia y de la transpiración producido por el O₃, aunque esta interacción no fue significativa. Sin embargo, el conjunto de medidas no recoge una variación de situaciones lo suficientemente amplia como para extraer conclusiones. Por otra parte, no hemos encontrado en la bibliografía referencias que avalen o contradigan este resultado.

Efecto de cámara

El efecto más consistente debido a la cámara fue una disminución de la fijación diaria de CO₂ en la mayor parte de los muestreos. Así, las plantas previamente situadas en el interior de las cámaras mostraron en general menores tasas fotosintéticas que las habituadas a mayores niveles de insolación. Este efecto puede explicarse por una aclimatación de las plantas a distintos niveles de luz incidente dentro y fuera de las cámaras. Las plantas adaptadas a condiciones de menor radiación luminosa suelen mostrar menor capacidad fotosintética que las plantas habituadas a mayor iluminación. Por ejemplo, Espelta (1996) encontró una capacidad fotosintética inferior en las plantas de *Pinus halepensis* y *Quercus ilex* previamente aclimatadas a menos luz, atribuida a una asignación preferente de N a pigmentos captadores de luz que a enzimas fotosintéticos (Evans, 1989; Ellsworth y Reich, 1992).

En experimentos con OTCs, Beyers *et al.* (1992) también observaron mayor capacidad fotosintética máxima (medida para PAR saturante) en las plantas de *Pinus*

ponderosa que habían estado fuera de las cámaras respecto a las que habían permanecido dentro de ellas.

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

8.1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento es una expresión integrada de la actividad fisiológica de la planta, proporcional al equilibrio entre la ganancia y la pérdida de carbono. Según la aproximación de Krupa (1990) es el resultado del balance entre el estrés al que está sometido la planta y los costes de mantenimiento y reparación que actúan a diversos niveles.

Se ha demostrado en diversos estudios de campo una disminución gradual del crecimiento de algunas especies forestales adyacentes a fuentes de emisión de SO₂ (Linzon, 1971; Nöjd y Reams, 1996). Por otra parte, existen abundantes pruebas experimentales en condiciones controladas de que el SO₂ afecta al crecimiento en especies arbóreas (este aspecto ha sido revisado por Darrall, 1989; Kozlowsky *et al.*, 1991), aunque existen discrepancias entre los resultados obtenidos por diversos autores cualitativa y cuantitativamente, debido sobretodo a las concentraciones empleadas, la distinta sensibilidad de cada especie y la variación de su respuesta en diferentes condiciones ambientales (Darrall, 1989).

Debido a su naturaleza ubicua, el O₃ representa un problema más regional que el del SO₂, con gradientes de exposición no fácilmente determinables en condiciones naturales (Benoit *et al.*, 1982), por lo que es difícil valorar si concentraciones ambiente de O₃ afectan significativamente al crecimiento y la productividad en el campo (Chappelka y Samuelson, 1998). No obstante, se han observado reducciones del crecimiento en campo en *Pinus ponderosa* y *Pinus strobus* asociadas con la severidad de síntomas de daño típicamente producidos por O₃ (Ohmart, 1977; Mann *et al.*, 1980) y en otras especies forestales en áreas de Estados Unidos (Miller, 1989; Taylor, 1994). También parece ser un factor involucrado en el declive de los bosques en Europa (Blank, 1985; Skarby *et al.*, 1998; Bussotti, 1999; McLaughlin y Percy, 1999). Se sabe además que concentraciones ambiente de O₃ causan pérdidas en el crecimiento y biomasa de cultivos herbáceos (Heck *et al.*, 1984) y concentraciones de O₃ cercanas al ambiente han sido capaces de afectar el crecimiento de especies arbóreas, principalmente en estudios de laboratorio, invernadero (Pye, 1988) y OTCs (Chappelka y Samuelson, 1998). Sin embargo, las respuestas del crecimiento al O₃ han sido con frecuencia variables e inconsistentes (Pye, 1988), probablemente como consecuencia de

que los efectos son dependientes de la edad de la planta, la sensibilidad genotípica, la dinámica de la exposición al O₃ y la existencia de estreses concurrentes, bióticos y abióticos (Runeckles y Krupa, 1994; Chappelka y Samuelson, 1998). Diversos autores han enfatizado la importancia de los efectos acumulativos del O₃ en las especies forestales, en contraste con los posibles efectos mayores y a más corto plazo en los cultivos agrícolas (Benoit *et al.*, 1982; Reich y Amundson, 1985; Edwards *et al.*, 1991; Durrant *et al.*, 1992; Andersen *et al.*, 1997; Elvira *et al.*, 1998; Langebartels *et al.*, 1998; Manninen *et al.*, 1999; Oksanen y Saleem, 1999).

Las respuestas del crecimiento a la acción combinada del SO₂ y del O₃ han sido también variables, observándose una respuesta sinérgica entre ambos (Constantinidou y Kozlowsky, 1979; Kress y Skelly, 1982; Chappelka *et al.*, 1985; Billen *et al.*, 1990), antagónica (Guderian, 1985; Landolt y Keller, 1985) o ausencia de interacción (Holland *et al.*, 1995).

Los efectos de los contaminantes atmosféricos en el crecimiento son el resultado neto de los efectos en procesos fisiológicos de la planta (p.e. Winner *et al.*, 1985; Chappelka y Chevone, 1992), la reducción del crecimiento y la biomasa se producirían a través del impacto de los contaminantes sobre esos procesos. La gran variedad de mecanismos posiblemente implicados en la reducción del crecimiento hace difícil su determinación, pero los más importantes estarían relacionados con la reducción de la capacidad fotosintética (Holland *et al.*, 1995; Peace *et al.*, 1995; Rennenberg, *et al.*, 1996), el aumento de la respiración (McLaughlin *et al.*, 1982) y la alteración del reparto de productos fotosintéticos (Thornton *et al.*, 1990; Gorissen *et al.*, 1991). Asimismo, la biosíntesis de antioxidantes (estimulada en general por el SO₂ y el O₃, como se ha discutido en el capítulo 5) consume una parte de la producción primaria bruta de la planta (Polle *et al.*, 1994; Benes *et al.*, 1995).

El SO₂ y el O₃ pueden alterar los patrones de distribución de los productos de asimilación fotosintética (Gorissen y Van Veen, 1988; Darrall *et al.*, 1989; Chappelka y Chevone, 1992; Woodbury *et al.*, 1994; Peace *et al.*, 1995; Houppis *et al.*, 1999) resultando en muchos casos en un aumento de la proporción entre la biomasa aérea y la biomasa subterránea (*shoot:root*, S:R) de la planta (McLaughlin *et al.*, 1982; Winner y Atkinson, 1986; Temple, 1988). Es previsible que el SO₂ y el O₃ afecten a la fisiología de las raíces a través de alteraciones en la fisiología de la parte aérea. Sin embargo, los mecanismos que regulan la distribución de los productos de asimilación no están bien

en esos procesos (Cooley y Manning, 1987).

Por otra parte, la disponibilidad de nutrientes en el suelo también modifica la relación S:R (Chapin *et al.*, 1987), posiblemente por ese motivo el tipo de suelo parece influir en la respuesta de las plantas al O₃. La disminución de la disponibilidad de nutrientes y el O₃ pueden interactuar, pudiendo ser un factor de contribución importante en la diferente sensibilidad que se ha observado en diversos estudios (Scagel y Andersen, 1997). Por ejemplo, Tjoelker y Luxmoore (1991) y Pell *et al.* (1995) sugirieron que *Pinus taeda* y *Populus tremuloides*, respectivamente, fueron más tolerantes a bajas concentraciones de N en el suelo que a altas concentraciones; otros autores obtuvieron resultados opuestos (Pääkkönen y Holopainen, 1995 en *Betula pendula*; Andersen y Scagel, 1997 en *Pinus ponderosa*), mientras que Greitner *et al.*, (1994) no encontraron efectos de la disponibilidad de nutrientes en el suelo en la sensibilidad de *Populus tremuloides* al O₃.

Los objetivos del capítulo que se presenta a continuación consisten en evaluar los efectos del SO₂, del O₃ y de la mezcla de SO₂+O₃ en: el crecimiento en altura y diámetro a lo largo de la experimentación; el área específica de las hojas en cada clase de edad; la acumulación de las fracciones aérea y subterránea de biomasa. Por otra parte, establecer los efectos de la cámara en esos parámetros.

8.2. MATERIAL Y MÉTODOS

La altura total de los individuos y el diámetro del tronco a 1 cm del suelo se midieron en cada estación del año a lo largo de toda la experimentación, empleándose una cinta métrica y un calibre digital Mitutoyo, respectivamente. En cada muestreo se midieron todos los individuos de cada cámara (135 por tratamiento).

A partir de los resultados de altura y de diámetro se calcularon las tasas relativas de crecimiento (RGR) en talla y grosor para los dos años de experimentación, 1996 y 1997, según la función propuesta por Evans (1972)

$$\text{RGR} = (\ln S_2 - \ln S_1) / (T_2 - T_1)$$

donde S_2 representa el valor final y S_1 el valor inicial de la variable (altura o diámetro) y $T_2 - T_1$ el intervalo de tiempo entre las medidas. Esta función ha sido muy utilizada en estudios sobre crecimiento en plantas, con la ventaja del cálculo de logaritmos y así linealización de las curvas de crecimiento. Sin embargo, tiene la desventaja de proporcionar un valor final con unidades de difícil interpretación. En los resultados que se presentan a continuación el resultado final de RGR se expresa en año⁻¹.

Una vez finalizada la experimentación, en octubre de 1997, se tomaron 10 pinos por cámara (30 individuos por tratamiento, 180 en total) de entre los que no se habían empleado para el muestreo destructivo de pigmentos y nutrientes, de manera que presentasen intacta su biomasa. En primer lugar se separó la parte aérea de la subterránea. La parte aérea se pesó en fresco, y para obtener la parte subterránea la tierra contenida en la maceta se tamizó, lavándose las raíces. De la biomasa aérea se separaron la madera y las acículas por clases de edad. Todas las fracciones se secaron en estufa a 70° C hasta peso constante, obteniéndose su peso seco.

Para obtener el área específica de las acículas (*specific leaf area*, SLA) se emplearon las acículas muestreadas a lo largo de la experimentación para determinar la concentración de pigmentos. De la parte central de esas acículas se obtuvieron fragmentos que se pesaron en fresco y cuya anchura y longitud se midieron con una lupa Nikon con lente micrométrica y papel milimetrado, respectivamente. Se calculó

nuevamente en seco, calculándose la proporción peso fresco/peso seco de las hojas y la relación área/peso seco de las acículas (SLA). Los resultados de SLA se utilizaron para el cálculo de:

- el área foliar total para cada clase de edad de las acículas al finalizar el experimento.
- la concentración foliar de pigmentos sobre la base del peso seco y del área foliar.
- la concentración foliar de nutrientes sobre la base del peso fresco y del área foliar.
- las tasas de intercambio gaseoso sobre la base del peso seco foliar. Además, para determinar el área proyectada del grupo de acículas sobre las que se realizaron las medidas de intercambio gaseoso, se utilizó la misma metodología que para el SLA en muestreos destinados al efecto, midiendo la anchura y la longitud de fragmentos de acículas.

A partir de los resultados de biomasa final se calcularon también en cada individuo muestreado las relaciones biomasa aérea:subterránea (*shoot:root*, S:R); la proporción entre peso seco de acículas y peso seco total (*leaf weight ratio*, LWR) y la proporción entre el área de las acículas y peso seco total (*leaf area ratio*, LAR).

Los resultados de los individuos muestreados en cada cámara o parcela ambiente se promediaron con lo que al existir tres cámaras por tratamiento, el tamaño de muestra fue $n=3$. El tratamiento estadístico consistió en un análisis de la varianza de dos factores (SO_2 y O_3) con interacción para determinar el efecto del SO_2 , el O_3 y su posible interacción en cada fecha de muestreo. En el caso de observarse una interacción significativa entre los factores, se procedió a un análisis de la mínima diferencia significativa (LSD) calculada para el nivel del 5 %, con objeto de determinar las diferencias significativas entre los tratamientos. Cuando se compararon solamente dos muestras independientes (por ejemplo el SO_2 con el AF, el AA con el ANF), se empleó el test de la t-Student. En los resultados que se presentan a continuación se señalan las diferencias significativas para $p<0.05$ y para $p<0.10$.

8.3. RESULTADOS

El crecimiento en altura y en diámetro se muestran en la figura 8.1 y la tabla 8.1. En la figura 8.2 y la tabla 8.2 se presentan resultados de algunas características estructurales de las acículas, el área específica de la hoja (SLA, *Specific Leaf Area*) y el grosor de las acículas. Los parámetros correspondientes a las medidas de biomasa al final de la experimentación se muestran en la figura 8.3 y tabla 8.3. Las tasas de crecimiento fueron máximas en primavera y mínimas en verano (resultados no mostrados), y resultaron mayores durante el primer año de experimentación que durante el segundo (tabla 8.1). El área específica de la hoja osciló en el tratamiento de control entre 44 y 67 cm²/g (figura 8.2).

Efectos del SO₂

El tratamiento con SO₂ afectó a la altura de las plantas (figura 8.1 y tabla 8.1) y a las características estructurales de las acículas (figura 8.2 y tabla 8.2).

La tasa relativa de crecimiento en altura (RGR-h) de la parte aérea no resultó afectada en conjunto durante 1996. Sin embargo, en la segunda estación de crecimiento la RGR-h fue significativamente superior por efecto del SO₂. Como resultado, la altura final (y la de los dos muestreos intermedios) fue superior en las plantas tratadas con SO₂ que sin el contaminante. Las tasas relativas de crecimiento en diámetro (RGR-φ) y el diámetro final no fueron afectados por el SO₂ (figura 8.1 y tabla 8.1).

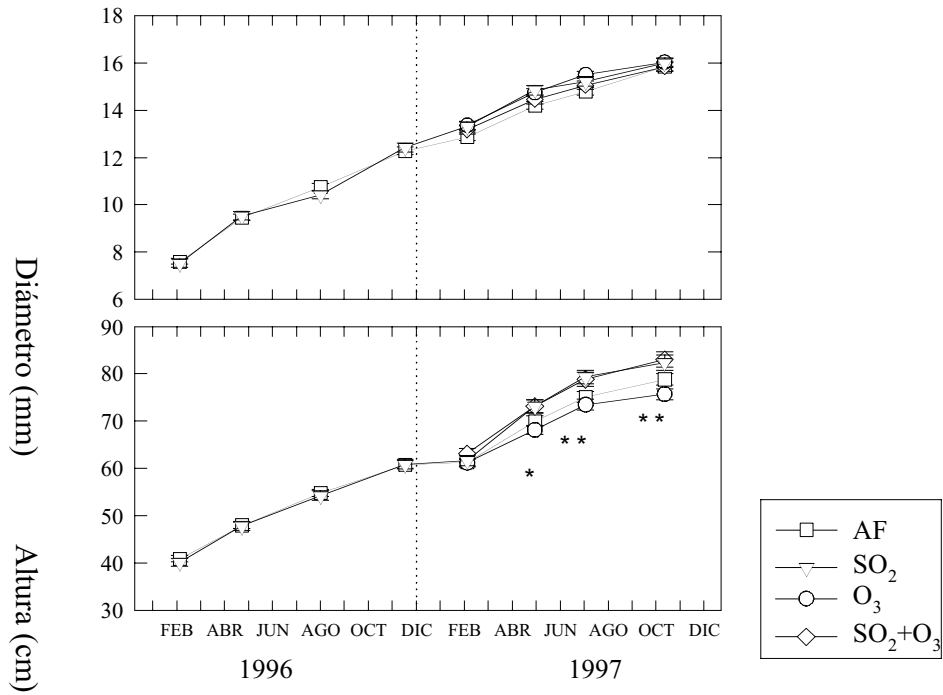


Figura 8.1. Crecimiento en diámetro y en altura de los individuos a lo largo del experimento. Cada símbolo representa la media \pm error estándar para plantas que reciben el mismo tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas debidas al SO₂ para * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Tabla 8.1. Efectos del SO₂ y del O₃ sobre las tasas relativas de crecimiento en altura (RGR-h) y en diámetro (RGR-φ). Se muestran el promedio±error estándar para cada año de crecimiento y los resultados de las comparaciones entre los tratamientos (t-test y ANOVA).

Parámetro	Tratamiento				ANOVA (p)		
	AF	SO ₂	O ₃	SO ₂ +O ₃	SO ₂	O ₃	SO ₂ +O ₃
RGR-h (año ⁻¹) en 1996	0.51 ± 0.01	0.54 ± 0.02	-	-	-	-	-
RGR-h (año ⁻¹) en 1997	0.30 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.007	0.104	0.665
RGR-φ (año ⁻¹) en 1996	0.63 ± 0.004	0.66 ± 0.02	-	-	-	-	-
RGR-φ (año ⁻¹) en 1997	0.29 ± 0.010	0.28 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.907	0.196	0.625
Altura final (cm)	79.0 ± 1.4	82.4 ± 0.4	76.2 ± 2.1	83.1 ± 1.1	0.006	0.459	0.246
Diámetro final (mm)	15.9 ± 0.2	15.9 ± 0.1	16.1 ± 0.1	15.8 ± 0.2	0.471	0.962	0.398
Peso seco final (g) (parte aérea)	144.5 ± 2.0	140.9 ± 5.5	139.1 ± 9.3	137.6 ± 1.8	0.654	0.462	0.859

El SO₂ afectó significativamente al SLA en las dos estaciones de crecimiento, pero de una manera diferente en función de la clase de edad de las acículas (figura 8.2 y tabla 8.2). En las acículas de 1995 el SLA fue superior por efecto del SO₂ (p<0.10). En contraste, en las acículas de 1996 el SLA disminuyó por efecto del SO₂. El efecto se mantuvo durante la totalidad de la experimentación. En las acículas de 1997 (segundo periodo de crecimiento) la tendencia fue similar a la de las acículas de 1996, pero no se observaron diferencias significativas. El grosor de las acículas crecidas en el tratamiento con SO₂ fue superior en el segundo año de experimentación en las acículas de 1996 (p<0.10) y de 1997 (p<0.01).

Tabla 8.2. Efectos del SO₂ y del O₃ sobre el área específica (SLA) y el grosor de las acículas. Se muestran el promedio±error estándar para cada año de crecimiento y clase de edad de las acículas y los resultados de las comparaciones entre los tratamientos (t-test y ANOVA).

Parámetro	Año	Clase de edad	Tratamiento				ANOVA (p)		
			AF	SO ₂	O ₃	SO ₂ +O ₃	SO ₂	O ₃	SO ₂ +O ₃

Parámetro	Año	Clase de edad	Tratamiento				ANOVA (p)		
			AF	SO ₂	O ₃	SO ₂ +O ₃	SO ₂	O ₃	SO ₂ +O ₃
SLA (cm ² g ⁻¹)	1996	1995	45.26 ^a ± 0.76	47.94 ^b ± 0.68 ^(*)	-	-	-	-	-
		1996	61.48 ^a ± 0.45	54.24 ^b ± 1.29 ^(*)	-	-	-	-	-
	1997	1996	48.03 ± 1.61	45.04 ± 0.73	47.32 ± 0.86	45.15 ± 1.26	(0.058)	0.803	0.735
		1997	53.23 ± 1.67	49.51 ± 2.25	51.64 ± 1.20	50.14 ± 0.62	0.107	0.997	0.720
	Grosor (mm)	1996	1995	0.89 ± 0.01	0.89 ± 0.01	-	-	-	-
1996			0.87 ± 0.01	0.88 ± 0.02	-	-	-	-	-
1997		1996	0.88 ± 0.01	0.93 ± 0.01	0.90 ± 0.03	0.93 ± 0.02	(0.079)	0.763	0.762
		1997	0.78 ± 0.02	0.84 ± 0.01	0.79 ± 0.03	0.86 ± 0.01	0.007	0.723	0.441

Los asteriscos indican diferencias significativas entre el tratamiento de SO₂ y el de aire filtrado (AF) para (*) p < 0.10.

La relación entre el peso seco de las hojas y el peso seco total (LWR, *Leaf Weight Ratio*) aumentó por efecto del SO₂ (p<0.10). Sin embargo, tomando el área foliar la relación LAR (*Leaf Area Ratio*) no mostró diferencias debidas al tratamiento (tabla 8.3). La proporción entre el peso seco de las acículas más jóvenes (originadas en 1997) respecto a las de 1996 mostró una tendencia a ser superior en los tratamientos con SO₂, pero las diferencias no fueron significativas.

Se calcularon además el área de las acículas de 1996, 1997, el peso seco de la madera y el peso seco de las acículas de 1996 y 1997 (tabla 8.3), así como la relación área foliar/peso de madera (resultados no mostrados) no observándose diferencias significativas debidas al tratamiento con SO₂.

Efectos del O₃ y del SO₂+O₃

Los efectos del O₃ y del SO₂+O₃ sobre el crecimiento, características estructurales de las acículas y biomasa final se muestran también en las figuras 8.1 a 8.3 y tablas 8.1 a 8.3.

Los efectos del O₃ fueron menos importantes que los del SO₂. No se observaron efectos significativos del O₃ en las tasas de crecimiento ni en la altura y diámetro finales, aunque la RGR-h, la RGR-φ y la altura final tendieron a ser inferiores por efecto del O₃ (figura 8.1 y tabla 8.1).

El O₃ tampoco mostró efectos sobre el SLA y el grosor de las acículas (figura 8.2 y tabla 8.2), las fracciones aéreas de la biomasa ni en la biomasa final (figura 8.3 y tabla 8.3). Sin embargo, el peso seco de la parte subterránea aumentó en un 8 % por efecto del O₃ (p<0.10) y como consecuencia de esos cambios la relación peso seco aéreo/peso seco subterráneo (S:R) disminuyó por efecto del O₃ (p<0.10). El LWR también disminuyó por efecto del O₃ (p<0.10).

Finalmente, los efectos de ambos contaminantes fueron aditivos, puesto que no se observaron interacciones entre ambos en ninguna de las medidas de

Tabla 8.3. Efectos del SO₂ y del O₃ sobre la biomasa (en peso fresco y peso seco) medida al final del experimento. Se muestran el promedio±error estándar y los resultados de las comparaciones entre los tratamientos (ANOVA).

Parámetro	Tratamiento				ANOVA (p)		
	AF	SO ₂	O ₃	SO ₂ +O ₃	SO ₂	O ₃	SO ₂ +O ₃
Peso fresco aéreo (g)	333.2 ± 7.4	339.9 ± 12.3	324.0 ± 20.9	327.7 ± 7.8	0.707	0.443	0.916
Peso seco aéreo (g)	144.5 ± 2.0	140.9 ± 5.5	139.1 ± 9.3	137.6 ± 1.8	0.654	0.462	0.859
Peso fresco aéreo / Peso seco aéreo	2.31 ± 0.03	2.41 ± 0.01	2.33 ± 0.03	2.38 ± 0.03	0.017	0.976	0.279
Peso seco madera (g)	66.1 ± 2.5	65.0 ± 2.7	66.6 ± 5.7	62.6 ± 1.6	0.477	0.795	0.692
Peso seco acículas 96 (g)	35.2 ± 1.6	31.7 ± 1.0	32.2 ± 3.1	32.5 ± 3.2	0.513	0.668	0.461
Peso seco acículas 97 (g)	43.2 ± 1.0	44.2 ± 2.2	40.3 ± 0.1	42.5 ± 3.1	0.435	0.278	0.775
Peso seco acículas 97/96	1.23 ± 0.09	1.39 ± 0.08	1.25 ± 0.08	1.31 ± 0.24	0.257	0.849	0.536
Peso seco raíces (g)	73.7 ± 2.8	66.7 ± 0.8	80.1 ± 2.2	71.5 ± 3.3	0.013	(0.054)	0.758
Peso seco total (g)	218.2 ± 3.9	207.6 ± 3.5	219.2 ± 11.1	209.1 ± 5.1	0.117	0.720	0.878
S:R	1.96 ± 0.07	2.11 ± 0.09	1.74 ± 0.08	1.92 ± 0.08	(0.051)	(0.065)	0.701
LWR	0.36 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.33 ± 0.00	0.36 ± 0.01	(0.066)	(0.064)	0.166
LAR (cm ² ·g ⁻¹)	17.9 ± 0.3	17.2 ± 0.82	16.33 ± 0.60	17.22 ± 0.43	0.908	0.262	0.191

S:R = *Shoot:Root* (peso seco aéreo / peso seco subterráneo)

LWR = *Leaf Weight Ratio* (peso seco de acículas / peso seco total)

LAR = *Leaf Area Ratio* (área foliar / peso seco total)

crecimiento, estructura de las acículas, ni biomasa. En los parámetros en los que el SO_2 y del O_3 tuvieron un efecto opuesto, como la biomasa subterránea y el índice S:R, la mezcla del SO_2+O_3 tuvo efectos intermedios con relación a los contaminantes por separado (figura 8.3 y tabla 8.3).

Efecto de cámara

Los efectos de la propia cámara en el crecimiento y la biomasa se muestran en la tabla 8.4. Las plantas que crecieron dentro de las cámaras (ANF) mostraron unas tasas de crecimiento en altura y una altura final superiores a las situadas en el exterior de éstas ($p < 0.05$). Las tasas de crecimiento en diámetro y el diámetro final tuvieron tendencia a ser mayores fuera de las cámaras, aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas. El área específica de las acículas (SLA) no mostró efectos de la cámara.

El peso seco total no difirió entre las plantas situadas en el exterior y el interior de las cámaras (aunque fue ligeramente superior fuera de ellas), pero su distribución hacia la fracción aérea respecto a la subterránea fue inferior en las plantas situadas fuera de las cámaras (S:R menor, $p < 0.05$), como consecuencia de un incremento en un 12 % de la biomasa de raíces ($p < 0.10$) y un descenso del 9 % (no significativo) de la biomasa aérea.

La proporción de acículas, en peso seco y en área, respecto al peso total de la planta, LWR y LAR, fue inferior fuera de las cámaras que en su interior ($p < 0.05$ y $p < 0.10$, respectivamente). En el resto de los parámetros de biomasa medidos no se observaron diferencias significativas (resultados no mostrados).

Tabla 8.4. Efecto de la cámara en las tasas relativas de crecimiento en altura (RGR-h) y en diámetro (RGR- ϕ), área específica de la hoja (SLA) y biomasa final. Se muestran el promedio \pm error estándar para cada año de crecimiento y los resultados de las comparaciones entre los tratamientos (t-test).

Parámetro		Tratamiento	
		ANF	AA
RGR-h (año ⁻¹)		0.42 ^a \pm 0.20	0.28 ^b \pm 0.20*
RGR- ϕ (año ⁻¹) en 1996		0.45 \pm 0.20	0.49 \pm 0.40
Altura final (cm)		82.3 ^a \pm 1.4	64.1 ^b \pm 1.0*
Diámetro final (mm)		15.8 \pm 0.28	16.8 \pm 0.50
SLA (cm ² g ⁻¹)	Acíc. 96	46.0 \pm 0.6	44.7 \pm 0.3
	Acíc. 97	55.9 \pm 0.8	57.3 \pm 2.6
Peso seco aéreo (g)		139.5 \pm 3.2	127.2 \pm 9.6
Peso seco raíces (g)		71.1 ^a \pm 2.8	80.0 ^b \pm 2.5(*)
Peso seco total (g)		210.6 \pm 4.7	207.2 \pm 12.1
S:R		1.96 ^a \pm 0.07	1.59 ^b \pm 0.08*
LWR		0.36 ^a \pm 0.01	0.32 ^b \pm 0.01*
LAR (cm ² ·g ⁻¹)		17.1 ^a \pm 0.4	15.6 ^b \pm 0.5(*)

Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos para (*) $p < 0.10$ y * $p < 0.05$.

S:R = *Shoot:Root* (peso seco aéreo / peso seco subterráneo)

LWR = *Leaf Weight Ratio* (peso seco de acículas / peso seco total)

LAR = *Leaf Area Ratio* (área foliar / peso seco total)

8.4. DISCUSIÓN

Las condiciones de crecimiento de plantas cultivadas en maceta son restrictivas para el desarrollo normal de las raíces, y alteran por otra parte los flujos naturales de agua en el suelo y en la planta. Como resultado de ello, la capacidad de adquisición de nutrientes y otros procesos que ocurren en la rizosfera, que posiblemente juegan un importante papel en la respuesta de la planta a los contaminantes, pueden verse severamente limitados.

Particularmente en estudios de plantas cultivadas en maceta sometidas a elevadas concentraciones de CO₂, algunos autores han mostrado que la restricción del crecimiento de las raíces produce un desequilibrio entre la producción y la demanda de carbohidratos, causando una interferencia en las respuestas de la planta a la elevada concentración de CO₂ (Arp, 1991).

Por tanto, es necesario tener en cuenta que se han podido producir alteraciones de la respuesta de las plantas a los contaminantes debido al volumen de suelo restringido en la maceta, fundamentalmente en los resultados referidos a la acumulación de biomasa subterránea al final del experimento y a la proporción entre la biomasa subterránea y la biomasa aérea (R:S). En la discusión que sigue, tales factores se han considerado, sobretodo a la hora de interpretar los efectos de O₃ en la acumulación de biomasa subterránea.

Efectos del SO₂

En el presente estudio las plantas mostraron alteraciones en el crecimiento inducidas por el tratamiento con SO₂. Durante el segundo periodo de crecimiento, se observó una tasa relativa de crecimiento en altura superior en el tratamiento con SO₂, así como una altura final mayor en ese tratamiento en relación con los tratamientos sin SO₂. Esos resultados son consistentes con otros estudios en los que se han encontrado aumentos de la altura como respuesta al tratamiento con SO₂ en diversas coníferas en experimentaciones de OTCs (Leininger *et al.*, 1991 en *Abies concolor* y *Picea engelmannii*) y en fumigaciones al aire libre (Holland *et al.*, 1995 en *Picea sitchensis*). Otros autores han encontrado un efecto similar en plantas que recibían

deposición de partículas de polvo (Mayo *et al.*, 1992). Algunos autores han atribuido este efecto a un incremento en la concentración foliar de nitrógeno causada por captación del amoníaco codepositado junto al SO₂ en experimentos de fumigación con SO₂ al aire libre (McLeod *et al.*, 1992; Holland *et al.*, 1995). Sin embargo, en nuestro caso el aumento del crecimiento de la parte aérea en el tratamiento con SO₂ no se correspondió con un incremento de la concentración foliar de N (antes bien, el SO₂ condujo a una disminución de la concentración de N en las acículas más antiguas y apenas produjo efectos en las más jóvenes; ver capítulo 4). Mayo *et al.* (1992) relacionaron la mayor estimulación de la elongación del brote principal en el híbrido de *Pinus contorta* x *Pinus banksiana* con el aumento del potencial de turgor celular a niveles elevados de potencial hídrico en árboles expuestos a SO₂ y a deposición de partículas de polvo. Independientemente de los mecanismos a través de los que se produzca, interpretamos nuestros resultados en el mismo sentido que Leininger *et al.* (1991), según los que la estimulación del crecimiento de la parte aérea inducida por el estrés del tratamiento con SO₂ puede indicar cambios en la distribución del carbono, quizás relacionado con la reparación o el reemplazo de tejido dañado por el contaminante.

Por otra parte, el SO₂ aumentó el área específica de las acículas (SLA) más maduras (es decir, disminuyó su peso específico) y disminuyó el SLA en las acículas más jóvenes (aumentando por tanto su peso específico). Según Slovik (1996) el SLA es uno de los factores implicados en la tolerancia al SO₂: el flujo de SO₂ es proporcional a la superficie de las hojas o acículas, pero el contenido de cationes (asumiendo la hipótesis discutida en el capítulo 4 acerca de la destoxicación del sulfato por los cationes en la vacuola de las células del mesófilo) es función del volumen, por tanto proporcional al peso seco de las hojas. Así, la relación superficie/volumen definiría la sensibilidad al SO₂, siendo promovida la mayor tolerancia por los valores mínimos de SLA. Por tanto, los efectos del SO₂ en el SLA, diferentes según la clase de edad de las acículas, podrían de nuevo interpretarse en el sentido de una distribución de recursos en la planta encaminada a aumentar la tolerancia de las acículas más jóvenes. Además, como se discute en los capítulos 4 y 7, los cambios en el SLA de las hojas pudieron mediar o coadyuvar en una aclimatación de la planta al SO₂, propiciando cambios en la concentración de N en base al área foliar, lo que pudo tener influencia en las tasas fotosintéticas.

La respuesta en altura no reflejó la respuesta de las plantas al SO₂ en la acumulación de biomasa aérea: las plantas que recibieron el tratamiento con SO₂ fueron mayores en altura (e iguales en diámetro) que las plantas sin tratamiento con el contaminante, aunque esas plantas mostraron una acumulación de biomasa aérea

similar. Edwards *et al* (1991) obtuvieron resultados similares en respuesta a diversos tratamientos con O₃, interpretando que era debido al efecto del contaminante en la densidad de los tejidos. En nuestro estudio, observamos un aumento de la relación peso fresco/peso seco de la parte aérea en el tratamiento con SO₂, lo que puede explicar las discrepancias entre los resultados de altura y de biomasa aérea.

La biomasa de raíces disminuyó por efecto del SO₂ en un 10 % ($p < 0.05$) y, como consecuencia de que la biomasa aérea apenas varió, la relación biomasa aérea/subterránea (S:R) aumentó en ese tratamiento ($p < 0.10$). La biomasa total disminuyó en un 5 % (no significativo estadísticamente). La reducción del crecimiento y otros parámetros relacionados con la acumulación de biomasa en árboles por efecto del SO₂ es un hecho generalmente aceptado (Darrall, 1989), observado por numerosos autores: por ejemplo, Garsed y Rutter (1984) encontraron una disminución de la biomasa de raíces en *Pinus sylvestris* y *Picea sitchensis* y un descenso del crecimiento en *Pinus taeda* y *Platanus occidentalis* (Garsed y Rutter, 1982). García *et al.* (1998) observaron menores tasas de crecimiento en dos poblaciones de *Quercus rotundifolia* sometidas a SO₂. Bucker y Ballach (1992) también observaron una disminución de la biomasa de raíces en *Populus* sp. sometidos a SO₂/NO₂. En *Picea abies* fumigados con SO₂, Holland *et al.* (1995) registraron una depresión del crecimiento del diámetro basal y Keller (1982) y Hirano y Morimoto (1999) una disminución del grosor de los anillos de crecimiento en *Picea abies* y *Pinus thumbergii*, respectivamente. Otros ejemplos de la disminución de la biomasa de raíces y del crecimiento se pueden consultar en las revisiones de Darrall (1989) y de Kozlowsky *et al.* (1991).

En general se estima que los efectos del SO₂ sobre las raíces son más importantes que sobre la parte aérea de la planta (Landolt y Keller, 1985; Kozlowsky *et al.*, 1991), debido a una redistribución de los recursos, produciéndose un aumento en la asignación de carbono a la parte aérea a expensas de la parte subterránea. Por ello, en multitud de estudios se ha observado, como en nuestro caso, un aumento de la relación S:R (Jones y Mansfield, 1982; Freer-Smith, 1985; Darrall, 1989; Hampp, 1992; Peace *et al.*, 1995; Houpis *et al.*, 1999). Los mecanismos que regulan la distribución de productos de asimilación en la planta no se conocen con exactitud (Wardlaw, 1990), pero parecen estar relacionados con mecanismos adaptativos encaminados a mantener tasas de crecimiento altas en condiciones de disponibilidad de carbohidratos reducida (Darrall, 1989; Peace *et al.*, 1995), equilibrando esa respuesta la disminución de la ganancia de carbono en las hojas (Darrall, 1989). Según otros autores, tales cambios

tejidos de la parte aérea de la planta (McLaughlin *et al.*, 1982; Mudd, 1982).

La vía de daño del SO₂ sobre la raíz debe estar relacionada con sus efectos sobre la parte aérea de la planta, puesto que el SO₂ gaseoso no penetra en el suelo, y por otra parte no es previsible un efecto directo por acidificación del suelo, debido a las características fisicoquímicas de éste. El grado en que los efectos de los contaminantes atmosféricos en la fisiología de la parte aérea alteran la fisiología de las raíces y los procesos en el suelo tampoco está determinado completamente (Scagel y Andersen, 1997). Se han propuesto diversos mecanismos de acción para explicarlo:

- disminución de las tasas de asimilación de CO₂ (Cooley y Manning, 1987; Clark *et al.*, 1996).

- inhibición de la translocación o carga floemática de los productos de la asimilación (Noyes, 1980; Landolt y Keller, 1985; Gorissen *et al.*, 1991; Wellburn y Wellburn, 1994), particularmente por inhibición de la exportación de sucrosas (Rennenberg *et al.*, 1996) desde las hojas (fuentes de producción) hacia las raíces (sumideros de la producción).

- alteración del metabolismo de los carbohidratos en el interior de las hojas, con acumulación de éstos y de almidón (Wellburn y Wellburn, 1994; Rennenberg *et al.*, 1996) o bien con disminución de la reserva de carbohidratos solubles en las hojas (Peace *et al.*, 1995).

- descenso de la actividad de las raíces (Peace *et al.*, 1995) y por tanto disminución de la demanda de carbohidratos por éstas.

En nuestro estudio la disminución de la distribución de recursos a las raíces pudo estar relacionada con la disminución de las tasas fotosintéticas observada (capítulo 7), aunque sin descartar la influencia de las otras posibilidades mencionadas.

Estos cambios suelen favorecer el desarrollo de las hojas hasta un cierto punto, compensando así la disminución de la capacidad fotosintética, pero limitan la absorción de agua y de nutrientes (Landolt y Keller, 1985; Darrall, 1989; Scagel y Andersen, 1997). Diversos autores han resaltado que plantas sometidas a contaminantes atmosféricos, con menor proporción R:S, son más susceptibles a la sequía (Kozlowsky *et al.*, 1991; Wellburn y Wellburn, 1994; Chappelka y Freer-Smith, 1995; Rennenberg *et al.*, 1996) debido a que un sistema aéreo relativamente mayor sería dependiente del suministro de agua de un sistema radicular relativamente menor.

La disminución de la distribución de carbono a las raíces puede además incrementar la susceptibilidad de la planta a enfermedades de la raíz (McLaughlin *et al.*, 1982), alterar su metabolismo y afectar a los organismos de la rizosfera (Scagel y Andersen, 1997). En efecto, en nuestras experimentaciones previas, observamos una disminución del porcentaje de micorrización por efecto del SO₂ en *Pinus halepensis* (Díaz *et al.*, 1996) con una posible incidencia, debido a la relevancia que tienen las asociaciones micorrícicas en la nutrición de las coníferas, sobre el descenso del crecimiento.

Globalmente, los resultados del presente apartado (aumento del crecimiento en altura, incremento del grosor de las acículas más jóvenes, disminución de la biomasa de raíces, aumento de la proporción S:R y aumento del índice LWR) indican una distribución preferente de recursos hacia la parte aérea de la planta por efecto del SO₂. Este efecto, junto con una tendencia a la disminución de la biomasa total, se producen posiblemente como consecuencia del conjunto de los procesos mencionados a lo largo de la discusión y en otros apartados de esta memoria:

- disminución de la capacidad fotosintética de las acículas (capítulo 7)
- derivación de la energía procedente de la fotosíntesis hacia otros procesos diferentes del crecimiento, como: activación de sistemas antioxidantes (Moliner *et al.*, datos no publicados; de hecho la biosíntesis de antioxidantes consume una parte de la producción de la planta, Polle *et al.*, 1994, Benes *et al.*, 1995) y detoxificación de radicales libres en general (capítulo 5 y 6); reparación/reemplazamiento de tejidos aéreos dañados; acumulación de cationes en las vacuolas de las células del mesófilo (capítulo 4)
 - sustracción de esos cationes al crecimiento (capítulo 4)
 - interferencia en el metabolismo de los carbohidratos en las hojas y su transporte a las raíces.
 - disminución de la micorrización.

Efectos del O₃

No se observaron efectos del O₃ en la altura, el diámetro, la biomasa final ni en las fracciones aéreas de la biomasa. Los resultados coinciden con los de otros autores, que no han observado efectos del O₃ en el crecimiento en una gran variedad de especies leñosas: *Pinus sylvestris* (Holland *et al.*, 1995; Pérez-Soba *et al.*, 1995; Kasurinen *et al.*, 1999), *Picea rubens* (Alschler *et al.*, 1989; Thornton *et al.*, 1990;

Bambridge *et al.*, 1996), *Pinus ponderosa* (Bytnerowicz *et al.*, 1990), *Quercus rubra* (Samuelson *et al.*, 1996; Wullschlegler *et al.*, 1996), *Picea abies* (Holland *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 1997; Leverenz *et al.*, 1999) y *Pinus halepensis* (Barrantes *et al.*, 1994; Díaz *et al.*, 1996, en nuestras experimentaciones previas; Kytoviita *et al.*, 1999).

En otros trabajos, sin embargo, sí se han observado efectos negativos del O₃ sobre el crecimiento y parámetros relacionados en otras especies: *Pinus taeda* (Edwards *et al.*, 1991; Reinert *et al.*, 1996), *Pinus ponderosa* (Scagel y Andersen, 1997), *Pinus elliotii* (Hogsett *et al.*, 1985a), *Betula pendula* (Pääkkönen *et al.*, 1993), clones de *Populus tremuloides* (Karnosky *et al.*, 1996), *Liriodendron tulipifera* (Jensen y Patton, 1990) y *Populus nigra* (Bortier *et al.*, 1997), *Olea europaea* y *Quercus ilex* (Inclán *et al.*, 1999).

No obstante, en la mayoría de los estudios en los que se observaron efectos sobre la biomasa y el crecimiento se requirieron unas concentraciones más altas de O₃ que las empleadas en nuestro estudio (en general mayores de 70 ppb) o bien más de una estación de crecimiento con exposición al contaminante. Durrant *et al.* (1992), en experimentaciones durante 3 años, concluyeron que en especies de crecimiento lento como los árboles, los efectos sobre el crecimiento se incrementaron con el tiempo. Los resultados de Bambridge *et al.* (1996) apoyan esa hipótesis, sugiriendo que son necesarias concentraciones altas de O₃ o bien exposiciones largas al contaminante para encontrar efectos en el crecimiento. En ese sentido, Simmons y Kelly (1989), Runeckles y Wright (1996) y Takemoto *et al.* (1997) no encontraron efectos en el primer período de crecimiento bajo exposición a O₃, pero sí en el segundo. Alscher *et al.* (1989) señalan que la baja conductancia estomática de *Picea rubens* puede ser un factor importante a la hora de explicar la ausencia de efectos sobre el crecimiento durante la primera estación de exposición al O₃. Además, hay una indudable importancia de la tolerancia genética de cada especie: Shafer y Heagle (1989), por ejemplo, observaron efectos del O₃ sobre el crecimiento en unas familias genéticas de *Pinus taeda*, pero no en otras. Payer *et al.* (1990) y Karlsson *et al.* (1997) encontraron diferente sensibilidad del crecimiento al O₃ para distintos clones de *Picea abies* empleados. Wulff *et al.* (1996) encontraron incluso una diferente sensibilidad en *Picea abies* y *Pinus sylvestris* de distintas procedencias geográficas.

Por otra parte, en nuestro estudio la biomasa de raíces aumentó en un 8 % ($p < 0.10$) y la relación S:R disminuyó por efecto del O₃ ($p < 0.10$). En algunos casos se ha observado como respuesta al O₃ una estimulación de la tasa de crecimiento de las raíces como en el clon de crecimiento lento "L" de *Picea abies* (Karlsson *et al.*,

1997), un aumento de la biomasa de raíces en *Liriodendron tulipifera* tras una estación de exposición (Rebbeck, 1996), una disminución de la proporción S:R en *Pinus taeda* (Tjoelker y Luxmoore, 1991) y en *Pinus virginiana* (Neufeld *et al.*, 2000) y una distribución de los productos de asimilación a las raíces incrementada en *Trifolium repens* (Blum *et al.*, 1983). Pero la tendencia general mostrada por la mayoría de los autores es, como en el caso del SO₂, a una disminución de la parte subterránea de la planta respecto a la parte aérea (McLaughling *et al.*, 1982; Hogsett *et al.*, 1985a; Winner y Atkinson, 1986; Cooley y Manning, 1987; Pye, 1988; Darrall, 1989; Wellburn y Wellburn, 1994; Woodbury *et al.*, 1994; Scagel y Andersen, 1997; Chappelka y Samuelson, 1998). Es sabido que las deficiencias nutricionales incrementan el papel de las raíces como sumidero de carbono respecto a la parte aérea (p.e., Cannell, 1986; Chapin *et al.*, 1987), de manera que Tjoelker y Luxmoore (1991) y Wulff *et al.*, (1996) destacan que la deficiencia nutricional (particularmente en N) pudo estimular el crecimiento de la raíz para superar esa deficiencia nutricional, lo que pudo enmascarar la posible influencia del O₃ en la proporción S:R. En nuestro caso se observó un posible agotamiento de nutrientes en el suelo hacia el final de la experimentación (ver capítulo 4) debido al volumen limitado del sustrato disponible para el crecimiento de las raíces, lo que pudo conducir a un redireccionamiento de los recursos hacia la parte subterránea de la planta, enmascarando el efecto del O₃ sobre el aumento de la relación S:R observada por otros autores. Por tanto, la posible interacción del efecto de la maceta con la respuesta al O₃ obligan a interpretar con cautela estos resultados.

Ahora bien, caso de haberse producido, el redireccionamiento de recursos hacia la parte subterránea no compensó el aumento de la proporción S:R producida por efecto del SO₂, registrándose una elevación neta de dicha relación en ese tratamiento. Tal aspecto se discutió en el apartado anterior.

Efectos del SO₂+O₃

Los resultados de este capítulo no apoyan la existencia de interacciones entre el SO₂ y el O₃ en el crecimiento de *Pinus halepensis*. Estos resultados coinciden con los del proyecto de “Liphook” en Inglaterra (McLeod *et al.*, 1992), donde se emplearon concentraciones promedio de ambos contaminantes de 22 ppb de SO₂ y 30 ppb de O₃, muy similares por tanto a las utilizadas en nuestro estudio. En ese proyecto no se observaron interacciones del SO₂ y del O₃ en el crecimiento de *Picea abies*, *Picea sitchensis* y *Pinus sylvestris* (Holland *et al.*, 1995).

En las referencias bibliográficas se han observado, sin embargo, un cierto número de interacciones de los dos contaminantes en el crecimiento de especies leñosas: negativas o antagónicas (experimentos de varios autores y diversas especies revisados en Guderian, 1985 y Landolt y Keller, 1985), positivas o sinérgicas (Constantinidou y Kozlowsky, 1979; Kress y Skelly, 1982; Chappelka *et al.*, 1985; Billen *et al.*, 1990). En nuestros experimentos previos, también observamos una sinergia de en la disminución de la biomasa total, aérea y subterránea de *Pinus halepensis* (Barrantes *et al.*, 1994; Díaz *et al.*, 1996). Sin embargo, en los estudios mencionados las concentraciones empleadas se hallaron en un rango de entre 40 y 500 ppb para el SO₂ y de 50 a 2000 ppb de O₃, superiores a las utilizadas en nuestra experimentación.

Efecto de cámara

La biomasa total de las plantas que crecieron dentro de las cámaras fue similar a la de las plantas situadas fuera de ellas. Sin embargo, hubo una distribución preferente de biomasa hacia la parte aérea en el interior de las cámaras, como lo refleja una mayor proporción S:R y una disminución de la biomasa de raíces, incremento en altura y aumento de la proporción de acículas en peso seco y en área respecto a la biomasa total (LWR y LAR).

Los efectos de las OTC en el microclima varían en función de las características climáticas del lugar y probablemente afectan de distinta manera a cada especie, lo que explica la variedad de efectos de las cámaras en el crecimiento observado por diversos autores: aumento de la biomasa (Sanders *et al.*, 1991; Karnosky *et al.*, 1996; Takemoto *et al.*, 1997), disminución (Adaros *et al.*, 1989; Bytnerowicz *et al.*, 1990). En otros trabajos, como en nuestra experimentación, no se observaron efectos de la cámara en la biomasa (Fuhrer, 1994; Shafer y Heagle, 1989; Laurence *et al.*, 1996).

Respecto a la distribución preferente de biomasa hacia la parte aérea, Sanders *et al.* (1991) obtuvieron similares resultados por efecto de la cámara. Tal tipo de respuesta puede atribuirse a diversos factores que resultan afectados por la cámara, como la disminución de la radiación solar incidente, el incremento de temperatura y la atenuación de la velocidad del viento que se produce en su interior. Ahora bien, Espelta (1996), en experimentaciones con plantas de *Pinus halepensis*, señaló que la intensidad de luz frente a la disponibilidad de agua fue el factor que mejor explicó el patrón de asignación de biomasa entre órganos, con un incremento de la biomasa subterránea con niveles de PAR crecientes.

Aunque las cámaras produjeron un sombreado moderado (el PAR dentro de las cámaras fue un 26 % menor que el incidente fuera de ellas en promedio, ver capítulo 3), indicado además por la ausencia de efectos importantes en el área específica de la hoja, la asignación preferente de biomasa a la parte aérea respecto a la subterránea se puede interpretar, tal y como otros autores han señalado, como un mecanismo de adaptación de la planta encaminado a incrementar la intercepción de la luz en condiciones limitantes para la actividad fotosintética (p.e., Brouwer, 1983; Lamberts y Poorter, 1992; Nilsson y Hällgreen, 1993).