



Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Universidad de Huelva

Máster Universitario en Ingeniería Química

Trabajo Fin de Máster

Parámetros morfológicos y fisiológicos relacionados
con la transpiración en nueve clones de eucalipto
utilizados en cultivos energéticos

André Carignato
Junio/2016

Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Universidad de Huelva

Máster Universitario en Ingeniería Química

Trabajo Fin de Máster

Parámetros morfológicos y fisiológicos relacionados
con la transpiración en nueve clones de eucalipto
utilizados en cultivos energéticos

*Morpho-physiological parameters related to water
transpiration in nine Eucalyptus clones used for energy
crops*

Bajo la dirección de los doctores:
Manuel Fernández Martínez
Francisco Javier Vázquez Piqué

André Carignato
Junio/2016

AGRADECIMIENTOS

Al CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil”, y a todos los otros organismos asociados al Programa *Ciência sem Fronteiras*, el CAPES, Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nivel superior, el MCTI, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação y el MEC, Ministério da Educação, que, en 2012 me concedió una beca para una estancia de grado en España y ahora nuevamente para desarrollar mi postgrado con una beca de Doctorado.

Este trabajo contó con el soporte financiero y la ayuda de la Universidad de Huelva, por el uso de instalaciones y equipos, de la empresa ENCE, energía y celulosa S.A., a través de un contrato de investigación sobre clones de eucaliptos, y del Plan Nacional de Investigación I+D+i a través del proyecto de referencia CTQ2013-46804-C2-1R que, a su vez, contó con financiación FEDER.

A mi director de tesis, Manuel Fernández Martínez, por la oportunidad concedida desde los primeros contactos cuando todavía estaba en Brasil, y luego por todas las enseñanzas relativas al desarrollo de ese trabajo y la comprensibilidad en todas las planificaciones y decisiones, lo que me hace pensar que tengo un gran privilegio de tenerlo involucrado en mi carrera profesional, y a mi codirector, Fco. Javier Vázquez Piqué, por el apoyo en la planificación y desarrollo del trabajo cuando se hizo necesario.

A toda mi familia, en especial mis padres y mis abuelos que contribuyeron en toda mi trayectoria profesional.

A Dios, por darme salud, sabiduría y a ayudarme en mis decisiones en todos los ámbitos.

A mis compañeros de despacho, Patricia Alesso y David Romero, por la contribución en algunas mensuraciones de los experimentos, convivio y amistad.

A mis amigos de toda la vida, José Alvaro y Ricardo, a todos de la UNESP, en especial mis compañeros de clase Daroça, Xorô e Lobinho, a todos los dieciocho del PPGF 2015, Programa de Preparação de Gestores Florestais, y a todos los amigos de las diferentes nacionalidades que conocí en Huelva.

No puedo dejar de recordar de los profesionales que estuvieron presentes como tutores de prácticas durante todo mi grado de Ingeniería Forestal en Brasil en la UNESP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Edson Seizo Mori, Carlos Frederico Wilcken y Cristiano Bueno de Moraes.

ÍNDICE

i. ABREVIATURAS	3
ii. RESUMEN	5
iii. ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN	9
1.1. Sector forestal y energías renovables	9
1.2. Ambiente y mejora genética	10
1.3. Ecofisiología y parámetros morfo-fisiológicos	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS	15
3.1 Material vegetal y diseño experimental	15
3.2. Tamaño y distribución de los estomas	15
3.3. Transpiración cuticular (E_c) y área foliar específica (SLA)	17
3.4. Transpiración diaria (T)	19
3.5. Análisis de datos	21
4. RESULTADOS	23
4.1. Estomas	23
4.1.1. Densidad	23
4.1.2. Longitud (LO) y anchura (AO) de las células oclusivas	24
4.1.3. Ratio entre el ancho y el largo de las células oclusivas (AO/LO)	26
4.1.4. Correlaciones entre parámetros	26
4.2. Transpiración cuticular y parámetros relacionados	27
4.2.1. Contenido hídrico relativo en el momento del cierre estomático (CHR_c)	27
4.2.2. Tiempo transcurrido hasta el cierre de los estomas (t_c)	29
4.2.3. Contenido de humedad en el momento del cierre estomático (H_c)	29
4.2.4. Área foliar específica (SLA)	31

4.2.5. Tasa de transpiración cuticular (E_c) y de transpiración total al inicio (E_t)	31
4.3. Transpiración diaria	34
4.3.1. Relaciones alométricas entre parámetros morfológicos de las plantas	34
4.3.2. Cálculo de la transpiración diaria (T)	36
5. DISCUSIÓN	43
5.1. Estomas	43
5.1.1. Densidad	43
5.1.2. Tamaño de los estomas	45
5.2. Transpiración	47
5.2.1. Transpiración cuticular y parámetros relacionados	47
5.2.2. Transpiración diaria	52
6. CONCLUSIONES	55
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

i - ABREVIATURAS

<i>AO</i>	Ancho de las células oclusivas.
<i>AO/LO</i>	Ratio entre el ancho y el largo de las células oclusivas.
<i>AO/AS</i>	Ratio entre el ancho de las oclusivas y de las subsidiarias.
<i>AS</i>	Ancho de las células subsidiarias.
<i>AS/LS</i>	Ratio entre ancho y largo de las subsidiarias.
<i>CHR_c</i>	Contenido hídrico relativo en el momento del cierre estomático.
<i>D</i>	Diámetro en la base del tallo principal.
<i>E_c</i>	Tasa de transpiración cuticular.
<i>E_e</i>	Tasa de transpiración estomática.
<i>E_t</i>	Tasa de transpiración total al inicio.
<i>H</i>	Altura de la planta
<i>H_c</i>	Contenido de humedad en el momento del cierre estomático.
<i>HR_{med}</i>	Humedad relativa media diaria del aire.
<i>HR_{min}</i>	Humedad relativa mínima diaria del aire.
<i>LO</i>	Largo de las células oclusivas.
<i>LO/LS</i>	Ratio entre el largo de las oclusivas y de las subsidiarias.
<i>LS</i>	Largo de las células subsidiarias.
<i>N_{hj}</i>	Número de hojas.
<i>Pf</i>	Peso final del conjunto planta-contenedor.
<i>Pi</i>	Peso inicial del conjunto planta-contenedor.
<i>PS</i>	Peso seco.
<i>PS_{hj}</i>	Peso seco de hojas.
<i>PS_{rz}</i>	Peso seco de raíces.
<i>PS_{tl}</i>	Peso seco de tallos.
<i>R</i>	Radiación solar acumulada diaria.
<i>SF</i>	Superficie foliar.
<i>SLA</i>	Área foliar específica.
<i>T</i>	Temperatura media diaria.
<i>T</i>	Transpiración diaria.
<i>t_c</i>	Tiempo transcurrido hasta el cierre de los estomas.
<i>T_{LA}</i>	Tasa de transpiración diaria en base al área foliar.
<i>T_{LW}</i>	Tasa de transpiración diaria en base al peso seco foliar.
<i>T_{St}</i>	Tasa de transpiración diaria en base al área de la sección transversal del tallo principal.
<i>v</i>	Velocidad media diaria del viento.

ii - RESUMEN

El estrés hídrico, es uno de los principales limitantes para el desarrollo de la producción de *Eucalyptus* en Brasil y España y para la expansión de las plantaciones comerciales. De este modo, el objetivo de este trabajo fue evaluar y comparar aspectos relacionados con el consumo de agua en distintos clones monoespecíficos e híbridos de *Eucalyptus*. Se utilizaron plantas de cinco clones de *E. globulus* y cuatro clones de híbridos procedentes del programa de selección y mejora vegetal de la empresa ENCE, *energía y celulosa*, que se cultivaron en el exterior en contenedores de 10 L y 100 L de capacidad. Se evaluaron parámetros como tasa de transpiración total y cuticular (E_t , E_c , respectivamente), el tiempo transcurrido hasta el cierre de los estomas (t_c), el contenido hídrico relativo y contenido de humedad en el momento del cierre estomático (CHR_c y H_c , respectivamente), el área foliar específica (SLA), el tamaño y distribución de los estomas, todos ellos medidos en distintas épocas del año. Los resultados señalaron que: la densidad estomática se correlacionó negativamente con el tamaño de los estomas, varió en función de la época del año y se diferenció entre clones (145 - 462 estomas por mm^2); SLA varió de $9.7\text{m}^2\text{ kg}^{-1}$ hasta $14.6\text{ m}^2\text{ kg}^{-1}$, con diferencia entre clones; E_c presentó una media de $0.17\text{ mmol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, con diferencias significativas entre clones; la transpiración diaria fue bastante variable de unos meses a otros, en un rango de 0.06 L día^{-1} hasta 5.58 L día^{-1} , con plantas de tamaño entre 0.31 cm y 4.57 cm de diámetro en la base, evidenciando el efecto del tamaño de planta y de los estímulos ambientales sobre la transpiración.

Palabras clave: *Eucalyptus*, resistencia a la sequía, estomas, transpiración, área foliar específica.

iii - ABSTRACT

Morpho-physiological parameters related to water transpiration in nine *Eucalyptus* clones used for energy crops

Water stress is one of the main limiting factors for the development of *Eucalyptus* production in Brazil and Spain and for the expansion of commercial tree plantations. In this way, the research objective of this work was to evaluate and compare some aspects related to water consumption in different monospecific and hybrid clones of *Eucalyptus*. Accordingly, we used plants of five clones of *E. globulus* and four clones of different hybrids taken from the selection and plant breeding program of the company *ENCE, energía y celulosa*. They were cultivated outside in containers with a capacity of 10 L and 100 L. The parameters that were evaluated were, among others, the total and cuticular transpiration rate (E_t , E_c , respectively), the time elapsed until the stomata were closed (t_c), the relative water content and moisture level until closing stomata (CHR_c and H_c , respectively), the specific leaf area (*SLA*) and the size and distribution of stomata, all of them measured at different times of the year. The results indicated that: the stomatic density was negatively correlated with the stomatal size, they varied according to the time of year and differed between the clones (145 - 462 stomata/mm²); *SLA* varied from 9.7 m² kg⁻¹ to 14.6 m² kg⁻¹, with significant differences between clones; E_c presented an average value of 0.17 mmol m⁻² s⁻¹, with significant differences between clones. The results also have shown that daily transpiration rates were quite variable between months, in a range from 0.06 L day⁻¹ to 5.58 L day⁻¹, based on the data of plants with a size of 0.31 cm to 4.57 cm diameter at the base, showing the effect of plant size and of environmental factors on transpiration.

Keywords: *Eucalyptus*, drought resistance, stomata, transpiration, specific leaf area.

1.INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

1.1. Sector forestal y energías renovables

Los bosques y otros terrenos forestales contribuyen a la mejora de nuestra calidad de vida. De forma casi imperceptible desarrollan funciones esenciales para la vida en el planeta, contribuyendo a nuestra salud a través de la mejora de la calidad del aire y del agua, la regulación del microclima, la fijación de CO₂, la formación de paisajes y la conservación de la diversidad biológica. Además, sus producciones benefician a toda la sociedad a través de la generación de rentas y empleo. El territorio forestal español, así como también el brasileño, están en expansión, y esta tendencia creciente se mantiene en mayor medida que en otros muchos países. Los bosques y terrenos forestales españoles ocupan el 53% de la superficie nacional y España es el tercer país europeo por superficie forestal arbolada, detrás de Suecia y Finlandia. Por su lado, Brasil es uno de los países con mayor riqueza forestal del mundo y contiene el 13% del área mundial de bosque, sólo detrás de Rusia (FAO, 2011; Montero y Serrada, 2013).

Eucalyptus es un género muy diverso dentro de las angiospermas, con más de 700 especies, que domina la flora arbórea del continente australiano y se cultiva ampliamente en todo el mundo. En España el uso del género *Eucalyptus* en las plantaciones efectuadas con frondosas es predominante, ocupando el 3.5% de la superficie forestal arbolada nacional, pero proporcionando el 38% de la madera cortada anualmente. En Brasil, es la especie forestal más empleada en plantaciones comerciales, en base a sus características de rápido crecimiento y buena adaptación a las condiciones edafoclimáticas (Almeida et al., 2007). Sin embargo, la ampliación de las áreas implantadas tiene riesgos importantes de pérdida de productividad debido al efecto de los estreses ambientales, siendo el estrés hídrico y el estrés térmico relacionado con las bajas temperaturas los principales (Whitehead y Beadle, 2004).

La biomasa ocupa la tercera posición de la matriz energética de Brasil (EPE, 2015) y, en España, es la principal fuente de la producción de energía a

partir de los recursos renovables (IDAE, 2015). Las plantaciones y cultivos realizados con fines energéticos, como en el caso de muchos eucaliptos, suponen una nueva oportunidad para paliar el abandono paulatino de superficies agrícolas y forestales, apoyando de este modo la economía rural y evitando el despoblamiento de estas zonas. En este contexto, estos cultivos lignocelulósicos se demuestran apropiados para el territorio español y brasileño al aportar gran cantidad de biomasa de forma rentable y con un coste de cultivo bajo (Maletta, 2009). Estos cultivos contribuirían, además, a reducir el déficit energético y el uso de energías no renovables, así como a conservar mejor las áreas forestales naturales, no cultivadas.

1.2. Ambiente y mejora genética

La provincia de Huelva posee los requisitos ecológicos requeridos por diversas especies del género *Eucalyptus* para su buen desarrollo, encontrándose en el límite superior de temperatura y siendo la sequía estival, que ronda los 4 meses de duración, y la ocurrencia periódica de temperaturas bajas durante los meses de invierno, los principales factores limitantes para el crecimiento de las plantaciones (Fernández et al., 2012). Los escenarios de cambio climático desarrollados prevén eventos climáticos extremos, como la disminución de las precipitaciones, mayor ocurrencia de heladas y un incremento en la recurrencia de episodios de sequía extrema, que impactarán en la disponibilidad de los recursos hídricos (IPCC, 2014). Cualquiera de esos cambios generará una serie de alteraciones para la vegetación en particular y la biodiversidad en general, que son actualmente difíciles de prever con precisión pero que obligan a tomar medidas adaptativas a las futuras variaciones ambientales. Para ello, la aplicación de técnicas de selección y mejora genética permite la obtención de genotipos mejor adaptados y estudiar su adaptación a distintas condiciones ambientales (Warren et al., 2005).

Asimismo, el acortamiento de estos programas de mejora, a partir de mediciones en plantas de corta edad y su extrapolación a edades mayores, es de vital importancia cuando se trata de especies arbóreas longevas. En el caso del estrés hídrico, y unido a estas técnicas de mejora, es necesario estudiar los parámetros ecofisiológicos en las distintas estirpes de plantas (procedencias, variedades, clones, etc.) que permitan comprobar su capacidad de aclimatación

y su adaptación a las condiciones de la zona de plantación (Andivia et al., 2012). Una adecuada selección de estos genotipos podrá servir para regenerar y mejorar los suelos marginales en los que se implantan, conservar sus recursos hídricos y garantizar su aprovechamiento sostenible. Por estas razones, con especial referencia a Huelva, es crucial implementar programas de mejora en resistencia a estrés hídrico en los taxones utilizados de este género, con el fin de mejorar las producciones en lugares limitantes, ampliar las plantaciones y ayudar a mitigar el impacto futuro del clima sobre ellos (Fernández et al., 2010).

1.3. Ecofisiología y parámetros morfo-fisiológicos

El primer paso a la hora de estudiar la capacidad de resistencia a estrés hídrico pasa por evaluar las pérdidas de agua a través de la parte aérea de la planta. Dichas pérdidas se conocen como transpiración, la cual no deben superar a la cantidad de agua absorbida por las raíces para poder mantener el estado de hidratación adecuado. La transpiración de las plantas puede ser considerada como un proceso físico de difusión (movimiento aleatorio neto de moléculas de agua desde el interior de la planta a la atmósfera) proporcional a la diferencia de presión de vapor de agua entre las superficies evaporantes y la atmósfera. Es la demanda evaporativa del aire la que provoca la principal pérdida de agua por medio de la transpiración, siendo necesaria la reposición continua del agua para que la planta mantenga un nivel apropiado de hidratación en sus tejidos. El clima mediterráneo, presente en la provincia de Huelva, caracterizado por inviernos templados y lluviosos y veranos secos y calurosos, varía considerablemente la demanda evaporativa entre estaciones meteorológicas, por lo que las plantas deben adaptarse a ello, siendo importante conocer la transpiración de las plantas durante un ciclo anual completo. Otras variables como la radiación, la velocidad del viento y la temperatura afectan también a la transpiración, por su efecto sobre la evaporación y sobre la difusión, al afectar a la apertura estomática y la resistencia de la capa límite (Larcher, 2006). La medida directa de la evapotranspiración forestal (evaporación directa del suelo y otras superficies más la transpiración de las plantas) es dificultosa, ya que exige la instalación de equipos especiales y costosos y mediciones continuadas en el tiempo, lo

que limita su conocimiento y utilización práctica. Por ese motivo, se han desarrollado métodos que en la mayoría de los casos incluyen medidas físicas y que permiten estimar la transpiración total de la planta a partir de un muestreo adecuado en unas pocas hojas o en intervalos de tiempo determinados (Reigosa Roger, 2001).

Por su parte, la anatomía y morfología foliar (grosor, área foliar específica, distribución de estomas, impermeabilización de la epidermis, etc.) están fuertemente relacionadas con la actividad fisiológica y el control de la transpiración, relacionadas a su vez con el crecimiento y la supervivencia. El movimiento estomático es el principal mecanismo que controla los intercambios de gases de las plantas terrestres, entre ellos el vapor de agua, y contribuye a mantener la turgencia celular (Tafur, 2014). Aparte de por los estomas, principal vía de salida del agua cuando están abiertos, también se produce transpiración a través de los tejidos en contacto con la atmósfera (principalmente las hojas), habitualmente denominada transpiración cuticular y representada por la medición de la pérdida de agua a través de la superficie foliar. En condiciones ambientales severas de escasez de agua los estomas se cierran y la cantidad residual de agua que se pierde por la superficie de las hojas está determinada por las tasas de transpiración cuticular.

2.OBJETIVOS

En este estudio, trabajando con clones monoespecíficos e híbridos de *Eucalyptus* a edad temprana (plantas de vivero menores de 1 año de edad) y evaluando su comportamiento en distintas épocas del año, fueron abordados los siguientes objetivos:

- Comparar el tamaño y distribución de estomas en las hojas, así como la tasa de transpiración con estomas abiertos y cerrados en condiciones de laboratorio entre distintos clones y híbridos.
- Medir el consumo de agua de las plantas y relacionarlo con el tamaño de estas y las variables ambientales, a fin de evaluar las necesidades de agua.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal y diseño experimental

El material vegetal utilizado fueron plantas de cinco clones de *E. globulus* (códigos de referencia: 334, 225, 227, 358, 437) y cuatro clones de híbridos (*E. urograndis*, 12€; *E. urograndis x globulus*, HE; *E. dunnii-grandis x globulus*, HG; *E. saligna x maidenii*, HI), obtenidas a partir del enraizamiento de estaquillas en vivero comercial y procedentes del programa de selección y mejora vegetal de la empresa ENCE, energía y celulosa S.A.

Las plantas fueron cultivadas en contenedores de 10 L y 100 L de capacidad, entre los meses de diciembre de 2014 y diciembre de 2015. Se usaron 4 plantas por clon y tipo de envase. El sustrato consistió en una mezcla de turba, fibra de coco y perlita (2:2:1, v/v), bien regados según necesidad y fertilizados con Ferticote 16-7-8 + 2 MgO + Micros (Burés profesional S.A., España) a la dosis de 1.5 kg m⁻³. Las plantas estaban situadas al aire libre, totalmente expuestas a la luz solar, en una parcela experimental de la Universidad de Huelva, en el Campus de La Rábida.

3.2. Tamaño y distribución de los estomas

En cuatro épocas del año (hojas de primavera, verano, otoño e invierno) se tomaron 2-4 hojas por clon. De dichas hojas, se extrajeron huellas o impresiones (impresión foliar) hechas con laca base de uñas teñida de color rosa o naranja con el objetivo de distinguir los estomas. Las impresiones se obtuvieron de la cara abaxial de las hojas, una vez comprobado que en el lado adaxial no habían estomas o eran extremadamente escasos. La imagen grabada en la película de laca de uñas se montó sobre un portaobjetos que permitía su visualización al microscopio óptico (Figura 3). Una cámara de vídeo, acoplada a un software captador de imágenes (Leica LAS EZ, Leica Microsystems), montada sobre el microscopio nos permitió tomar fotos de las preparaciones hechas. Fue necesaria la captura de fotos con aumento 100x para la densidad (d ; número de estomas por mm²), y 400x para las

dimensiones de ancho y largo, tanto de células oclusivas (AO, LO, respectivamente) como de las subsidiarias (AS, LS). En la Figura 4 se muestra un ejemplo de las imágenes captadas.

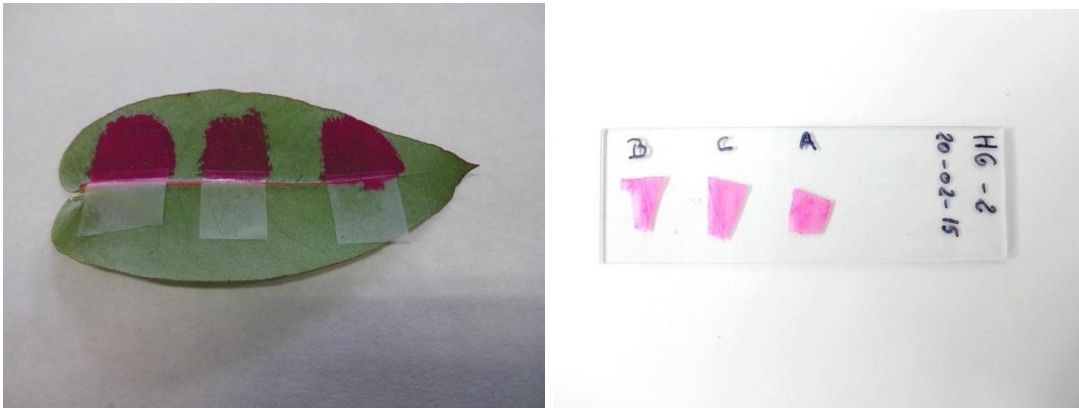


Figura 3. (Izda.) Técnica de coloración con laca de uña para la visualización de la imagen del molde de los estomas en el microscopio. (Dcha.) Muestra montada sobre un portaobjetos.

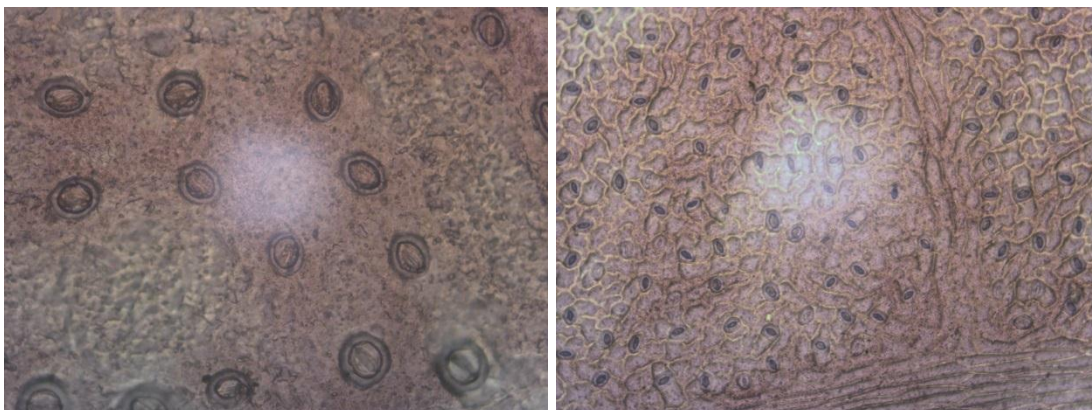


Figura 4. (Izda.) Estomas en aumento de 400x para la medición de las dimensiones, largo y ancho; (Dcha.) Estomas vistos en aumento de 100x para medición de la densidad.

Las muestras fueron tomadas de tres zonas de la hoja (base, centro y ápice), con el objetivo de constatar si existen diferencias entre zonas. De cada hoja y zona se tomaron dos fotos aleatoriamente. Para determinar la densidad, se contabilizaron el número de estomas presentes en cuadrículas tomadas al azar de tamaño 250 x 250 micras (0.0625 mm^2). Se midieron 10 cuadrículas por zona y hoja; y para las dimensiones, fueron medidos 31 estomas de cada zona de cada hoja, escogidos aleatoriamente. El software utilizado para ambas mediciones fue ImageJ.

3.3. Transpiración cuticular (E_c) y área foliar específica (SLA)

Siguiendo metodología estándar presente en la bibliografía (Carevic et al., 2010), se realizaron mediciones en hojas juveniles, pero completamente desarrolladas, crecidas en cuatro épocas del año (febrero, mayo, julio y noviembre) correspondientes al tercer verticilo superior de los tallos. Se tomaron tres hojas por clon, de tres plantas diferentes, en cada fecha de medición. Una vez recolectadas e hidratadas hasta saturación (en oscuridad, a 4 °C durante 16 h), se tomaron pesos sucesivos en intervalos de tiempo reducidos (cada 5 minutos durante la primera hora, cada 10 minutos las 2 horas siguientes y cada 20 minutos posteriormente, hasta la comprobación en el gráfico generado de que la caída de peso era constante en el tiempo) (Figura 1). Las hojas se exponían a la luz, con la cara abaxial hacia abajo y sobre una rejilla, para permitir la libre circulación del aire por ambas caras, en ambiente climatizado a (20-23) °C y (45-60) % de humedad relativa.

Con los datos tomados (peso fresco con precisión $\pm 0,1$ mg, y tiempo en minutos) se pudo representar gráficamente la pérdida de agua o transpiración de la hoja en el tiempo (Figura 2). En una primera fase, la transpiración ocurre a través de los estomas (transpiración estomática, E_e) y de la epidermis foliar (transpiración cuticular, E_c), pero tras el cierre de los estomas, solo queda E_c . Posteriormente, terminado el pesaje, las hojas fueron escaneadas para determinar el área foliar (AF) con la ayuda del software ImageJ. Asimismo, seguidamente, se llevaron a estufa hasta peso constante a 80 °C para determinar su peso seco (PS). Con estos últimos datos se pudo calcular el área foliar específica ($SLA = AF/PS$, $m^2 kg^{-1}$).

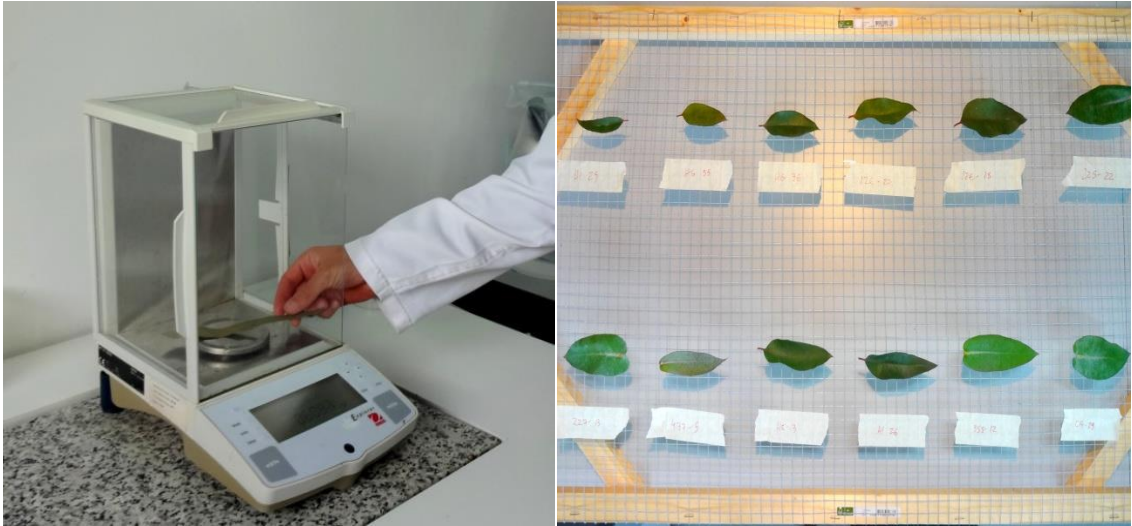


Figura 1. (Izda.) Balanza de precisión utilizada en el pesaje de las hojas para la determinación de la tasa de transpiración cuticular (E_c) y parámetros derivados. (Dcha.) Hojas expuestas en una rejilla elevada sobre la mesa del laboratorio durante las mediciones.

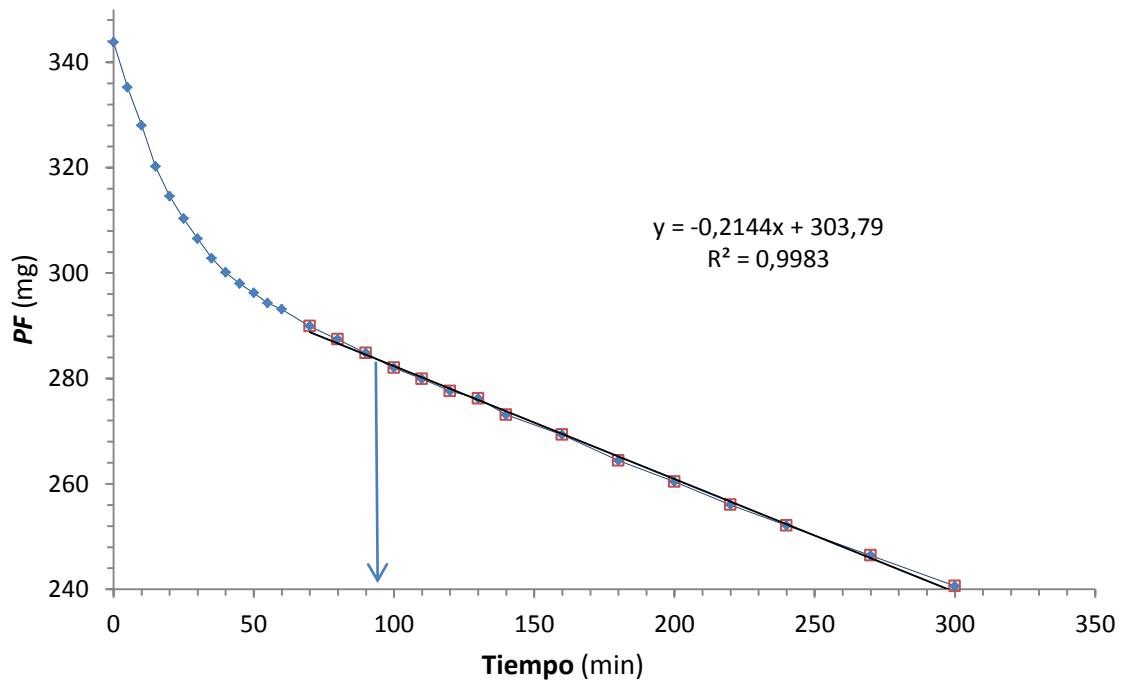


Figura 2. Ejemplo de representación gráfica de las mediciones tomadas y de algunos parámetros derivadas de ellas. La flecha indica el tiempo transcurrido hasta el cierre estomático (t_c); la pendiente de la recta de regresión ($y = a x + b$) es considerada la tasa de transpiración cuticular (E_c). PF: peso fresco.

Con las mediciones tomadas y la representación gráfica realizada se pudieron estimar varios parámetros, tales como: tasa de transpiración total al inicio ($E_t = E_e + E_c$) y tasa de transpiración cuticular (E_c), referidas tanto al peso seco como a superficie foliar; tiempo transcurrido hasta el cierre de los estomas (t_c); contenido hídrico relativo y contenido de humedad en el momento del cierre estomático (CHR_c y H_c , respectivamente).

3.4. Transpiración diaria (T)

Para determinar el consumo diario de agua por las plantas se utilizaron 36 plantas (4 plantas por clon), crecidas en contenedores de 10 y 100 L, y se midieron en distintas fechas a lo largo del año. El método utilizado consistió en el pesaje directo en balanza de precisión (± 5 g para contenedores de 10 L, y ± 50 g para los de 100 L) del conjunto planta-contenedor (que suponían unos 5 y 50 kg de media, respectivamente). El consumo de agua por parte de las plantas se evaluó mediante la diferencia de peso de los contenedores en medidas tomadas en dos días consecutivos. Las plantas eran regadas hasta superar la capacidad de campo y se colocaba en la parte superior del contenedor un plástico blanco que cubría toda la superficie de este, evitando así la pérdida de agua por evaporación directa desde la superficie del sustrato. Seguidamente se dejaba drenar completamente toda el agua gravimétrica durante 2-4 h, momento en el que se realizaba la primera pesada (peso inicial del conjunto planta-contenedor, P_i), tomada entre las 10 y las 11 h de la mañana, para evitar la acumulación de rocío en la parte aérea. Transcurridas 24 h desde el peso inicial se volvían a pesar, determinando el peso final (P_f). La diferencia entre P_f y P_i nos proporcionaba el agua transpirada por la planta en un día completo (Figura 5).

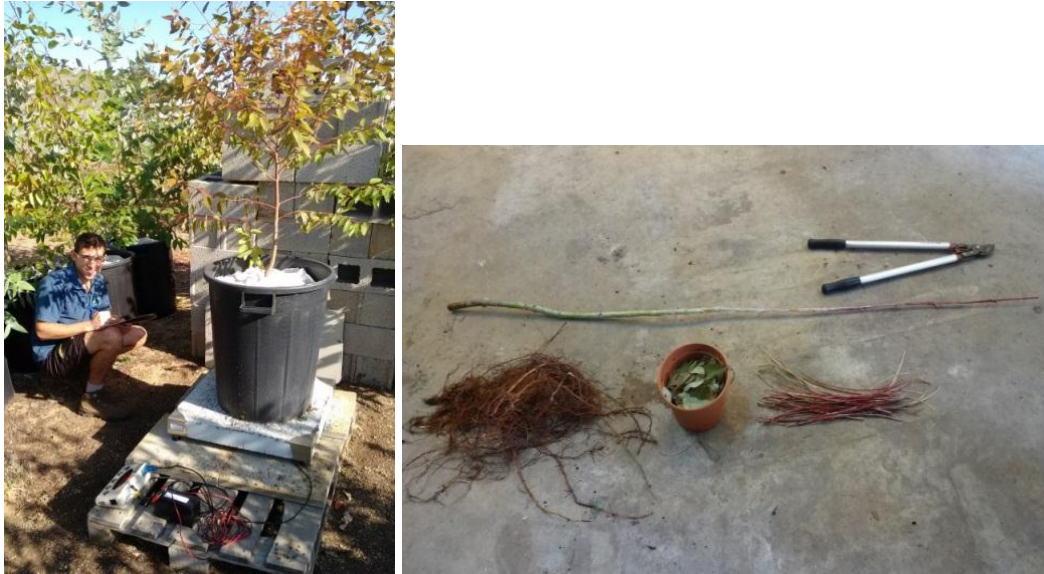


Figura 5. (Izda.) pesaje de las plantas en contenedores de 100 L; (Dcha.) separación de la planta en partes en la cosecha final, para la estimación de la distribución de biomasa, de la superficie foliar y su relación alométrica con el diámetro y la altura.

Asimismo, para poder relacionar el agua transpirada con el tamaño de las plantas, especialmente con la superficie foliar transpirante (SF), en cada una de las fechas se midió la altura (H) y el diámetro en la base del tronco principal (D), se contó el número de hojas (N_{hj}) y se estimó la superficie foliar específica (SLA), siguiendo la metodología de Andivia et al. (2013). Al final del ensayo, las plantas se cosecharon y se determinó H , D , N_{hj} , el peso seco de hojas (PS_{hj}), tallos (PS_{tl}) y raíces (PS_{rz}) y SLA (Figura 5). Con estos datos se pudo determinar la superficie foliar total de cada planta ($SF = SLA PS_{hj}$), así como construir relaciones alométricas para cada clon, que nos permitieron estimar SF para cada una de las fechas de medición anteriores (de las que conocíamos D , H y N_{hj} pero no SF). En la Tabla 1 se puede observar el tamaño de las plantas en el momento de la plantación y a la finalización del ensayo.

Tabla 1. Valores medios de la altura (H , cm) y el diámetro en la base (D , mm) de los distintos genotipos ensayados en la primera (21/10/2014) y última fecha de medición (30/06/2015), para las mediciones de consumo diario de agua.

Clon	Inicio ensayo		Fin ensayo	
	H	D	H	D
HE	68.3	8.11	189.8	28.64
HG	77.5	10.16	173.8	23.05
HI	81.8	10.68	178.0	31.88
12€	107.7	12.40	249.3	41.76
358	87.8	10.61	230.5	25.86
437	67.5	7.53	222.3	26.01
227	69.3	10.80	218.3	33.41
225	79.5	9.08	183.7	26.65
C14	56.3	6.65	191.5	24.22

En cada fecha de medición se registró, en intervalos de 10 minutos, la velocidad del viento con un anemómetro (PCE-WL 1), la radiación solar con un dosímetro de radiación solar (MacSolar, SLM018c-2), la temperatura y la humedad relativa del aire con un dispositivo HOBO® Pro v2. Estas cuatro variables ambientales influyen en la transpiración de la planta y deben ser siempre tenidas en consideración en ese tipo de estudios.

A partir de los datos medidos del consumo de agua diario de las plantas en los contenedores, fueron calculadas las tasas de transpiración diarias en base al área foliar (T_{LA} , L m⁻² día⁻¹), al peso seco foliar (T_{LW} , L kg⁻¹ día⁻¹) y al área de la sección transversal del tallo principal (T_{St} , L cm⁻² día⁻¹). Como primera aproximación, y sin pretender profundizar en esta primera etapa de análisis, mediante regresión lineal múltiple, paso a paso, se ajustaron los respectivos modelos de predicción utilizando como variables independientes las humedades relativas media y mínima diarias del aire (RH, %), la velocidad media diaria del viento (v , ms⁻¹), la temperatura media diaria (T , °C) y la radiación solar acumulada diaria (R , MJ m² día⁻¹), mediante el paquete estadístico SPSS 15.0 (IBM).

3.5. Análisis de datos

El análisis de los datos se realizó siguiendo un Modelo Lineal General. Para los datos de transpiración cuticular y estomas se llevó a cabo un ANOVA de dos (clon, fecha) o tres factores (clon, fecha, zona), dependiendo de la variable analizada. Todos los factores se consideraron fijos. Para la estimación

de la tasa de transpiración diaria en plantas completas se realizó un ANOVA de medidas repetidas en el que el consumo fue tomado como variable dependiente, la fecha de ensayo como efecto intrasujetos y el clon como efecto fijo intersujetos. Las diferencias significativas entre los grupos de los distintos factores fueron analizadas mediante el test de Tukey HSD o T3 de Dunnett, en función de si las varianzas eran iguales o no, respectivamente, tras aplicarles la prueba de Levene. El efecto de las variables ambientales sobre el consumo de agua se analizó mediante regresión lineal múltiple, mientras que las ecuaciones alométricas que relacionaban *D*, *H*, *SF* y pesos secos fue mediante correlación de Pearson. En cada fecha de medición, los datos de las variables ambientales se calcularon como el valor medio diario (de los datos registrados desde el inicio hasta el final de las pesadas de esa fecha), excepto el de radiación solar que se consideró el valor acumulado de todo el día. También se consideró la inclusión de dichas variables como covariables en los ANOVAs realizados. Todas las diferencias significativas se consideraron para un $\alpha = 0.05$. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el software SPSS 15.0 (IBM).

4. RESULTADOS

4.1. Estomas

4.1.1. Densidad

Comparando los estomas en hojas crecidas y recolectadas en las cuatro épocas del año, se detectaron diferencias entre los distintos clones ($p < 0.001$), entre fechas ($p < 0.001$) pero no entre las tres partes de las hojas (base, centro y ápice) (Tablas 2 y 3). Asimismo, para las distintas interacciones entre los tres factores, solamente la interacción Clon x Fecha resultó significativa ($p < 0.001$), indicando un patrón de evolución temporal distinto entre clones (Figura 6).

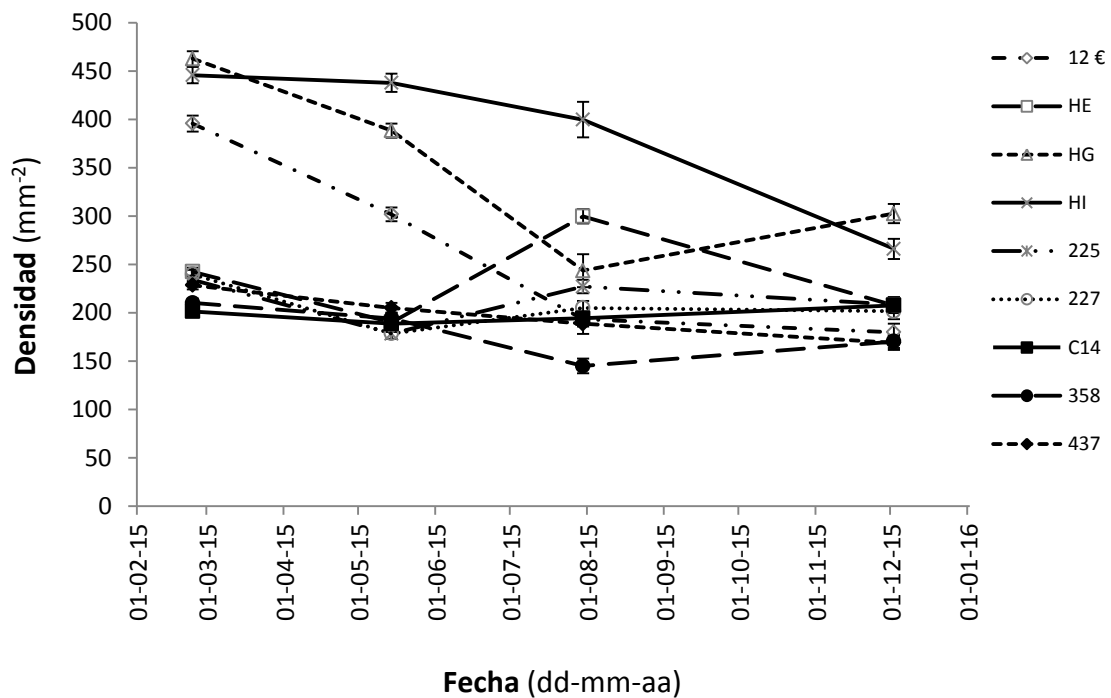


Figura 6. Valores medios (\pm ET) de la densidad (d) de estomas en las cuatro fechas de medición de los nueve clones estudiados.

Tabla 2. Valores medios (\pm ET) de la densidad (d), ancho (AO) y largo (LO) de las células oclusivas, así como la relación entre el ancho y el largo, de los estomas de los distintos genotipos ensayados y fechas de medición. p = nivel de significación. Para cada factor principal (clon, fecha) letras distintas en cada columna indican diferencias significativas.

Clon	d (n ^o / mm ²)	LO (μ m)	AO (μ m)	AO/LO
Total	266.7 \pm 2.0	13.95 \pm 0.03	9.80 \pm 0.04	0.71 \pm 0.01
Clon				
12 €	320.0 \pm 6.1 d	12.17 \pm 0.06 a	8.15 \pm 0.04 a	0.681 \pm 0.004 a
HE	227.8 \pm 3.9 c	15.04 \pm 0.09 c	10.62 \pm 0.07 ef	0.715 \pm 0.004 bc
HG	387.8 \pm 6.3 e	12.43 \pm 0.07 a	8.74 \pm 0.05 b	0.713 \pm 0.004 bc
HI	409.2 \pm 6.3 e	12.40 \pm 0.07 a	8.66 \pm 0.05 b	0.706 \pm 0.004 bc
225	216.2 \pm 2.8 bc	14.04 \pm 0.10 b	10.21 \pm 0.08 d	0.735 \pm 0.004 d
227	214.5 \pm 3.1 bc	14.67 \pm 0.09 c	10.41 \pm 0.07 de	0.718 \pm 0.004 cd
C14	198.1 \pm 2.4 a	15.81 \pm 0.09 d	10.96 \pm 0.07 g	0.700 \pm 0.004 b
358	196.3 \pm 3.1 a	13.88 \pm 0.07 b	9.66 \pm 0.05 c	0.705 \pm 0.004 bc
437	209.5 \pm 3.1 ab	14.93 \pm 0.08 c	10.89 \pm 0.07 fg	0.734 \pm 0.004 d
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Fecha				
Febrero	296.7 \pm 3.0 c	15.02 \pm 0.05 d	10.05 \pm 0.05 c	0.672 \pm 0.002 a
Mayo	251.7 \pm 3.7 b	14.27 \pm 0.05 c	10.24 \pm 0.04 d	0.729 \pm 0.002 b
Julio	237.8 \pm 5.4 b	13.09 \pm 0.07 b	9.60 \pm 0.05 b	0.741 \pm 0.003 c
Noviembre	212.6 \pm 3.2 a	12.20 \pm 0.05 a	8.74 \pm 0.04 a	0.722 \pm 0.003 b
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Tabla 3. Valores medios (\pm ET) de la densidad (d), ancho (AO) y largo (LO) de las células oclusivas (LO), así como de la relación entre el ancho y el largo, de los estomas evaluados en cada zona de la hoja (A, ápice; B, base; C, centro). p = nivel de significación. Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas.

Zona	d (n ^o / mm ²)	LO (μ m)	AO (μ m)	AO/LO
A	272.8 \pm 3.4 a	14.24 \pm 0.05 c	9.96 \pm 0.04 c	0.708 \pm 0.002 a
B	261.7 \pm 3.5 a	13.64 \pm 0.05 a	9.64 \pm 0.04 a	0.714 \pm 0.002 a
C	265.7 \pm 3.4 a	13.94 \pm 0.05 b	9.79 \pm 0.04 b	0.711 \pm 0.002 a
p	0.369	<0.001	<0.001	0.027

4.1.2. Longitud (LO) y anchura (AO) de las células oclusivas

Se detectaron diferencias significativas, tanto para LO como para AO , entre los distintos clones ($p < 0.001$), fechas ($p < 0.001$) y zonas de la hoja ($p < 0.001$), aunque muy pequeñas en valor absoluto para este último factor (Tabla

3). Asimismo, para la interacción Clon x Fecha, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.001$) (Figuras 7 y 8).

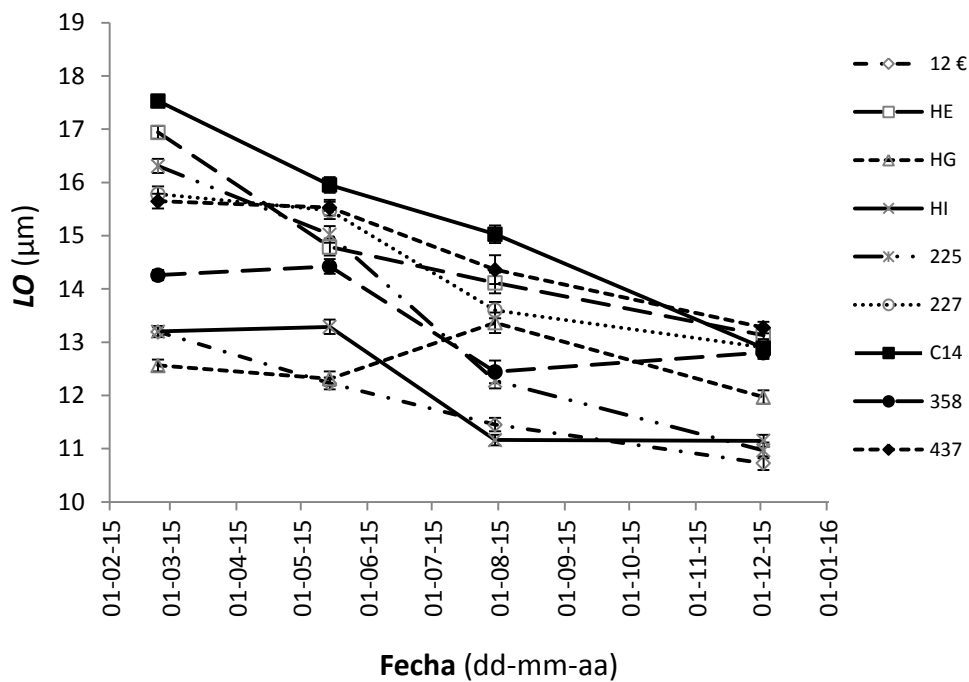


Figura 7. Longitud de las células oclusivas de los estomas (LO) de los nueve clones estudiados en las cuatro fechas de medición (media \pm ET).

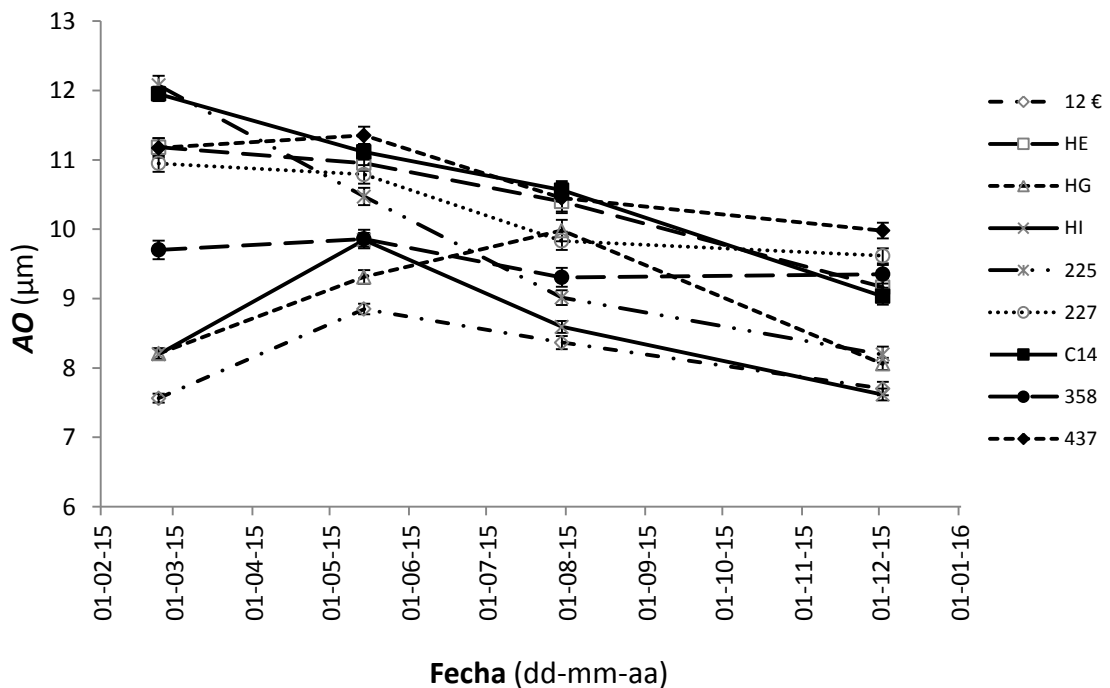


Figura 8. Ancho de las células oclusivas de los estomas (AO) de los nueve clones estudiados en las cuatro fechas de medición (media \pm ET).

4.1.3. Ratio entre el ancho y el largo de las células oclusivas (AO/LO)

Se detectaron diferencias entre los distintos clones y entre fechas de medición ($p < 0.001$) (Tabla 2). Entre zonas de las hojas también se encontraron diferencias significativas ($p = 0.027$), pero resultaron tan pequeñas en valor absoluto que el test T3-Dunnett no las diferenció en grupos homogéneos separados (Tabla 3). Para la interacción Clon x Fecha, se detectaron asimismo diferencias significativas ($p < 0.001$) (Figura 9).

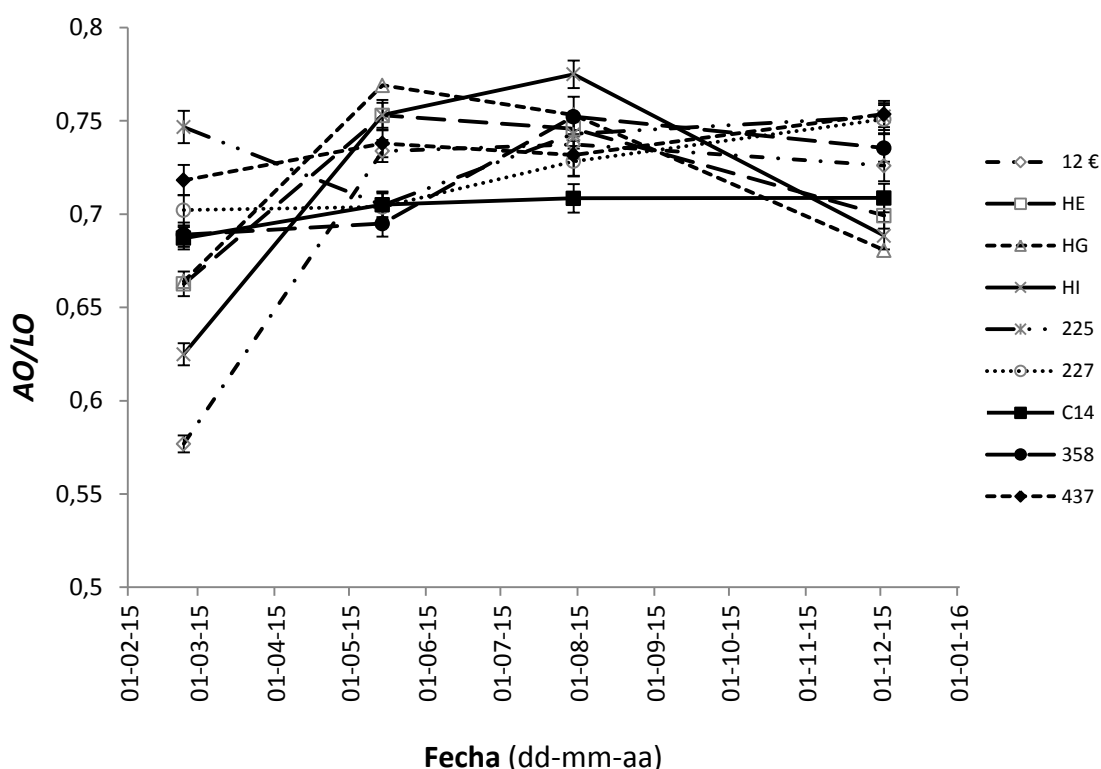


Figura 9. Relación entre el ancho y el largo de las células oclusivas de los estomas (AO/LO) de los nueve clones estudiados en las cuatro fechas de medición (media \pm ET).

4.1.4. Correlaciones entre parámetros

Las correlaciones de los ocho parámetros evaluados (ancho y largo de células oclusivas (AO, LO) y subsidiarias (AS y LS), ratio entre ancho y largo de las subsidiarias (AS/LS), ratio entre ancho y largo de las oclusivas (AO/LO), ratio entre el ancho de las oclusivas y de las subsidiarias (AO/AS) y ratio entre el largo de las oclusivas y de las subsidiarias (LO/LS), están presentadas en la Tabla 4.

Tabla 4. Coeficientes de correlación entre los ocho parámetros evaluados en los estomas para el conjunto de todos los clones. N = 9114 para todos ellos. El nivel de significación (p) resultó < 0.01 en todos los casos.

	<i>LS</i>	<i>AS</i>	<i>LO</i>	<i>AO</i>	<i>AS/LS</i>	<i>AO/LO</i>	<i>AO/AS</i>	<i>LO/LS</i>
<i>LS</i>	1							
<i>AS</i>	0.723	1						
<i>LO</i>	0.778	0.585	1					
<i>AO</i>	0.614	0.780	0.670	1				
<i>AS/LS</i>	-0.214	0.507	-0.136	0.330	1			
<i>AO/LO</i>	-0.119	0.302	-0.313	0.477	0.575	1		
<i>AO/AS</i>	-0.097	-0.240	0.175	0.405	-0.231	0.311	1	
<i>LO/LS</i>	-0.186	-0.099	0.461	0.175	0.092	-0.334	0.406	1

LS ($21.24 \pm 0.04 \mu\text{m}$) se correlacionó significativamente con *LO* a través de la ecuación $LS = 6.323 + 1.070 LO$ ($r = 0.778$, $p < 0.001$). *LS* presentó un rango de $8.45 \mu\text{m}$ a $38.43 \mu\text{m}$. Por su parte, *AS* ($16.05 \pm 0.04 \mu\text{m}$) se correlacionó significativamente con *AO* a través de la ecuación $AS = 4.414 + 1.187 LO$ ($r = 0.780$, $p < 0.001$). *AS* presentó un rango entre $5.08 \mu\text{m}$ y $32.94 \mu\text{m}$. No se han presentado con más detalle los resultados obtenidos para *AS* y *LS* debido a las altas y significativas correlaciones de estos dos parámetros con *AO* y *LO*, respectivamente, así como su similar evolución temporal y diferenciación entre clones.

Los restantes parámetros no presentaron altas correlaciones entre sí ni con los demás parámetros, a pesar de la significación obtenida (Tabla 4). Los valores obtenidos fueron: $AS/LS = 0.760 \pm 0.001$ (rango de 0.303 a 1.302); $AO/AS = 0.615 \pm 0.001$ (rango de 0.308 a 1.007); y $LO/LS = 0.659 \pm 0.001$ (rango de 0.274 a 0.960).

4.2. Transpiración cuticular y parámetros relacionados

4.2.1. Contenido hídrico relativo en el momento del cierre estomático (CHR_c)

Comparando las hojas recolectadas en las cuatro estaciones del año, se detectaron diferencias significativas entre los distintos clones ($p = 0.002$) y entre fechas ($p < 0.001$), pero entre los clones las diferencias resultaron tan

pequeñas que el test T3-Dunnett no las diferenció en grupos homogéneos separados (Tabla 5). Para la interacción Clon x Fecha, se detectaron asimismo diferencias significativas ($p < 0.001$) (Figura 10).

Tabla 5. Valores medios (\pm ET) del contenido hídrico relativo (CHR_c), el tiempo transcurrido (t_c), y el contenido de humedad (H_c) en el cierre de los estomas y el *área foliar específica* (SLA) de las hojas de los distintos genotipos ensayados, fechas de medición. p = nivel de significación. Para cada factor (clon, fecha) letras distintas en cada columna indican diferencias significativas.

	CHR_c (%)	t_c (min)	H_c (%)	SLA ($m^2\ kg^{-1}$)
Total	79.23 \pm 0.79	71.13 \pm 2.39	61.19 \pm 0.52	11.26 \pm 0.27
Clon				
12 €	79.35 \pm 1.72 a	62.19 \pm 5.02 a	62.52 \pm 1.75 ab	14.56 \pm 0.93 b
HE	72.19 \pm 2.51 a	91.20 \pm 7.99 a	59.22 \pm 1.39 a	9.70 \pm 0.55 a
HG	81.16 \pm 2.30 a	72.07 \pm 8.05 a	65.16 \pm 0.76 b	13.84 \pm 0.43 b
HI	81.18 \pm 2.19 a	60.00 \pm 6.19 a	60.90 \pm 1.55 ab	11.21 \pm 0.83 ab
225	79.50 \pm 2.52 a	66.80 \pm 5.74 a	59.43 \pm 2.24 ab	9.90 \pm 0.75 a
227	77.01 \pm 2.80 a	80.50 \pm 11.82 a	59.27 \pm 2.13 ab	10.03 \pm 0.89 ab
C14	79.70 \pm 2.16 a	72.92 \pm 5.44 a	61.15 \pm 1.16 ab	9.71 \pm 0.52 a
358	80.72 \pm 2.42 a	68.38 \pm 5.12 a	60.74 \pm 1.24 ab	10.71 \pm 0.41 a
437	82.29 \pm 2.12 a	67.33 \pm 6.89 a	60.96 \pm 1.58 ab	10.16 \pm 0.50 a
p	0.002	0.137	0.005	<0.001
Fecha				
Febrero	73.15 \pm 1.17 a	86.29 \pm 3.32 b	58.68 \pm 0.58 a	11.536 \pm 0.291 b
Mayo	82.87 \pm 0.76 b	81.30 \pm 4.33 b	60.38 \pm 0.61 a	10.069 \pm 0.327 a
Julio	79.16 \pm 1.68 b	50.10 \pm 2.73 a	59.37 \pm 1.49 a	9.919 \pm 0.730 ab
Noviembre	81.38 \pm 2.51 b	48.96 \pm 1.53 a	67.71 \pm 1.09 b	14.124 \pm 0.720 c
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

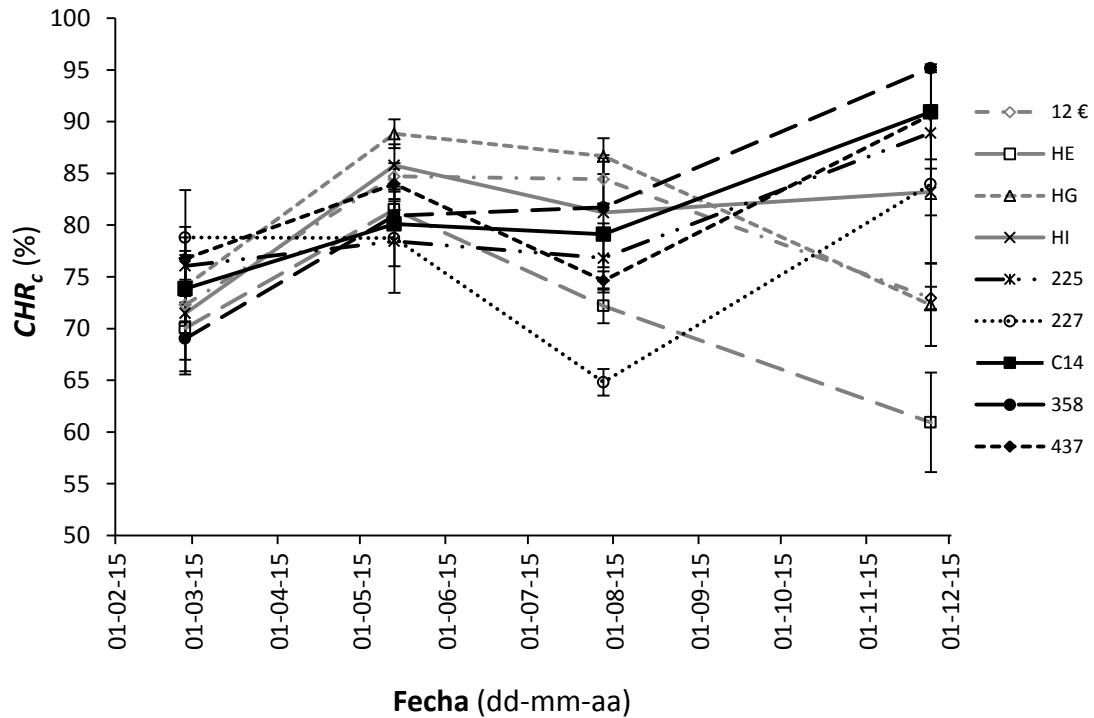


Figura 10. Valores medios (\pm ET) del contenido hídrico relativo en el momento del cierre estomático (CHR_c) de hojas de los nueve clones estudiados en las cuatro fechas de medición.

4.2.2. Tiempo transcurrido hasta el cierre de los estomas (t_c)

No se detectaron diferencias significativas entre los distintos clones ($p = 0.137$) y tampoco para la interacción Clon x Fecha ($p < 0.639$) (Figura 11), indicando un patrón de evolución temporal semejante, aunque fueron detectadas diferencias significativas entre fechas ($p < 0.001$) (Tabla 5).

4.2.3. Contenido de humedad en el momento del cierre estomático (H_c)

Se detectaron diferencias significativas entre los distintos clones ($p = 0.005$), entre fechas ($p < 0.001$) y en la interacción Clon x Fecha ($p = 0.012$) (Figura 12), aunque pequeñas para el primer factor (Tabla 5).

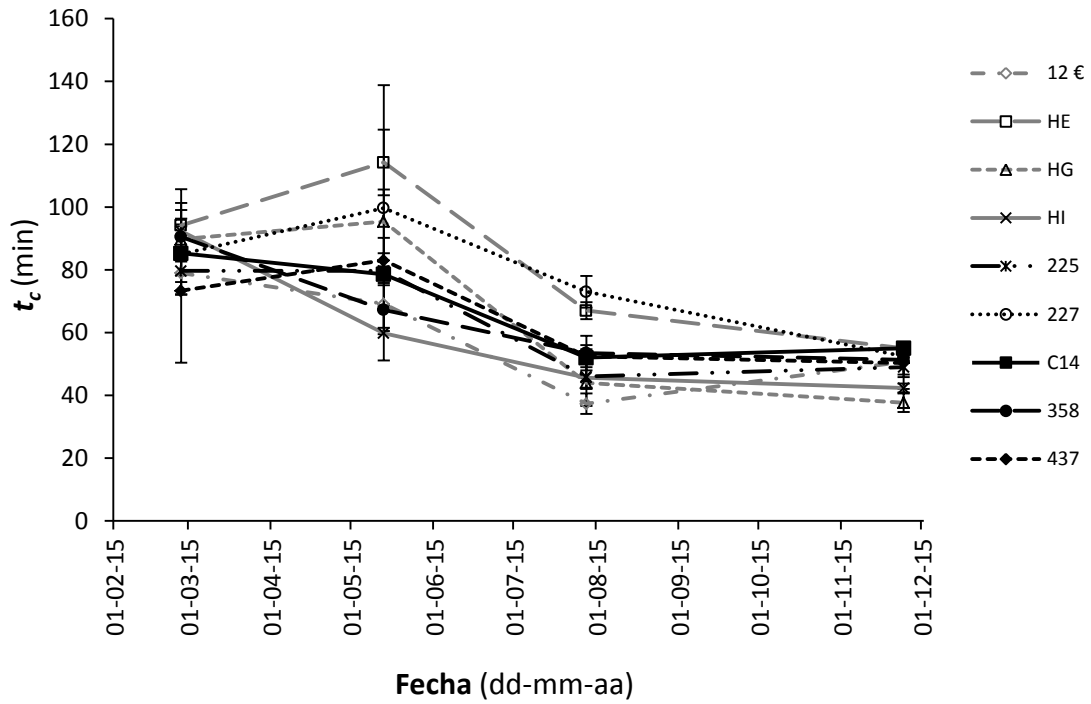


Figura 11. Tiempo transcurrido hasta el cierre de los estomas (t_c) de los nueve clones estudiados en las cuatro fechas de medición (media \pm ET).

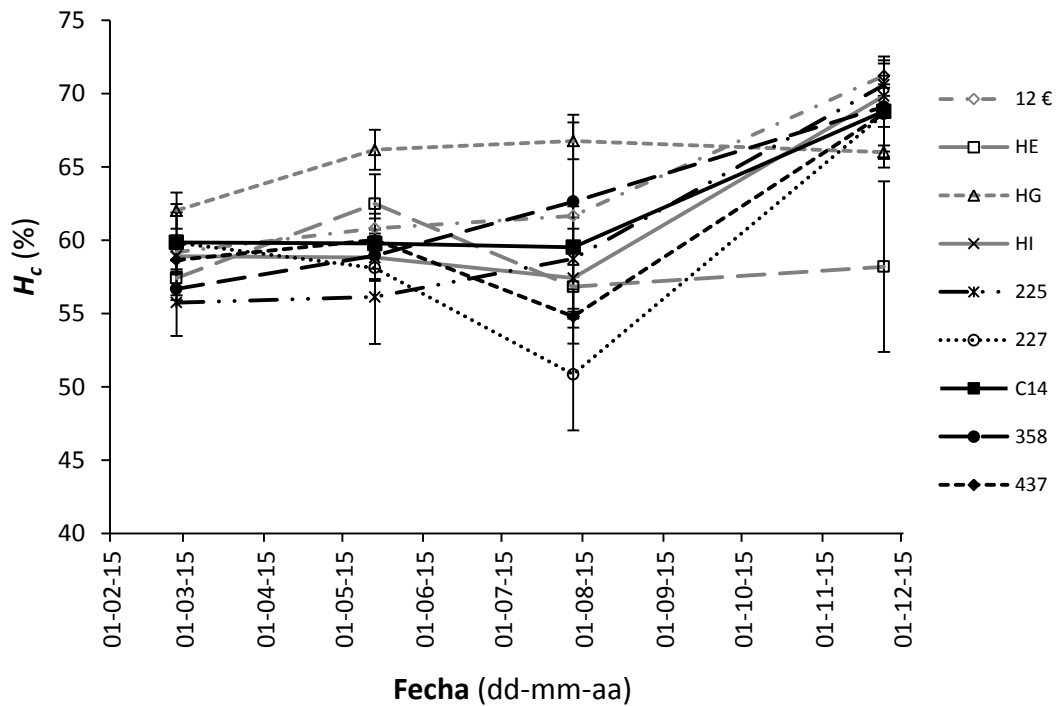


Figura 12. Contenido de humedad al cierre de los estomas (H_c) de los nueve clones estudiados en las cuatro fechas de medición (media \pm ET).

4.2.4. Área foliar específica (SLA)

Se detectaron diferencias entre los distintos clones, fechas de medición ($p < 0.001$) (Tabla 5) y para la interacción Clon x Fecha ($p < 0.014$) (Figura 13).

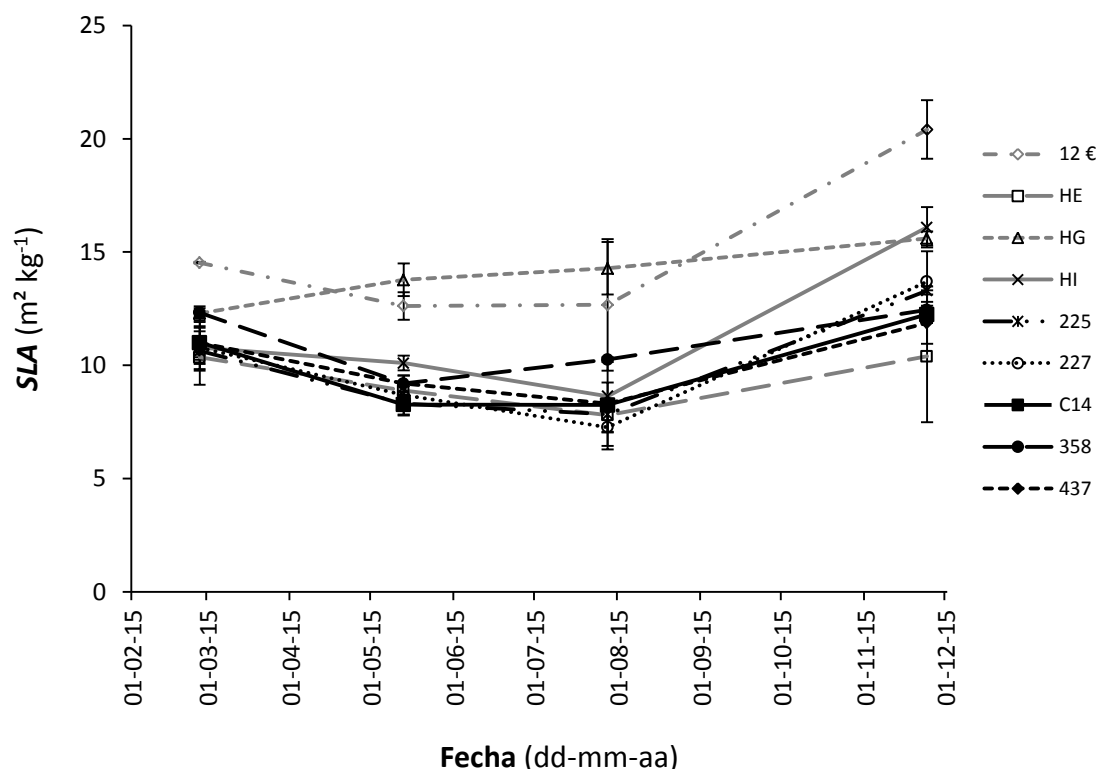


Figura 13. Área foliar específica (SLA) de los nueve clones estudiados en las cuatro fechas de medición (media \pm ET).

4.2.5. Tasa de transpiración cuticular (E_c) y de transpiración total al inicio (E_t)

Se detectaron diferencias significativas, tanto para E_c como para E_t (en base al peso seco o al área foliar) entre los distintos clones y fechas de medición (Tabla 6). Asimismo, para la interacción Clon x Fecha, se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.001$) (Figuras 14 a 17).

Tabla 6. Valores medios (\pm ET) de la tasa de transpiración total al inicio (E_t) y de la tasa de transpiración cuticular (E_c) de las hojas de los distintos clones ensayados y fechas de medición. p = nivel de significación. Para cada factor (clon, fecha) letras distintas en cada columna indican diferencias significativas.

	E_t ($\text{mmol kg}^{-1} \text{s}^{-1}$)	E_c ($\text{mmol kg}^{-1} \text{s}^{-1}$)	E_t ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	E_c ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Total	8.24 \pm 0.57	1.85 \pm 0.11	0.724 \pm 0.042	0.170 \pm 0.012
Clon				
12 €	12.05 \pm 2.21 a	1.59 \pm 0.25 ab	0.779 \pm 0.107 a	0.103 \pm 0.010 a
HE	7.56 \pm 1.81 a	3.13 \pm 0.47 b	0.745 \pm 0.149 a	0.326 \pm 0.046 b
HG	10.48 \pm 2.50 a	2.22 \pm 0.31 ab	0.724 \pm 0.157 a	0.160 \pm 0.022 ab
HI	8.07 \pm 1.13 a	1.67 \pm 0.23 ab	0.741 \pm 0.110 a	0.152 \pm 0.024 a
225	9.70 \pm 1.60 a	1.45 \pm 0.21 ab	1.010 \pm 0.181 a	0.153 \pm 0.033 ab
227	6.69 \pm 0.95 a	2.44 \pm 0.57 ab	0.697 \pm 0.130 a	0.258 \pm 0.074 ab
C14	6.54 \pm 0.90 a	1.43 \pm 0.25 ab	0.682 \pm 0.105 a	0.141 \pm 0.020 a
358	6.20 \pm 0.75 a	1.19 \pm 0.10 a	0.599 \pm 0.078 a	0.109 \pm 0.007 a
437	6.09 \pm 1.07 a	1.51 \pm 0.16 ab	0.605 \pm 0.118 a	0.150 \pm 0.018 a
p	<0.001	< 0.001	0.014	<0.001
Fecha				
Febrero	7.55 \pm 0.39 b	1.91 \pm 0.14 b	0.628 \pm 0.033 b	0.162 \pm 0.013 b
Mayo	4.53 \pm 0.40 a	1.12 \pm 0.07 a	0.477 \pm 0.045 a	0.115 \pm 0.009 a
Julio	11.86 \pm 0.88 c	1.83 \pm 0.26 ab	1.236 \pm 0.075 c	0.222 \pm 0.044 ab
Noviembre	12.85 \pm 2.13 bc	3.07 \pm 0.34 c	0.878 \pm 0.133 bc	0.235 \pm 0.034 b
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

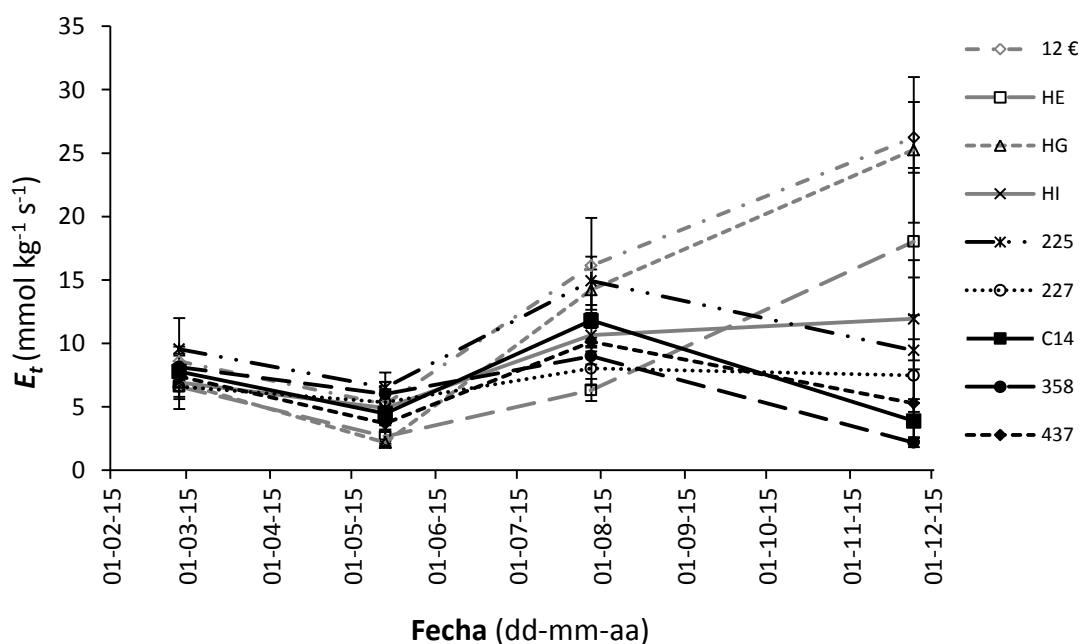


Figura 14. Tasa de transpiración total al inicio (E_t) en base al peso seco, de los nueve clones estudiados en las cuatro fechas de medición (media \pm ET).

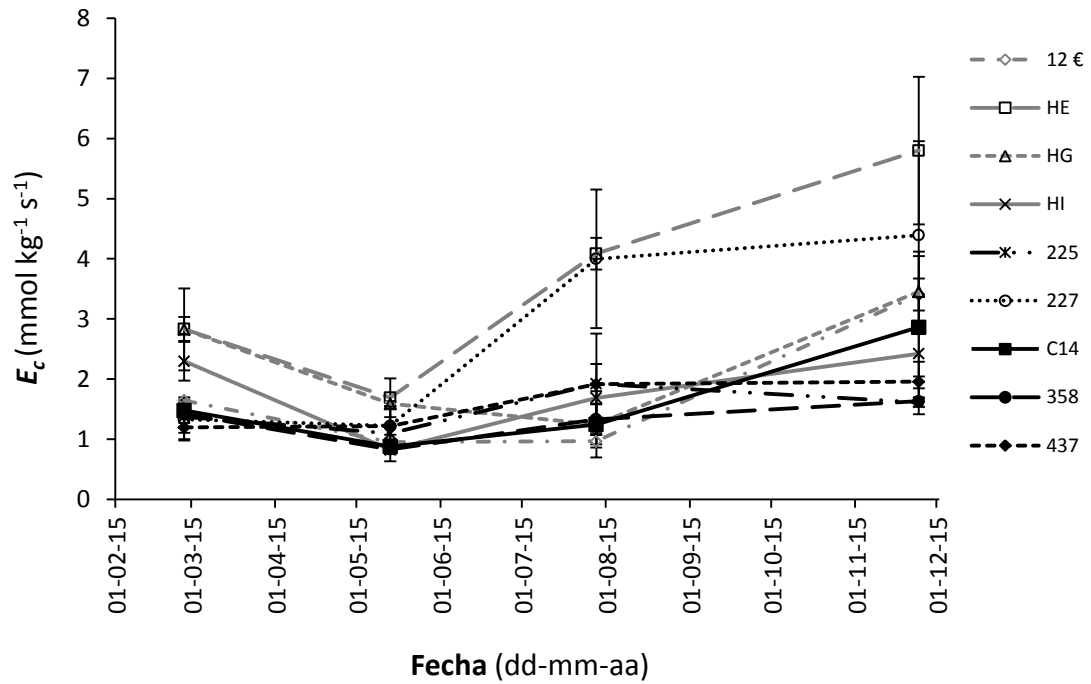


Figura 15. Tasa de transpiración cuticular (E_c) en base al peso seco, de los nueve clones estudiados en las cuatro fechas de medición (media \pm ET).

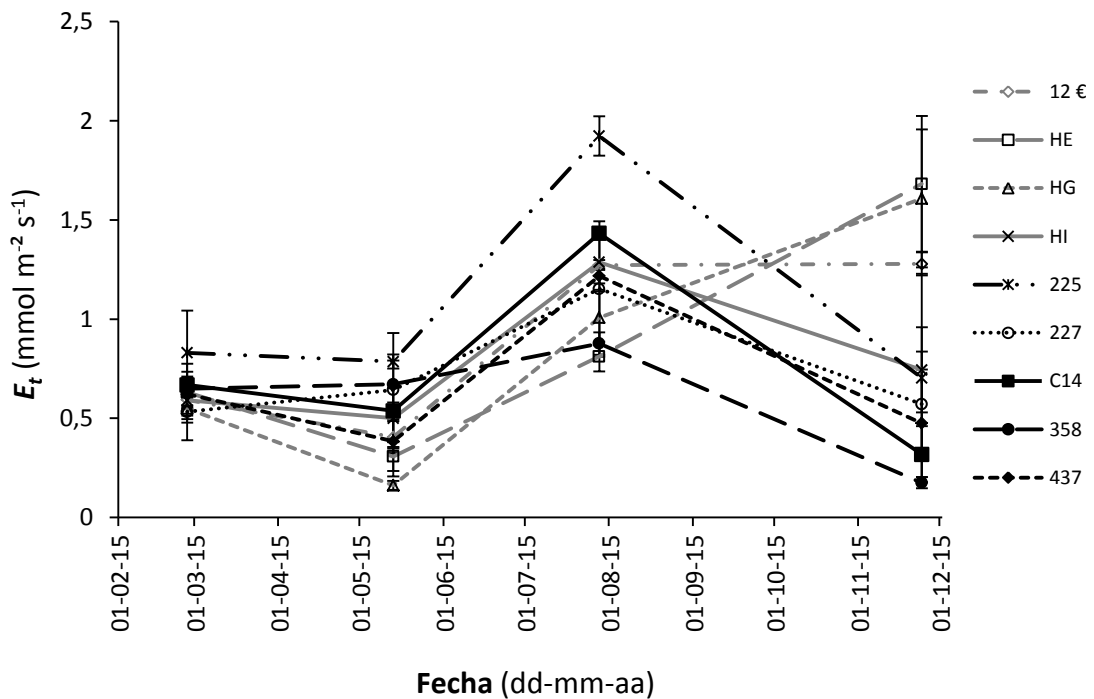


Figura 16. Tasa de transpiración total al inicio (E_t) en base al área foliar, de los nueve clones estudiados en las cuatro fechas de medición (media \pm ET).

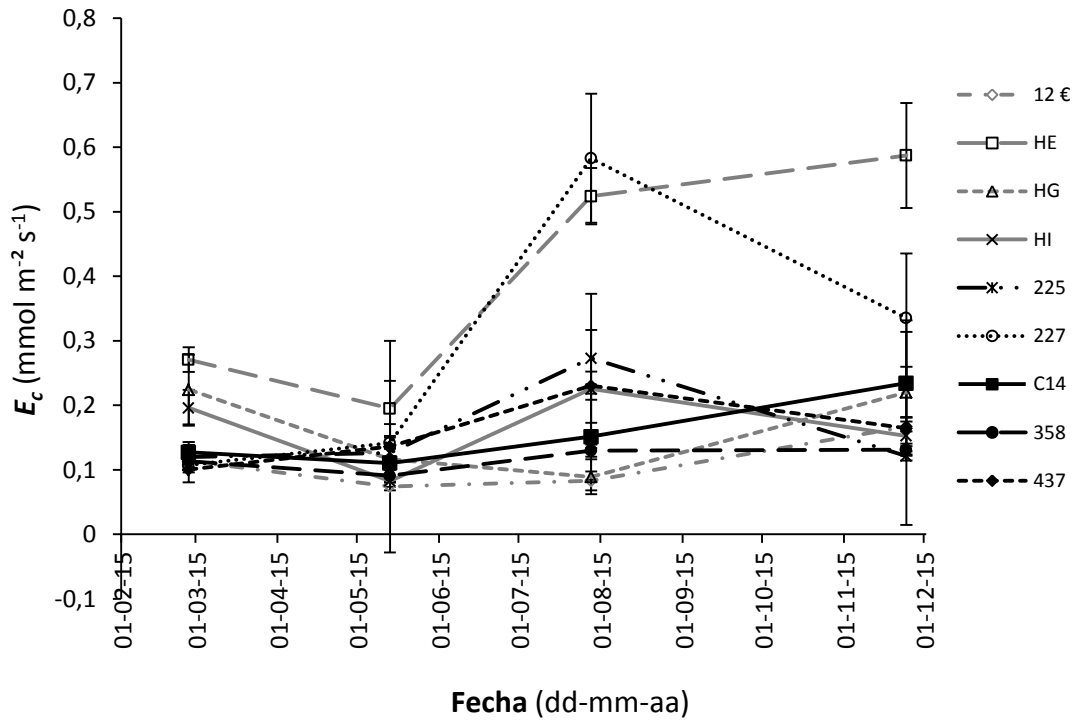


Figura 17. Tasa de transpiración cuticular (E_c) en base al área foliar de los nueve clones estudiados en las cuatro fechas de medición (media \pm ET).

4.3. Transpiración diaria

4.3.1. Relaciones alométricas entre parámetros morfológicos de las plantas.

Para poder determinar las tasas de transpiración diaria de las plantas en base al área foliar transpirante (T_{LA} , en base a SF) o al peso seco foliar (T_{LW} , en base a PS_{hj}) es necesario conocer el valor de estos dos parámetros. Como éstos solo se midieron con precisión en la medición correspondiente a la fecha final (tras la cosecha de las plantas), para las demás fechas se hizo necesario estimar sus valores en base a otros parámetros de las plantas, por ejemplo el diámetro medido en la base del tallo (D). Por ello, se obtuvieron ecuaciones alométricas que relacionaba D con otras partes de las plantas como peso seco de los componentes del árbol (hojas, tallos y raíz) y la superficie foliar (Figuras 18 a 21).

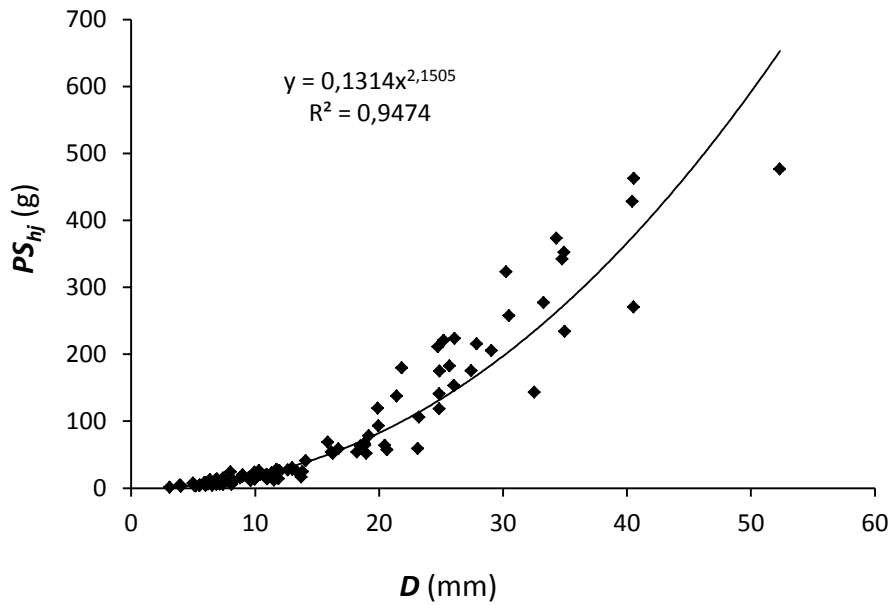


Figura 18. Relación entre el diámetro en la base del tallo (D) y el peso seco de hojas (PS_{hojas}) para el conjunto de clones de *Eucalyptus* estudiados y crecidos en macetas de 10 L y 100 L.

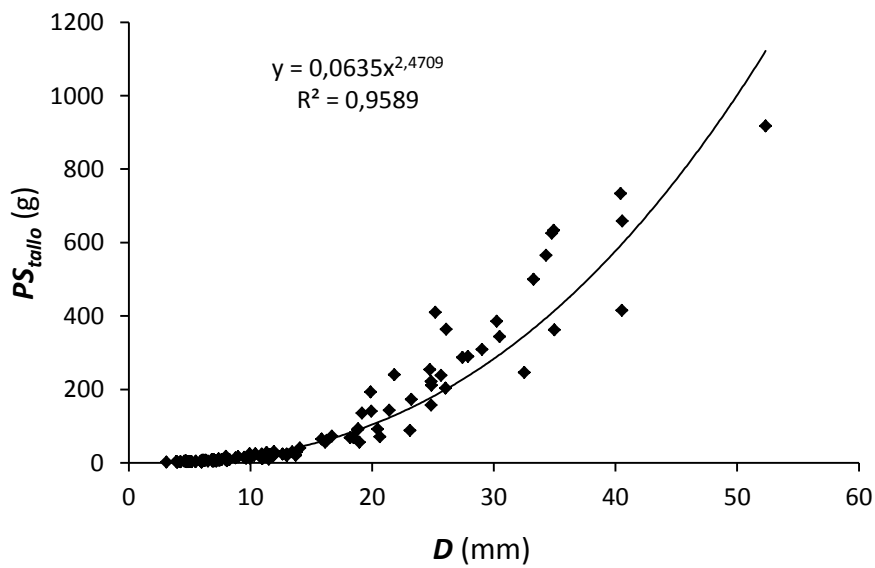


Figura 19. Relación entre el diámetro en la base del tallo (D) y el peso seco de los tallos (PS_{tallo}) para el conjunto de clones de *Eucalyptus* estudiados y crecidos en macetas de 10 L y 100 L.

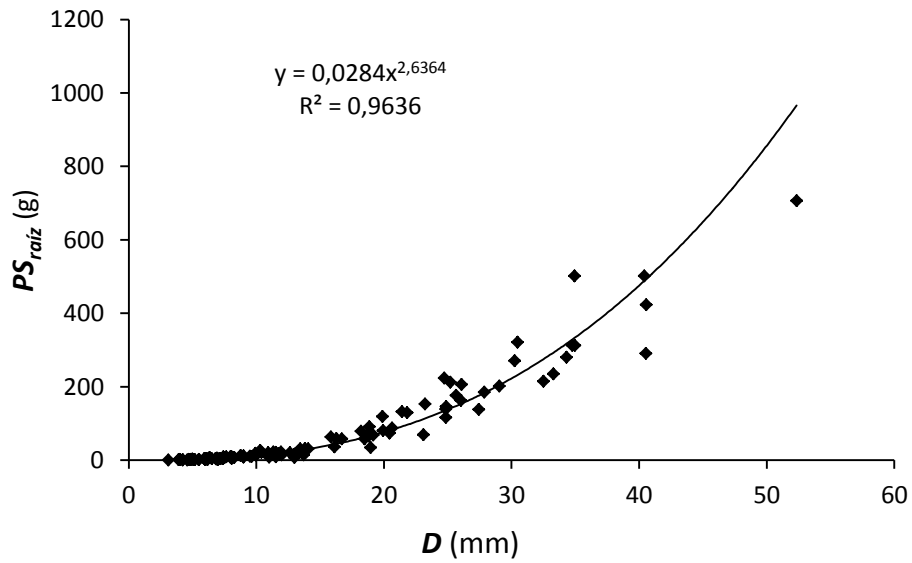


Figura 20. Relación entre el diámetro en la base del tallo (D) y el peso seco de las raíces (PS_{raiz}) para el conjunto de clones de *Eucalyptus* estudiados y crecidos en macetas de 10 L y 100 L.

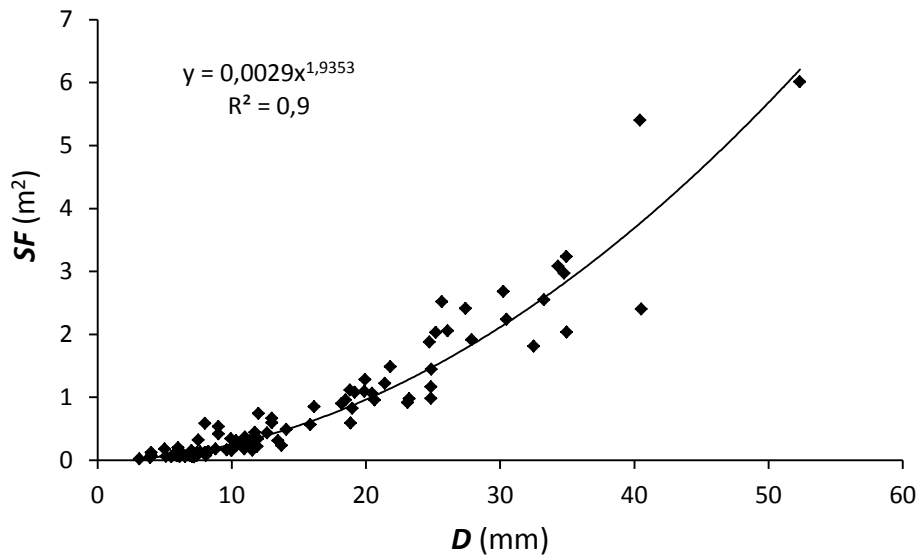


Figura 21. Relación entre el diámetro en la base del tallo (D) y la superficie foliar total de la planta (SF) para el conjunto de clones de *Eucalyptus* estudiados y crecidos en macetas de 10 L y 100 L.

4.3.2. Cálculo de la transpiración diaria (T)

De las cinco variables predictoras utilizadas en los modelos de regresión múltiple (HR_{med} , HR_{min} , v , T y R), tomando para ellas el valor medio diario,

excepto para HR_{min} , para el conjunto de clones y fechas de medición, las mejores ecuaciones de ajuste resultantes fueron las reflejadas en la Tabla 7. En la Tabla 8, se puede observar las ecuaciones de ajuste para T_{LA} para cada clon individualmente. Se probaron, asimismo, más de una ecuación por clon para T_{LA} , T_{LW} y T_{St} , pero solo se muestran aquellas que resultaron mejor para cada caso.

Tabla 7. Ecuaciones de ajuste para la transpiración diaria, resultantes de aplicar las cinco variables predictoras utilizadas en los modelos de regresión múltiple, expresadas en base al área foliar (T_{LA}), a la sección transversal del tallo principal (T_{St}) y al peso foliar (T_{LW}), para el conjunto de clones y fechas de medición. Se muestra el coeficiente de determinación (R^2) y del nivel de significación ($p < 0.001$, para todos los modelos de esta tabla).

	Modelo	Coeficientes de las variables					R^2
		Cte.	T (°C)	v ($m\ s^{-1}$)	R ($MJ\ m^{-2}\ día^{-1}$)	RH_{med} (%)	
T_{LA} ($L\ m^{-2}\ día^{-1}$)	1	-3.06	0.156		0.124		0.569
	2	-2.256	0.123	-2.953	0.306		0.611
	3	-4.598	0.175	-2.612	0.214		0.637
T_{St} ($L\ cm^{-2}\ día^{-1}$)	1	0.232	0.047			-0.007	0.589
	2	0.567	0.046	-0.204		-0.009	0.598
	3	0.133	0.044	-0.384	0.013	-0.005	0.607
	4	-0.473	0.052		0.008		0.579
	5	-0.359	0.047	-0.42	0.02		0.603
T_{LW} ($L\ kg^{-1}\ día^{-1}$)	1	6.664	2.206			-0.272	0.563
	2	30.180	2.088	-14.312		-0.452	0.585
	3	13.938	2.033	-21.03	0.491	-0.286	0.590
	4	-22.749	2.467		0.267		0.548
	5	-16.409	2.206	-23.286	0.913		0.582

Como puede observarse en la Tabla 7, así como en las Figuras (22, 23 y 24), el mejor ajuste y correspondencia entre la tasa de transpiración medida y la predicha fue, aunque con una diferencia muy pequeña, para la referente a superficie foliar (T_{LA}). Por tanto, nos hemos centrado en esta última para analizar el comportamiento individual de cada clon (Tabla 8 y Figura 25).

Tabla 8. Ecuaciones de ajuste para la transpiración diaria, resultantes de aplicar las cinco variables predictoras utilizadas en los modelos de regresión múltiple, expresadas en base al área foliar (T_{LA}), para cada uno de los nueve clones de *Eucalyptus* estudiados. Solo se presentan las ecuaciones que mostraron un mejor ajuste para cada clon, en función del coeficiente de determinación (R^2) y del nivel de significación ($p < 0.001$, para todos los modelos de esta tabla).

	Clon	Coeficientes de las variables					R^2
		Cte.	T (°C)	v ($m\ s^{-1}$)	R ($MJ\ m^{-2}\ día^{-1}$)	RH_{med} (%)	
T_{LA} ($L\ m^{-2}\ día^{-1}$)	12 €	-2.122	0.205				0.524
	HE	-2.011		-5.414	0.405		0.677
	HG	-1.356			0.16		0.674
	HI	-1.682		-3.985	0.335		0.663
	225	-1.729	0.159	-2.78	0.136		0.739
	227	-7.06	0.324	-3.968	0.247		0.759
	C14	-2.423		-3.963	0.368		0.763
	358	1.599	0.120			-0,27	0.494
	437	-0.776	0.095	-2.555	0.138		0.656

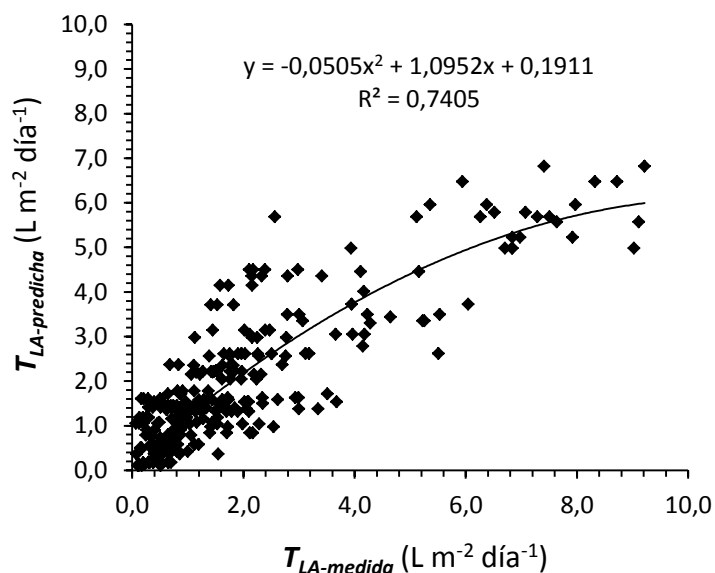


Figura 22. Correlación entre la transpiración diaria medida y la predicha por el modelo estadístico, expresadas en base al área foliar (T_{LA}), para el conjunto de clones y fechas de medición. Los valores de $T_{LA-predicha}$ se calcularon aplicando las ecuaciones de la Tabla 8 para cada clon en particular.

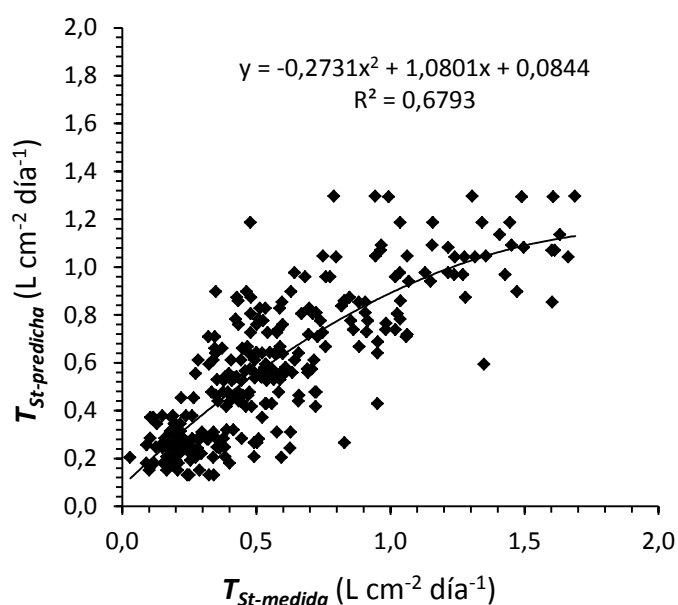


Figura 23. Correlación entre la transpiración diaria medida y la predicha por el modelo estadístico, expresadas en base al área basimétrica, es decir, a la sección transversal del tallo principal (T_{St}), para el conjunto de clones y fechas de medición. Los valores de $T_{LA-predicha}$ se calcularon aplicando las ecuaciones particulares para cada clon.

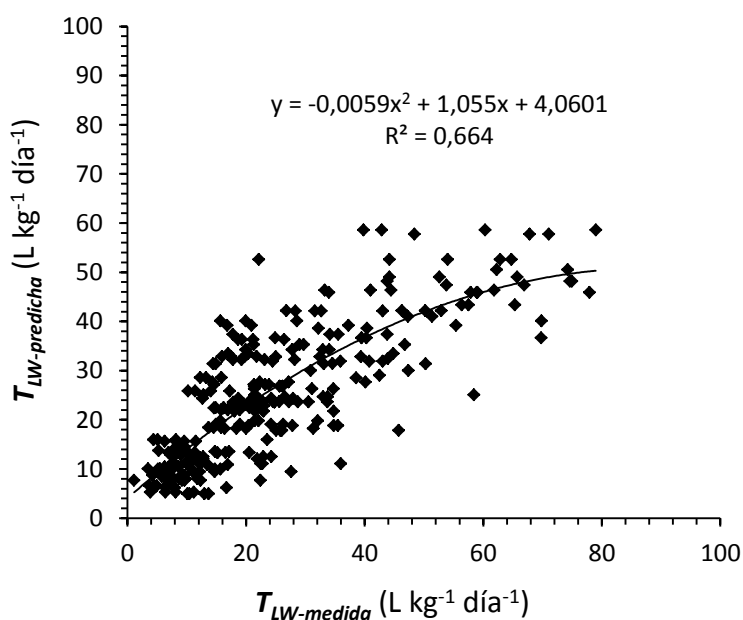


Figura 24. Correlación entre la transpiración diaria medida y la predicha por el modelo estadístico, expresadas en base al peso foliar (T_{LW}), para el conjunto de clones y fechas de medición. Los valores de $T_{LA-predicha}$ se calcularon aplicando las ecuaciones particulares para cada clon.

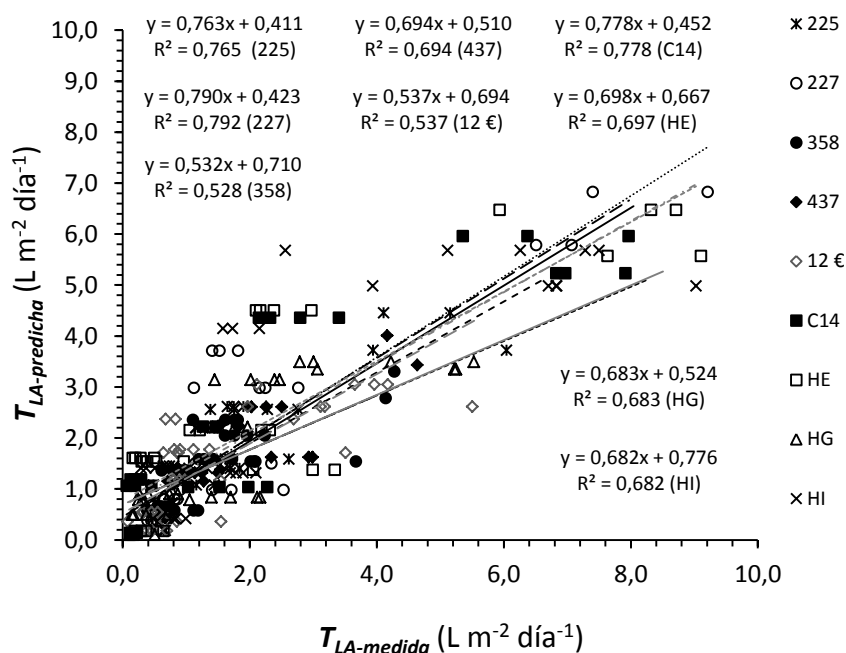


Figura 25. Correlaciones entre la tasa de transpiración diaria medida y la predicha, expresadas en base al área foliar (T_{LA}) de los nueve clones de *Eucalyptus* estudiados.

Comparando la transpiración, expresada en base al área foliar, entre los nueve clones de *Eucalyptus* y las nueve fechas de medición, se detectaron diferencias significativas entre clones pero resultaron tan pequeñas que el test T3-Dunnnett no los diferenció en grupos homogéneos separados (Tabla 9). También fueron detectadas diferencias significativas entre fechas y para la interacción Clon x Fecha ($p = 0.001$) (Figura 26).

Como la transpiración diaria también depende del tamaño de la planta, a su vez relacionado con la superficie foliar transpirante, se evaluó la relación entre la transpiración diaria total y el diámetro o la sección transversal del tallo (Figura 27 y 28). También se analizó la influencia de la altura de la planta (H), pero su inclusión en el modelo junto con D no lo mejoraba significativamente y por sí sola no resultó una buena predictora, por tanto fue descartada en esta primera aproximación.

Tabla 9. Valores medios (\pm ET) de la tasa de transpiración diaria en base al área foliar (T_{LA}) de los distintos genotipos ensayados y fechas de medición. p = nivel de significación. Para cada factor (clon, fecha) letras distintas en cada columna indican diferencias significativas.

Clon	T_{LA} (L m ⁻² día ⁻¹)	Fecha	T_{LA} (L m ⁻² día ⁻¹)
Total	1.89 \pm 0.12	Total	1.89 \pm 0.12
12 €	1.51 \pm 0.23 a	21/10/2014	1.19 \pm 0.13 c
HE	2.19 \pm 0.48 a	29/10/2014	1.01 \pm 0.12 bc
HG	1.66 \pm 0.26 a	17/11/2014	0.60 \pm 0.06 ab
HI	2.45 \pm 0.43 a	01/12/2014	0.39 \pm 0.03 a
225	1.80 \pm 0.25 a	25/03/2015	1.11 \pm 0.09 c
227	2.11 \pm 0.42 a	20/05/2015	1.96 \pm 0.10 d
C14	2.02 \pm 0.46 a	02/07/2015	5.72 \pm 0.41 e
358	1.57 \pm 0.18 a	23/07/2015	5.41 \pm 0.41 e
437	1.66 \pm 0.20 a	10/11/2015	1.95 \pm 0.11 d
p	<0.001	p	<0.001

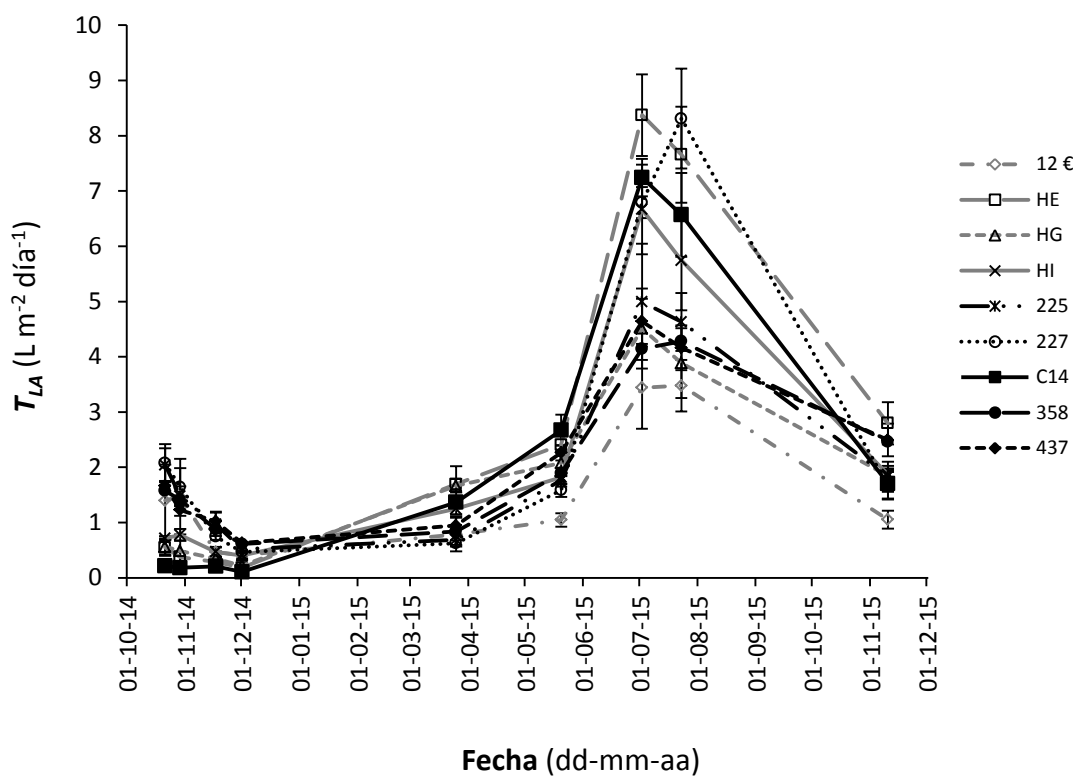


Figura 26. Tasa de transpiración diaria en base al área foliar (T_{LA}) para los nueve clones estudiados en las distintas fechas de medición (media \pm ET).

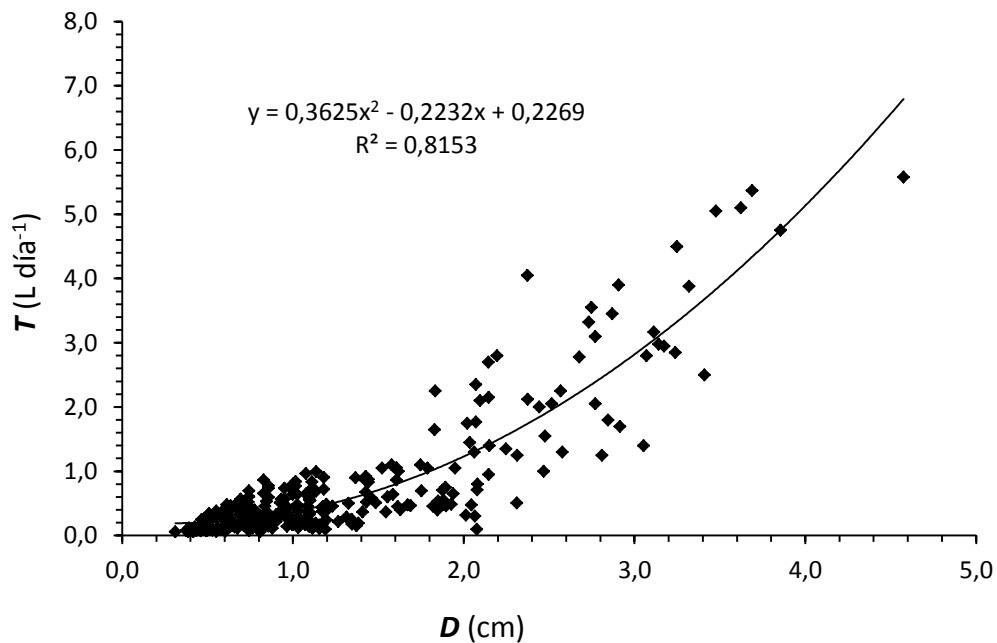


Figura 27. Relación entre el diámetro en la base del tallo (D) y la transpiración diaria (T) para el conjunto de clones de *Eucalyptus* estudiados, crecidos en macetas de 10 L y 100 L y medidos en distintas fechas del año.

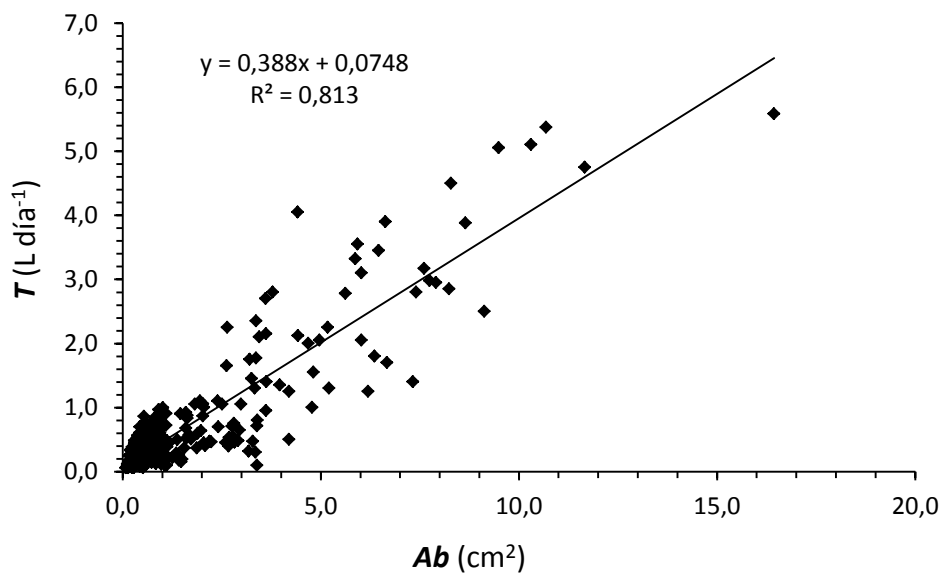


Figura 28. Relación entre la sección de la base del tallo (Ab) y la transpiración diaria (T) para el conjunto de clones de *Eucalyptus* estudiados, crecidos en macetas de 10 L y 100 L y medidos en distintas fechas del año.

5. DISCUSIÓN

5.1. Estomas

5.1.1. Densidad

El tamaño de los estomas y la densidad parecen ser las variables más sensibles al cambio en las condiciones ambientales, en especial las condiciones de estrés hídrico, posiblemente relacionadas con la resistencia estomática, lo que evitaría el exceso de transpiración y permitiría una mejor adaptación de los árboles a condiciones de mayor demanda hídrica (Lammertsma et al., 2011). En las hojas crecidas en invierno, la densidad estomática resultó mayor, facilitando la vía de salida del agua cuando la demanda atmosférica es menor, y en el verano, cuando hay limitación de agua y mayor demanda atmosférica, la densidad disminuyó, haciendo posible que las plantas ahorren agua y resistan mejor los eventos de sequía.

La densidad estomática varía también con el estado de madurez de la planta. En los clones de eucalipto del presente estudio, la presencia de estomas se concentró en la superficie abaxial de la hoja. En los limbos foliares de hojas planas, los estomas pueden estar en ambas superficies (hojas anfiestomáticas), o solamente en una de las superficies, por lo general la inferior (hojas hipoestomáticas) (Camargo y Marengo, 2011). Para todos los clones estudiados se encontró una cantidad muy baja de estomas en la superficie adaxial, 2-3 estomas por milímetro cuadrado. Esto es debido a que se han utilizado hojas maduras pero de plantas en estado juvenil, procedentes de plantas de corta edad. Estas especies presentan dimorfismo foliar marcado,

entre estado juvenil y adulto, que también se hace patente en la disposición de los estomas en el limbo foliar, como hemos visto. Para hojas de estado adulto, las diferencias morfológicas entre haz y envés se minimizan, especialmente para *E. globulus*, *E. maidenii* y *E. saligna*, pudiendo encontrar estomas en ambos lados. No obstante, aunque puede haber presencia de estomas en ambas superficies en hojas adultas, Tuffi Santos et al. (2006), al estudiar la densidad de estomas también en hojas juveniles de *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla*, *E. saligna*, *E. pellita* y *E. resinífera*, constataron que, para todas las especies, en la superficie adaxial fue, en media, diez veces menor que la superficie abaxial, que se situó en torno a los 600 estomas por mm² mientras que en la superficie adaxial estuvo entre 10 y 80 estomas por mm², con diferencias entre clones.

En las plantas de este estudio, los valores medios estimados se situaron entre 145 y 462 estomas por mm², dentro del rango de valores medios de hojas esclerófilas (100-500 mm²) descritos por Larcher (2006). Los clones con mayor densidad estomática, considerando todas las fechas, fueron los híbridos HI y HG, presentando una media en torno a 400 estomas, mientras que la densidad estomática para los clones 358, C14 y 437 de *E. globulus* fue la mitad que para los anteriores. Muianga (2013) estudiando la relación entre crecimiento y respuestas ecofisiológicas en seis clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, sometidos a diferentes dosis de fertilización potásica, encontró que los clones más susceptibles al déficit hídrico presentaron mayores densidades estomáticas, en aquel caso de 74 estomas mm⁻². Por tanto, la menor densidad estomática de *E. globulus* en los clones estudiados, podría estar relacionada con una mejor adaptación a la sequía. Por otro lado, los clones de *E. globulus* y

el clon HE tendieron a mantener la densidad estomática a lo largo del año, mientras que los otros tres clones disminuyeron su densidad del invierno al otoño. Esto nos indica una menor plasticidad de *E. globulus* en cuanto a la densidad estomática.

5.1.2. Tamaño de los estomas

Analizando el tamaño de los estomas, medidos en el plano de la epidermis foliar, podemos destacar que algunos de los clones que presentaron menores densidades estomáticas fueron los que presentaron estomas de mayor tamaño. Por tanto, una mayor densidad estomática fue acompañada de una reducción en el tamaño de los estomas. Hetherington y Woodward (2003) reportaron que, con frecuencia, la densidad estomática se relaciona negativamente con el tamaño de los estomas. Este fenómeno ha sido descrito en álamos ribereños crecidos en ambiente semiárido (Pearce, 2006), también en especies de selva tropical como *Eschweilera bracteosa* y *Ferdinandusa elliptica* que presentan relación negativa entre la longitud de las células oclusivas y la densidad (Camargo y Marengo, 2011), y en *Eucalyptus globulus*, tanto para tamaño total del estoma (incluyendo largo y ancho) como para la longitud de las células oclusivas, en poblaciones de lugares con alta y baja precipitación (Franks et al., 2009). En nuestro estudio, en el conjunto de todas las fechas, los clones monoespecíficos de *E. globulus* y el híbrido HE presentaron mayor tamaño que los demás híbridos estudiados.

Comparando las tres zonas evaluadas en las hojas (base, centro y ápice), aunque el análisis estadístico mostró diferencias significativas en el tamaño

(Tabla 3), estas fueron pequeñas en valor absoluto que, lo que no parece que tenga una justificación biológica destacable.

En general, los valores de longitud y ancho de las células oclusivas mostraron una evolución decreciente a lo largo del año, en particular LO , lo que indica un cierto grado de aclimatación del aparato estomático al cambio en las condiciones ambientales, que origina estomas más grandes en invierno y menores en épocas más cálidas y secas. El mismo fenómeno fue encontrado para plantas de *Sequoia sempervirens* en diferentes plantaciones de Chile (Torral et al., 2010). Cabe señalar que el año 2015 fue atípico en la zona, ya que las altas temperaturas y la escasez de lluvias se prolongaron durante casi todo el otoño y parte del invierno. En consecuencia, durante los meses de otoño-invierno, cuando la temperatura, radiación y fotoperiodo son menores y la humedad relativa mayor, el desarrollo de las hojas podría estar favoreciendo la formación de estomas de mayor tamaño, y viceversa, con el objetivo de regular el intercambio gaseoso y la eficiencia de uso del agua.

El menor valor de la ratio AO/LO obtenido en el clon 12€ indica una forma menos redondeada de los estomas respecto a los demás clones estudiados. Tanto la longitud (LO), como el ancho (AO) de las células oclusivas presentaron una alta correlación positiva con la longitud (LS) y con el ancho (AS) de las células subsidiarias, respectivamente, lo que indica que en el estándar global el aumento de la longitud o ancho de un tipo de células provoca también el aumento de la longitud o ancho de las otras células asociadas al aparato estomático.

No obstante, es conveniente seguir tomando datos durante, al menos, otra anualidad para confirmar la consistencia de estos resultados (evolución estacional y correlaciones entre parámetros).

5.2. Transpiración

5.2.1. Transpiración cuticular y parámetros relacionados

El contenido hídrico relativo (CHR_c) y el contenido de humedad (H_c) en el punto de cierre de estomas son importantes indicadores del estado hídrico de las hojas en condiciones de sequía. Estos parámetros están estrechamente relacionados con la turgencia celular y, por lo tanto, reflejan con precisión el equilibrio entre el contenido de agua interno, el suministro de agua en la hoja y la tasa de transpiración, así como la tolerancia de la hoja a la deshidratación (Andivia et al., 2012).

Los valores medios encontrados del contenido hídrico relativo (CHR_c) en los nueve clones estudiados se encuentran dentro del rango obtenido por Carevic et al. (2010), estudiando plantas de encina (*Quercus ilex* L. spp. *ballota*), especie de ambiente mediterráneo y hojas esclerófilas, que obtuvo una variación estacional de CHR_c entre $62.0\% \pm 3.9\%$ (marzo) y $91.2\% \pm 5.9\%$ (junio). En nuestro estudio, la evolución estacional osciló entre un mínimo de $73.2\% \pm 1.2\%$ (febrero) y $82.9\% \pm 0.8\%$ (mayo), con el último valor no diferenciándose de los meses de julio y noviembre. Andivia et al. (2012), estudiando la tolerancia a la sequía de dos procedencias españolas de encina observaron variaciones estacionales en este parámetro, indicativos de conservación del agua durante el verano (con valores máximos cerca de 90%),

pero la disminución de CHR_c durante la estación húmeda sugiere una estrategia "gastadora de agua" cuando hay abundante agua disponible.

Por otro lado, el contenido de humedad (H_c) presentó un valor medio de 61.2%, con diferencias reducidas entre clones en valor absoluto. La evolución estacional se diferenció de CHR_c , sin diferencias significativas entre febrero y julio (58.7% a 60.4%), pero diferenciados del valor observado en noviembre (67.7%).

Todo ello indica que los nueve clones de *Eucalyptus*, con ligeras diferencias entre ellos, utilizaron adaptaciones foliares morfo-fisiológicas para reducir la pérdida de agua en las épocas de mayor demanda, pues tienden a mantener el CHR_c alto en los períodos más secos y el contenido de humedad relativamente constante durante el año, aspecto útil para la supervivencia en climas como el mediterráneo.

En una determinada planta, el tiempo hasta el cierre de los estomas (t_c) durante el aumento del déficit de agua en la hoja puede variar con la edad de la hoja, así como también con el tamaño del estoma y de su localización. Estomas de hojas juveniles, como el caso de las muestras estudiadas, frecuentemente cierran más rápidamente los estomas que aquellas de hojas viejas en respuesta al estrés hídrico (Kozlowski, 2012). El rango de tiempo para el cierre de estomas varía entre las especies, incluso entre individuos de la misma especie. Los clones del presente estudio no se diferenciaron significativamente entre sí según el test T3-Dunnet, pero en la evolución estacional se movieron en un rango de 49 minutos (noviembre) hasta 86 minutos (febrero). En tal caso, las hojas formadas en los períodos más secos cerraron sus estomas en la mitad de tiempo que las formadas en períodos más

fríos y húmedos. Esto evidencia, una vez más, estrategias de plasticidad para la aclimatación a climas como el mediterráneo, donde deben prevenir pérdidas excesivas de agua en meses más secos.

El área foliar específica (*SLA*) es una característica que indica cómo se distribuye la biomasa foliar buscando un equilibrio entre la ganancia de carbono y la pérdida de agua, puesto que a igualdad de masa, una lámina foliar más amplia y delgada favorece la fotosíntesis pero también la pérdida de agua por transpiración. Es una importante propiedad de adaptación de las plantas a las condiciones ambientales y su plasticidad se ve a menudo como una forma de optimizar su eficiencia en la absorción de luz y la eficiencia en el uso del agua (Poorter y Rozendaal, 2008).

SLA está altamente relacionada con las condiciones hídricas del ambiente y los niveles de radiación durante el desarrollo de las hojas (mayor cuanto más humedad y menor radiación). Sefton et al. (2002) hicieron un estudio con tres especies de *Eucalyptus* (*E. occidentalis*, *E. camaldulensis* y *E. grandis*) a partir de plántulas recién germinadas hasta 12 semanas de edad, observando que los valores en las primeras etapas del desarrollo eran mayores y con mayor variación entre las especies, pero a medida que maduraban las hojas y crecían las plantas esos valores se aproximaron en un rango de $16.1 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$ (*E. occidentalis*) hasta $25.4 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$ (*E. grandis*). Los valores encontrados en los clones de nuestro estudio, con plantas superiores a los 3 meses de edad, estuvieron en un rango de $9.7 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$ (C14) hasta $14.6 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$ (12 €), pero dentro de los valores encontrados por Sefton et al. (2002), teniendo en cuenta que nuestras plantas eran de mayor edad y crecidas al aire libre, en un ambiente de alta radiación y humedad relativa más baja. En nuestro estudio,

los menores valores encontrados para los clones de *E. globulus* y el clon HE, diferenciados de 12€ y HG, indicaría hojas más gruesas para los primeros, propio de su mayor adaptación a climas secos, comparado con *E. grandis* o *E. urophylla*, típicos de climas más húmedos.

Como hemos comentado, las variaciones estacionales o interanuales en *SLA* son habituales en muchas especies, incluido el género *Eucalyptus*, resultado de las variaciones de la luz o de la demanda y disponibilidad de agua (Nouvellon et al., 2009). En la evolución estacional de los clones estudiados, hubo una caída progresiva en *SLA* de las hojas formadas en febrero ($11.5 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$) hasta las formadas en julio ($9.9 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$), aumentando en las de noviembre ($14.1 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$), que debió ser resultado de la variación de las condiciones climáticas (humedad relativa, radiación) ya que estuvieron bien regadas, lo que demuestra su sensibilidad y capacidad de reacción a las variables meteorológicas.

La cutícula forma una eficaz barrera protectora en las plantas ante la pérdida no controlada de agua. Durante el estrés hídrico, cuando los estomas están cerrados, la supervivencia de las plantas depende en gran medida de la cantidad de agua que se pierde a través de la cutícula. Los valores encontrados de E_c tuvieron una media de $1.85 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$, superiores a los encontrados por Carevic et al. (2010) para encinas adultas crecidas en campo, que estuvieron entre 0.06 hasta $0.19 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pero inferiores a los valores encontrados por Fernández et al. (2015) para siete especies (*Dichrostachys cinérea*, *Populus x euroamericana* "I-214", *Eucalyptus camaldulensis*, *Casuarina cunninghamiana*, *Paulownia fortunei*, *Salix purpurea* y *Leucaena diversifolia*) crecidas bajo malla de sombreo en vivero, que obtuvieron valores

de $0.83 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para *E. camaldulensis* hasta $3.98 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para las otras especies, mientras que los clones de nuestro estudio promediaron $0.17 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Los valores de E_c fueron semejantes estadísticamente para todos los clones, con excepción de las diferencias entre el clon de valor más extremo (HE) respecto al de menor valor (358) para la E_c en base al peso foliar, y HE respecto a 358, 437, C14, 12€ y HI cuando E_c se expresa en base al área foliar. Eso sugiere que el clon HE tiene una estrategia menos eficiente de ahorro de agua en relación a los otros clones citados, cuando medimos permeabilidad de epidermis foliar (Andivia et al., 2012). Eamus et al. (2008), analizando hojas de *Eucalyptus haemastoma* (Sm.) a diferentes temperaturas, especie nativa común de Nueva Gales del Sur (Australia), de clima semiárido en el verano con inviernos de noches frías, obtuvo valores de E_c entre $0.04 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en las temperaturas más bajas ($18 \text{ }^\circ\text{C}$) y $0.5 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en la temperatura más elevada ($38 \text{ }^\circ\text{C}$), valores que se encuadran dentro de los obtenidos en nuestra medición.

Por otro lado, el test estadístico no diferenció entre clones para la tasa de transpiración total al inicio (E_t) en las condiciones medidas de laboratorio, con baja radiación luminosa y sin viento. El valor medio de E_t fue $0.72 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, con valor mínimo de $0,48 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en primavera y $1,24 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en verano. Este rango de valores es habitual para este género y en las condiciones medidas (Vellini et al., 2008; Marrichi, 2009; Moreno, 2010). Para nuestros clones, las mayores tasas de transpiración fueron encontradas para las hojas desarrolladas y medidas en el verano y el otoño, debido posiblemente

a las condiciones ambientales de elevada temperatura y baja humedad relativa (Eamus et al., 2008).

5.2.2. *Transpiración diaria*

Para el conjunto de clones y fechas de medición, la transpiración diaria en base al área foliar ($T_{LA\text{-predicha}}$), calculada a partir de los valores medios diarios de temperatura, velocidad del viento, radiación solar diaria acumulada y valores mínimos diarios de humedad como variables independientes, fue la mejor predictora de la transpiración medida ($T_{LA\text{-medida}}$), en esta primera aproximación. También mejor que las calculadas en base al peso seco foliar y al área basimétrica del tallo principal, aunque con una diferencia pequeña. El análisis individual por clon también produjo el mismo resultado. No obstante, casi con toda seguridad, estos modelos de predicción mejorarán si consideramos intervalos más cortos de tiempo a lo largo del día, pues como la transpiración por la noche es mínima, hay una relativa distorsión de los parámetros ambientales que influyen directamente en la predicción del modelo. Esto está previsto realizarlo como continuación del estudio, para el conjunto de clones y para cada clon individualmente, para detectar las diferencias que comienzan a intuirse entre ellos.

La transpiración media diaria por planta varió en función del tamaño y la época del año, en un rango de 0.06 L día^{-1} hasta 5.58 L día^{-1} , con plantas de tamaño entre 0.31 cm y 4.57 cm de diámetro en la base (0.07 cm^2 hasta 16.43 cm^2), es decir, 0.34 L cm^{-2} de sección de tallo para las máximas tasas medidas. Este resultado es lógico puesto que a mayor tamaño de planta se corresponde mayor superficie foliar transpirante (Fernández et al., 2010). No obstante,

debemos ser cautos con estos datos y no extrapolarlos a transpiraciones en plantaciones o masas naturales (Gentil, 2010), puesto que las condiciones ambientales y la competencia entre árboles son distintas. Es necesario disponer de más datos y analizarlos para cada fecha y clon por separado con el fin de mejorar los modelos de predicción en función del tamaño.

Las altas correlaciones entre el diámetro del tallo principal con la biomasa (pesos secos de hojas, raíz y tallo) así como con la superficie foliar nos permitieron estimar estos últimos parámetros a partir de la medición del diámetro, medición no destructiva y fácil de realizar. Dicha capacidad de predicción de otros parámetros a partir del diámetro ha sido indicada para *Eucalyptus* por otros autores (Montagua et al., 2005; Onrizal et al., 2009).

A pesar de que el test T3-Dunnet no diferenció entre clones, el nivel de significación obtenido en el ANOVA y la tendencia observada en los distintos clones invita a profundizar más en ellos, con más mediciones durante uno o dos años más, con el fin de analizar las posibles diferencias entre clones, de esperar en *Eucalyptus* (Fernández et al., 2010).

La transpiración diaria fue bastante variable de unos meses a otros, evidenciando que las plantas responden a los estímulos del ambiente, como la radiación, temperatura, humedad relativa y velocidad del viento. Las dos fechas en que la transpiración fue más elevada coincidieron con el verano y las de transpiración más reducida al final del otoño y el invierno, en coincidencia con otros autores (Marrichi, 2009; Fernández et al., 2015). En las dos fechas de medición del verano fue cuando se pudo notar las mayores diferencias entre los clones. Los clones HE, HI, C14 y 227 presentaron mayores tasas de transpiración unitaria ($L\ m^{-2}\ día^{-1}$) frente a los otros. En las otras fechas de

medición, las diferencias de transpiración entre clones fueron menores. No obstante, también deberá tenerse en cuenta la ratio entre superficie foliar (SF) y el diámetro del tronco (D) para cada clon individualmente, por su efecto en la transpiración total diaria (en $L \text{ día}^{-1}$), pero este es un análisis que escapa a este primer estudio.

6. CONCLUSIONES

- La presencia de estomas se concentró en la superficie abaxial de la hoja para todos los clones estudiados.
- La densidad estomática varió en función de la época del año, mayor en las hojas desarrolladas durante el invierno y menor en las de verano, pudiendo significar estrategias de control de la pérdida de agua a través de los estomas.
- La densidad estomática se correlacionó negativamente con el tamaño de los estomas. Los clones monoespecíficos de *E. globulus* y el híbrido HE presentaron menor densidad estomática, mayor tamaño y menor variación temporal de la densidad que los demás híbridos estudiados.
- El tamaño de los estomas, medido por la longitud (LO) y ancho (AO) de las células oclusivas, disminuyó a lo largo del año, en particular LO .
- Los nueve clones de *Eucalyptus* tendieron a mantener altos contenidos hídricos relativos (CHR_c) y a acortar el tiempo (t_c) en el momento del cierre estomático en los períodos más secos, con el fin de mantener constante el contenido de humedad (H_c).
- Valores más altos de SLA en época húmeda y bajos en la más seca indican sensibilidad y capacidad de reacción a las variables meteorológicas por parte de los clones de *Eucalyptus* estudiados. Los valores más altos de los clones 12€ y HG indican hojas más delgadas y propias de climas con más humedad ambiente que los otros clones.
- Los valores de E_c fueron semejantes estadísticamente para todos los clones, con excepción del clon HE frente a algunos otros clones, lo que sugiere que el clon HE tiene una estrategia menos eficiente de ahorro de agua en

relación a la impermeabilidad de la epidermis foliar cuando los estomas están cerrados.

- La tasa de transpiración diaria, calculada a partir de variables meteorológicas, resultó un poco mejor si se refería al área foliar (T_{LA}) que al peso foliar (T_{LW}) o área transversal del tallo principal (T_{St}), en esta primera aproximación. No obstante, casi con toda seguridad, estos modelos de predicción mejorarán si consideramos intervalos más cortos de tiempo a lo largo del día para estimar el valor de las variables ambientales.

- Las altas correlaciones entre el diámetro del tallo principal con la biomasa (pesos secos de hojas, raíz y tallo) así como con la superficie foliar nos permitió estimar estos últimos parámetros a partir de la medición del diámetro, medición no destructiva y de fácil realización.

- La transpiración diaria fue bastante variable de unos meses a otros, evidenciando el efecto de los estímulos ambientales sobre la transpiración (radiación solar, temperatura, humedad relativa y velocidad del viento). También se apreció diferencias entre clones, aunque el test T3-Dunnett no los diferenció significativamente. Sin embargo, la tendencia observada en los distintos clones invita a profundizar más en ellos, con más mediciones, con el fin de analizar las posibles diferencias, tanto para transpiración diaria como para transpiración cuticular.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, A.C., Soares, J.V., Landsberg J.J., Rezende, G.D. Growth and water balance of *Eucalyptus grandis* hybrid plantations in Brazil during a rotation for pulp production. *Forest Ecology and Management*, 251: 10-21. 2007.
- Andivia, E., Fernández, M., Alejano, R., Vázquez-Piqué, J. Diferencias en el estado hídrico entre dos procedencias de encina. Implicaciones para futuros programas de restauración forestal. II Reunión conjunta AEET-SECF. Palencia (España), 22-23 de noviembre. 2012.
- Andivia, E., Fernández, M., Alaejos, J., Tapias, R. Consumo de agua de distintas especies leñosas utilizables como cultivos energéticos. 6º Congreso Forestal Español. Vitoria-Gasteiz (España), junio. 2013.
- Camargo, M.A.B., Marengo, R.A. Density, size and distribution of stomata in 35 rainforest trees species in Central Amazonia. *Acta Amazonica*, 41(2): 205-212, 2011.
- Carevic F.S., Fernández, M., Alejano, R., Vázquez Piqué, J., Tapias, R., Corral, E., Domingo, J. Plant water relations and edaphoclimatic conditions affecting acorn production in a holmoak (*Quercus ilex* L. ssp. *ballota*) open woodland. *Agroforestry Systems*, 78(3): 299–308, 2010.
- Eamus D., Taylor D.T., Macinnis-Ng C.M., Shanahan S., De Silva L. Comparing model predictions and experimental data for the response of stomatal conductance and guard cell turgor to manipulations of cuticular conductance, leaf-to-airvapour pressure difference and temperature: feedback mechanisms are able to account for all observations. *Plant, Cell and Environment*, 31(3), 269–277, 2008.
- EPE. *Balanzo energético nacional*. Rio de Janeiro. 155p. 2015
- FAO. *Situación de los Bosques del mundo*. Roma. 193p. 2011.
- Fernández, M., Tapias, R., Alesso, P. Adaptación a la sequía y necesidades hídricas de *Eucalyptus globulus* Labill. en Huelva. *Boletín del CIDEU*, 8-9: 31-41. 2010.
- Fernández, M., Tapias, R., Alesso, P., Ruiz, F., López, G. Variación estacional del incremento diametral diario de cuatro clones de *Eucalyptus globulus*

Labill. en Huelva medido con dendrómetros de precisión. *Cuadernos Sociedad Española Ciencias Forestales*, 35: 143-149. 2012.

Fernández, M., García-Albalá, J., Andivia, E., Alaejos, J., Tapias, R., Menéndez, J. Sickle bush (*Dichrostachys cinerea* L.) field performance and physical-chemical property assessment for energy purposes. *Biomass and Bioenergy*, 81: 483-489, 2015.

Franks, P.J., Drake, P.L., Beerling, D.J. Plasticity in maximum stomatal conductance constrained by negative correlation between stomatal size and density: an analysis using *Eucalyptus globulus*. *Plant, Cell and Environment*, 32(12): 1737–1748, 2009.

Gentil, M.S. *Transpiração e eficiência do uso da água em árvores clonais de Eucalyptus aos 4 anos em áreas com e sem irrigação em Eunápolis, Bahia*. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2010. 71p.

Hetherington, A.M. and Woodward, F.I. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424(6951): 901–908, 2003.

IDAE. *Informe Estadístico Energías Renovables*. Recuperado el 30 de diciembre de 2015, de <http://informeestadistico.idae.es/t1.htm>

IPCC. *Cambio climático 2014: Impactos, adaptación y vulnerabilidad – Resumen para responsables de políticas*. Contribución del Grupo de trabajo II al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Field, C.B., Barros, V.R., Dokken, D.J., Mach, K.J., Mastrandrea, M.D., Bilir, T.E., Chatterjee, M., Ebi, K.L., Estrada, Y.O., Genova, R.C., Girma, B., Kissel, E.S., Levy, A.N., MacCracken, S., Mastrandrea, P.R., White, L.L.(eds.)]. Organización Meteorológica Mundial, Ginebra (Suiza), 34p. 2014.

Kozlowski, T.T. *Water Deficits and Plant Growth, Volume III: Plant Responses and Control of Water Balance*. Cambridge: Academic Press, 2012, 382 p.

Lammertsma, E.I., de Boer, H.J., Dekker, S.C., Dilcher, D.L., Lotter, A.F., Wagner-Cremer, F. Global CO₂ rise leads to reduced maximum stomatal conductance in Florida vegetation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108(10): 4035-4040, 2011.

Larcher W. *Ecofisiología Vegetal*. São Carlos: Rima, 2006, 532 p.

- Maletta, E. Cultivos energéticos: una respuesta a los objetivos energéticos y medioambientales. *The Bioenergy*, 4: 18-19. 2009.
- Marrichi, A.H.C. *Caracterização da capacidade fotossintética e da condutância estomática em sete clones comerciais de Eucalyptus e seus padrões de resposta ao déficit de pressão de vapor*. Tesina de Fin de Máster. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 104p. 2009.
- Montagua, K.D., Düttmera, K., Bartonaand C.V., Cowie, M.A.L. Developing general allometric relationships for regional estimates of carbon sequestration - An example using *Eucalyptus pilularis* from seven contrasting sites. *Forest Ecology and Management*, 204(1): 113–127, 2005.
- Montero, G., Serrada, R.; *La situación de los bosques y el sector forestal en España - ISFE 2013*. Edit. Sociedad Española de Ciencias Forestales. Lourizán (Pontevedra). 2013.
- Moreno, E.A.M. *Efecto del déficit hídrico en algunas respuestas fisiológicas de Eucalyptus globulus LABILL, Eucalyptus camaldulensis DEHNH y Eucalyptus cladocalyx F. MUELL*. Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero Forestal. Universidad de Chile. 51p. 2010.
- Muianga, M.R.D. *Relação entre crescimento e respostaecofisiológicaem clones híbridos de Eucalyptus grandis x Eucalyptus urophylla submetidos à diferentes doses de adubação potássica*. Tesina de Fin de Máster. Universidade de São Paulo. 69p. 2013.
- Nouvellon Y., Laclau J.P., Epron D., Kinana A., Mabilia A., Roupsard O., Bonnefond J.M., le Marie G., Marsden C., Bontemps J.D., Saint-André L. Within-stand and seasonal variations of specific leaf area in a clonal *Eucalyptus* plantation in the Republic of Congo. *Forest Ecology and Management*, 259(9): 1796-1807, 2010.
- Onrizal, K.C., Mansor, M., Hartono, R.. Allometric biomass and carbon stock equations of planted *Eucalyptus grandis* in Toba Plateau, North Sumatra. *Research on Plantation Forests : Challenges and Opportunities*. Bogor (Indonesia), 5-6 de noviembre. 2009.
- Pearce, D.W., Millard, S., Bray, D.F., Rood, S.B. Stomatal Characteristics of Riparian Poplar Species in a Semi-Arid Environment. *Tree Physiology*, 26(2): 211-218, 2006.

- Poorter, L., Rozendaal, D.M.A. Leaf size and leaf display of thirty-eight tropical tree species. *Oecologia*, 158(1): 35–46, 2008.
- Reigosa Roger, M. (ed). Handbook of Plant Ecophysiology Techniques. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001, 452 p.
- Sefton, C.A., K.D. Montagu, B.J. Atwell, J.P. Conroy. Anatomical variation in juvenile eucalypt leaves accounts for differences in specific leaf area and CO₂ assimilation rates. *Australian Journal of Botany*, 50(3): 301–310, 2002.
- Tafur, M.S.M., Díaz, R.A.B., Díaz, M.A.G., García, D.B. Respuesta fotosintética de *Eucalyptus grandis* W. Hill a la disponibilidad de agua en el suelo y a la intensidad de luz. *Acta Agronómica*, 63(4): 311-317, 2014.
- Toral, M., Manríquez, A., Navarro-Cerrillo, R., Tersí, D., Naulin, P. Características de los estomas, densidad e índice estomático en secuoya (*Sequoia sempervirens*) y su variación en diferentes plantaciones de Chile. *Bosque*, 31(2): 157-164, 2010.
- Tuffi Santos, L.D.; Iarema, L.; Thadeo, M.; Ferreira, F.A.; Meira, R.M.S.A. Crescimento e morfoanatomia foliar de eucalipto sob efeito de deriva do glyphosate. *Planta daninha*, 23(1): 133-142, 2005.
- Vellini, A.L.T.T., Paula, N.F., Alves, P.L.C.A., Pavani, L.C., Bonine, C.A.V.; Scarpinati, E. A., Paula, R.C. Respostas fisiológicas de diferentes clones de eucalipto sob diferentes regimes de irrigação. *Revista Árvore*, 32(4): 651-663, 2008.
- Warren, C.R., Tausz, M., Adams, M.A. Does rainfall explain variation in leaf morphology and physiology among populations of red ironbark (*Eucalyptus sideroxylon* subsp. *tricarpa*) growing in a common garden? *Tree Physiology*, 25(11): 1369–1378. 2005.
- Whitehead, D., Beadle, C.L. Physiological regulation of productivity and water use in *Eucalyptus*: a review. *Forest Ecology and Management*. 193(1-2): 113-140. 2004.