



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Escuela de Ciencias

PROFESOR PATROCINANTE

DRA. MIREN ALBERDI LAG

INSTITUTO DE BOTÁNICA

FACULTAD DE CIENCIAS

PROFESOR CO-PATROCINANTE

DRA. ALEJANDRA ZÚÑIGA FEEST

INSTITUTO DE GEOCIENCIAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE TRES PROTEACEAS CHILENAS EN
RESPUESTA AL DÉFICIT HÍDRICO**

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
**Grado de Licenciado en Ciencias
Biológicas.**

RUDY MOISES MONTENEGRO JEREZ

VALDIVIA - CHILE

2006

A mi Familia...

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alberdi L., por sus consejos y empeño en educarme no sólo en el ámbito académico.

A la Dra. Alejandra Z., por su espíritu crítico, en el quehacer científico.

A Vivi y Rafa, por su rigurosidad en el trabajo de laboratorio y simpatía, dos elementos muy importantes en el diario vivir de un científico.

A Don Rubén Moncada y Víctor Hugo Martínez, por su simpatía y disposición, una ayuda invaluable.

Y en especial, a Denisse, por haberme ayudado sin ser su obligación, sin obtener nada a cambio, sólo mi amor.

Y a todos los que me han apoyado, de alguna manera, en la realización de mi tesis.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Ecofisiología Vegetal del Instituto de Botánica, en la Universidad Austral de Chile y fue financiado por el Proyecto FONDECYT N° 1050663.

ÍNDICE

1	RESUMEN	1
1.1	SUMMARY	2
2	INTRODUCCIÓN	3
2.1	Efectos del déficit hídrico sobre la fisiología de las plantas	3
2.1.1	<i>Efectos del déficit hídrico sobre el aparato fotosintético</i>	4
2.1.2	<i>Efectos sobre la tasa transpiratoria</i>	5
2.1.3	<i>Estrés hídrico y acumulación de solutos compatibles</i>	6
2.1.4	<i>Efectos del déficit hídrico sobre el crecimiento</i>	7
2.2	Mecanismos generales de las plantas para resistir al estrés de déficit hídrico	7
2.3	Características de las especies de la familia <i>Proteaceae</i>	9
2.4	Hipótesis	11
2.5	Objetivos	11
	General	11
	Específicos	12
3	MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1	Procedencia y obtención de las plantas	13
3.2	Instalación y acondicionamiento de las plantas	13
3.3	Registro de las condiciones ambientales	14
3.4	Tratamiento de déficit hídrico	14
3.5	Determinación del potencial hídrico del suelo	15
3.6	Determinación del contenido relativo de agua foliar	17
3.7	Determinación del potencial hídrico (Ψ_{hf}) y osmótico (Ψ_{π}) foliar	17
3.7.1	<i>Potencial hídrico (Ψ_h) foliar</i>	17
3.7.2	<i>Potencial osmótico (Ψ_{π}) foliar</i>	18
3.8	Funcionalidad del aparato fotosintético	19
3.8.1	<i>Procedimiento para la determinación de fluorescencia</i>	20
3.9	Tasa de transpiración	21
3.10	Determinación de los solutos compatibles	22
3.10.1	<i>Determinación del contenido de prolina</i>	22

3.10.2	<i>Determinación de los carbohidratos solubles totales</i>	22
3.11	Determinación de la distribución de biomasa	23
4	RESULTADOS	24
4.1	Potencial hídrico del suelo	24
4.2	Parámetros hídricos foliares	25
4.2.1	<i>Contenido relativo de agua foliar</i>	25
4.2.2	<i>Potencial hídrico foliar</i>	28
4.2.3	<i>Potencial osmótico foliar</i>	29
4.2.4	<i>Potencial hídrico del suelo versus potencial hídrico foliar</i>	30
4.3	Funcionalidad del aparato fotosintético	31
4.3.1	<i>Eficiencia cuántica máxima</i>	31
4.3.2	<i>Eficiencia cuántica efectiva</i>	31
4.4	Transpiración	34
4.5	Concentración de solutos compatibles foliares	36
4.5.1	<i>Prolina</i>	36
4.5.2	<i>Carbohidratos solubles totales</i>	37
4.6	Distribución de biomasa	39
4.6.1	<i>Relación raíz – vástago</i>	39
5	DISCUSIÓN	41
6	BIBLIOGRAFÍA	49

1. RESUMEN

Se estudió la respuesta fisiológica a la sequía en tres especies de Proteáceas de diferentes requerimientos ecológicos creciendo en invernadero bajo las mismas condiciones. Se hipotetizó que *E. coccineum* (Forst) (especie heliófita y pionera) sería menos afectada por el déficit hídrico que *G. avellana* (Mol) (especie semitolerante y eventualmente pionera) y que *L. ferruginea* (Cav.) (umbrófila y no pionera). Se evaluó el potencial hídrico del suelo y de las hojas, el potencial osmótico foliar, el contenido relativo de agua de hojas (CRA_f), acumulación de solutos compatibles (L-Prolina y carbohidratos solubles totales), tasa transpiratoria, eficiencia fotoquímica del fotosistema II (*PSII*) (F_v/F_m y $\Phi PSII$) y la proporción de biomasa raíz/vástago. Inesperadamente el sustrato en que crecía *L. ferruginea* experimentó un menor descenso de su potencial hídrico que *E. coccineum* y *G. avellana*, lo que se manifestó en mayores CRA_f, potenciales hídrico foliares y tasas de transpiración. *E. coccineum* acumuló preferencialmente carbohidratos solubles ante la sequía, mientras que *G. avellana* acumuló mayormente L-prolina. Al final del experimento se encontró un descenso leve pero significativo en el F_v/F_m de *E. coccineum*, mientras que el *PSII* descendió en las tres especies a baja y alta densidad de flujo fotónico (*DFF*); siendo mayor el descenso a alta *DFF*. La proporción raíz/vástago no varió significativamente en las tres especies, durante el tratamiento.

Bajo las condiciones impuestas, las mayores diferencias fisiológicas encontradas entre *E. coccineum* y *G. avellana*, corresponden al tipo de soluto acumulado y a la cinética de respuesta en algunos parámetros fisiológicos, como el potencial hídrico foliar, en periodos intermedios de sequía. Sin embargo, fueron afectadas de la misma manera, al final del tratamiento de déficit hídrico. *L. ferruginea* no estuvo sometida a un déficit hídrico intenso como las otras especies, debido a su menor superficie foliar evaporativa.

1.1. SUMMARY

The physiological response to drought in three species of Proteáceas with different ecological requirements growing under the same conditions in a green-house was studied. It was hypothesized that *E. coccineum* (Forst) (heliophyte and pioneer species) would be less affected by water deficit than *G. avellana* (Mol) (semitolerant and sometimes a pioneer species) and *L ferruginea*. (Cav.) (umbrófila and non-pioneer species). The soil and leaf water potential and osmotical leaf potential, relative water content of leaves (CRA_f), accumulation of compatible solutes (L-Prolina and total carbohydrates), transpiration rates, photochemical efficiency of photosystem II (*PSII*) (F_v/F_m and Φ_{PSII}) and the proportion of biomass root/shoot were evaluated. Unexpectedly the substrate in which *L ferruginea* grew, experienced a smaller reduction of its water potential than *E. coccineum* and *G. avellana*, which was expressed in greater leaf water potential and CRA_f and transpiration rates. *E. coccineum* accumulated preferential soluble carbohydrates during the drought, whereas *G. avellana* accumulated mainly L-prolina. At the end of the experiment a slight but significant reduction in the F_v/F_m of *E. coccineum*, was found whereas the *PSII* decreased in the three species at low and high photon flux density (*DFE*); being greater the reduction to high *DFE*. The proportion root/shoot did not vary significantly in the three species, during the treatment. Under the imposed conditions, the greater physiological differences were found between *E. coccineum* and *G. avellana*, corresponding with the type of accumulated solute and with the response kinetic of some physiological parameters, such as the foliar water potential at intermediate periods of drought. Nevertheless, they were affected in the same way, at the end of the treatment. *L ferruginea* was not subjected to an intense a water deficit like the other species, due to their low evaporative surface of leaves.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Efectos del déficit hídrico sobre la fisiología de las plantas.

La disponibilidad de agua es considerada como uno de los factores fundamentales en la limitación de la supervivencia, crecimiento y distribución geográfica de las plantas (Sakai & Larcher, 1987; Lemcoff *et al.*, 1994; Ruiz-Lozano, 2003). Las plantas responden a la falta de agua con una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que les permiten resistir en mayor o menor grado los trastornos producidos por el déficit hídrico (Ludlow, 1980; Larcher, 2003).

En climas templado-húmedos como el predominante en la región austral de nuestro país, donde se desarrollan parcialmente los bosques de hoja caduca y en su totalidad los bosques siempre verdes, se pueden presentar períodos de déficit hídrico en verano, por disminución de la pluviosidad o en invierno, por efecto de las bajas temperaturas que disminuyen la disponibilidad de agua en el suelo (Weinberger 1973; Alberdi 1995). No obstante, es la sequía de verano, por producirse en la época de crecimiento del vegetal, la que más debiera afectar a este proceso.

Una exhaustiva revisión sobre crecimiento de árboles sometidos a sequía demuestra que aproximadamente 70-80% de los cambios en crecimiento, pueden ser explicados en base a déficit de agua (Zahner, 1968).

La respuesta más apreciable de las plantas frente al estrés hídrico, es la disminución del rendimiento fotosintético y transpiratorio y por ende del crecimiento. Además, se producen otras manifestaciones bioquímicas, tales como, acumulación de solutos compatibles, incremento del grado de insaturación de lípidos de membrana, cambios en la actividad de las enzimas, síntesis de proteínas de estrés hídrico, etc., y morfológicas (disminución del área foliar, aumento de los

revestimientos de ceras cuticulares, formación de tricomas, aumento de los estratos foliares, aumento del sistema radicular y disminución del vástago, entre otras) (Levitt, 1980; Sakai & Larcher, 1987; Taiz & Zeiger, 2002). Todas estas manifestaciones ayudan en menor o mayor grado a que la planta reduzca la pérdida de agua aumentando su resistencia a la sequía, y por ende, a los efectos nocivos de ella.

2.1.1 *Efectos del déficit hídrico sobre el aparato fotosintético*

El déficit hídrico provoca alteraciones del metabolismo, originando un distanciamiento de las condiciones ideales de funcionamiento en las células fotosintéticas, aumentando la intensidad de los factores que interactúan con el aparato fotosintético, tornándolos estresantes para la planta en condiciones que antes no lo eran. Por ejemplo, se ha reportado que la energía lumínica necesaria para producir cierto grado de fotoinhibición (inhibición de la fotosíntesis por exceso de luz) es menor en presencia de varios estreses incluido el déficit hídrico (Krause, 1988; Demming-Adams & Adams, 1992; Demming-Adams & Adams, 1996).

La inhibición de la fotosíntesis ante un déficit hídrico se debe en gran medida a que los estomas en su rol regulador del balance hídrico, disminuyen su apertura para impedir la pérdida de agua por transpiración, al igual que cualquier intercambio gaseoso entre el interior de la hoja y la atmósfera (Bradford & Hsiao, 1982, Schultze, 1986; Yordanov *et al.*, 2003). Esto impide la entrada del anhídrido carbónico (CO₂) necesario para la fotosíntesis (inhibición estomática) (Cornic, 2000). Adicionalmente, Tezara *et al.* (1999), establecieron que en plantas de girasol (*Helianthus annuus L.*) el estrés hídrico inhibía la fotosíntesis por disminución de las cantidades de ATP-sintasa y de ATP, lo que se relacionó con una disminución en la concentración de Ribulosa 1,5 bifosfato, la molécula necesaria para la fijación del CO₂ por Rubisco.

Adicionalmente, se ha documentado que la disminución de la fotosíntesis en plantas bajo déficit hídrico, produce perturbaciones en los procesos fotoquímicos claves para la fotosíntesis (Graan & Boyer, 1990; Lauer & Boyer, 1992, Flexas & Medrano, 2002). Particularmente el fotosistema II (*PSII*) ha demostrado ser muy susceptible al déficit hídrico. Varios estudios *in vivo* indican que específicamente el complejo de evolución de oxígeno del *PSII* es dañado por estrés hídrico (Canaani *et al.*, 1986; Toivonen & Vidaver, 1988).

El análisis de los fotosistemas por emisión *in vivo* de fluorescencia de la clorofila *a* constituye una herramienta sensible y muy fácil de aplicar en la estimación de los procesos fotoquímicos de la fotosíntesis, y por ende de este último proceso (Krause & Weiss, 1991). Parámetros tales como eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m , *fluorescencia variable/fluorescencia máxima*) y efectiva (Φ_{PSII} , $F_m' - F_o' / F_m'$) dan cuenta de la capacidad total y eficiencia efectiva del aparato fotosintético ante condiciones de oscuridad y luz, respectivamente (ver material y método). Sin embargo, Φ_{PSII} ha demostrado ser más sensible que el F_v/F_m (Conming & Jianhua, 1999), en plantas sometidas a déficit hídrico (Olivares *et al.*, 2005).

2.1.2 Efectos sobre la tasa transpiratoria

El déficit hídrico provoca disminución de la tasa transpiratoria (Taiz & Zeiger, 2002), la que es regulada por los estomas y cuando se abren se establece un gradiente entre la cámara subestomática y la atmósfera circundante (que debe de poseer un potencial hídrico más negativo), entregándose vapor de agua. Esta entrega está asociada con la entrada de anhídrido carbónico (CO_2) necesario para la fotosíntesis.

La apertura y cierre estomático se relacionan con cambios de turgor de las células guardianas del estoma (Taiz & Zeiger, 2002; Levitt, 1980). Cuando éste aumenta el ostíolo (poro)

se abre, y cuando disminuye se cierra. A su vez, los cambios de turgor están relacionados con cambios químicos en las células guardianas, tales como, acumulación o disminución de azúcares, entrada o salida de potasio (K^+) y ácido abscísico *ABA* (Lauer & Boyer, 1992). Bajo condiciones de sequía, el ácido abscísico se traslada a los estomas, provocando cierre estomático por pérdida de turgor inducido por salida de K^+ . De esta manera, las plantas pueden mantener su estatus hídrico, aún cuando adicionalmente se limite la entrada de anhídrido carbónico (CO_2).

2.1.3 Estrés hídrico y acumulación de solutos compatibles

Un mecanismo frecuente de resistencia a la sequía se relaciona con el incremento de carbohidratos, compuestos de amonio cuaternario e iones inorgánicos; estos reciben el nombre de solutos compatibles, debido a que a pesar de su alta concentración en la célula no interfieren con su normal funcionamiento (Taiz & Zeiger 2002). La función de estas moléculas en primera instancia es, disminuir el potencial osmótico y con ello desarrollar bajos potenciales hídricos celulares con respecto al suelo, asegurándose de un buen abastecimiento de agua y manteniendo con ello el turgor, lo que se denomina ajuste osmótico (Clifford *et al.*, 1998).

Un aumento en la concentración de solutos tales como aminoácidos, se han detectado principalmente en hojas de muchas plantas como respuesta al déficit hídrico (Turner & Jones, 1980). En *Ziziphus mauritiana* sometida a sequía inducida por cese de riego, se ha reportado aumento en las concentraciones de azúcares y prolina asociados con ajuste osmótico (Clifford *et al.*, 1998). Igualmente, plántulas de varias especies de *Eucalyptus* presentaron un ajuste osmótico asociado a déficit hídrico y acumulación de solutos compatibles (Lemcoff *et al.*, 1994). En *Rubus spp* cultivado bajo déficit hídrico, se ha reportado una mantención de un potencial de turgencia foliar positivo, en el momento de menor humedad del suelo, debido al descenso del potencial

osmótico. Estos cambios se asociaron con un aumento de 218% de prolina foliar, con respecto de las plantas que se mantuvieron bajo riego constante, lo que sugiere que probablemente hubo ajuste osmótico (Parra *et al.*, 1999).

Maldonado (1992) en un estudio realizado en dos genotipos de *Avena sativa* L., demostró que al inducir déficit hídrico con distintas concentraciones de solución nutritiva de polietilén-glicol (PEG 6000), se produce una acumulación de prolina, además de la rápida aparición de proteínas de 37 kDa y 42 kDa, las que no estaban presentes en las plantas bien hidratadas.

2.1.4 Efectos del déficit hídrico sobre el crecimiento

Plantas sometidas a déficit hídrico, presentan, por lo general un mayor desarrollo radical que del vástago, lo que se expresaría en un mayor cociente raíz-vástago, con respecto a plantas bien abastecidas hídricamente. Mayores antecedentes, en el punto 2.2 (Mecanismos generales de las plantas para resistir el estrés de déficit hídrico).

2.2 Mecanismos generales de las plantas para resistir al estrés de déficit hídrico.

Los mecanismos de resistencia al estrés hídrico han sido agrupados en mecanismos de evasión y de tolerancia (Levitt, 1980 y Ludlow, 1980). En los mecanismos de evasión, como su nombre lo indica, la planta evade el déficit hídrico, favoreciendo la entrada de agua y disminuyendo la pérdida, mientras que en los de tolerancia, el estrés hídrico es soportado, es decir, se produce desecamiento acompañado de estabilización celular (Larcher, 2003).

Las plantas evasoras poseen tejidos muy sensibles a la deshidratación (potencial hídrico letal de -1,5 a -2,5 MPa, contenido hídrico relativo letal menor que 50%), y por ende, poseen características que les permiten evadir las situaciones de déficit hídrico, tales como la capacidad

de regular la proporción raíz-vástago, aumentando la longitud del sistema radical, para tener acceso a zonas hídricamente mejor abastecidas del suelo; cierre efectivo de los estomas al menor indicio de sequía, aumento de la cantidad de estomas por unidad de superficie y reducción del tamaño, hojas pequeñas o abscisión de las hojas senescentes, que permiten disminuir la superficie transpiratoria; aumento del grosor de las ceras cuticulares, aumentando la resistencia a la entrega de agua desde la hoja (menor transpiración cuticular). Si bien la pérdida de agua por vía cuticular es pequeña (alrededor del 5 al 10% del total transpirado), bajo problemas de déficit hídrico se torna de vital importancia (Larcher, 2003; Taiz & Zeiger, 2002).

Las plantas tolerantes pueden perder gran cantidad de agua desde sus protoplasmas celulares, sin sufrir daños graves. La capacidad límite de la planta o los tejidos para perder agua, son medidos en base al contenido hídrico relativo (*CRA*), déficit de saturación de agua o potencial hídrico mínimo capaz de producir el primer signo de daño irreparable (umbral crítico), o sobre el potencial hídrico capaz de producir un 5 - 10 o 50% (*DL₅₀*-dosis letal 50), de tejido necrótico (Larcher, 2003).

Las plantas tolerantes poseen un potencial hídrico y osmótico más bajo que las especies sensibles. Además, suelen presentar una resistencia plasmática (Stocker, 1956) alta al desecamiento, como se ha demostrado en algunas especies arbóreas del bosque templado chileno (Weinberger *et al.*, 1973). En algunas especies, como las “*resurrection plants*” el desecamiento puede ser tan intenso que los procesos fisiológicos se detienen, pero se reanudan con la rehidratación. En parte, esto es posible gracias a la síntesis o liberación de proteínas (deshidrinas, osmotinas y LEA –*late embryogenesis abundant*), metabolitos del stress (prolina, D-pinitol, rafinosa, trialosa, β -dimetilsulfopropionato, espermita y glicina-betaina, entre otros) desde los compartimentos almacenadores, que logran estabilizar la estructura celular (Larcher, 2003).

Los dos mecanismos descritos, evasión y tolerancia, pueden ser igualmente eficientes ante una sequía, aún cuando es posible que ambos mecanismos se presenten simultáneamente (Ludlow *et al.*, 1985).

2.3 Características de las especies de la familia *Proteaceae*

Cinco son las especies arbóreas de la familia Proteáceae representadas en Chile, *Embothrium coccineum* (J. R. *et* G. Foster) “Notro”, *Gevuina avellana* (Mol) “Avellano”, *Lomatia dentata* (R. *et* P.) R. Br. “Avellanillo”, *Lomatia ferruginea* (Cav). R. Br. “Fuinque” y *Lomatia hirsuta* (Lam.) Diles ex Macbr “Radal”, las cuales se restringen a la región Centro Sur y Austral del país, donde el clima es templado lluvioso con tendencia oceánica predominantemente (Alberdi, 1995). Estas especies han sido caracterizadas por Weinberger (1974) en cuanto a los factores microclimáticos bajo los cuales se regeneran espontáneamente. Basándonos en este trabajo, seleccionamos para el presente estudio, tres especies que poseen diferentes requerimientos ecológicos de hábitat (rango ecológico), para su desarrollo, las que se describen a continuación.

E. coccineum es una especie heliófita sombra intolerante, de rápido crecimiento, siempreverde facultativa (tropófito), es decir, elimina sus hojas en periodos desfavorables (heladas) (Weinberger, 1974), pero sólo en estado adulto (Alberdi *et al.*, 1985; Alberdi y Donoso, 2004). En Chile se distribuye de la Provincia de Curicó (VII Región) hasta la Isla Hoste (XII Región), y desde el nivel del mar hasta los 1.200 m s m, desarrollándose preferentemente en la región situada al sur del Lago Llanquihue y Chiloé, siendo esta última parte su centro de dispersión (Rodríguez *et al.*, 1983). En general, crece en suelos arenosos, livianos y húmedos (Rodríguez *et al.*, 1983). También puede desarrollarse sobre escoria volcánica en los Andes,

teniendo el rol de especie pionera (capacidad de establecerse en suelos denudados por acción natural o antrópica) (Weinberger, 1974; Alberdi, 1995). Su presencia en los Ñadis (tipo especial de suelo) ubicados entre cordones montañosos que pueden presentar fuertes inversiones térmicas es también característica (Alberdi y Donoso, 2004). En Mallines, formaciones vegetales donde pueden producirse condiciones desfavorables de bajas temperaturas, heladas y nieve invernal e inversiones térmicas en primavera e incluso verano (Alberdi *et al.*, 1985; Alberdi, 2004), *E. coccineum* se desarrolla sobre un suelo turboso. En la alta cordillera y regiones subantárticas, adopta formas arbustivas. Esta especie es la que posee la mayor amplitud ecológica de entre las proteáceas chilenas.

La siempre verde *G. avellana*, ocupa hábitats templados y con reducidas fluctuaciones térmicas (Weinberger, 1974). Es una especie de rápido crecimiento, que eventualmente puede comportarse como pionera. Su regeneración óptima se produce bajo el dosel del bosque y posteriormente puede crecer en sitios más iluminados (especie semitolerante). Crece generalmente entremezclado con otras especies del bosque húmedo, aunque a veces se le encuentra en pequeños grupos aislados. Se distribuye desde la Provincia de Curicó (VII Región) hasta las Islas Guaytecas (XI Región), preferentemente en los faldeos de ambas cordilleras (Rodríguez *et al.*, 1983)

Por otro lado, *L. ferruginea*, a diferencia de las demás especies de proteáceas estudiadas, es la única restringida a condiciones de baja luminosidad (especie sombra-tolerante), alta humedad edáfica, atmosférica y temperaturas frías del bosque lluvioso templado, creciendo al resguardo del bosque. Se distribuye desde el Sur del Río Bío-Bío (VIII Región) hasta la Provincia de Última Esperanza (XII Región), entre los 5 – 1.125 m s. n. m., siendo más abundante entre la Provincia de Valdivia y la Isla de Chiloé.

Debido a la habilidad contrastante de éstas Proteáceas para desarrollarse bajo condiciones ambientales diferentes (intensidad lumínica, temperatura, humedad edáfica y atmosférica) es interesante conocer los cambios de las propiedades fisiológicas ante un estrés hídrico inducido bajo las mismas condiciones experimentales. Esto permitirá, establecer si las preferencias de hábitat de estas especies se expresan en sus propiedades fisiológicas y además aclarar la estrategia de colonizar sitios alterados en forma natural o antrópica.

2.4 Hipótesis

Se postula que, de acuerdo al mayor carácter heliofítico y pionero de *E. coccineum* con respecto a *G. avellana* (sombra semi-tolerante) y *L. ferruginea* (sombra-tolerante), su aparato fotosintético debería ser capaz de resistir en mayor grado un déficit hídrico que las otras especies, presentando características típicas de plantas adaptadas a sequía, tales como una menor transpiración, mayor eficiencia fotoquímica, mayor acumulación de solutos compatibles, y un mayor cociente entre la biomasa de la raíz versus vástago, que en las otras especies de la familia *Proteaceae*.

2.5 Objetivos

Objetivo general:

Evaluar la respuesta fisiológica a la sequía en plántulas de tres especies de Proteáceas de requerimientos ecológicos contrastantes, sometidas a déficit hídrico en condiciones controladas de invernadero.

Objetivos específicos:

- Evaluar los cambios en los parámetros hídricos foliares y edáficos (potencial hídrico, y los contenidos relativos de agua) inducidos por déficit hídrico en plántulas.
- Determinar el comportamiento transpiratorio ante el déficit hídrico en plántulas.
- Determinar el efecto de la sequía sobre la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (*PSII*), evidenciada por el estudio *in vivo* de los parámetros de fluorescencia de la clorofila *a* en plántulas de Proteáceas.
- Analizar la acumulación de solutos compatibles, carbohidratos totales y prolina, en las partes del cormo y hojas, respectivamente.
- Determinar los cambios de la relación raíz/vástago durante el tratamiento de déficit hídrico en plántulas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Procedencia y obtención de las plantas

Se trabajó con plántulas de 1 a 2 años de edad de tres representantes de la familia Proteaceae: *Embothrium coccineum* “Notro”, *Gevuina avellana* “Avellano” y *Lomatia ferruginea* “Fuinque”, caracterizadas por poseer diferente rango ecológico. Un total de 30 plántulas de cada especie, fueron recolectadas en un bosque de la Cordillera de Pichiquillaie (41° 31’ S, 72° 45’ W), X Región, Chile, en el invierno del año 2005, y fueron trasladadas al Invernadero del Instituto de Botánica de la Universidad Austral de Chile en Valdivia, X Región, Chile, para su instalación y acondicionamiento.

3.2 Instalación y acondicionamiento de las plantas

Las plántulas fueron depositadas en maceteros de 1 litro, que contenían sustrato de tierra de hoja y corteza de pino compostada en proporción 1:1. Fueron regadas 2 a 3 veces por semana, con agua y solución nutritiva completa (Phostrogen ®) alternadamente, por algunos meses, para su acondicionamiento en invernadero. Previo al inicio del experimento, se determinó la capacidad de campo del sustrato, así como las curvas pF (relación entre el potencial hídrico del suelo $-\Psi_h$ y su respectivo contenido relativo de agua ($CRA_s = CRA$ suelo)), siguiendo las instrucciones de Hartge & Horn (1992) en la forma descrita más adelante. La importancia de esta conversión radica en que el potencial hídrico, a diferencia del CRA , es una medida universal de la disponibilidad de agua, que nos indica cuan fijada está el agua al suelo (en unidades de presión – MPa por lo general-), o cuanta energía es necesaria ejercer (en este caso particular por la planta)

para obtener agua libre a partir de una fuente combinada, independientemente de la textura y estructura del suelo.

3.3 Registro de las condiciones ambientales.

Se instaló una estación climática portátil unida a un Data-Logger en el invernadero, la cual registró las condiciones de humedad relativa del aire (%HR), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), y densidad de flujo fotónico ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, DFF). La temperatura promedio máxima registrada al medio día durante el tratamiento fluctuó entre 13°C y $30,5^{\circ}\text{C}$, mientras que la humedad relativa del aire osciló entre 48,3 y 86,4%. La DFF máxima registrada al medio día fue de $1.428 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la mínima de $622,370 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.4 Tratamiento de déficit hídrico

Transcurrido el acondicionamiento de las plántulas, éstas fueron regadas a capacidad de campo máxima, dejando escurrir el exceso de agua por cerca de 1 hora, hasta peso constante. De las 30 plantas iniciales de cada especie, 20 fueron sometidas a déficit hídrico por privación de riego y 10 se establecieron como control (Fig. 1). Sólo 5 de estas 10 plantas fueron retiradas para determinar el contenido relativo de agua foliar (CRAf), el potencial hídrico (Ψ_{hf}) y osmótico foliar ($\Psi_{\pi f}$), la concentración de solutos compatibles y distribución de biomasa total para el tiempo cero (inicio) del tratamiento de déficit hídrico. Las otras cinco plantas control se mantuvieron bien regadas con agua y nutrientes alternadamente y fueron sacrificadas al final del tratamiento. De las 20 plantas destinadas a privación de riego 10 fueron sacrificadas en el tiempo intermedio y las restantes al final, determinándose en cada tiempo los parámetros descritos arriba.

El experimento finalizó cuando las plántulas de *E. coccineum* mostraron marchites.

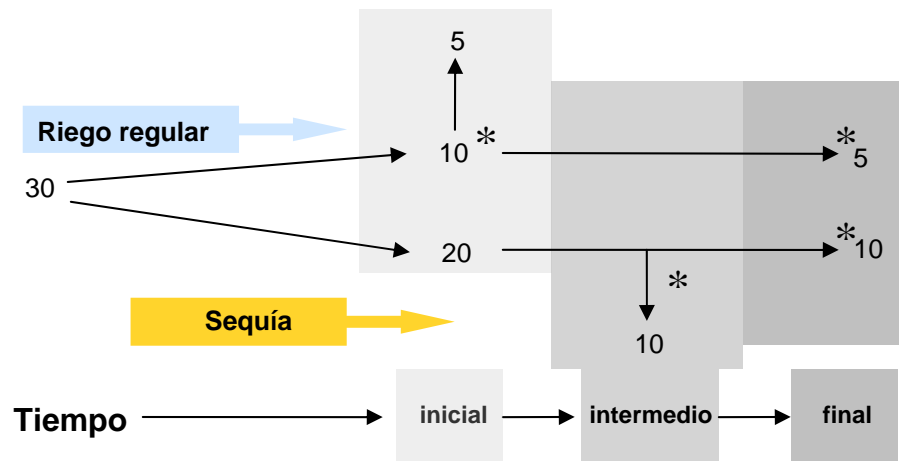


Fig. 1. Diagrama de flujo del tratamiento de déficit hídrico. El asterisco en el esquema señala el tiempo inicial, intermedio y final, respectivamente, en el cuál se realizaron las determinaciones descritas en el texto (más arriba) en las plantas durante el tratamiento de déficit hídrico.

3.5 Determinación del potencial hídrico del suelo

El potencial hídrico del suelo se determinó indirectamente a través de la determinación gravimétrica del contenido relativo de agua del suelo (*CRA*s), la que se asoció con sus respectivas curvas *pF*.

El *CRA*s se determina mediante la siguiente relación:

$$CRA_s = \frac{(\text{Peso suelo húmedo} - \text{Peso suelo seco}) \times 100}{(\text{Peso suelo a Capacidad de Campo} - \text{Peso suelo seco})}$$

Las curvas *pF* nos permiten interpretar la distribución de los poros en el suelo, al someter, en envases de presión, muestras de suelo saturados de agua a presiones de 0.060, 0.0330, y 15,430 MPa. Estas presiones son capaces de desplazar el agua retenida en los poros de >50, entre 50 - 10, y entre 10 - 0,2 μm de diámetro, respectivamente. Estos intervalos de poros corresponden

a los espacios ocupados por el agua de escurrimiento rápido, lento, y de agua útil, respectivamente.

En el equilibrio de presión, la presión aplicada es igual a la fuerza con que está retenida el agua en el suelo (la medida de esta fuerza está dada en unidades de presión (MPa) y se simboliza como: Ψ_h , potencial hídrico del suelo). La porosidad para cada una de las presiones se calcula de una manera extensa y compleja (Hartge & Horn, 1992), por lo tanto, sólo se mencionará que en el proceso de caracterizar la porosidad del suelo se determina el porcentaje de agua volumen base (Hv) para cada presión mediante la siguiente fórmula:

$$Hv_{(60, 330, 15430 \text{ c.a})} = \frac{Psh - Pss}{Pss} * Da * 100$$

Donde: Psh = Peso suelo húmedo.

Pss = Peso suelo seco.

Da = Densidad aparente del suelo = Peso Suelo / Volumen suelo Total.

Por lo tanto, a cada presión aplicada le corresponde un CRA s. Esto permite establecer una relación entre las dos variables (CRA s versus Ψ_h).

Para este procedimiento, se registró semanalmente el peso de los maceteros completos. Al momento de procesar las plantas para los análisis bioquímicos, adicionalmente se determinó el peso de la planta y del macetero, para luego restar estas cantidades al peso obtenido en cada semana. Luego se procedió a secar el suelo en cámaras de secado a 90 °C por 2 días, hasta peso constante. Por diferencia de peso entre el peso húmedo y el suelo seco y conociendo el peso de

saturación, se determinó el CRA_s en cada momento del registro semanal, el cuál se transformó a potencial hídrico Ψ_h .

3.6 Determinación del contenido relativo de agua foliar

Para determinar el CRA_f se pesó la hoja fresca recién cortada y se sumergió en agua destilada dentro de un tubo de plástico, luego de pasados 48 horas se pesó y se procedió a secarlas por 72 horas a 80 °C para luego ser pesadas nuevamente, de esta manera se obtuvo los parámetros necesarios para calcular el CRA_f , cuya fórmula es la siguiente:

$$CRA_f = \frac{\text{Peso hoja fresca} - \text{Peso hoja seca}}{\text{Peso hoja saturada de agua} - \text{Peso hoja seca}}$$

3.7 Determinación del potencial hídrico (Ψ_{hf}) y osmótico (Ψ_π) foliar

3.7.1 Potencial hídrico (Ψ_{hf}) foliar

Este fue evaluado por medio de una cámara de presión (Modelo PMS-1000, U.S.A), según el método de Scholander *et al.* (1964) (Fig. 2). Primeramente se separó la hoja del tallo bajo agua destilada, para evitar entrada de aire a los haces conductores, la que fue insertada en la cámara de la bomba, de tal forma que el pecíolo sobresaliera de ella (Fig. 2). El pecíolo fue aprisionado con una goma perforada, de modo de evitar escape de presión por los alrededores cuando ésta sea aplicada. Se midió inmediatamente el potencial hídrico foliar, aplicando una presión conocida de nitrógeno (N_2) gaseoso por el lado lateral de la bomba. Como consecuencia de la presión ejercida se liberó una gota de agua proveniente de las columnas del xilema del pecíolo. La presión necesaria para la liberación de la gota corresponde al potencial hídrico xilemático de la hoja (potencial hídrico foliar) que se leyó en el manómetro ubicado lateralmente.

Para cambiar la muestra se despresuriza la cámara abriendo la llave ubicada en el lado opuesto a la entrada del gas.

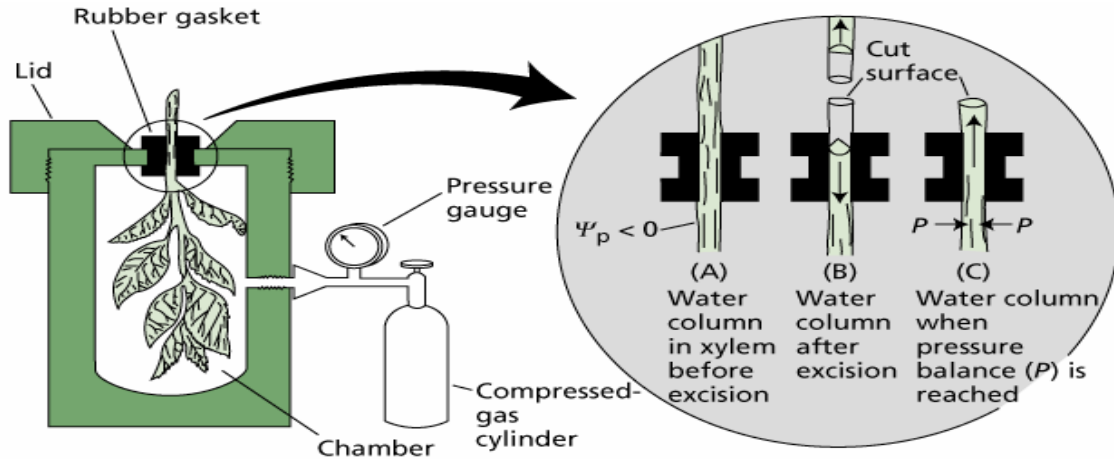


Fig. 2. Procedimiento para determinar el potencial hídrico foliar mediante cámara de presión (según el método de Scholander). Esquema tomado de Taiz & Zeiger, del sitio *Web Plant Physiology Web Topic 3.5*.

3.7.2 Potencial osmótico (Ψ_{π}) foliar

El potencial osmótico foliar fue determinado por el método psicrométrico de acuerdo a instrucciones de Brown, R. & Oosterhuis, M. (1992), con modificaciones. Este equipo está dotado de una cámara portadora de un sensor de termocupla (L-51) acoplado a un microvoltímetro psicrométrico (HR-33T, Wescor Inc., Logan, UT). Para ello se tomó una hoja de cada plántula y se hidrató por 48 h en agua destilada, el líquido celular fue extraído con jeringa y depositado en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, luego de homogeneizarse con un Vortex se dejó caer una pequeña gota en un papel filtro N°1, el cuál se introdujo en el sensor de la cámara para ser medido en el laboratorio en condiciones ambientales constantes.

El principio subyacente de este método radica en la capacidad de los solutos de limitar la libertad del agua manteniéndola aferrada a ellos (a mayor cantidad de solutos más negativo es el

potencial osmótico ($-\Psi_{\pi}$), impidiendo su evaporación, por lo tanto la humedad relativa dentro del sensor de la cámara es menor si hay solutos en la solución que si estuviera únicamente con agua a una misma temperatura. Para que el agua evaporada vuelva al estado líquido, es necesario bajar la temperatura de manera directamente proporcional a la cantidad de vapor de agua contenida en el volumen de aire.

Las diferencias de temperaturas entre la unión de la termo-cupla y la referencia interna hacen que haya una diferencia de potencial eléctrico, que el equipo mide en μVolt , ya que ésta es muy pequeña. Por lo tanto, el potencial osmótico es proporcional a la diferencia de potencial eléctrico, de esta manera se puede estimar el Ψ_{π} .

Estas determinaciones fueron hechas en tres tiempos, al inicio del tratamiento de sequía, a la mitad y al final.

3.8 Funcionalidad del aparato fotosintético

Se estableció en base a la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II (*PSII*) del aparato fotosintético, utilizando un fluorímetro modulado portátil (FMS1, Hansatech, Reino Unido), el cuál es un método no intrusivo y que por lo tanto, permite medir “*in vivo*” los cambios de fluorescencia de las hojas.

Para una mejor comprensión de la operatividad de este método debe tenerse en cuenta que, la energía lumínica absorbida por las moléculas de clorofila en la hoja puede tener tres rutas: ser transferida hasta los centros de reacción y producir fotosíntesis (fotoquímica), ser transformada y disipada en forma de calor, o ser re-emitida en forma de fluorescencia (emisión de un fotón atenuado). Estos tres procesos compiten entre sí, de manera que cuando uno aumenta,

los otros disminuyen su rendimiento (Taiz & Zeiger, 2003; Krause & Weis, 1991; Maxwell & Johnson, 2000).

Cuando la planta está en oscuridad los tres procesos están detenidos, y los centros de reacción del *PSII* están oxidados o abiertos (sin electrones). Cuando la planta es sometida a una condición de luz intensa, la emisión de fluorescencia aumenta desde un nivel mínimo (F_o) hasta un máximo (F_m). Luego de que las enzimas encargadas del metabolismo del carbono son activadas, los estomas abiertos permiten la entrada de CO_2 produciéndose fotosíntesis, disminuyendo así la emisión de fluorescencia paulatinamente, tardando varios minutos en estabilizarse, dependiendo de la especie (Baker, 1993; Maxwell & Johnson, 2000).

El espectro de fluorescencia es diferente al de la luz absorbida, siendo el *pick* de fluorescencia de menor longitud de onda que el de la luz absorbida. De esta manera se puede discriminar entre fluorescencia y la luz entrante.

3.8.1 Procedimiento para la determinación de fluorescencia

Se oscurecieron las hojas con una pinza especial, durante 30 minutos, con el fin de que los centros de reacción se encuentren abiertos. Luego se aplicaron pulsos de luz de intensidad y duración determinadas y se obtuvo el siguiente parámetro:

F_o = fluorescencia mínima o basal, luego de aplicar una luz de medida de baja intensidad.

F_m = fluorescencia máxima, luego de aplicar una intensidad saturante de luz.

$(F_m - F_o)/F_m = F_v/F_m$. Este parámetro estima la eficiencia fotoquímica máxima o potencial del *PSII*, cuando todos los centros de reacción están abiertos (Maxwell & Jonson 2000). Los valores óptimos para este parámetro son de alrededor de 0.83 (Björkman & Demming, 1987).

A continuación se estableció la eficiencia fotoquímica efectiva o rendimiento cuántico efectivo del *PSII*, mediante la siguiente relación:

$\Phi_{PSII} = (Fm' - Ft) / Fm'$; donde Fm' corresponde a la máxima fluorescencia emitida por una hoja adaptada a la luz, luego de ser aplicado una intensidad de luz saturante y Ft es la fluorescencia producida en un estado estable de fotosíntesis luego de aplicar continuamente luz actínica de una intensidad fijada por los requerimientos del experimento. Este parámetro mide la proporción de la luz absorbida por la clorofila asociada con el *PSII* que es usada efectivamente en la vía fotoquímica bajo condiciones de luz (Maxwell & Jonson, 2000).

Este último parámetro se obtuvo al aplicar, por un periodo de 4 minutos, dos intensidades de luz actínica alternadamente, una de 100 y otra de 400 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, de tal manera que el aparato fotosintético se adapte a la nueva condición lumínica, dando origen a Ft , antes de que sea aplicado el pulso de saturación que origina Fm' . Estas intensidades fueron definidas *a priori* por una curva de eficiencia fotoquímica *versus* intensidad de luz. Las dos intensidades de luz corresponden a un nivel normal y de saturación, respectivamente, para las especies estudiadas. Las determinaciones de Φ_{PSII} fueron hechas cada 20 días, desde el inicio del experimento.

3.9 Tasa de transpiración

La tasa de transpiración total fue registrada con un Analizador de Gases Infrarrojos (IRGA ADC-LCA4- Analytical Development Co. England), expresada en $\text{mmol H}_2\text{O}_{(g)} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Antes de iniciar el tratamiento de déficit hídrico se realizó un registro de la variación diaria de la tasa de transpiración en las tres especies, con la finalidad de determinar las horas a las cuales se presenta el máximo de transpiración, para así utilizar este intervalo de tiempo en las mediciones posteriores. Este análisis reportó que entre las 12:00 y 15:00 horas, se producía la

máxima transpiración en las tres especies. Por lo tanto, las mediciones fueron hechas dentro de este rango horario, cada 20 días, desde el inicio del experimento. La transpiración medida por este equipo representa la transpiración de una determinada superficie foliar, la que es igual para las tres especies, independiente de la superficie foliar total.

3.10 Determinación de los solutos compatibles

3.10.1 Determinación del contenido de prolina

El contenido de prolina fue determinado por el método de Bates *et al.* (1973), para lo cuál se maceró 0.2 g de tejido foliar fresco en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido, y se homogeneizó con 10 ml de ácido sulfosalicílico 3%. La pasta resultante fue filtrada en papel filtro, y del líquido libre de tejido foliar se tomó una alícuota de 2 ml al cual se le agregaron 2 ml de ácido acético glacial y 2 ml de nihidrina (compuesto que al reaccionar con prolina a pH ácido forma un complejo coloreado). Este conjunto se agitó en Vortex por 15 s y se dejó incubar a baño termostático por 1 h a 100°C. Se retiraron los tubos y se enfriaron en hielo rápidamente. Se añadió 4 ml de tolueno y se agitó por 30 s. La fase superior (tolueno + complejo coloreado) se retiró con pipeta Pasteur. Se leyó la absorbancia a 546 nm en el espectrofotómetro y los valores se interpolaron en la curva de calibración hecha con estándar de L-prolina.

3.10.2 Determinación de los carbohidratos solubles totales

Carbohidratos solubles totales (CST) en hojas, tallo y raíces fueron determinados por medio del método descrito por Zúñiga-Feest *et al.* (2003). Se pesaron 0.2 g de tejido fresco, el que fue pulverizado con nitrógeno líquido en un mortero y homogeneizado con 6 ml de etanol al 80%, para luego ser incubado por 30 min a 60°C en baño termostático. Posteriormente se

centrifugó por 30 min a 10.000 rpm y desde el sobrenadante se tomó una alícuota de 200 μ l el cuál se diluyó en 800 μ l de agua destilada en un tubo de ensayo, a esta solución se le agregaron 250 μ l de Resorcinol al 1% junto con 1,75 ml de HCl 37%. Luego se incubó durante 8 min a 80°C. Se leyó la absorbancia a 520 nm y se estimó su concentración en la curva de calibración hecha con estándar de sacarosa. Por lo tanto, los CST se expresan en base a sacarosa.

3.11 Determinación de la distribución de biomasa

Se determinó gravimétricamente por medio de una balanza de precisión (APX-203, Denver Instrument). Se estableció el cuociente raíz/vástago como otro indicador de la respuesta al estrés por sequía (Larcher, 2003).

4. RESULTADOS

4.1 Potencial hídrico del suelo

El potencial hídrico del suelo (Ψ_h suelo) disminuyó en las tres especies con respecto al inicio del experimento (Fig. 3). *E. coccineum* y *G. avellana* manifestaron el mayor descenso, -2,58 MPa y -2,61 MPa, respectivamente. Al término del experimento, no así *L. ferruginea* que disminuyó sólo hasta -0,74 MPa. Los valores promedios registrados para *E. coccineum* son más bajos en cada punto de la curva que los de *G. avellana*, a excepción del día 63 en que prácticamente se igualan. Los valores de Ψ_h del suelo y la tasa de descenso de éste ($\Delta\Psi_h$ suelo x día⁻¹, pendiente de la curva) son semejantes hasta los 27 días, entre *G. avellana* y *E. coccineum*. Sin embargo, desde este día en adelante la tasa de *G. avellana* se mantiene en un valor que rodea los 0,04 MPa x día⁻¹ hasta el final del tratamiento, no así *E. coccineum* que presenta un $\Delta\Psi_h$ suelo x día⁻¹ de 0,073 que disminuye drásticamente a 0,017 MPa x día⁻¹ desde el día 45. *L. ferruginea* disminuye poco, a razón de 0,003 MPa x día⁻¹ los primeros 20 días, para luego mantener una tasa de alrededor 0,015 MPa x día⁻¹ hasta el término del experimento, llegando hasta 0,74 MPa al término del experimento.

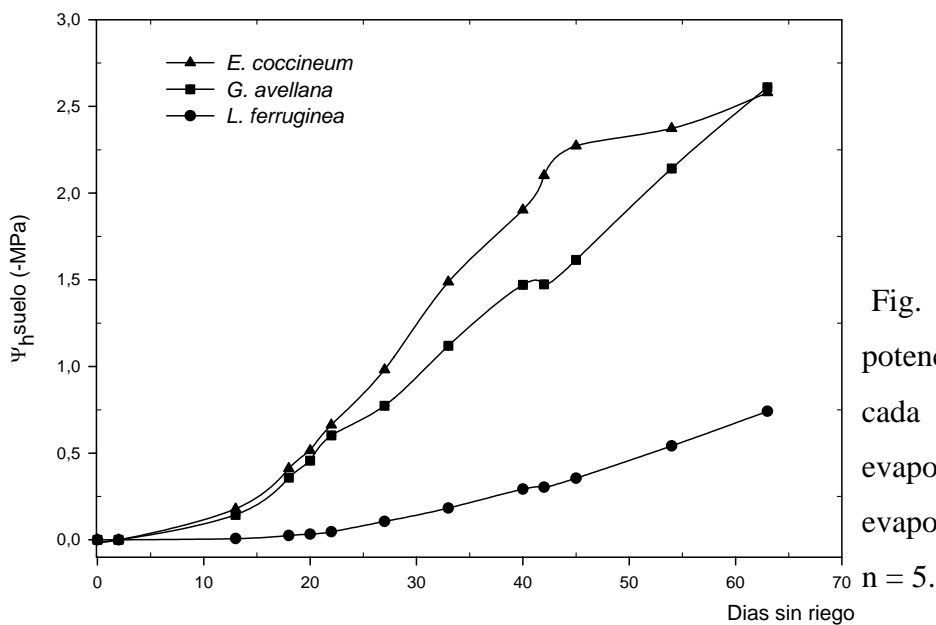


Fig. 3. Disminución del potencial hídrico del suelo de cada especie, producto de la evapo-transpiración foliar y la evaporación directa del suelo.

4.2 Parámetros hídricos foliares

4.2.1 Contenido relativo de agua foliar

El contenido relativo de agua foliar (CRAf) inicial fue similar entre *E. coccineum* y *L. ferruginea* $\pm 97,20\%$, siendo *G. avellana* más bajo que los demás (87,20%) (Fig. 4). Las curvas de CRAf durante el tratamiento de sequía muestran un descenso marcado ($P \leq 0,05$), en relación a la condición inicial del experimento. Este descenso fue mucho mayor en *E. coccineum* y *G. avellana* que en *L. ferruginea*. También hubo diferencias significativas entre el CRAf inicial y final de las plantas irrigadas (controles). En *L. ferruginea* no se presentaron diferencias en el CRAf al final del tratamiento entre las plantas sometidas a sequía y las irrigadas.

La disminución porcentual, entre el inicio del experimento y las plántulas en déficit hídrico, a distintos tiempos, y en comparación a su respectivo control, a los 63 días, se indica en la Tabla 1. Según esta tabla, entre el inicio (punto 0) y los 63 días de experimento, todas las plantas irrigadas, independiente de la especie, experimentan una disminución del CRAf, siendo más marcada esta situación en *G. avellana*. Este descenso fue mucho más marcado en las plántulas sometidas a déficit hídrico. Todas las especies en déficit hídrico, disminuyeron el CRAf en la primera mitad del tratamiento (0 - 27 días) para luego disminuir en menor proporción en la segunda mitad (27 - 63 días), siendo *L. ferruginea* el que lo hace en una menor proporción en las dos etapas, disminuyendo durante todo el tratamiento, un total de 11,31%. La disminución del CRAf en la primera etapa, en plántulas en déficit hídrico, entre *E. coccineum* y *G. avellana* es similar (19%), pero en la segunda mitad *G. avellana* disminuye un 86% más que *E. coccineum*.

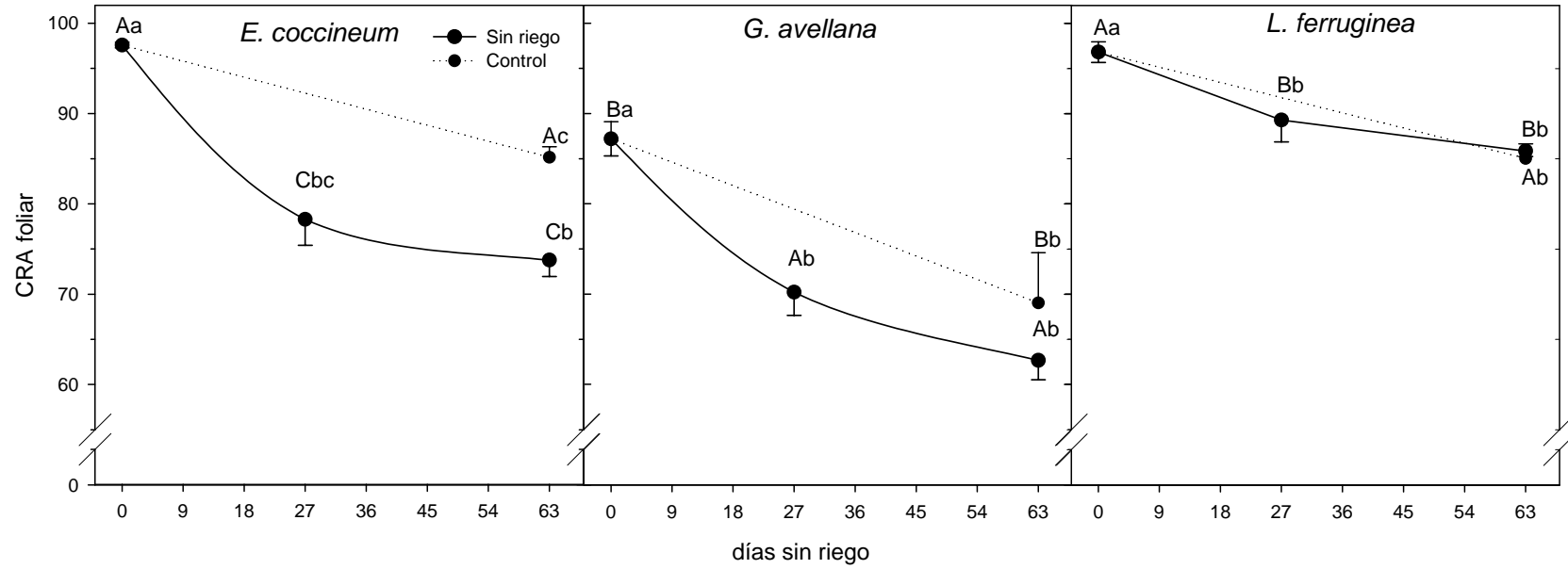


Fig. 4. Contenido relativo de agua foliar en tres tiempos del tratamiento en plantas control y sin riego de *E. coccineum*, *G. avellana* y *L. ferruginea*. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas en el CRA_f dentro de la especie, entre los días sin riego y letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas en el CRA_f entre las especies, medidas a un mismo tiempo. Los resultados son promedios de 5 réplicas \pm error estándar.

Tabla 1. Porcentajes de disminución del *CRAf*, entre distintos tiempos de tratamiento. 0 = inicio, en plántulas de *E. coccineum*, *G. avellana* y *L. ferruginea*. Variaciones entre el 0 y 63 días en plántulas hidratadas, sugieren cambios normales en las plántulas. El asterisco indica diferencias significativas entre los días comparados.

		% disminución				
especie	días	plántulas hidratadas	plántulas en sequía		Respecto al Control	
		0 – 63	0-27	27-63	0-63	63 ctrl-63 seq
<i>E. coccineum</i>		12,740*	19,776*	5,776	24,401*	13,364*
<i>G. avellana</i>		20,841*	19,479*	10,757	28,141*	9,222
<i>L. ferruginea</i>		12,163*	7,774*	3,835	11,311*	-0,970

4.2.2 Potencial hídrico foliar

Los potenciales hídricos foliares (Ψ_{hf}) disminuyeron significativamente al término del experimento a -1,98 MPa y -2,05 MPa en *E. coccineum* y *G. avellana*, respectivamente (Fig 5). *L. ferruginea* no manifestó diferencia significativa con la condición de su control, pero fue la única especie que tuvo diferencias entre el tiempo 0 y 63 días en las plantas bien hidratadas. *G. avellana* manifestó un descenso inmediato a los 27 días de transcurrido el déficit hídrico, siendo esta diferencia significativa ($P \leq 0,05$) en relación a las demás especies.

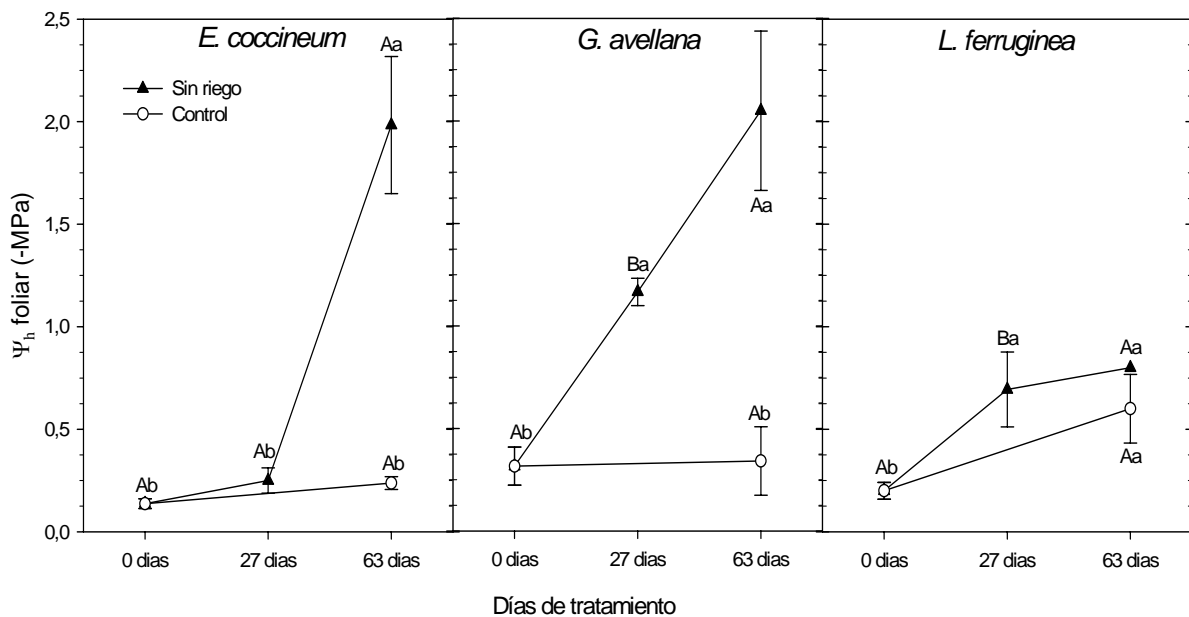


Fig 5. Potencial hídrico foliar a través del tratamiento de sequía en plantas irrigadas y sometidas a déficit hídrico, en plántulas de *E. coccineum*, *G. avellana* y *L. ferruginea*. Los valores son promedios de 4 réplicas \pm error estándar. Letras minúsculas diferentes, indican diferencias significativas entre los días de tratamiento, control y sequía, para una misma especie. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre las especies dentro de un tratamiento, en un mismo día.

4.2.3 Potencial osmótico foliar

El potencial osmótico foliar (Ψ_{π}) no mostró diferencias significativas ($P \geq 0,05$) en las plántulas sometidas a déficit hídrico, dentro de las especies consideradas (Fig 6). Las plántulas control (final del tratamiento) de *E. coccineum* y *G. avellana* aumentaron el Ψ_{π} con respecto a la condición inicial, intermedia y final de Ψ_{π} de las plántulas en déficit hídrico, siendo marcada en *G. avellana*. *L. ferruginea* no manifestó esta disminución en el Ψ_{π} de sus plántulas control durante el tratamiento.

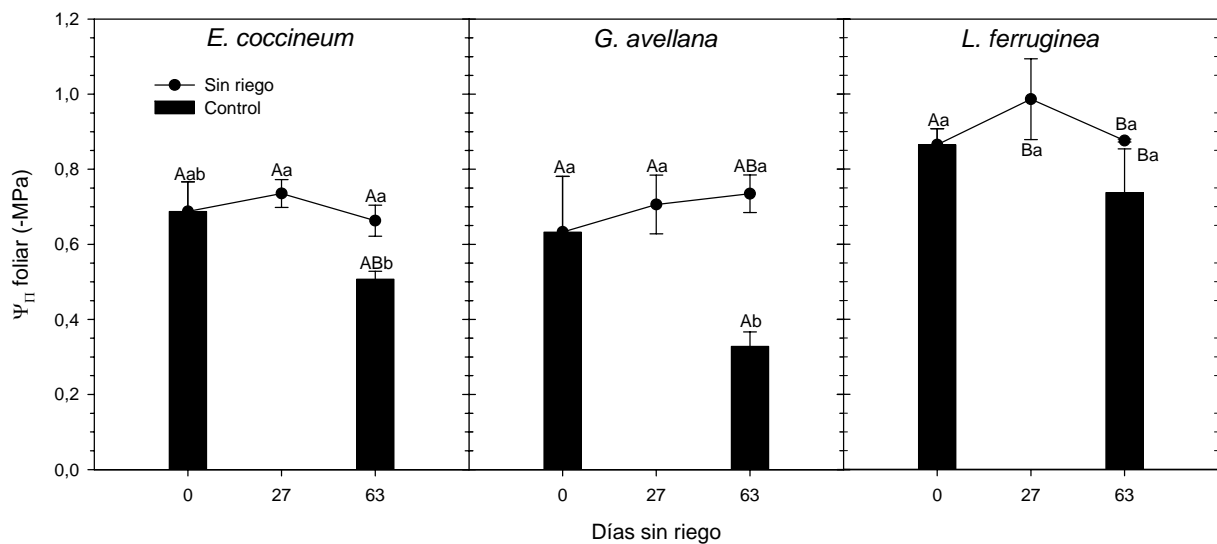


Fig 6. Variación del potencial osmótico foliar a través del tratamiento de déficit hídrico, en plántulas de *E. coccineum*, *G. avellana* y *L. ferruginea*. Valores son promedios de 4 réplicas \pm error estándar. Letras minúsculas distintas, indican diferencias significativas dentro y entre los tratamientos, en una misma especie. Letras mayúsculas distintas, indican diferencias entre especies medidas a un mismo tiempo y tratamiento.

4.2.4 Potencial hídrico del suelo versus potencial hídrico foliar

Al inicio del tratamiento de déficit hídrico, los potenciales hídricos foliares estuvieron por debajo (más negativos) que el respectivo potencial hídrico del suelo en todas las especies (Fig 7). Esta situación se mantuvo en *L. ferruginea* y parcialmente en *E. coccineum*. *G. avellana* no superó esta condición en los sucesivos dos tiempos de medición, lo que se observa teniendo como referencia la línea punteada. Conceptualmente, la línea punteada marcaría la igualdad de potencial hídrico entre el suelo y la hoja.

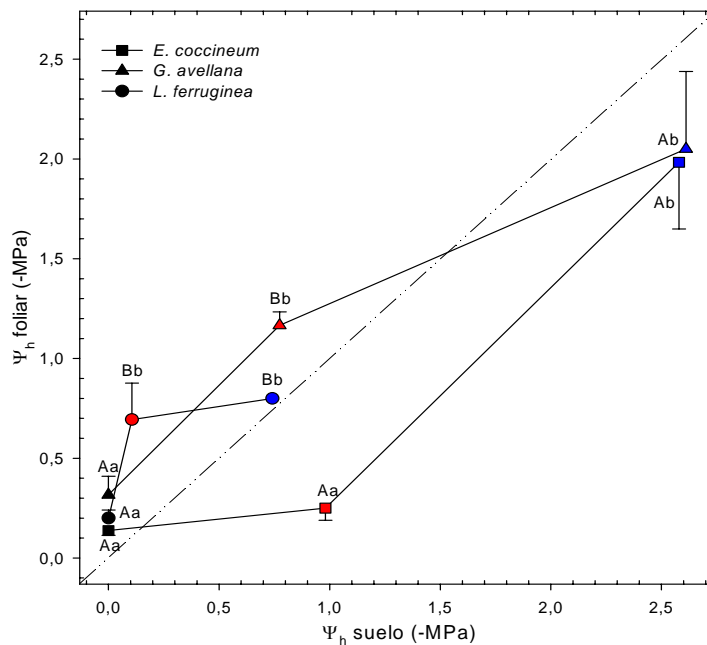


Fig 7. Cinética del potencial hídrico foliar en función del potencial hídrico del suelo, expresado en MPa, a los 0 (negro), 27 (rojo) y 63 días (azul) de transcurrido el déficit hídrico, en plántulas de *E. coccineum*, *G. avellana* y *L. ferruginea*. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre el potencial hídrico foliar dentro de una misma especie. Letras mayúsculas distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) del potencial hídrico foliar entre las especies a un mismo tiempo. Una relación óptima entre estas variables, para la incorporación de agua, desde las raíces, debería ser que el potencial hídrico foliar fuese menor que el potencial hídrico del suelo ($\Psi_{h f} < \Psi_{h s}$), lo cuál correspondería a puntos en la gráfica ubicados en la región superior a la línea punteada.

4.3 Funcionalidad del aparato fotosintético

4.3.1 Eficiencia cuántica máxima

La eficiencia cuántica máxima del *PSII* (F_v/F_m), no mostró variaciones significativas dentro de las especies con respecto a sus controles, a pesar de que los valores promedios en las plántulas sometidas a déficit hídrico son menores a las irrigadas (control) (Fig 11), la excepción se manifestó al día 54 de privación de riego en *E. coccineum* y *G. avellana*, donde los valores de F_v/F_m en las plántulas sometidas a sequía disminuyeron significativamente, con respecto a sus controles (Fig 11), situación que no se observó en el día final de tratamiento en ninguna de estas especies.

4.3.2 Eficiencia cuántica efectiva

La eficiencia cuántica efectiva (Φ_{PSII}) se mantuvo estable (Fig.12) en las plantas irrigadas (control) de todas las especies sometidas a una baja intensidad de luz, a excepción del día 23 de suspendido el riego, en donde todas las especies mostraron un aumento del Φ_{PSII} . Con respecto a sus controles, *E. coccineum* y *L. ferruginea* disminuyeron significativamente el Φ_{PSII} al día 42, tres días antes que lo registrado para *G. avellana*.

Un nivel más alto de luz, independientemente del tratamiento y especie, provocó un descenso del Φ_{PSII} , siendo éste más notorio en las plantas sometidas a estrés hídrico. *E. coccineum* manifestó una disminución significativa (63.3%; $P \leq 0,05$) al día 42, con respecto a su control, la cuál se mantuvo hasta el final del tratamiento. *G. avellana* sólo tuvo diferencias significativas con su control al día 54 y *L. ferruginea* al final del tratamiento (día 62), siendo el mayor porcentaje de disminución de todas las mediciones.

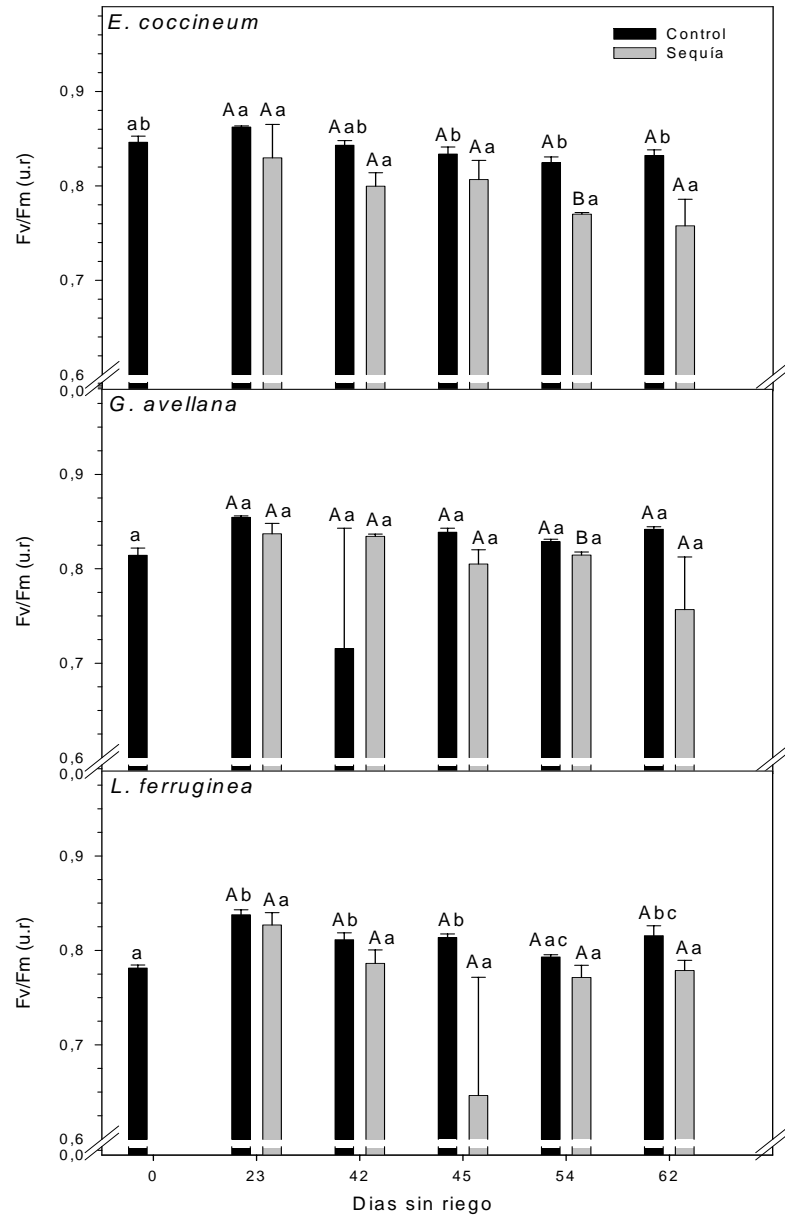


Fig. 11. Eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m) desde el inicio del tratamiento, en plántulas irrigadas y sometidas a sequía de *E. coccineum*, *G. avellana* y *L. ferruginea*. Valores son promedios de 3 réplicas \pm error estándar. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre los días sin riego dentro de un mismo tratamiento y dentro de una misma especie. Letras mayúsculas distintas indican diferencias entre tratamientos dentro de un mismo día dentro de una misma especie.

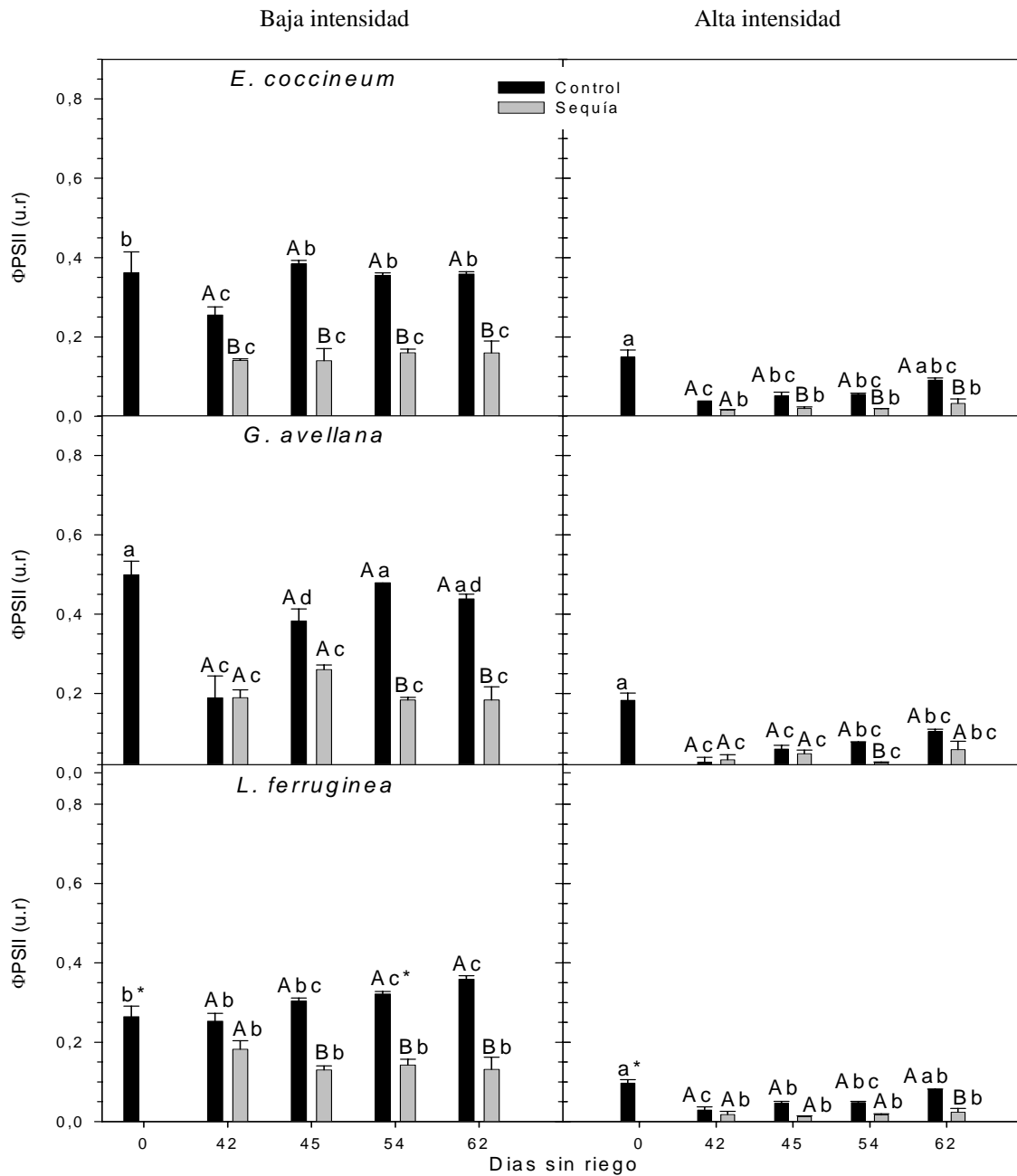


Fig. 12. Eficiencia cuántica efectiva Φ_{PSII} , en plántulas de *E. coccineum*, *G. avellana* y *L. ferruginea* irrigadas (control) y privadas de agua, al ser sometidas a una intensidades de luz alta ($438,18 \mu\text{mol fot m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y baja ($121,43 \mu\text{mol fot m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en diferentes tiempos. Los valores son promedios de 3 réplicas \pm error estándar. Letras minúsculas distintas denotan diferencias en un mismo tratamiento a distintos tiempos. Letras mayúsculas distintas denotan diferencias entre tratamientos en un mismo tiempo y el asterisco indica diferencia significativa entre especies.

4.4 Transpiración

Se apreció una disminución significativa ($P \leq 0,05$) de la tasa transpiratoria en todas las especies, luego de 24 días de haber eliminado el riego (Fig. 10), siendo estas disminuciones, con respecto a las plantas irrigadas de 85,49% en *E. coccineum*, 80,05% y 78,21% en *G. avellana* y *L. ferruginea*, respectivamente. A los 45 días de tratamiento, la tasa transpiratoria siguió descendiendo levemente en *E. coccineum* (83,67%), algo más en *G. avellana* (69,63%) y un 57,84% en *L. ferruginea*. Al término del tratamiento, las mayores disminuciones de la tasa transpiratoria se encontraron en *E. coccineum* (88,00%) y en *G. avellana* (83,06%), respectivamente y la menor en *L. ferruginea* (49,72%).

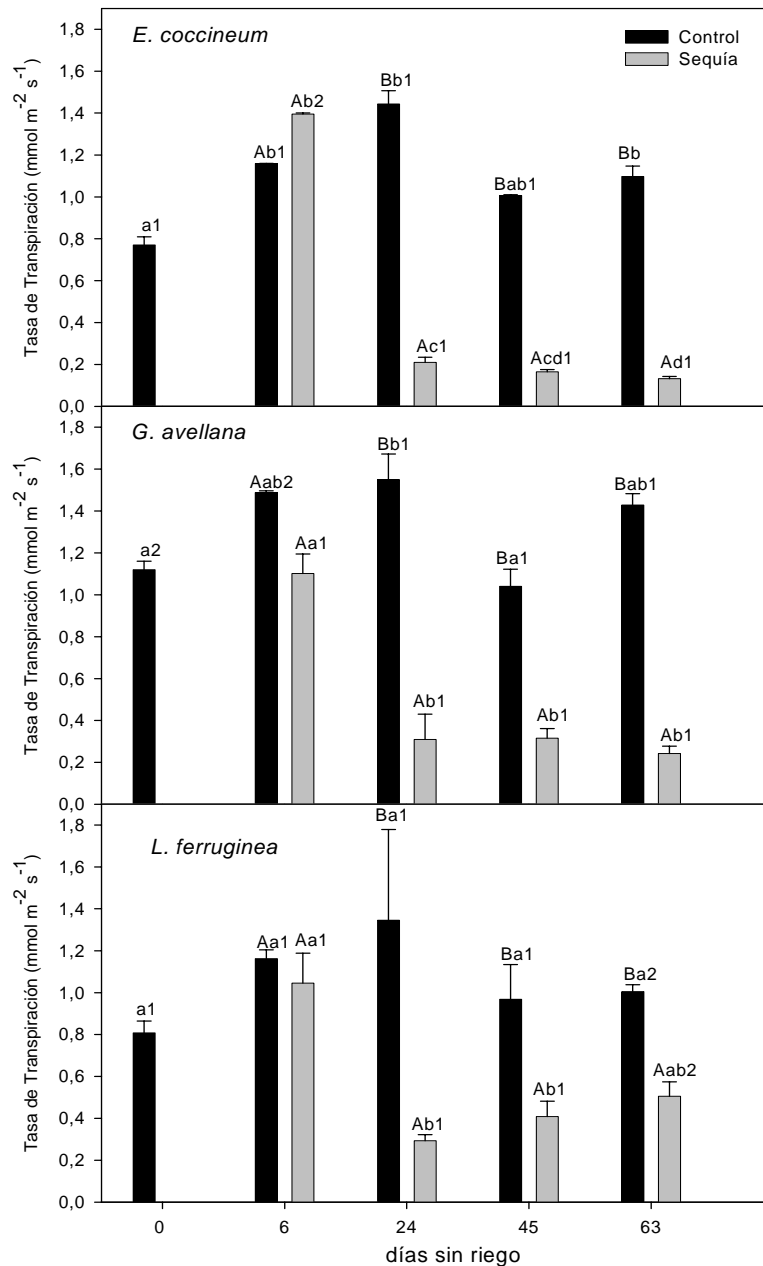


Fig 10. Cinética de la Tasa transpiratoria desde el inicio del tratamiento, en plántulas irrigadas (control) y en sequía, de plántulas de *E. coccineum*, *G. avellana* y *L. ferruginea*. Valores son promedios de 3 réplicas \pm error estándar. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas dentro de un tratamiento entre los días sin riego dentro de una misma especie. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos dentro de un mismo día sin riego y dentro de la misma especie. Y números diferentes, indican diferencias entre especies, dentro del mismo tratamiento y día sin riego. Se incluye error estándar. n = 3.

4.5 Concentración de solutos compatibles foliares

4.5.1 Prolina

Los contenidos de prolina foliar fueron significativamente mayores en *E. coccineum* y *G. avellana* en los tratamientos, con respecto a sus controles, mostrando esta última especie un apreciable aumento ya en el día 27 (Fig. 8), *E. coccineum* manifestó una disminución de la concentración de prolina en las plantas bien hidratadas, la que se mantuvo en las sometidas a estrés. Los valores iniciales de *G. avellana* fueron intermedios entre *E. coccineum* y *L. ferruginea*, siendo *E. coccineum* significativamente ($P \leq 0,05$) mayor a *L. ferruginea*. Esta última especie no mostró cambios significativos a lo largo del tratamiento.

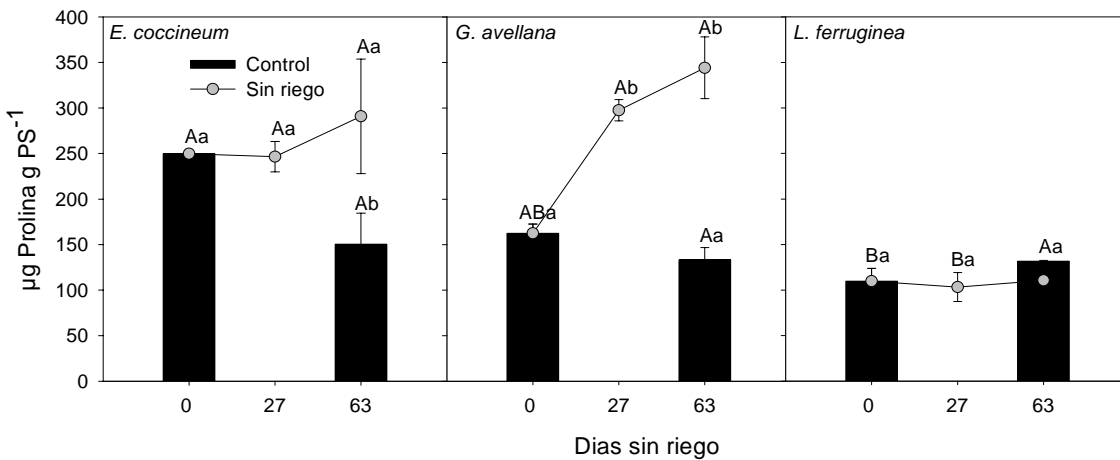


Fig 8. Variación de la concentración de prolina durante el tratamiento, en plántulas con y sin riego de *E. coccineum*, *G. avellana* y *L. ferruginea*. Valores representan el promedio de 4 réplicas \pm error estándar. Letras minúsculas distintas denotan diferencias significativas dentro de la especie en los distintos tratamientos, letras mayúsculas distintas denotan diferencias significativas entre especies dentro del tratamiento y en un mismo día.

4.3.2 Carbohidratos solubles totales

Al final del tratamiento *E. coccineum* manifestó un incremento significativo ($P \leq 0,05$) de carbohidratos solubles totales (*CST*) en hojas y tallos (159,4 y 158,2%, respectivamente) (Fig. 9) en plantas sometidas a déficit hídrico, con respecto al control. La concentración de *CST*, en la raíz, no varió significativamente ($P \geq 0,005$) en esta especie.

Si bien, *L. ferruginea* experimentó variaciones en la concentración de *CST* durante el tratamiento en todos sus órganos, estas diferencias no fueron significativas ($P \geq 0,05$).

G. avellana aumentó un 37,2% la concentración de *CST* en hojas, diferencia significativa ($P \leq 0,05$) con respecto al control. En las demás partes del corno existió una tendencia a aumentar la concentración de *CTS*, sin embargo, esta diferencia no fue lo suficientemente significativa ($P \geq 0,005$) con respecto a su control, al término del tratamiento de déficit hídrico.

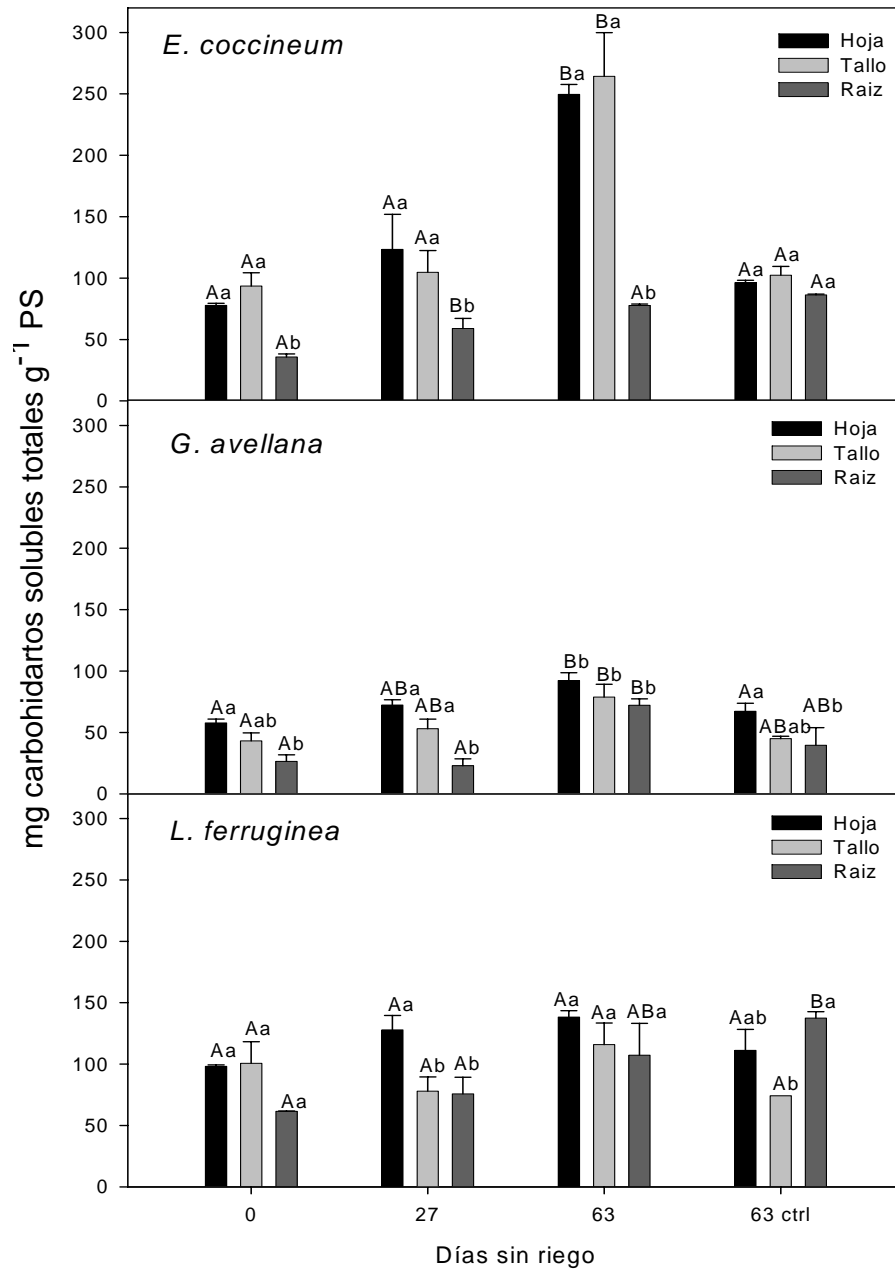


Fig 9. Variación de los carbohidratos solubles totales en hojas, tallos y raíces, durante el tratamiento de déficit hídrico, en plántulas de *E. coccineum*, *G. avellana* y *L. ferruginea*. Valores son promedios de 5 réplicas \pm error estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los órganos dentro de una misma especie, en un mismo día sin riego. Letras mayúsculas diferentes, indican diferencias significativas dentro de un mismo órgano en una misma especie, entre los días sin riego.

4.6 Distribución de biomasa

La biomasa vegetal es un buen indicador de su productividad y crecimiento. En plantas sometidas a estrés ambiental, incluido el estrés hídrico, la distribución de la biomasa aérea y subterránea puede cambiar, reflejándose por lo general en un aumento de la biomasa radical y disminución del vástago. Esto debiera expresarse en un mayor cociente raíz/vástago en las plantas sometidas a disminuciones en la disponibilidad de agua.

4.6.1 Relación raíz – vástago

Contrariamente a lo esperado, este cociente no incrementó en ninguna de las plantas durante el tratamiento (Fig. 13). Más bien se detectó una tendencia a la reducción de este cociente. Por otro lado, se pudo apreciar un aumento significativo del vástago ($P \leq 0,05$) al día 26 en *E. coccineum*. En *E. coccineum* existieron diferencias en la relación raíz/vástago entre las especies al inicio del tratamiento, pero sólo con respecto a las demás, en donde la raíz fue mucho mayor que el vástago, en los días sucesivos esta condición se normalizó (Fig. 13).

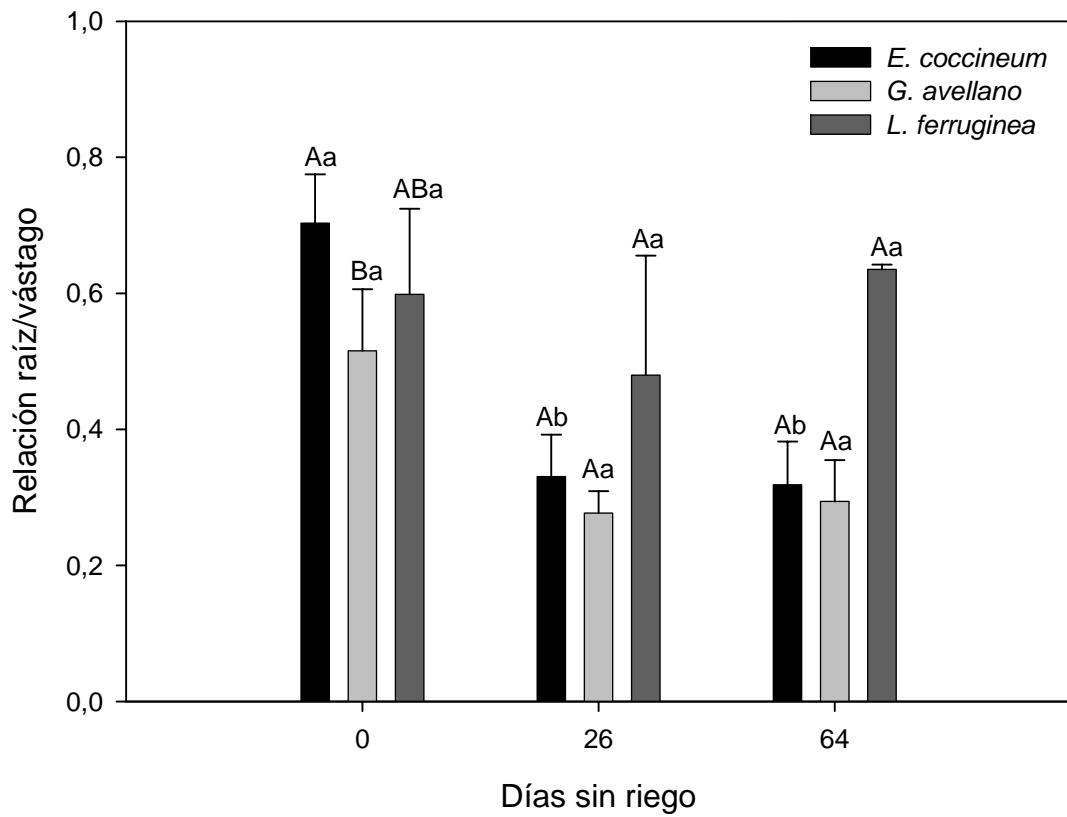


Fig. 13. Relación raíz/vástago durante el tratamiento de sequía, en plántulas de *E. coccineum*, *G. avellana* y *L. ferruginea*. Valores son promedios de 5 réplicas \pm error estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los días sin riego dentro de una misma especie. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre especies dentro de un mismo tiempo.

5. DISCUSIÓN

El propósito de esta investigación fue el de caracterizar el efecto de la sequía sobre las propiedades fisiológicas de tres especies de la familia *Proteaceae*, que poseen diferentes requerimientos de hábitat, cuando crecen bajo las mismas condiciones experimentales, con el objetivo de comprobar si las preferencias de hábitat de las especies se expresan en sus propiedades fisiológicas.

Es conocido que el comportamiento del potencial hídrico del suelo ante eventos de déficit hídrico depende de la evaporación directa del agua desde el suelo a la atmósfera (la que a su vez depende de la temperatura ambiente y del grado de humedad relativa del aire), y de la entrega de vapor de agua (transpiración) por parte de la planta (Larcher, 2003; Taiz & Zeiger, 2002). En consideración a esto, asumimos que la pérdida de agua por evaporación directa desde el suelo, fue la misma para las tres especies, ya que se trataba del mismo tipo de suelo y superficie edáfica, ante similares condiciones ambientales (temperatura y humedad). Por ende, las diferencias de potencial hídrico del suelo en que estaban instaladas las diferentes especies (Fig. 3), debería ser explicable en base a distintas tasas transpiratorias de ellas (Fig. 10). Ya que el equipo utilizado entrega la tasa transpiratoria (vapor de agua transpirada) por una misma unidad de superficie foliar, la transpiración total debería estar fuertemente influida por la superficie foliar total de cada planta. Esta fue estimada relacionando los pesos secos (obtenidos en nuestro experimento) con las superficies foliares entregadas por Weinberger (1973) y reportadas por Alberdi (1995), para estas especies. Efectivamente la superficie foliar total de *L. ferruginea* fue inferior (5 a 6 veces) que la de *E. coccineum* y *G. avellana*, a pesar de que las plantas tenían la misma edad, lo que podría explicar la mayor disminución de las reservas hídricas del suelo en las dos primeras especies con respecto a *L. ferruginea*.

El transcurso transpiratorio ante condiciones de déficit hídrico sugiere que las tres especies presentarían cierto grado de control estomático, el que sería mayor en *E. coccineum* pues al final del experimento presentó las menores tasas transpiratorias. Cabe preguntarse, si estas tasas fueron menores por un buen control estomático, o por que las reservas de agua estaban agotándose, como lo indican los bajos potenciales hídricos del suelo (Fig. 3). Estos fueron casi siempre menores que los de las hojas (Fig. 7), lo que indicaría que estas no fueron siempre capaces de desarrollar durante todo el experimento un potencial hídrico foliar lo suficientemente negativo como para extraer agua del suelo. Por ello, la escasa agua transpirada podría provenir de reservas hídricas eliminadas por vía cuticular. Al respecto, *E. coccineum* posee una transpiración cuticular 2 veces mayor que la de *L. ferruginea* y 5 veces mayor que *G. avellana* (Weinberger *et al.*, 1973 y Alberdi, 1995). Esto podría ser demostrado por el visible marchitamiento que mostraron las hojas de *E. coccineum* en las últimas etapas del tratamiento. Un marchitamiento de *G. avellana* y *L. ferruginea* sería más difícil de apreciar visualmente que en *E. coccineum*, debido al carácter altamente esclerófilo de las dos primeras especies (Alberdi *et al.*, 1995). Se sabe que *E. coccineum* compensa su alta capacidad de perder agua y baja regulación estomática con una alta resistencia plasmática a la sequía, pudiendo perder agua hasta en un 75%, sin sufrir daños permanentes (Weinberger *et al.*, 1973). La resistencia a la sequía está determinada, en alto grado, por la capacidad de la cutícula de frenar la entrega de agua (resistencia cuticular, según Stocker, 1956). Esta característica representa, según este autor, una resistencia constitucional a la sequía. En especies arbóreas siempreverdes de nuestro país, estaría mayormente desarrollada en árboles de hábitat más xerotermos que en hábitat más húmedos. Es interesante destacar, que debido a las propiedades físico-químicas de la cutícula, ésta es mucho más eficiente en limitar la entrega de agua en hábitat secos, que en hábitat húmedos (Weinberger *et al.*, 1973; Stocker, 1956). Esta

evidencia puede ser explicada en base a que la transpiración cuticular depende del grado de imbibición de la cutícula, el que a su vez está determinado por la hidratación de los tejidos y por la humedad del aire. Una alta presión de vapor favorece la imbibición y con ello, la entrega de agua cuticular. La transpiración cuticular se comporta en forma contraria a la transpiración estomática, ya que en climas muy húmedos y ventosos no ofrece una protección adecuada ante la pérdida de agua cuando al mismo tiempo la incorporación de agua desde el suelo y su conducción, están limitadas, debido a los factores mencionados en el párrafo precedente.

Nuestro estudio demostró que *E. coccineum* y *G. avellana* poseen distintas preferencias en la acumulación de solutos compatibles foliares, ante un déficit de agua. Mientras *E. coccineum* aumentó la cantidad de carbohidratos solubles totales, llegando éstos a ser 1,6 veces mayor que el control al final del tratamiento, no se detectó aumento apreciable en la concentración de L-prolina por efecto de la sequía. En cambio, *G. avellana*, aumentó la concentración de prolina 1,58 veces más que el control al final del tratamiento, y el aumento de carbohidratos solubles totales no fue estadísticamente significativo (0,37 veces con respecto a su control). *L. ferruginea* no manifestó cambios apreciables en la concentración de estos dos solutos compatibles, debido probablemente a la buena disponibilidad de agua durante el tratamiento.

La acumulación de uno u otro osmolito reflejaría la disponibilidad de sus precursores bajo condiciones adversas, lo que estaría determinando una actividad diferencial de las enzimas involucradas en la síntesis y degradación de estos precursores, bajo condiciones de déficit hídrico (Hare *et al.*, 1998). En general, las especies heliófitas, como *E. coccineum*, poseen una mayor capacidad de generar hidratos de carbono, los cuales son almacenados en forma de almidón en los órganos reservantes, el desdoblamiento de almidón a hidratos de carbono es una vía rápida y eficiente para contrarrestar los efectos nocivos de la pérdida de agua, por otro lado, se ha

reportado que la síntesis de almidón en plantas sometidas a sequía disminuye, aumentando la concentración de sus precursores (Hare *et al.*, 1998). La acumulación de prolina en *G. avellana* no sólo se puede asociar a su función como osmolito, ya que es una fuente importante de ATP una vez que la planta a superado el periodo de estrés (Taylor, 1996). Además, la prolina puede estabilizar la estructura terciaria de las proteínas y las membranas celulares al disminuir el contenido hídrico celular (Low, 1985), sin embargo, estas capacidades permanecen sujetos a debate (Munns, 1993). Este último atributo representaría una ventaja comparativa en relación con la acumulación de carbohidratos, manifestado por *E. coccineum*, frente a déficit hídrico.

En relación a los cambios de potencial hídrico foliar de *E. coccineum* y *G. avellana*, se pudo apreciar diferencias importantes de potencial hídrico foliar entre estas dos especies en la mitad del tratamiento (27 días) (a pesar de que el potencial hídrico del suelo fue muy similar entre ambas). *G. avellana* disminuyó considerablemente su potencial hídrico foliar (cerca de 3,7 veces) en comparación a *E. coccineum*. Esta última especie mantuvo sus potenciales hídricos foliares sin diferencias con respecto al inicio ($P \geq 0,05$) en esta etapa. Estas diferencias no son explicables en base al potencial osmótico, ya que no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$). Una posible respuesta estaría dada por el mayor grado de esclerofilia (fibra cruda x 100/proteína cruda) reportado por Alberdi (1995) el cuál fue de un 52% mayor en *G. avellana* que *E. coccineum*. Es sabido que el entramado de fibras de celulosa actúan como fuerzas capilares en la pared celular (Taiz & Zeiger, 2002), cuando estas están embebidas de agua no representan ningún impedimento para la extracción de líquido, pero a medida que disminuye la cantidad de agua, aumenta la tensión sobre el agua, dificultando la extracción de ésta. La mayor cantidad de fibra documentado para *G. avellana*, actuaría como una fino capilar reteniendo el agua en la hoja, ayudando a disminuir el potencial hídrico foliar, a pesar de poseer los mismos CRA_f y Ψ_{π} foliares

que *E. coccineum*, parámetros observados efectivamente en el tratamiento, esta fuerza debería ser menos influyente en el potencial hídrico foliar a medida que el contenido hídrico aumenta, y serlo más, a medida que disminuye el contenido relativo de agua foliar (*CRAf*).

La eficiencia fotoquímica del *PSII*, evidenciada como eficiencia fotoquímica potencial (F_v/F_m) o eficiencia fotoquímica efectiva (Φ_{PSII}), son consideradas como buenos indicadores *in vivo* de la funcionalidad del aparato fotosintético en plantas sometidas a estrés (Krause & Weis, 1991; Maxwell & Johnson, 2000). Plantas de girasol sometidas a estrés hídrico disminuyeron considerablemente los F_v/F_m (Maury *et al.*, 1996), al igual que en *Picea glauca* (Eastman & Camm, 1995) y el arbusto leñoso *Nerium Oleander* L. (Demmig *et al.*, 1988). En esta última especie, el déficit estuvo acompañado de estrés lumínico. Sin embargo, existen evidencias contrarias a la disminución del F_v/F_m respecto a la sequía, que dan cuenta de una mantención de este parámetro ante un desecamiento. Corroboran estos resultados los de Olivares, E. (2005) y Saavedra, I. (2004), que en *Nothofagus dombeyi* y *N. nitida* no encontraron descenso ante déficit hídrico. Al igual que en *Rosmarinus officinalis* L. y *Triticum aestivum* L., se ha demostrado que no existe descenso de los F_v/F_m ante un desecamiento (Munné-Bosch & Alegre, 2000). Nuestros resultados demostraron que F_v/F_m disminuyó significativamente sólo al día 54 del tratamiento en *E. coccineum* y *G. avellana*, situación que no se observó al final. A pesar de esta disminución, este cociente se mantuvo en los límites fisiológicos (0,76) aceptados como normales (Mohammed *et al.*, 2003). Por otro lado, esta disminución puede ser interpretada como un proceso de ajuste del aparato fotosintético ante el déficit hídrico que es conocido como un fenómeno de fotoprotección (*down regulation*) (Krause & Weis, 1991). También en especies siempreverdes de la familia Fagáceas (Reyes-Díaz *et al.*, 2005; Zúñiga *et al.*, 2005), se han referido a este fenómeno.

La respuesta al déficit hídrico de la eficiencia fotoquímica del $PSII$ de estas especies, se determinó ante dos densidades de flujo fotónico (DFF). A ambas DFF , las tres especies mostraron un comportamiento similar del $\Phi PSII$ con respecto a la sequía, apreciándose un descenso significativo ($P \leq 0,05$) a partir de los 42 días de tratamiento, sin que hubiesen diferencias entre los valores del $\Phi PSII$ de las especies para cada una de las DFF . Sin embargo, el tratamiento combinado de sequía y alta intensidad de luz disminuyó en más de un 50% el $\Phi PSII$ de las especies investigadas como también de las plantas irrigadas, aún cuando en estas últimas el descenso es menor. Esto sugeriría un proceso de fotoinhibición (disminución de la eficiencia fotoquímica de la fotosíntesis), este fenómeno sucede cuando la DFF captada por el complejo antena de aparato fotosintético excede la cantidad de luz que es utilizada en la fotosíntesis (Larcher, 2003).

Es sabido que un incremento de la superficie radicular junto con una disminución en el crecimiento de la superficie evaporativa (principalmente hojas) constituye una de las mejores respuestas a largo plazo para mitigar los efectos destructivos de la sequía (siempre y cuando haya agua disponible en los estratos inferiores del suelo) (Levitt, 1980; Larcher, 2003). En nuestro experimento, no hubo modificaciones apreciables en la proporción raíz/vástago durante todo el tratamiento. Contrariamente, *E. coccineum* incrementó considerablemente la cantidad de biomasa foliar, no así, las demás especies, respondiendo probablemente a su fenología, creciendo en este período del año, sugiriendo que el grado de déficit hídrico desarrollado en el tratamiento no alteró su capacidad normal de crecimiento, lo cual debería comprobarse.

Por lo tanto, basados en la hipótesis planteada podemos concluir que bajo las condiciones en que se realizó este experimento, no se expresan claramente los requerimientos ecológicos de estas tres especies. Ya que el déficit hídrico impuesto dependió de la capacidad de las especies

para desecar el suelo, lo cuál está directamente relacionado con sus tasas transpiratorias y superficies foliares, probablemente los resultados fueron enmascarados por este último factor. Esto se deduce como consecuencia de que a pesar de la menor transpiración de *E. coccineum* con respecto a *G. avellana*, desecaron de igual manera el suelo, en contraste a *L. ferruginea* que debido a una baja superficie foliar no pudo desecar el suelo como las otras dos especies, lo que permitió que la disponibilidad de agua del suelo se mantuviera en mayor proporción como lo indica su potencial hídrico del suelo. Por lo tanto, *L. ferruginea* no estuvo sometida a un déficit hídrico intenso como las otras especies.

Bajo las condiciones impuestas, las mayores diferencias fisiológicas encontradas entre *E. coccineum* y *G. avellana*, corresponden al tipo de soluto acumulado y a la cinética de respuesta en algunos parámetros fisiológicos, como el potencial hídrico foliar, en periodos intermedios de sequía. Sin embargo, estas especies parecieran haber sido afectadas de la misma manera, al final del tratamiento de déficit hídrico. La desviación del comportamiento fisiológico de *L. ferruginea*, con respecto a algunos parámetros, ante un déficit hídrico y especialmente la poca variación del potencial hídrico del sustrato, parecen avalar que esta especie no estuvo sometida a un déficit hídrico de la misma magnitud que las otras especies, debido a su menor superficie foliar evaporativa.

La hipótesis planteada proponía que *E. coccineum* sería menos afectado, por el déficit hídrico que *G. avellana* y *L. ferruginea*. Esto se cumplió sólo con respecto a la umbrófila *L. ferruginea* pero no con respecto a la sombra semitolerante *G. avellana*, que presentó comportamiento fisiológico similar a *E. coccineum*, lo que podría explicar la capacidad del avellano de adecuarse en su estado adulto a condiciones de mayor luminosidad y de menor disponibilidad hídrica. Pareciera ser, que las diferentes demandas de hábitat de estas especies no

serían explicables únicamente en base a la baja disponibilidad hídrica, ya que en condiciones naturales, por lo general los diferentes factores ambientales estresantes, no se presentan por separado, sino en forma combinada. Bajo esta premisa, surge la pregunta, si el déficit hídrico disminuiría la capacidad de responder de manera eficiente, frente a otros factores, también causantes de estrés, tales como, alta y baja intensidad lumínica (presentes en claros o bordes de bosques y bajo el dosel, respectivamente), temperaturas cálidas o frías (norte y sur de nuestro país, respectivamente), en los límites de distribución de estas especies.

Basados en lo anterior, concluimos que sería necesario continuar este estudio teniendo en consideración la interacción de varios factores ambientales que son característicos de sus hábitats.

6. LITERATURA CITADA

Alberdi, M. (1995). Ecofisiología de especies leñosas de los bosques hidrófilos templados de Chile: Resistencia a la sequía y bajas temperaturas. En: Armesto, J., Villagrán, C., & Kalin-Arroyo, M. (eds). Ecología de los bosques nativos de Chile: 279-299. Ed. Universitaria, Chile.

Alberdi, M., & Donoso, C. (2004). Variabilidad en *Embothrium coccineum*. En: Donoso, C., Premoli, A., Gallo, L., & Ipinza, R. (eds). Variación intra-específica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina: 345-356. Ed. Universitaria, Chile.

Alberdi, M., Romero, M., Ríos, D., & Wenzel, H. (1985). Altitudinal gradients of seasonal frost resistance in *Nothofagus* communities of southern Chile. *Acta Oecologica/Oecol. Plant.*, 6:21-30.

Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39:205-207.

Baker, N. R. (1993). Light-use efficiency and photoinhibition of photosynthesis in plants under environmental stress. En: Smith, J. & Griffiths, H. (ed). Water deficit: plant responses from cell to community: 221-235. Bios Scientific Publishers, Oxford.

Björkman O., & Demmig B. (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence at 77k among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170:489-504.

Bradford, K. J., & Hsiao, T. C. (1982). Physiological response to moderate stress. En: Lange, O. L., Nobel, P. S., Osmond, C. B., & Zieger, H. (eds). Encyclopaedia of plant physiology, physiological plant ecology. Water relations and carbon assimilation: 263-324. Springer, Berlin.

Brown, R. W. & Oosterhuis, M. D. (1992). Measuring plant and soil water potential with thermocouple psychrometers: some concerns. *Agron. J.*, 84:78-86.

Caanani, C., Havaux, M., & Malkin, S. (1986). Hydroxylamine, hydrazine and methylamine donate electrons to the photooxidizing side of PSII in leaves inhibited in oxygen evolution due to water stress. *Biochim. Biophys. Acta*, 851:151-155.

Clifford, S., Arndt, S., Corlett, J., Joshi, S., Sankhla, N., Popp, M. & Jones, H. (1998). The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). *J. Exp. Bot.*, 49(323):967-977.

Congming, L., & Jianhua, Z. (1999). Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *J. Exp. Bot.*, 50(336):1199-1206.

Cornic, G. (2000). Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. *Trends Plant Sci.*, 5:187-188.

Demming-Adams, B., & Adams, W. (1992). Photoprotection and other responses of plants to light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.*, 43:599-626.

Demming-Adams, B., & Adams, W. (1996). The role of xanthophylls cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.*, 1:21-26.

Demming, B., Winter, K., Krüger, A., & Czygan, F. (1987). Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the xanthophylls cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant Physiol.* 84:218-224.

Demming, B., Winter, K., Krüger, A., & Czygan, F. (1988). Zeaxanthin and the heat dissipation of excess light energy in *Nerium oleander* exposed to a combination of high light and water stress. *Plant Physiol.*, 87:17-24.

Eastman, P. A. K., & Camm, E. L. (1995). Regulation of photosynthesis in interior spruce during water stress: changes in gas exchange and chlorophyll fluorescence. *Tree Physiol.*, 15:229-235.

Flexas, J., & Medrano, H. (2002). Drought-inhibition of photosynthesis in C₃ plants: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann. Bot.*, 89:183-189.

Graan, T., & Boyer, J. S. (1990). Very high CO₂ partially restores photosynthesis in sunflower at low water potentials. *Planta*. 181:378-384.

Hare, P. D., Cress, W. A., & Staden, V. (1998). Dissecting the role of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.* 21:535-553.

Hartge, K., & Horn, R. (1992). Die physikalische Untersuchung von Böden. Enke Verlag. Hannover, Kiel, Alemania. 177 pp.

Krause, G. H. (1988). Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanism. *Physiol. Plant.*, 74:566-574.

Krause, G. H., & Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42:313-349.

Larcher, W. (2003). Plant under stress. En: Larcher W. (ed). *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and stress physiology of functional groups*: 345-450. Ed. Springer, Berlin.

Lauer, M. J. y Boyer, J. S. (1992). Internal CO₂ measures directly in leaves: abscisic acid and low leaf water potential cause opposing effects. *Plant. Physiol.* 98:1310-1316.

Lemcoff, J., Guarnaschelli, A., Garau, A., Bascialli, M., & Ghera, C. (1994). Osmotic adjustment and its use as a selection criterion in *Eucalyptus* seedlings. *Can. J. For. Res.* 24:2404-2408.

Levitt, J. (1980). Responses of plants to environmental stresses: Water, radiation, salt and another stresses. Vol. II. 2^a Ed. Academic Press Inc., New York. 607 pp.

- Low, P. S. (1985). Molecular basis of the biological compatibility of nature's osmolytes. En: Gillies, R., & Gillies-Baillien. (eds). *Transport Processes, Iono- and Osmoregulation*: 469-477. Springer Verlag, Berlin.
- Ludlow, M. M. (1980). Stress physiology of tropical pasture plants. *Tropical Grasslands.*, 14:136-145
- Ludlow, M. M., Fisher, M. J., & Wilson, J. R. (1985). Stomatal adjustment to water deficits in three tropical grasses and a tropical legume grow in controlled conditions and in the field. *Aust. J. Plant. Physiol.*, 12:131-149.
- Maldonado, C. (1992). Respuestas fisiológicas al déficit hídrico en dos genotipos de *Avena sativa* L. con resistencia contrastante a la sequía. Tesis de Magíster en Ciencias, Facultad de Ciencias, Univ. Austral de Chile, 100 pp.
- Maury, P., Mojayad, F., Verger, M., & Planchon, C. (1996). Photochemical response to drought acclimation in two sunflower genotypes. *Physiol. Plant.*, 98:57-66.
- Maxwell, K., & Johnson, G. (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.*, 51(345):659–668.
- Mohammed, G. H., Zarco-Tejada, P., & Miller, J. R. (2003). Applications of chlorophyll fluorescence in forestry and ecophysiology. En: DeEll, R., & Toivonen, P. M. A. (eds). *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*: 80-115. Kluwer Academic Publisher, USA.
- Montenegro, G., Romero, M., Mujica, A. M. Gómez, M., Flores, E., & Alberdi, M. (1989). Leaf structure of evergreen species from the South Central Chilean forests. *Medio Ambiente.* 10:84-91.

Munné-Bosch, S. & Alegre, L. (2000). Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*, 210:925-931.

Munns, R. (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: Some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.* 16:15-24.

Olivares, E. O. (2005). Efecto de la sequía sobre la eficiencia fotoquímica del PSII en *N. dombeyi* (Mirb.) Oerst. Tesis, Escuela de Licenciatura en Ciencias, Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile, 58 pp.

Parra, R., Rodríguez, J., & González, V. (1999). Transpiración, potencial hídrico y prolina en zarzamora bajo déficit hídrico. *Terra*, 17(2):125-130.

Rodríguez R. Mattei, O., & Quezada M. (1983). Flora Arbórea de Chile. Editorial de la Universidad de Concepción: 408 pp.

Ruiz-Lozano, J. M. (2003). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*. 13:309-317.

Saavedra, I. A. (2004). Respuestas fisiológicas de *Nothofagus nitida* (Phi.) Krasser ante estrés hídrico y estrés lumínico. Tesis, Escuela de Ingeniería Forestal, Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Austral de Chile. 33 pp.

Sakai, A., & Larcher, W. (1987). Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress. *Ecological Studies* 62. Springer-Verlag, Berlin. 319 pp.

Scholander, P. F., Hammel, H. T., Hemmingsen, E. A. & Bradstreet, E. D. (1964). Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and other plants. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 52:119-125.

Schultze, E. D. (1986). Carbon dioxide and water vapour exchange in response to drought in the atmosphere and the soil. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 37:247-274.

Stocker O. (1956). Die Wasserabgabe: Die Abhängigkeit des transpiration von den Umweltfaktoren. En: Ruhland W. (ed). *Encyclopedia of plant physiology*, Vol. III: 436-488. Springer-Verlag, Berlin.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. 3th Ed. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts. 690 pp.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. 3th. Sitio Web: <http://3e.plantphys.net/article.php?ch=3&id=29>.

Tezara, W., Mitchell, V. J., Driscoll, S. D., & Lawlor, D. W. (1999). Water stress inhibits plants photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*. 401:914-917.

Toivonen, P., & Vidaver, W. (1988). Variable chlorophyll *a* fluorescence and CO₂ uptake in water stressed white spruce seedlings. *Plant Physiol.*, 86:744-748.

Turner, N. C., & Jones, M. M. (1980) Turgor maintenance by osmotic adjustment: A review and evaluation. En: Turner, N. C., & Kramer, P. K. (eds). *Adaptation of plants to water and high temperature stress*: 38-42. Willey Interscience Publication, New York.

Weinberger, P. (1974). Verbreitung und Wasserhaushalt araukano-patagonischer Proteaceen in Beziehung zu mikroklimatischen. *Flora*. 163:251-264.

Weinberger, P., Romero, M., & Oliva, M. (1973). Untersuchungen über die Dürre-resistenz patagonischer immergrüner Gehölze. *Vegetatio*. 28:75-98.

Yordanov, I., Velikova, V., & Tsonev, T. (2003). Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulg. J. Plant. Physiol.*, Special Issue, 187-206.

Zahner, R. (1968). Water deficits and growth of trees. En: Koslowski, T. (ed). Water deficits and plant growth: 191-254. Academic Press, New York.

Zúñiga-Feest, A., Inostroza, P., Vega, M., Bravo, L. A. & Corcuera, L. J. (2003). Enzyme activity and sugars in the grass *Deschampsia antarctica*. *Antarctic Sci.*, 15:483-491.