

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA Y ANATOMÍA
FOLIAR EN CLONES DE *Eucalyptus grandis* E HÍBRIDOS
INTERESPECÍFICOS, CRECIENDO EN CONDICIONES CONTROLADAS

por

Matías NIÓN PERDOMO

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO
URUGUAY
2018

Tesis aprobada por:

Director: _____

Ing. Agr. Mag. José Gándara

Lic. MSc. Gastón Quero

Ing. Agr. MSc. Luis Viega

Ing. Agr. Mag. Silvia Ross

Fecha: 10 de diciembre de 2018

Autor: _____

Matías Nión Perdomo

AGRADECIMIENTOS

A todos los docentes del Laboratorio de Fisiología Vegetal, en especial a José Gándara y Gastón Quero por todo su apoyo y motivación.

A los docentes y ayudantes del Laboratorio de Botánica por permitirme trabajar con sus instrumentos, darme consejo y por sus constantes palabras de aliento e interés.

A Agustina Colamonici, Inés Rebollo, Franco De Benedetti y Lorenzo Macagno por alentarme, involucrarse incondicionalmente y haberme acompañado en lo personal y académico.

A mi familia, especialmente a mis sobrinas, que supieron ser compañeras curiosas y no dejan de ser una fuente de inspiración.

A la Empresa Forestal Lumin S.A por brindar la posibilidad de llevar a cabo este trabajo de investigación.

Con mucho cariño y agradecimiento, les dedico este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
A. OBJETIVOS.....	1
1. <u>Objetivo general</u>	1
2. <u>Objetivos específicos</u>	1
II. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	2
A. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO <i>Eucalyptus</i>	2
1. <u>Características de <i>Eucalyptus grandis</i> W. Hill ex Maiden</u>	2
2. <u>Características de <i>Eucalyptus tereticornis</i> Smith</u>	2
3. <u>Características de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnhardt</u>	2
B. ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA.....	3
1. <u>Fase fotoquímica</u>	3
2. <u>Fase bioquímica: asimilación del dióxido de carbono</u>	4
C. FACTORES AMBIENTALES.....	5
1. <u>Concentración de dióxido de carbono</u>	5
2. <u>Irradiancia (PAR)</u>	6
3. <u>Temperatura</u>	6
D. MECANISMOS DE FOTOPROTECCIÓN.....	7
E. FLUORESCENCIA DE LAS CLOROFILAS	7
1. <u>Aspectos generales</u>	7
2. <u>Técnicas de medición</u>	9
3. <u>Partición de la energía</u>	10
4. <u>Parámetros asociados</u>	11
F. ANATOMÍA FOLIAR.....	13
1. <u>Epidermis</u>	13

2. <u>Mesófilo</u>	14
III. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	15
A. INSTALACIÓN DEL ENSAYO	15
B. PARTICIÓN DE LA ENERGÍA	15
C. ASIMILACIÓN DE CO ₂	16
D. REGISTRO DE RADIACIÓN PAR	17
E. ESTUDIOS ANATÓMICOS	17
1. <u>Epidermis</u>	17
2. <u>Mesófilo</u>	17
F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	18
IV. <u>RESULTADOS</u>	20
A. FLUORESCENCIA.....	20
1. <u>Ensayo I</u>	20
2. <u>Ensayo II</u>	22
3. <u>Ensayo III</u>	22
B. Asimilación DE CO ₂	23
C. Anatomía del mesófilo.....	26
D. Estudio de la epidermis	28
V. <u>DISCUSIÓN</u>	29
A. FLUORESCENCIA	29
1. <u>Ensayo I</u>	29
2. <u>Ensayo II</u>	30
3. <u>Ensayo III</u>	30
B. ASIMILACIÓN DE CO ₂	31
C. ANATOMÍA DE HOJA.....	33
D. PROPUESTAS.....	34
VI. <u>CONCLUSIONES</u>	36
VII. <u>RESUMEN</u>	37
VIII. <u>SUMMARY</u>	38
IX. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	39

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Media de los parámetros Φ_{Po} , $\Phi_{PSII.pot}$, ETR, $\Phi_{NPQ.fast}$, $\Phi_{NPQ.slow}$ para los clones ABH23 y GT en tres niveles de irradiancia.....	21
2. Media de los parámetros Φ_{Po} , $\Phi_{PSII.pot}$, ETR, $\Phi_{NPQ.fast}$, $\Phi_{NPQ.slow}$ para los clones ABH23 y GT en dos niveles de irradiancia.....	23
3. Parámetros de intercambio gaseoso y eficiencia de uso de la luz, medidos en 400 y 800 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	26
4. Parámetros de intercambio gaseoso y eficiencia de uso de la luz, medidos en 800 y 1600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	26
5. Resultado de la fase bioquímica medido a través de An en función de PPFD y CO_2	33
Figura No.	
1. Ejemplo de perfil de medición de fluorescencia mediante análisis de quenching y de relajación con fluorómetro PAM	10
2. Componentes de la partición de energía	11
3. Distribución de las plantas en el invernáculo y foto del invernáculo	15
4. Media de los parámetros Φ_{NO} , Φ_{NPQ} y Φ_{PSII} para los clones ABH23 y GT en tres niveles de irradiancia.....	21
5. Media de los parámetros Φ_{NO} , Φ_{NPQ} y Φ_{PSII} para ABH17, ABH23, GC y GT en dos niveles de irradiancia	23
6. Tasa de asimilación neta para los cuatro clones medida en 400 y 800 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	24
7. Tasa de asimilación neta para los cuatro clones medida en 400 y 800 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	25
8. Proporción de los tejidos del mesófilo evaluados en una hoja de cada clon .	27
9. Aspecto del mesófilo de una hoja colectada por cada clon	27

10. Boxplot para el conteo de estomas en epidermis adaxial y abaxial	28
11. Aspecto de los estomas de la cara abaxial en cada clon.....	28

I. INTRODUCCIÓN

La forestación con *Eucalyptus* presenta gran relevancia a nivel global, dado que son especies de rápido crecimiento capaces de adaptarse a diversas condiciones ambientales. Es por ello que hoy en día existen más de 20 millones de hectáreas plantadas en todo el mundo (Booth, 2013). En Uruguay aproximadamente el 10% del total de la superficie productiva se encuentra ocupada por bosques implantados o naturales. Los bosques artificiales comprenden casi la mitad del total y en su mayoría incluyen eucaliptos. Si bien las más utilizadas son *E. dunnii*, seguido por *E. grandis* (MGAP. DIEA, 2018), se evalúan clones híbridos entre *E. grandis* y eucaliptos colorados (*E. camaldulensis* y *E. tereticornis*), especialmente por su mayor rusticidad y aptitud industrial de la madera.

Para caracterizar el potencial productivo de genotipos promisorios, es importante estudiar procesos que determinan la generación de biomasa y la eficiencia en el uso de recursos, como lo son la asignación de energía durante la fase fotoquímica y la fijación de CO₂. A su vez, mediante la valoración del mesófilo, se pueden estudiar los mecanismos de difusión de CO₂ y de dispersión de la luz, y así evaluar la relación entre la estructura de la hoja y el desempeño fotosintético. Esta información es útil para desarrollar una metodología que permita identificar diferencias a partir de variables fotosintéticas y a su vez, aportar al conocimiento de clones de uso comercial.

A. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Caracterizar clones comerciales de *E. grandis* e híbridos con eucaliptos colorados (*E. camaldulensis* y *E. tereticornis*) a través del estudio de variables fotosintéticas y la anatomía foliar.

2. Objetivos específicos

- a) Identificar niveles de irradiancia que permitan observar diferencias genotípicas en parámetros de partición de la energía.
- b) Evaluar la fijación de carbono con distintos niveles de irradiancia y CO₂.
- c) Analizar atributos estomáticos (nº, distribución, tipo de estomas).
- d) Estudiar la anatomía del mesófilo en los clones de *Eucalyptus*.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO EUCALYPTUS

El género *Eucalyptus* está compuesto por aproximadamente 600 especies de la familia *Myrtaceae* y comprende desde arbustos de pequeño porte, hasta árboles con más de 100 m de altura. Se distribuye naturalmente en una amplia zona de Oceanía por lo que presentan una enorme capacidad adaptativa (Brussa, 1994). Generalmente, los híbridos interespecíficos presentan mayor plasticidad en condiciones de estrés (Wingenfeld et al., 2013) y por esta razón, su uso es cada vez más frecuente en programas de forestación.

A partir de la madera de eucalipto se obtiene una amplia gama de productos de elevado valor comercial. En Uruguay, la mayoría de las plantaciones se destinan a pulpa de celulosa y madera aserrable, siendo las especies más utilizadas *Eucalyptus dunnii* y *E. grandis* (Martín, 2017). A continuación, se mencionan las principales características de *E. grandis* y de dos eucaliptos colorados de interés comercial (*E. tereticornis* y *E. camaldulensis*).

1. Características de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden

E. grandis es un árbol de tronco recto, con follaje de textura gruesa y corteza caduca en fajas largas, persistentes en la base. Esta especie se originó en el este, centro-norte y en la costa sur de Australia. Crece en áreas con temperaturas máximas entre 24 y 30 °C, mínimas entre 3 y 8 °C y precipitaciones promedio entre 1000 y 3500 mm anuales. Es una de las especies con mayor difusión a nivel mundial (Brussa, 1994).

2. Características de *Eucalyptus tereticornis* Smith

E. tereticornis presenta copa amplia, hojas péndulas semiduras y corteza caduca en fajas cortas. Es la especie con mayor distribución latitudinal de Australia (6 y 38 °S) y está adaptada a temperaturas máximas entre 24 y 36 °C, y a mínimas entre 1 y 19 °C. Se desarrolla en zonas con regímenes pluviométricos muy variables (Brussa, 1994).

3. Características de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnhardt

E. camaldulensis es un árbol de gran porte con follaje péndulo, hojas finas y corteza caduca en fajas cortas. Presenta una distribución muy amplia en Australia, por lo que se ajusta a diferentes condiciones climáticas. Se adapta a

temperaturas máximas entre 27 y 40 °C, mínimas entre 3 y 15 °C, y a precipitaciones entre 150 y 600 mm anuales (Brussa, 1994). Al igual que *E. tereticornis*, es una especie altamente tolerante al déficit hídrico (Whitehead y Beadle, 2004).

B. ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual se generan cadenas carbonadas a partir de la asimilación de CO₂. El proceso ocurre en los cloroplastos de las células del mesófilo de la hoja. Los cloroplastos contienen un sistema de doble membrana que al plegarse forma los tilacoides. Es en ellos donde ocurre la primera fase de la fotosíntesis (fase fotoquímica). Éstos pueden presentarse apilados formando lamelas grana o pueden permanecer solitarios en las lamelas estromáticas. La cavidad definida en el interior del pliegue se denomina lumen y es allí donde ocurre la fotólisis del agua. El estroma es el espacio acuoso definido entre los tilacoides y el medio interno general del cloroplasto. En el estroma se encuentran las enzimas necesarias para la segunda fase de la fotosíntesis (fase bioquímica) (Buchanan et al. 2015, Taiz et al. 2015).

1. Fase fotoquímica

Desde el punto de vista físico, la luz puede ser caracterizada como onda o como partícula. Un fotón es una partícula que contiene una unidad discreta de energía, la cual depende directamente de la longitud de la onda. Dentro de la emisión solar la proporción comprendida entre los 400 y 700 nm de longitud de onda corresponde con la radiación fotosintéticamente activa (PAR). Dentro de la radiación PAR, el 15% corresponde a la longitud de onda del verde y es reflejada por las hojas, mientras que el restante 85% puede utilizarse en el proceso fotosintético. De esta proporción, la mayor parte se disipa (calor y fluorescencia) y el resto (5%) se utiliza efectivamente en el proceso fotosintético (Buchanan et al. 2015, Taiz et al. 2015).

Los fotosistemas son unidades insertas en la membrana tilacoidal, formados por pigmentos antena y un centro de reacción. Los pigmentos antena son carotenoides y clorofilas que cumplen la función de captar la energía para dirigirla al centro de reacción, el cual posteriormente cederá un electrón. Esto permite que varios fotones sean colectados simultáneamente, alcanzando así niveles de energía elevados que mantienen activo al sistema. El centro de reacción es una molécula de clorofila que cede electrones cuando recibe energía lumínica en la cantidad suficiente. Existen dos fotosistemas vinculados por una cadena transportadora de electrones. El primero de ellos se denomina fotosistema II (PSII o P680) y el siguiente fotosistema I (PSI o P700). Los dos

fotosistemas se ubican en diferentes zonas del tilacoide, absorben luz con distinta longitud de onda y presentan diferente poder oxidoreductor (Buchanan et al. 2015, Taiz et al. 2015).

El PSII está más próximo al lumen del tilacoide y absorbe principalmente luz correspondiente al rojo (cerca a 680 nm), mientras que PSI se ubica en la zona de la bicapa lipídica más próxima al estroma y absorbe en el rojo lejano (aprox. 700 nm). En cuanto a su reactividad química, el PSII presenta una gran capacidad oxidante que le permite oxidar al agua. Sin embargo, el PSI tiene actividad reductora y actúa sobre el NADP^+ . La conexión entre ambos fotosistemas se da a través de una serie de aceptores primarios de electrones y un complejo proteico denominado citocromo b_6f (Buchanan et al. 2015, Taiz et al. 2015).

Al incidir luz en la hoja, ambos fotosistemas pierden electrones en sus centros de reacción que deben reponerse para continuar con su función. El PSII recupera su estado inicial oxidando una molécula de agua. De esta reacción se obtienen: a) protones que serán liberados al lumen del tilacoide, b) átomos de oxígeno que se unen formando oxígeno gaseoso que difundirá al medio externo y c) electrones (Buchanan et al. 2015, Taiz et al. 2015).

Algunos electrones reducen nuevamente el centro de reacción del PSII, pero otros continúan el pasaje hacia un aceptor primario denominado pheofitina, que posteriormente reduce a dos nuevos aceptores: la plastoquinona A (Q_A) y la plastoquinona B (Q_B). Este último se asocia con hidrógenos del estroma y difunde hacia el complejo b_6f , el cual está conectado con el PSI. Los protones tomados por Q_B son liberados en el lumen junto con los liberados por la oxidación del agua. El trayecto continúa hacia la plastocianina, otro aceptor con movilidad en la membrana que conduce las cargas al PSI (Buchanan et al. 2015, Taiz et al. 2015).

Los electrones cedidos por el PSI se dirigen a una enzima denominada Ferredoxina-NADP reductasa, que transforma el NADP^+ en NADPH_2 . Como consecuencia, disminuye el pH del lumen y se da la fotofosforilación. Como resultado final de la fase fotoquímica, se libera al estroma poder reductor (NADPH_2) y energía=ATP (Buchanan et al. 2015, Taiz et al. 2015).

2. Fase bioquímica: asimilación del dióxido de carbono

En esta etapa la célula incorpora a esqueletos carbonados una fuente de carbono inorgánico como es el CO_2 . El proceso se denomina ciclo de Calvin-Benson o ciclo C3 y está presente en todos los eucariotas fotosintéticos y también en numerosos procariontes. El 85% de las plantas superiores presentan

este síndrome fotosintético (Yamori et al., 2013) que comprende tres etapas muy distintas (Buchanan et al. 2015, Taiz et al. 2015).

La primera se denomina carboxilación y consiste en la incorporación de tres moléculas de CO_2 y tres de agua a otras tres moléculas de cinco carbonos denominadas ribulosa 1,5-bisfosfato (primer aceptor de CO_2). La enzima que cataliza esta reacción es la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco). Tras la reacción, se obtienen seis moléculas de tres carbonos (3-fosfoglicerato). En la segunda etapa se reduce este compuesto, utilizando el NADPH_2 y el ATP generados en la fase fotoquímica. El resultado final son 6 moléculas de gliceraldehído 3-fosfato. En la fase final, se regenera a la ribulosa 1,5-bisfosfato necesaria para reiniciar un nuevo ciclo. Para ello, ocurren una serie de reacciones en las que se consume ATP y cinco de las seis moléculas de gliceraldehído 3-fosfato. El gliceraldehído 3-fosfato que no se utilizó en la regeneración, será un insumo para la síntesis de compuesto carbonados. En definitiva, se requieren tres moléculas de CO_2 , tres de ribulosa 1,5-bisfosfato, tres de agua, seis de NADPH_2 y nueve de ATP para generar una molécula de tres carbonos. Esta molécula es precursora de carbohidratos más complejos (Buchanan et al. 2015, Taiz et al. 2015).

En oscuridad, la concentración de los intermediarios del ciclo disminuye. Por esta razón, cuando se los expone a la luz, se los utiliza en su totalidad para reconstruir la ribulosa 1,5-bisfosfato. Así, se establece un periodo de aclimatación a la luz en el cual se activan diversas enzimas dependientes de la luz, entre ellas la rubisco (Buchanan et al. 2015, Taiz et al. 2015).

En plantas que presentan metabolismo C_3 ocurre un proceso denominado fotorrespiración. Dado que la rubisco presenta actividad oxigenasa, eventualmente una molécula de oxígeno puede ingresar al centro de reacción e incorporarse a la ribulosa 1,5-bisfosfato. Esto implica una reducción en la eficiencia de fijación de CO_2 , ya que se genera fosfoglicolato en lugar de fosfoglicerato y a su vez se consume parte del ATP y NADPH_2 generado en la fase fotoquímica (Buchanan et al. 2015, Taiz et al. 2015).

C. FACTORES AMBIENTALES

1. Concentración de dióxido de carbono

Existen tres factores principales que determinan la tasa fotosintética cuando no hay limitantes hídricas y nutricionales, y son: la irradiancia, el CO_2 y la temperatura.

A través de curvas de asimilación neta (A) en función de la concentración interna de CO_2 (C_i) se puede caracterizar la respuesta fotosintética frente al aumento de la concentración CO_2 . En plantas C3 la relación es hiperbólica y presenta un punto de saturación en CO_2 (PSC) cercano al doble de la concentración ambiental. En dicho punto, se minimiza la fotorrespiración. Otro parámetro que se obtiene a partir de las curvas es el punto de compensación en CO_2 (PCC) que es la concentración interna de CO_2 con la que se igualan la asimilación bruta con la suma de la respiración mitocondrial y fotorrespiración (Pallardy 2008, Taiz et al. 2015).

Farquhar y Sharkey (1982) plantean que se pueden identificar dos zonas en la curva A vs C_i , en las que existen diferentes limitantes al incremento en A . En la fase lineal, la tasa de regeneración de la ribulosa 1,5-bifosfato supera la velocidad de carboxilación por lo que la principal limitante es el CO_2 . En la segunda zona (zona de saturación) la limitante más importante es la luz. En esta etapa, el aumento de irradiancia permitiría obtener más energía (ATP) y poder reductor (NADPH_2) para la regeneración de la ribulosa 1,5-bifosfato del ciclo de Calvin (Pallardy 2008, Taiz et al. 2015).

2. Irradiancia (PAR)

Existe una relación hiperbólica entre la A y la irradiancia hasta el punto de saturación en luz (PSL). A partir de este valor, los productos de la fase fotoquímica dejan de ser limitantes para el proceso fotosintético y lo será la concentración de CO_2 (Taiz et al., 2015). A su vez, en este punto la fotosíntesis neta es máxima (A_{max}).

Las especies de *Eucalyptus* desarrollan altas tasas fotosintéticas asociadas a altas tasas de carboxilación y de transporte de electrones, que se alejan de los valores para la mayoría de las especies leñosas y que se asemejan a los de especies herbáceas anuales. Promedialmente, en *E. grandis* se obtienen valores de A_{max} entre 13,4 y 32,9 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. El punto de saturación de luz, que permite obtener A_{max} es menor a 1000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Whitehead y Beadle, 2004). Larcher (2003) reporta valores de PSL entre 600 y 800 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para latifoliadas perennes creciendo en plena luz, y entre 100 y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para plantas creciendo a la sombra.

3. Temperatura

La temperatura determina la actividad de cada una de las enzimas vinculadas en el proceso fotosintético. En este sentido, se definen valores de temperatura como lo son la temperatura mínima, máxima y óptima que

determinan los valores de A que se pueden alcanzar y que permiten caracterizar la respuesta de las plantas (Taiz et al., 2015).

En plantas con metabolismo C3, la fotorrespiración se ve favorecida por los incrementos de temperatura lo que determina que A se modifique poco en un intervalo amplio de temperaturas (15 a 30 °C). Esto se debe principalmente a dos factores. Primero a altas temperaturas la rubisco disminuye su afinidad por el CO₂ más que por la del O₂ y segundo el aumento de temperatura genera menor solubilidad del CO₂ respecto del O₂, lo cual hace que la relación O₂/CO₂ aumente (Taiz et al., 2015).

D. MECANISMOS DE FOTOPROTECCIÓN

La fotoinhibición es la disminución de la actividad fotosintética como consecuencia de la exposición a una elevada irradiancia. En estas condiciones, se pueden generar átomos libres de oxígeno, capaces de dañar lípidos y proteínas cercanos a los centros de reacción. Uno de estos daños es la degradación de la proteína D1, que interconecta el PSII con la Q_A (Pallardy, 2008). En consecuencia, disminuye la capacidad fotosintética y se fija menos CO₂ por cada fotón absorbido (Long, 1994).

En niveles bajos y moderados de radiación, la energía se destina principalmente a la transferencia de electrones, las pérdidas (emisión de calor) son bajas y no ocurre fotoinhibición. Sin embargo, con alta irradiancia, la concentración de iones hidrógeno del tilacoide aumenta rápidamente y se activan vías de fotoprotección (Ort, 2001). En estas condiciones, el pH del lumen tilacoidal disminuye y promueve cambios de conformación en proteínas del centro de reacción, además de activar una enzima clave del ciclo de las xantófilas. Esta enzima transforma violaxantina en zeaxantina. El incremento de zeaxantina genera cambios en el fotosistema que facilitan la disipación energética bajo la forma de calor. Este proceso se revierte al reducir la irradiancia. Los carotenoides también participan de la disipación de energía (Taiz et al., 2015). En diversas situaciones de estrés lumínico, el aumento del quenching no fotoquímico puede ir acompañado de procesos de fotoinhibición (Melis, 1999) que causan daños oxidativos en el PSII (Aro et al., 1994).

E. FLUORESCENCIA DE LAS CLOROFILAS

1. Aspectos generales

Cuando una molécula de clorofila recibe luz se modifica su estructura y se vuelve inestable, por lo que debe perder energía para recuperar un estado basal. Según el tipo de luz, se alcanzan distintos niveles de inestabilidad. La luz

azul promueve estados energéticos más elevados que la luz roja. En condiciones de alta excitación, la clorofila transforma rápidamente la energía en calor para alcanzar una condición más favorable, pero aún inestable. A partir de ese punto, la energía puede ser administrada de cuatro formas hasta alcanzar el estado basal estable. Las alternativas son: la emisión de fluorescencia, la transformación de la energía para la disipación como calor, desplazamiento de un electrón del centro de reacción del fotosistema o la transferencia de la energía a otra molécula (Taiz et al., 2015).

La fluorescencia de la clorofila es luz emitida por estos pigmentos al ser iluminados por radiación PAR (Mc Cree, 1972), y presenta mayor longitud de onda que la radiación incidente. Si bien ambos fotosistemas emiten fluorescencia, la proporción del PSI es despreciable en relación a la del PSII (Lazár, 2015). La intensidad de la fluorescencia es inversamente proporcional a la fracción de energía utilizada en la fotosíntesis (Kalaji et al., 2017) y al mismo tiempo, es inversamente proporcional a los cambios en los mecanismos de disipación de calor (Krause y Weis, 1991).

Por esta razón, se puede definir a la fluorescencia a través de una ecuación general [1] en la cual su intensidad queda en función de las constantes de decaimientos de los procesos fotoquímicos y disipativos. A su vez, depende de un factor S que se construye en función de características propias de la hoja (Kasajima et al., 2009).

$$F = \frac{S \times k_f}{(k_f \times k_d \times k_{isc} \times k_{NPQ} \times k_p)} = \frac{S \times k_f}{(\Phi_{NO} + \Phi_{NPQ} + \Phi_{PSII})} = \frac{S \times k_f}{k_s}$$

$$S = I \times A_{hoja} \times Frac_{PSII} \times Noabs \times Resp$$

donde,

F : intensidad de fluorescencia.

k_f : constante de decaimiento de fluorescencia.

k_d : constante de decaimiento basal no radiativo.

k_{isc} : constante de decaimiento de intersystem crossing.

k_{NPQ} : constante de decaimiento de quenching no fotoquímico.

k_p : constante de decaimiento debido a procesos fotoquímicos.

Φ_{NO} : rendimiento cuántico disipación basal.

Φ_{NPQ} : rendimiento cuántico quenching no fotoquímico.

Φ_{PSII} : rendimiento cuántico de la transferencia de electrones.

S : factor de sensibilidad.

I : intensidad de luz emitida.

A_{hoja} : proporción de luz incidente absorbida.

$Frac_{PSII}$: fracción de luz absorbida recibida por el PSII.

Noabs: fracción de fluorescencia emitida no reabsorbida por la clorofila.

Resp: respuesta del instrumento.

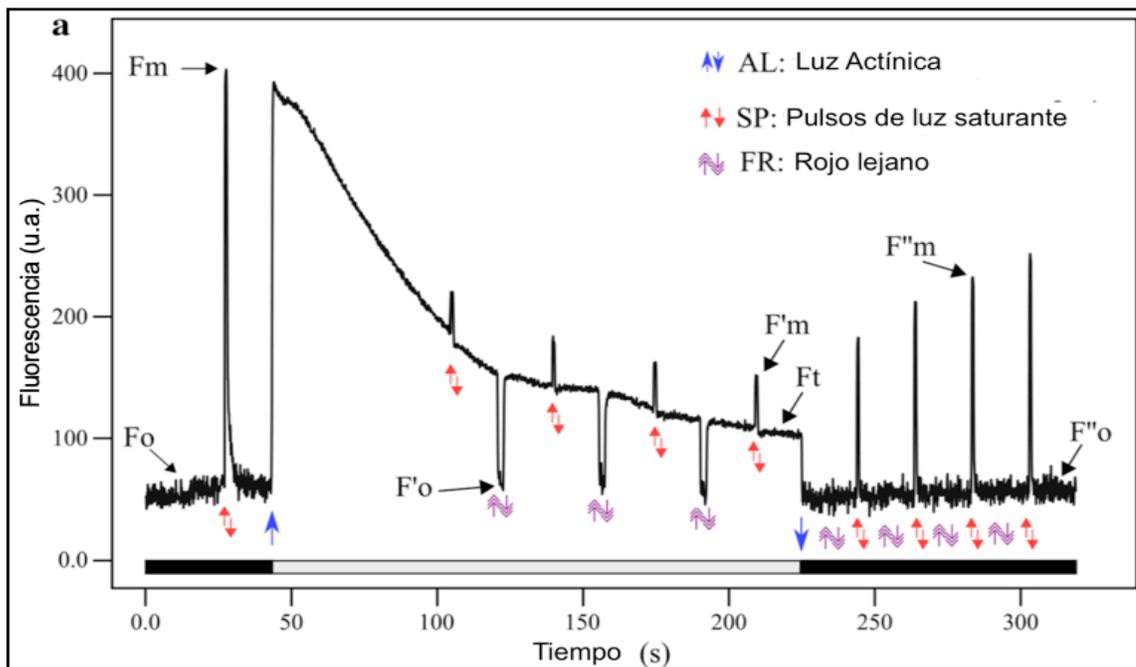
2. Técnicas de medición

La medición de la fluorescencia mediante el uso del método de pulso de amplitud modulada (PAM) permite conocer los mecanismos de des-excitación de la clorofila en forma simple y no destructiva (Baker, 2008). A partir de la medición se genera un perfil de curva del que se extraen valores de puntos específicos (Figura 1).

La curva se puede dividir en tres tramos, de los que se extrae la información para el cálculo de los componentes de la partición de energía. En el primer tramo, las hojas se someten a la oscuridad para que las Q_A se oxiden y se encuentren abiertas o disponibles para la transferencia de electrones en la mayoría de los fotosistemas. Una alternativa a la aclimatación en oscuridad es utilizar luz rojo lejano que "limpia" la cadena de transporte de electrones, ya que estimula el PSI favoreciendo el flujo. Luego se emite una señal débil que no tiene la capacidad de reducir al aceptor primario, para obtener el valor de fluorescencia basal (F_0). Finalmente se aplica un pulso de luz actínica hipersaturante (mayor a $9000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) que reduce al máximo la Q_A , obteniendo así el valor de fluorescencia máxima F_m (Baker, 2008).

El segundo tramo se denomina análisis de quenching y consiste en la aplicación de nuevos ciclos de pulsos saturantes, pero esta vez manteniendo la luz actínica encendida en todo momento. A partir de cada pulso se registran los valores de fluorescencia máxima en luz (F'_m) y de fluorescencia en un momento dado (F_i), que serán necesarios para el cálculo de los parámetros de disipación de calor (Baker, 2008). El valor F'_m representa el nivel máximo de fluorescencia emitida tras la activación de los mecanismos de disipación (Kasajima et al., 2009) y por ello su valor es menor al de F_m , ya que compite con la disipación inducida por la luz (Tambussi y Graciano, 2010).

El tercer tramo se denomina análisis de relajación y permite conocer en detalle los mecanismos de disipación por calor. El mismo consiste en apagar la luz y medir la respuesta frente a nuevos ciclos de pulsos saturantes. Se registran máximos y mínimos que se denotan con la nomenclatura F''_m y F''_0 respectivamente (Lazár, 2015).



La barra de la parte inferior indica si la luz actínica se encuentra apagada (barra negra) o encendida (barra gris). La barra gris se corresponde con el análisis de quenching y la segunda barra negra con el análisis de relajación. Flechas hacia arriba y abajo indican encendido y apagado de luz Actínica (AL), pulsos saturantes (SP) y rojo lejano (FR).

Figura 1. Ejemplo de perfil de medición de fluorescencia mediante análisis de quenching y de relajación con fluorómetro PAM.

Fuente: adaptado de Quero et al. (2018).

3. Partición de la energía

La partición de energía es una forma de representar cómo la planta administra la energía lumínica absorbida (Lazár, 2015). Sus parámetros se calculan en términos de rendimiento cuántico (Φ), ya que expresan el efecto individual ponderado por todos los efectos parciales. La consecuencia algebraica determina que la suma de los rendimientos cuánticos sea la unidad ($\sum \Phi_i = 1$, Lazár, 2015).

Para su elaboración, Kasajima et al. (2009) proponen realizar el análisis de quenching para calcular Φ_{PSII} , Φ_{NPQ} y Φ_{NO} y el análisis de relajación para poder subdividir Φ_{NPQ} , en dos nuevas fracciones, $\Phi_{NPQ.fast}$ y $\Phi_{NPQ.slow}$. En la Figura 2 se muestra cómo se organizan cada uno de los componentes durante la asignación de energía. Inicialmente la molécula debe de desexcitarse y para ello existen dos opciones. Por un lado, puede ceder un electrón mientras

que, por el otro, puede disipar o perder energía a través de diferentes formas de calor, representadas a través de los parámetros de la partición.

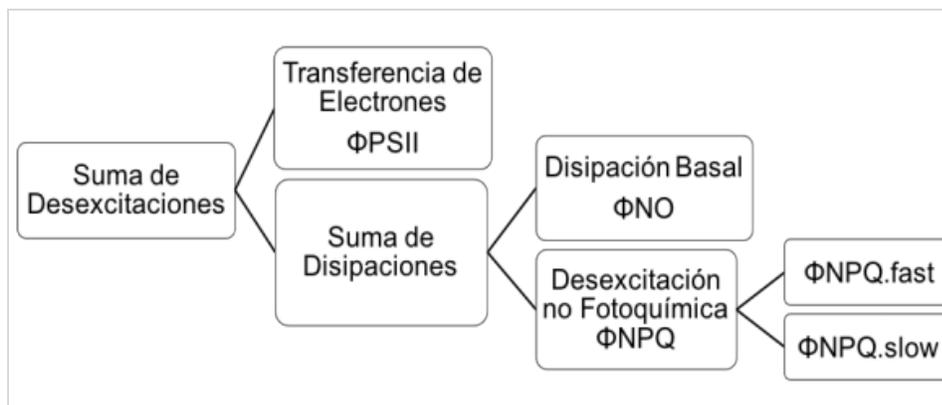


Figura 2. Componentes de la partición de energía.

Fuente: adaptado de Kasajima et al. (2009).

4. Parámetros asociados

Kasajima et al. (2009) sugieren el siguiente listado de fórmulas para calcular la partición de energía. Algunas de ellas son modificaciones algebraicas o propuestas anteriores de otros autores.

• Φ_{PSII}

Rendimiento cuántico efectivo de PSII. $\Phi_{PSII} = (F_t^{-1} - F_m'^{-1}) / F_t^{-1}$. Indica la cantidad de energía destinada a la transferencia de electrones (Genty, 1989). Berenguer et al. (2018) realizaron mediciones del parámetro en plantas que crecieron bajo luz PAR de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y obtuvieron en *E. globulus* obtuvo un valor de $0,537 \pm 0,087$, *E. nitens* de $0,608 \pm 0,013$ y *E. globulus* x *E. cypellocharpa* de $0,459 \pm 0,065$.

• Φ_{NO}

Rendimiento cuántico de la disipación basal térmica no fotoquímica de la energía. Es resultado de la estructura del sistema. $\Phi_{NO} = (F_m^{-1} - F_t^{-1}) / F_t^{-1}$ (Hendrickson, 2004).

• Φ_{NPQ}

Rendimiento cuántico de los mecanismos de disipación controlada inducidos por la luz. $\Phi_{NPQ} = (F_m'^{-1} - F_m^{-1}) / F_t^{-1}$ (Cailly, 1996).

- $\Phi_{NPQ.fast}$

Rendimiento cuántico de la fracción del quenching no fotoquímico, asociado a la activación de mecanismos de disipación que tiene que ver específicamente con la acidificación del lumen y el ciclo de las xantofilas. $\Phi_{NPQ.fast} = (F'_m{}^{-1} - F''_m{}^{-1}) / F_t{}^{-1}$ (Kasajima et al., 2009).

- $\Phi_{NPQ.slow}$

Rendimiento cuántico de la fracción del quenching no fotoquímico, asociado principalmente a efectos de fotoinhibición. $\Phi_{NPQ.slow} = (F''_m{}^{-1} - F_m{}^{-1}) / F_t{}^{-1}$ (Kasajima et al., 2009).

Parámetros complementarios:

- Φ_{Po}

Máximo rendimiento cuántico de PSII en oscuridad. $\Phi_{Po} = F_v / F_m$ (Kitajima y Butler, 1975). En situaciones de estrés lumínico, este parámetro decae por la disminución de F_m , que no se recupera en un período corto de tiempo (Baker, 2008). Este parámetro muestra gran correlación con la cantidad de centros funcionales del PSII. El valor promedio en hojas sin estrés es aproximadamente 0,8 (Tambussi y Graciano, 2010).

- $\Phi_{PSII.pot}$

Máximo rendimiento cuántico fotoquímico en iluminación. $\Phi_{PSII.pot} = F'_v / F'_m$ (Oxborough y Baker, 1997). Berenguer et al. (2018) obtuvieron los siguientes valores en diferentes especies de eucaliptos: $0,821 \pm 0,007$ en *E. globulus*, $0,821 \pm 0,0013$ en *E. nitens* y de $0,766 \pm 0,043$ en el híbrido *E. globulus* x *E. cypelloarpa*.

- ETR

Tasa de transferencia de electrones. $ETR = \Phi_{PSII} \times PPFD \times 0,5 \times Abs.$ PPFD es la intensidad de luz a la que se realizó la medición. Se utiliza 0,5 como la distribución de PPFD, asumiendo que la mitad de los fotones se dirigen al PSI y la otra mitad al PSII. Abs., es la absorbancia y toma un valor de a 0,85 en especies C3 (Krall y Edwards, 1992). Existe una alta correlación entre este parámetro y la asimilación de CO_2 cuando la concentración de O_2 es baja, ya que se suprime la fotorrespiración (Kalaji, 2017).

F. ANATOMÍA FOLIAR

1. Epidermis

La hoja es un órgano vegetativo que contiene los tres sistemas de tejidos fundamentales: dérmico, vascular y fundamental. Dado que excepcionalmente ocurre desarrollo secundario, el tejido de protección es la epidermis. Ésta constituye el tejido más externo y se compone de una sola capa de células, translúcidas, cuya función principal es la protección y vinculación con el medio externo (Esau, 1982).

Los tipos celulares de la epidermis de la hoja se clasifican por su grado de especialización. Por un lado, existen células epidérmicas típicas, sin clorofila, y cubiertas por una cutícula de espesor y composición variable, que presentan forma convexa y por ello se comportan como lentes que maximizan la entrada de luz (Taiz et al., 2015). Por otra parte, en la epidermis foliar también se observan células especializadas en regular el intercambio gaseoso y que forman parte del aparato estomático. Estas células se denominan oclusivas y delimitan los ostiolos, que son los poros a través de los cuales se da el intercambio de gases (Esau, 1982).

La posición, densidad y anatomía estomática son muy variadas y tienen carácter taxonómico. Las células oclusivas pueden o no presentar células anexas cuya función es regular el potencial osmótico de las células oclusivas. La morfología y disposición de las células anexas, permiten clasificar al aparato estomático como: anamocítico (sin células anexas), anisocítico (tres células anexas con una de ellas marcadamente menor), paracítico (una o más células con el eje mayor paralelo al eje mayor de las oclusivas), diacítico (dos células perpendiculares al eje mayor de las oclusivas) y actinocítico (similar al anterior, pero con tres células o más, Esau, 1982).

Por otra parte, si los estomas localizan exclusivamente en la cara adaxial, las hojas son hipostomáticas, mientras que si están en ambas caras son anfiestomáticas (Esau, 1982). En *E. grandis* creciendo a campo se reportaron estomas en ambas caras con valores de densidades promedio de 32,46 unidades mm^2 en la cara adaxial y hasta 566 en la superficie abaxial (Tuffi et al., 2008).

Los estomas funcionan como válvulas que regulan el intercambio de gases y, por lo tanto, inciden directamente en la actividad fotosintética y estado hídrico. Su función principal es maximizar el ingreso de CO_2 , minimizando la pérdida de vapor de agua. El grado de apertura estomática puede estimarse mediante la conductancia estomática (gs). Witehead y Beadle (2004)

observaron valores medios entre 278 y 725 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ para *E. camaldulensis*, 280 y 600 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ para *E. grandis* y entre 500 y 980 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ para *E. tereticornis*.

2. Mesófilo

Existen dos tipos de parénquima en el mesófilo, el parénquima en empalizada y el parénquima esponjoso. De acuerdo a la cantidad de filas del primero, las hojas se clasifican en dorsiventrales si la fila es única, y adaxial o isobilaterales si hay una fila en cada cara de la hoja (Esau, 1982). El parénquima en empalizada es un tejido formado por un conjunto de células dispuestas paralelamente como pilares. La luz las atraviesa y alcanza las capas más inferiores, facilitando su distribución en el interior de la hoja. En el parénquima esponjoso, el aire y el agua de los espacios aéreos, facilitan la dispersión de la luz en todas direcciones. A su vez, cuanto mayor sean los espacios, la superficie de cada una de las células queda más expuesta al CO₂ que se encuentra en solución acuosa (Taiz et al., 2015).

El mesófilo presenta una serie de barreras a la difusión del CO₂, las cuales se denominan resistencias residuales y tienen que ver con la permeabilidad que tiene el mesófilo para la difusión del gas (Larcher, 2003). Las barreras que impone el mesófilo son relativamente bajas en comparación a la impuesta por la capa límite y la apertura de los estomas, y se relacionan con la cantidad de espacios aéreos presentes en el parénquima esponjoso. Cuanto mayor sea la cantidad de espacios, menores serán las barreras a la difusión (Taiz et al., 2015).

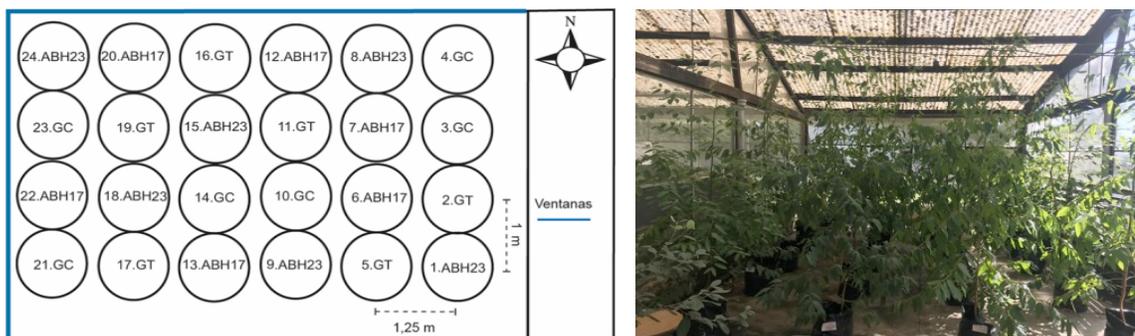
Tuffi et al. (2008) reportaron que las hojas de *E. grandis* son dorsiventrales y contienen gran proporción de parénquima esponjoso. A su vez Sefton et al. (2002) sostienen que el parénquima en empalizada tiene una sola capa de células en *E. grandis*, mientras que en *E. camaldulensis* presenta dos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. INSTALACIÓN DEL ENSAYO

El ensayo se instaló en mayo de 2017 con 24 plantas aleatoriamente distribuidas, correspondientes a dos clones de *Eucalyptus grandis* (ABH17 y ABH23), un clon de *E. grandis* x *E. camaldulensis* (GC) y un clon de *E. grandis* x *E. tereticornis* (GT). El trabajo se realizó en el invernáculo del Depto. de Biología Vegetal de Facultad de Agronomía (34° 50'S, 56° 13'W) y se utilizaron seis plantas por clon suministradas por la empresa Lumin. Las mismas se colocaron en macetas de 15 L con sustrato Carolina Soils®, que consiste en una mezcla de turba (58%), vermiculita (40%) y trazas de elementos minerales.

En primavera (noviembre/2017) se monitoreó el consumo de agua por planta durante tres semanas y en base a esta información se regó a demanda (650 a 850 mL H₂O planta⁻¹ día⁻¹) con ajustes quincenales. En diciembre/2017 comenzó la medición de parámetros fotosintéticos. En ese momento las plantas presentaban nueve meses de edad y promediaban 2 m de altura (Figura 3).



A la izquierda, croquis de la distribución de plantas. A la derecha foto del invernáculo. ABH17 y ABH23: clones de *E. grandis*, GC: clon *E. grandis* x *camaldulensis* y GT: clon de *E. grandis* x *tereticornis*.

Figura 3. Distribución de las plantas en el invernáculo y foto del invernáculo.

B. PARTICIÓN DE LA ENERGÍA

Se midió fluorescencia con fluorómetro de pulso de amplitud modulada (PAM, FMS1 Hansatech®). Se seleccionaron hojas subapicales, completamente expandidas y sin síntomas de ataque de patógenos ni déficit nutricional. Las mediciones abarcaron tres etapas. La primera (Ensayo I) fue de carácter exploratorio y permitió caracterizar el comportamiento de los clones para posteriormente ajustar un protocolo de medición. En la siguiente etapa (Ensayo II) se modificaron aspectos de muestreo (No. plantas) y submuestreo

(No. hojas), y en la última etapa (Ensayo III) se implementó el protocolo definitivo. La partición de energía del PSII se estimó a partir de los siguientes parámetros:

$$\Phi_{PSII} = (F_t^{-1} - F'_m^{-1}) / F_t^{-1}$$

$$\Phi_{NO} = (F_m^{-1} - F_t^{-1}) / F_t^{-1}$$

$$\Phi_{NPQ} = (F'_m^{-1} - F_m^{-1}) / F_t^{-1}$$

$$\Phi_{NPQ.fast} = (F'_m^{-1} - F''_m^{-1}) / F_t^{-1}$$

$$\Phi_{NPQ.slow} = (F''_m^{-1} - F_m^{-1}) / F_t^{-1}$$

$$\Phi_{Po} = F_v / F_m$$

$$\Phi_{PSII.pot} = F'_v / F'_m$$

$$ETR = \Phi_{PSII} \times PPF \times 0,5 \times Abs.$$

•Ensayo I

Esta medición se realizó el 08/12/17 con tres plantas de un clon puro (ABH23) y tres plantas del híbrido *E. grandis x tereticornis* (GT). En cada una se tomaron tres hojas con las características anteriormente mencionadas y se analizaron tres secuencias, cada una con una intensidad de luz actínica diferente (255, 778 y 2800 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Durante todo el experimento las hojas recibieron un tratamiento previo de luz rojo lejano, para asegurar la oxidación de las Q_A . Los valores de intensidad de fluorescencia utilizados, se obtuvieron del quinto y último ciclo de pulso saturante (ver Figura 1).

•Ensayo II

Esta medición se realizó el día 19/02/18 con 778 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz actínica en los cuatro clones. Se seleccionaron tres árboles por clon y se midió la fluorescencia en una hoja por árbol.

•Ensayo III

Esta medición se realizó el 4/05/18 y se duplicaron las repeticiones, pasando de tres a seis árboles por clon, y se midió en una hoja de cada uno. A su vez, se midieron dos niveles de luz actínica (255 y 778 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Previamente al cambio de luz actínica, se aplicó luz rojo lejano.

C. ASIMILACIÓN DE CO_2

La tasa de fijación de CO_2 se midió el 11/12/17 (próximo Ensayo I) en tres plantas por genotipo (12 en total). Se seleccionó una hoja subapical en buen estado sanitario, completamente expandida y plenamente iluminada. Las medidas se realizaron con un analizador de gases por infrarrojo (IRGA, Licor-6400®, Lincoln Nebraska) y se tomaron dos tipos de registros. En primer lugar, se fijó la concentración de CO_2 de referencia en 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y se midió

a 800 y 1600 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia. Luego se fijó el flujo lumínico en 800 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y dos concentraciones de CO_2 ambiente, 400 y 800 $\mu\text{mol} \text{CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En todo momento se mantuvo el flujo de aire en 100 $\mu\text{mol} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los registros se tomaron con un coeficiente de variación inferior a 0,1 %.

D. REGISTRO DE RADIACIÓN PAR

Se midió la irradiancia (PAR) en diferentes puntos mediante el uso de un ceptómetro LP-80 AccuPAR Decagon Devices®. Durante el mes de febrero de 2018, se tomaron diez registros, nueve dentro del invernáculo y el restante en el exterior. El valor medio de PAR en el invernáculo fue un 8% del valor externo y la luz se distribuyó en forma homogénea.

E. ESTUDIOS ANATÓMICOS

1. Epidermis

Se contabilizó la densidad estomática a partir hojas de tres árboles por clon. Las hojas muestreadas presentaron las mismas características que las utilizadas en las mediciones de fluorescencia y asimilación neta. Sobre ellas se aplicó una capa de esmalte incoloro, y una vez seco, se la retiró con cinta adhesiva transparente. El procedimiento se realizó de a una cara por hoja, por lo que se necesitaron dos hojas por árbol. La visualización se realizó con microscopio Nikon E100® que contaba con una cámara digital acoplada, modelo Dino Eye 2.0®. Se capturaron imágenes 10x y se delimitaron 10 campos de 0,07 mm^2 para el conteo de estomas (adaptado de Tuffi et al., 2008). Las imágenes se procesaron con el software DinoCapture® versión 1.5.27.A (Electronic Corp).

2. Mesófilo

Se analizó la estructura del mesófilo en una hoja de cada genotipo. Tras la colecta, las hojas se almacenaron durante 48 h en medio de fijación FAA (50% alcohol 96 + 10% formol + 5% ácido acético) y luego fueron deshidratadas y almacenadas en alcohol 70%. Se realizaron cortes transversales de 20 μm con micrótopo de mano, utilizando bastones de zanahoria como soporte de las muestras. Para la tinción, se aplicó una solución de NaClO (50%) y se lavó con H_2O . Luego se sumergieron en azul de toluidina 1% y se lavó con H_2O nuevamente. Finalmente se añadieron gotas de una solución de ácido acético y agua (3:1) en cantidad suficiente para aclarar (D' Ambrogio, 1986). Posteriormente se midió el espesor del parénquima (empalizada y esponjoso) y

también el grosor total de lámina foliar. La visualización y análisis se realizó con el instrumental y metodología anteriormente mencionados.

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con modelos lineales que dependiendo del caso incluyeron arreglos factoriales. Se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad y cuando el efecto fue significativo, se realizaron los contrastes ortogonales. Los análisis de varianza se realizaron con el software libre R (R Core Team 2017). Los contrastes ortogonales se realizaron con el paquete de R emmeans (Russell, 2018).

Los modelos para cada medición fueron:

- Ensayo I

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ij} \quad \text{donde,}$$

α_i es el efecto del i-ésimo genotipo (GT, ABH23)

β_j es el efecto del j-ésimo nivel de actínica (255, 778, 2800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

$(\alpha\beta)_{ij}$ es la interacción entre el i-ésimo nivel de α y el j-ésimo nivel de β

- Ensayo II

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_i \quad \text{donde,}$$

α_i es el efecto del i-ésimo genotipo (ABH17, ABH23, GC, GT)

- Ensayo III

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ij} \quad \text{donde,}$$

α_i es el efecto del i-ésimo genotipo (ABH17, ABH23, GC, GT)

β_j es el efecto del j-ésimo nivel de actínica (255, 778 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

$(\alpha\beta)_{ij}$ es la interacción entre el i-ésimo nivel de α y el j-ésimo nivel de β

- Parámetros de Asimilación neta en función de CO_2 R (An, ci, gs)

$$Y_{ik} = \mu + \alpha_i + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik} + \varepsilon_{ik} \quad \text{donde,}$$

α_i es el efecto del i-ésimo genotipo (ABH17, ABH23, GC, GT)

γ_k es el efecto del k-ésimo nivel de CO_2R (400, 800 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

$(\alpha\gamma)_{ik}$ es la interacción entre el i-ésimo nivel de α y el k-ésimo nivel de γ

•Parámetros de Asimilación neta en función de PPFD (An, ci, gs)

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \delta_l + (\alpha\delta)_{il} + \varepsilon_{ij} \quad \text{donde,}$$

α_i es el efecto del i-ésimo genotipo (ABH17, ABH23, GC, GT)

δ_l es el efecto del l-ésimo nivel de PPFD (800, 1600 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

$(\alpha\delta)_{il}$ es la interacción entre el i-ésimo nivel de α y el l-ésimo nivel de δ

IV. RESULTADOS

A. FLUORESCENCIA

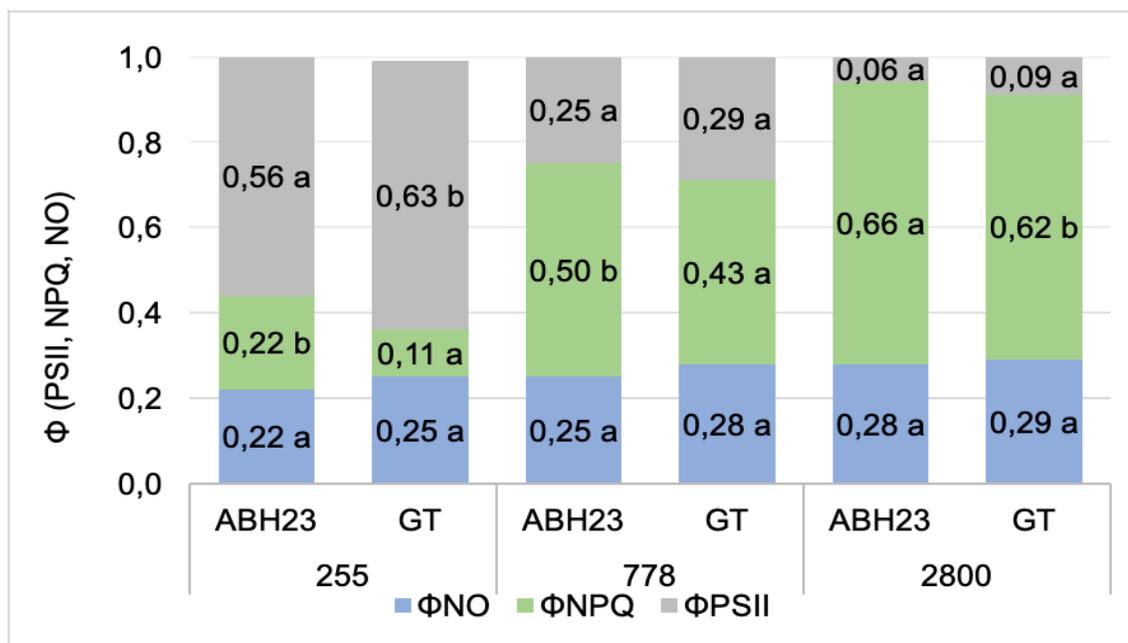
1. Ensayo I

Los niveles mínimo e intermedio diferenciaron los clones en varios parámetros de la partición (Figura 4, Cuadro 1). Con el nivel máximo se generaron particiones casi idénticas. La disipación basal (Φ_{NO}) de los clones no se diferenció en ningún caso.

Con $255 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia se destinó aproximadamente el 60% de la energía a la transferencia de electrones y los mecanismos inducidos de disipación demandaron menor energía en comparación a los demás procesos. El valor de $\Phi_{NPQ.fast}$ fue el doble en ABH23. Ambos cedieron igual cantidad de electrones y mantuvieron valores bajos de $\Phi_{NPQ.slow}$. Los indicadores de rendimiento cuántico potencial ($\Phi_{PSII.pot}$ y Φ_{Po}) se diferenciaron mínimamente, al igual que en los demás tratamientos.

En el nivel intermedio ($778 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ambos clones destinaron aproximadamente el 30% de la energía a la transferencia de electrones y la disipación controlada (Φ_{NPQ}) incrementó hasta demandar la mayor cantidad de energía. Los demás parámetros mostraron igual comportamiento en la comparación.

Con intensidades de $2800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se observaron diferencias en $\Phi_{NPQ.slow}$, ETR, $\Phi_{PSII.pot}$ y Φ_{Po} . La energía destinada a procesos fotosintéticos disminuyó a menos de un 10% y los valores de disipación crecieron hasta superar el 60% de la energía suministrada.



Se comparan las medias de cada parámetro parámetro en tres niveles puntuales radiación (255, 778 y 2800) para los clones ABH23 y GT. Letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0,05$.

Figura 4. Media de los parámetros Φ_{NO} , Φ_{NPQ} y Φ_{PSII} para los clones ABH23 y GT en tres niveles de irradiancia.

Cuadro 1. Media de los parámetros Φ_{Po} , $\Phi_{PSII.pot}$, ETR, $\Phi_{NPQ.fast}$, $\Phi_{NPQ.slow}$ para los clones ABH23 y GT en tres niveles de irradiancia.

PPFD	Clon	Φ_{Po}	$\Phi_{PSII.pot}$	ETR	$\Phi_{NPQ.fast}$	$\Phi_{NPQ.slow}$
255	ABH23	0,82 a	0,69 a	60,81 a	0,21 b	0,01 a
	GT	0,83 b	0,76 b	68,39 a	0,10 a	0,01 a
778	ABH23	0,82 a	0,60 a	82,98 a	0,47 b	0,03 a
	GT	0,84 b	0,67 b	96,24 a	0,41 a	0,02 a
2800	ABH23	0,82 a	0,58 a	68,33 a	0,54 a	0,12 b
	GT	0,84 b	0,63 b	101,62 b	0,55 a	0,07 a

Se comparan las medias de cada parámetro en tres niveles puntuales radiación (255, 778 y 2800) para los clones ABH23 y GT. Letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0,05$.

2. Ensayo II

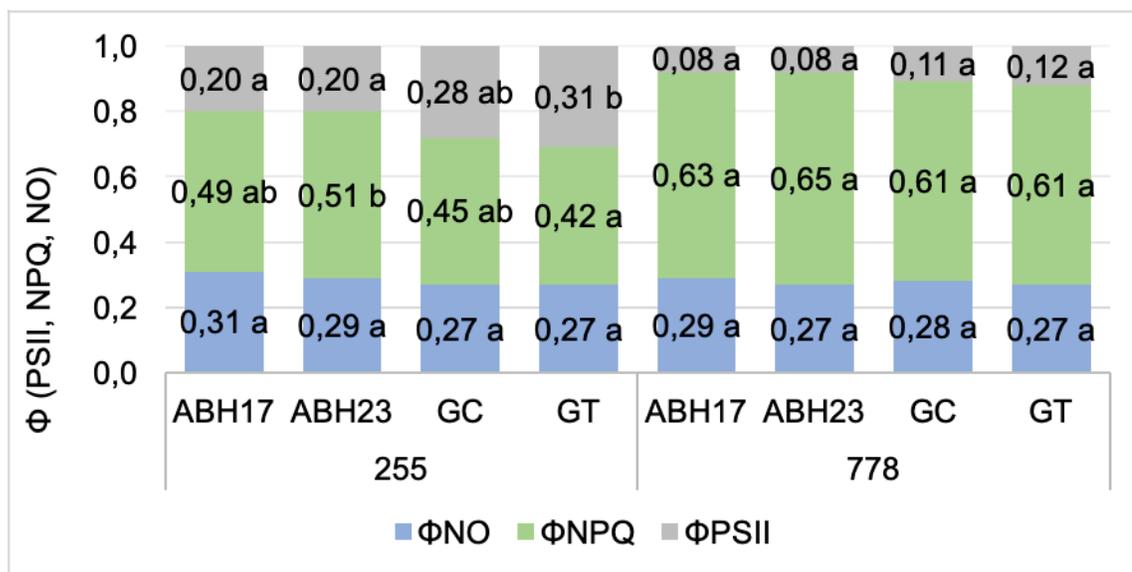
Al medir con una actínica de $778 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, los valores ΦPo , $\Phi\text{PSII.pot}$, ΦPSII , ΦNPQ , $\Phi\text{NPQ.fast}$, $\Phi\text{NPQ.slow}$ y ETR fueron estadísticamente iguales entre los cuatro clones.

3. Ensayo III

Los resultados mostraron que las diferencias fueron más marcadas entre los cuatro clones al exponer a las hojas $255 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ya que con $778 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ los únicos parámetros que acusaron diferencias fueron ETR y ΦPo (Figura 5, Cuadro 2).

Con el tratamiento inferior, ΦPSII fue máximo en GT y mínimo en los clones puros. GC mostró un comportamiento que no se diferenció de los comportamientos extremos. Por otro lado, la disipación de calor en forma regulada (ΦNPQ) fue mínima en GT, máxima en ABH23, mientras que en los demás no se diferenció de ninguno de los dos anteriores. La disipación asociada a fotoinhibición ($\Phi\text{NPQ.slow}$) fue mínima e igual en ambos híbridos. En oposición ABH17 obtuvo un valor casi 5 veces mayor que los híbridos. El restante clon puro tuvo una respuesta intermedia.

Todos los clones cedieron la misma cantidad de electrones (ETR). Los indicadores de rendimiento potencial oscilaron en los mismos valores que las restantes mediciones. Si bien ΦPo se distinguió entre genotipos, su variación nuevamente fue acotada. Finalmente $\Phi\text{PSII.pot}$ no arrojó diferencias.



Se compara el efecto entre clones con igual nivel de intensidad. Letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0,05$

Figura 5. Media de los parámetros Φ NO, Φ NPQ y Φ PSII para ABH17, ABH23, GC y GT en dos niveles de irradiancia.

Cuadro 2. Media de los parámetros Φ Po, Φ PSII.pot, ETR, Φ NPQ.fast, Φ NPQ.slow para los clones ABH23 y GT en dos niveles de irradiancia.

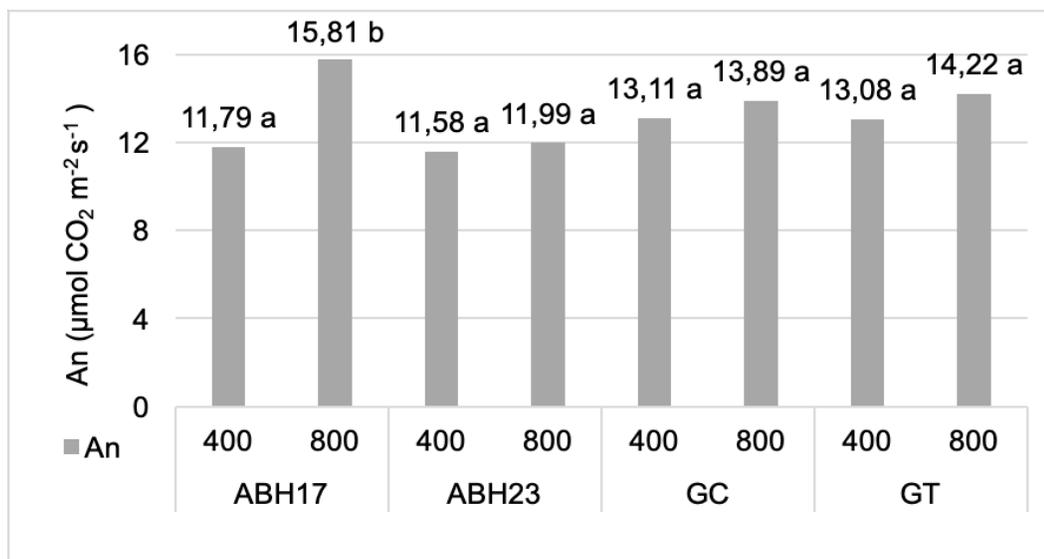
PPFD	Clon	Φ Po	Φ PSII.pot	ETR	Φ NPQ.fast	Φ NPQ.slow
255	ABH17	0,82 a	0,63 a	21,92 a	0,44 ab	0,05 b
	ABH23	0,82 a	0,62 a	21,58 a	0,48 b	0,03 ab
	GC	0,83 ab	0,65 a	29,96 a	0,43 ab	0,02 a
	GT	0,85 b	0,69 a	33,36 a	0,41 a	0,01 a
778	ABH17	0,82 a	0,58 a	25,20 a	0,58 a	0,05 a
	ABH23	0,82 a	0,56 a	27,70 ab	0,60 a	0,05 a
	GC	0,83 ab	0,57 a	36,79 ab	0,57 a	0,04 a
	GT	0,85 b	0,59 a	40,42 b	0,58 a	0,03 a

Se compara el efecto entre clones con igual nivel de intensidad. Letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0,05$.

B. ASIMILACIÓN DE CO₂

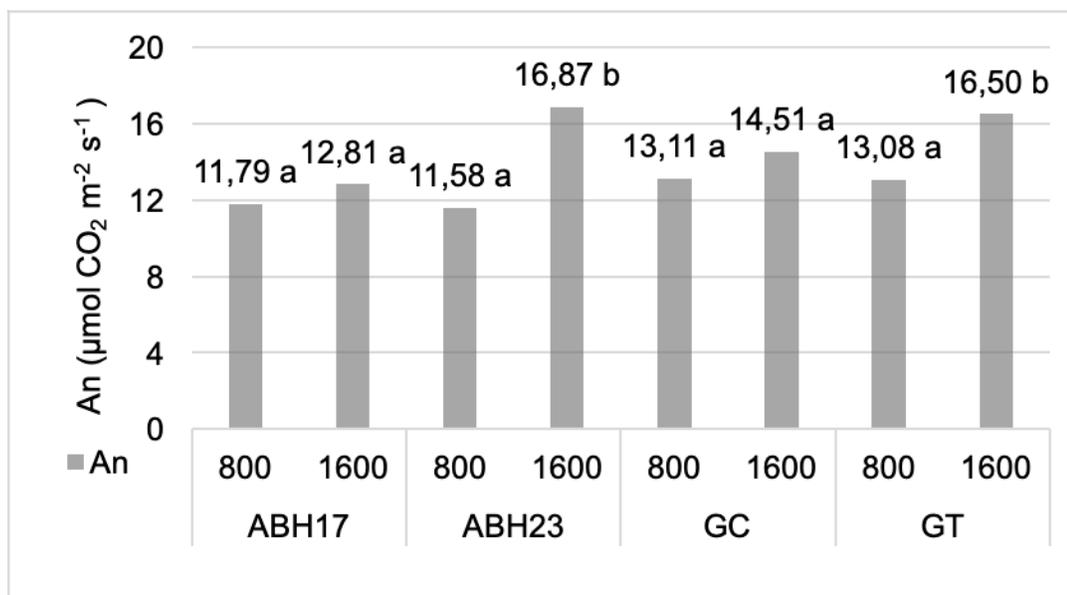
El único clon que respondió al duplicar la concentración de CO₂ de referencia, fue ABH17 que incrementó en más de un 30% su tasa de asimilación (Figura 6). A su vez, los clones ABH23 y GT, respondieron al

aumento en la intensidad lumínica, mientras que ABH17 y GC la mantuvieron (Figura 7).



Asimilación neta (A_n) medida en dos concentraciones de CO_2 de referencia (400 y 800 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), con una intensidad de luz de 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Se comparan las respuestas de cada clon en cada nivel de CO_2 . Letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0,05$.

Figura 6. Tasa de asimilación neta para los cuatro clones medida en 400 y 800 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.



Asimilación neta (An) medida en dos intensidades de luz (800 y 1600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), con una concentración de CO_2 de referencia de 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se comparan las respuestas de cada clon. Letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0,05$.

Figura 7. Tasa de asimilación neta para los cuatro clones medida en 400 y 800 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El Cuadro 3, muestra cómo se modificaron los valores de la concentración intercelular de CO_2 (C_i), de la conductancia estomática (g_s) y de la eficiencia en el uso de la radiación (EUR) al duplicar la concentración de CO_2 de referencia. El valor de g_s se mantuvo estable y al evaluar la dispersión de los resultados mediante el coeficiente de variación del modelo (CV), se obtuvo un valor de 25%. Lo que probablemente no permitió establecer diferencias estadísticas para esta variable si bien la tendencia mostrada por los cuatro clones fue de disminuir g_s al aumentar el C_i . Por su parte C_i presentó un CV de 20%. Finalmente, la eficiencia en el uso de la radiación fue estable, salvo en ABH17, que la incrementó.

El resultado tras el aumento en la intensidad luz fue más estable, ya que no se encontraron diferencias significativas en los valores de C_i y g_s (Cuadro 4). Sin embargo, los CV para los modelos de C_i y g_s fueron de 25% y 55% respectivamente. La eficiencia en el uso de la radiación disminuyó, a diferencia del caso anterior.

Cuadro 3. Parámetros de intercambio gaseoso y eficiencia de uso de la luz, medidos en 400 y 800 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Clon	CO ₂ R ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Ci ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	gs ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	EUR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ CO}_2 / \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
ABH17	400	232,27 a	0,213 a	0,015 a
	800	527,58 b	0,129 a	0,020 b
ABH23	400	272,29 a	0,244 a	0,014 a
	800	573,92 b	0,150 a	0,015 a
GC	400	244,87 a	0,215 a	0,016 a
	800	628,03 b	0,173 a	0,017 a
GT	400	224,75 a	0,149 a	0,016 a
	800	403,51 b	0,089 a	0,018 a

Variables obtenidas a partir de la medición con equipo IRGA con 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de PPFD y dos concentraciones de CO₂ de referencia (400 y 800 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). CO₂ R: concentración de CO₂ de referencia. Ci: Concentración de CO₂ en la cámara sub estomática. gs: Conductancia estomática. EUR: eficiencia en el uso de la radiación. Letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0,05$.

Cuadro 4. Parámetros de intercambio gaseoso y eficiencia de uso de la luz medidos en 800 y 1600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

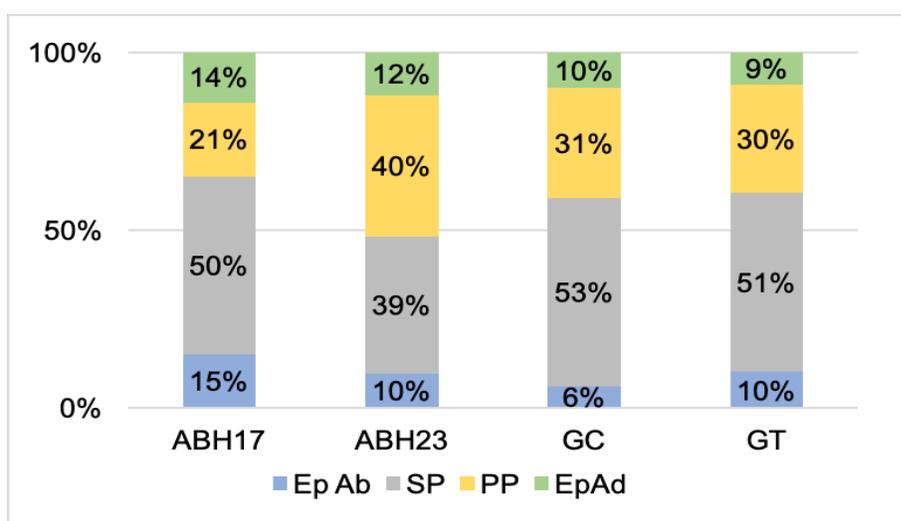
Clon	PPFD ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Ci ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	gs ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	EUR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ CO}_2 / \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
ABH17	800	232,27 a	0,213 a	0,015 b
	1600	241,64 a	0,211 a	0,008 a
ABH23	800	272,29 a	0,244 a	0,014 b
	1600	216,19 a	0,326 a	0,011 a
GC	800	244,87 a	0,215 a	0,016 b
	1600	180,25 a	0,137 a	0,009 a
GT	800	224,75 a	0,149 a	0,016 b
	1600	247,25 a	0,243 a	0,010 a

Variables obtenidas a partir de la medición con equipo IRGA con 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de CO₂R y dos intensidades de luz (800 y 1600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). CO₂ R: concentración de CO₂ de referencia. Ci: Concentración de CO₂ en la cámara sub estomática. gs: Conductancia estomática. EUR: eficiencia en el uso de la radiación. Letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0,05$.

C. ANATOMÍA DEL MESÓFILO

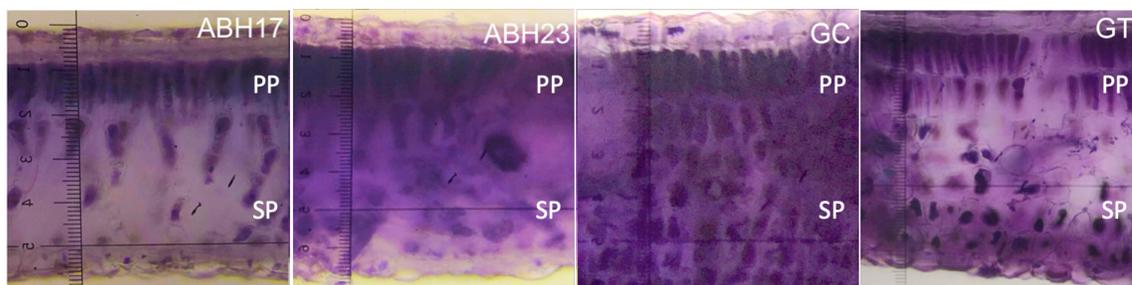
Si bien la cantidad de hojas colectadas por clon no permite describir la estructura de la hoja, se puede aproximar a la posible relación entre la

estructura y los resultados de las mediciones. Las láminas presentaron un espesor similar por lo que las diferencias se debieron principalmente a las proporciones de tejidos (Figura 8, Figura 9). Las epidermis de ambas caras fueron similares en ABH17 y GT, no así en los otros clones. El parénquima en empalizada fue menor que el esponjoso, salvo en ABH23 que mostró una relación más equilibrada entre ambos. Por su parte la proporción del parénquima esponjoso resultó similar entre todos los clones, salvo en ABH23 que lo tiene en menor cantidad. Sin embargo, la cantidad de espacios aéreos parece ser distinta, ya que ABH17 pareciera presentar mayor cantidad que los demás.



Las barras muestran el porcentaje de cada tejido de la hoja respecto al espesor total de lámina. Ep Ab: epidermis abaxial, Ep Ad: epidermis adaxial, SP: parénquima esponjoso. PP: parénquima en empalizada.

Figura 8. Proporción de los tejidos del mesófilo evaluados en una hoja de cada clon.

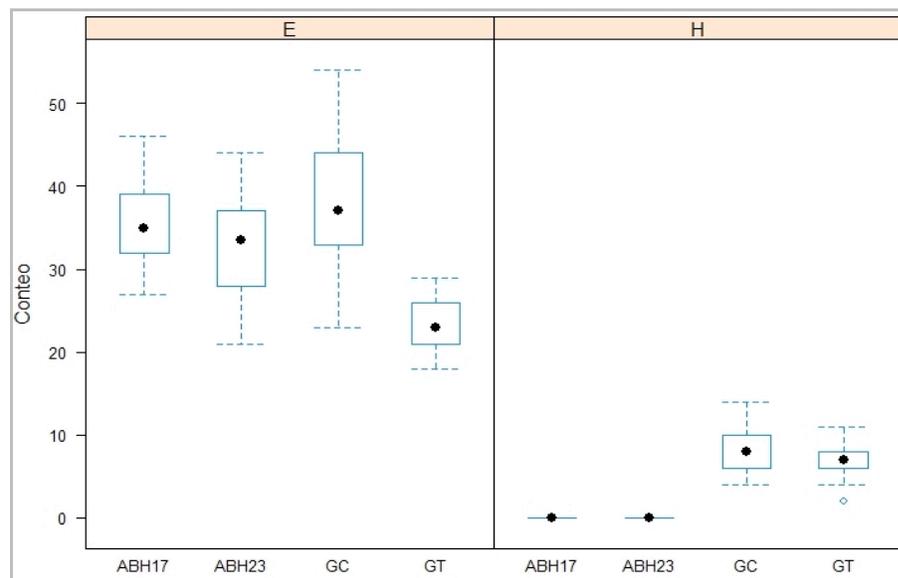


Aspecto del mesófilo de las hojas utilizadas muestreadas durante el Ensayo III. Fotografías obtenidas a partir de la observación en microscopio 10x. PP: parénquima en empalizada. SP: parénquima esponjoso.

Figura 9. Aspecto del mesófilo de una hoja colectada por cada clon.

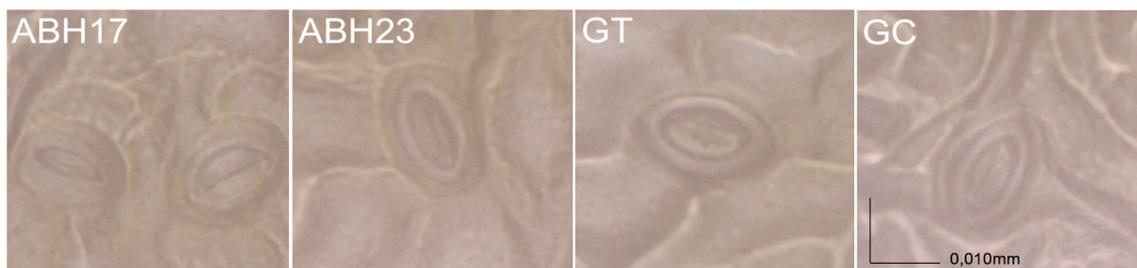
D. ESTUDIO DE LA EPIDERMIS

Las fotografías mostraron que todos los clones presentan estomas de tipo paracítico, ya que las células acompañantes se disponen con su eje mayor paralelo al de las oclusivas (Figura 11). El conteo de estomas mostró que todos presentan igual conteo en la cara abaxial. Únicamente los híbridos tienen estomas en la epidermis superior, pero en menor cantidad que en la inferior (Figura 10).



Densidad media en $0,07 \text{ mm}^2$. E: envés. H: haz.

Figura 10. Boxplot para el conteo de estomas en epidermis adaxial y abaxial.



Fotografías de los estomas de la cara abaxial, obtenidas a partir de la observación en microscopio 40x.

Figura 11. Aspecto de los estomas de la cara abaxial en cada clon.

V. DISCUSIÓN

A. FLUORESCENCIA

La serie de mediciones de fluorescencia permitió elaborar una metodología para discriminar entre genotipos en base a los parámetros de partición de la energía definidos por Kasajima et al. (2009). Los resultados del primer ensayo definieron las condiciones del segundo, y este último las del tercero.

1. Ensayo I

Al aumentar el flujo de fotones se evidenció que los procesos de transferencia de electrones y de disipación de calor compiten entre sí. Los dos clones evaluados (ABH23 y GT) disminuyeron la cantidad de energía destinada al proceso fotoquímico y la aumentaron hacia los procesos de disipación, cumpliendo con lo propuesto por Kasajima et al. (2009). La tasa de transferencia de electrones (ETR) no varió al aumentar la radiación PAR, a pesar de la reducción del valor de ϕ_{PSII} y del aumento en calor disipado asociado a fotoinhibición ($\phi_{NPQ.slow}$). Por lo tanto, no necesariamente menor energía destinada a fotosíntesis, y mayor disipación con fotoinhibición implican cambios en la cantidad de electrones cedidos (Figura 4, Cuadro 1).

Los valores P_o y $PSII.pot$ (Cuadro 1) se encontraron dentro del rango propuesto por Tambussi y Graciano (2010), Berenguer et al. (2018) respectivamente. Si bien se observaron diferencias entre clones, éstas fueron muy bajas (1%) y por lo tanto, los fotosistemas presentaron una capacidad potencial de procesamiento similar. Esto determina que el análisis de los demás indicadores se realizará sobre la base de estructuras que potencialmente se comportan igual.

A altos niveles de luz actínica ($2800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) la mayoría de los parámetros se igualaron y el valor de $\phi_{NPQ.slow}$ aumentó considerablemente en ambos clones (Figura 4, Cuadro 1), por lo que se plantea la ocurrencia de fotoinhibición asociada a daño por foto oxidación (Aro et al., 1994). Sin embargo, el valor de ETR se mantuvo en el clon de *E. grandis* ABH23 y aumentó en el híbrido GT, por lo que la transferencia de electrones no se afectó, a pesar de que la energía lumínica suministrada superó ampliamente los valores de saturación en luz propuestos por Larcher (2003). En síntesis, dado que se evidenciaron pocas diferencias, no se considera este tratamiento para el siguiente ensayo.

A bajos niveles de luz actínica ($255 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sí se observaron diferencias en varios indicadores para ambos clones. En este caso, más de la mitad de la energía se destinó al proceso fotoquímico (ϕPSII) y los mecanismos de disipación actuaron en menor medida. A nivel medio de luz actínica ($778 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ambos clones destinaron menor proporción de energía al ϕPSII . Sin embargo, los procesos de disipación aumentaron respecto a los observado en niveles bajos de luz actínica, lo cual representó una mayor actividad de los mecanismos de disipación de calor. Esta intensidad de luz actínica definió las condiciones de medición de fluorescencia para la siguiente fecha (Ensayo II).

2. Ensayo II

No se detectaron diferencias en los parámetros de la partición de energía del PSII por lo que se propusieron una serie de ajustes para el Ensayo III. Por un lado, se tomó mayor consideración de la baja intensidad de radiación PAR que recibieron las plantas durante su crecimiento. Por ello, se reconsideró al tratamiento de luz actínica de $255 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Por otro lado, la falta de diferencias pudo atribuirse a la dispersión en los valores, por lo que se aumentaron las repeticiones de tres a seis. Para integrar las propuestas, se realizaron medidas consecutivas de fluorescencia utilizando primero 255 y luego $778 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ que se refirieron a la misma condición inicial para el cálculo de ϕPo .

3. Ensayo III

Tras los ajustes con $778 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no fue posible establecer diferencias en la mayoría de los parámetros (Figura 5, Cuadro 3), ya que el resultado fue estadísticamente igual, a pesar de que se trató de disminuir la dispersión con el aumento de las repeticiones. Teniendo en cuenta los valores de referencia para Po y PSII.pot , se obtuvo un resultado dentro de lo esperable, mientras que los valores de ϕPSII son menores a los propuestos por Berenguer et al. (2018) al medir con $255 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Posiblemente esto se debió a la baja irradiancia recibida por las plantas durante su crecimiento.

Las diferencias fueron notorias al medir con una actínica de $255 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 5, Cuadro 3), que fue el tratamiento que más se asemejó a la condición de crecimiento de las plantas ($\text{PAR} < 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). En esta situación todos los clones obtuvieron igual valor o similar valor de Po y PSII.pot , por lo tanto, la comparación se realizó sobre materiales que tuvieron una respuesta similar en cuanto a los rendimientos cuánticos potenciales.

Con una actínica de $255 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la cantidad de electrones cedidos no fue significativamente diferente entre los clones, por lo tanto, el resultado de la fase fotoquímica en términos de ATP y NADPH_2 fue similar. Sin embargo, la administración de la energía fue distinta, ya que la cantidad necesaria para alcanzar el mismo ETR no fue igual en todos. Los ejemplares de *E. grandis* (ABH17 y ABH23) obtuvieron el menor valor de ϕPSII , por lo que requirieron de menos energía que los híbridos (GC y GT) para lograr el mismo resultado final de la fase. En oposición el clon GT destinó más energía que los demás a la transferencia. El clon GC obtuvo un resultado intermedio, entonces su respuesta se puede asociar con la de GT o con la de ABH17-ABH23.

A su vez, las estrategias de disipación fueron distintas. La cantidad de calor emitido en forma regulada ($\phi\text{NPQ.fast}$) se diferencia entre clones de la misma forma que ϕNPQ . Valores altos en $\phi\text{NPQ.fast}$ indican que la planta puede mantener su actividad, ya que al priorizar esta vía puede disminuir la asociada a fotoinhibición ($\phi\text{NPQ.slow}$). Otra alternativa para evitar la detención de la actividad fotosintética es destinar más energía a la transferencia de electrones. Es decir que cuanto mayor sean $\phi\text{NPQ.fast}$ y ϕPSII , menor será $\phi\text{NPQ.slow}$. En relación a los demás, GT fue el que menos reguló la emisión de calor, sin embargo, como ya se mencionó fue el que destinó más energía a la transferencia de electrones y posiblemente ese balance explique la razón por la que obtuvo el menor valor de $\phi\text{NPQ.slow}$. El razonamiento opuesto se puede aplicar en ABH23 que alcanzó un valor medio $\phi\text{NPQ.slow}$ gracias a un bajo ϕPSII , pero alto $\phi\text{NPQ.fast}$ en relación a los demás.

En síntesis, el desempeño de la fase fotoquímica medido en las condiciones planteadas fue similar entre los ejemplares de *E. grandis* y diferente al de GT. Por su parte GC tuvo una respuesta intermedia en cuanto a la emisión regulada y a ϕPSII , mientras que en cuanto a $\phi\text{NPQ.slow}$ se pareció más a GT.

B. ASIMILACIÓN DE CO_2

Los resultados evidenciaron que a nivel de asimilación los clones son diferentes ya que, dependiendo del caso, algunos se encontraron limitados por CO_2 , mientras que en otros la limitante se debió a la intensidad de luz (Cuadro 5). Los valores obtenidos de A en función de CO_2 y PPFD, se aproximaron al intervalo de (A_{max}) citado por Whitehead y Beadle (2004).

Teniendo en cuenta la respuesta al incremento de CO_2 , ABH17 se diferenció de los demás (Figura 6). Sin embargo, dicho comportamiento no se puede explicar a través de los valores de C_i y g_s , ya que en ese sentido todos

tuvieron una tendencia similar (Cuadro 3). En relación a estos parámetros (C_i y g_s), los contrastes realizados para evaluar diferencias significativas mostraron que la condición fue la misma en 400 y en 800 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Al determinar los coeficientes de variación de los modelos, se evidenció que tomaron valores muy elevados, por lo que la dispersión fue alta y por esa razón no se detectaron diferencias. A su vez, los intervalos de confianza para las medias ajustadas en cada nivel de CO_2 fueron amplios (a causa de la dispersión) y se intersectaron. A pesar de esta condición, se puede realizar un análisis desde el punto de vista de la tendencia.

Todos los clones tendieron a un aumento de la concentración interna del gas en la cámara sub estomática y a un descenso de su conductancia. Sin embargo, ABH17 no se comportó de igual forma que los demás e incrementó su tasa de asimilación. Si se considera la eficiencia en el uso de la radiación (EUR), únicamente se modificó en ABH17 que aumentó el valor y posiblemente sea esta la razón que podría explicar el resultado. Este comportamiento sigue en línea con lo visto en partición de energía (Ensayo III), ya que, con la menor cantidad de energía destinada a la transferencia, obtuvo el mismo resultado que los demás. Otra posible explicación al resultado podría encontrarse en la estructura del mesófilo, ya que en aspecto ABH17 se diferencia de los demás al presentar grandes espacios aéreos, lo que facilitaría la difusión del CO_2 en el mesófilo (Figura 9).

Al evaluar la asimilación en función de la intensidad de radiación, se encontraron aún más diferencias que en el caso anterior, ya que en ABH23 y GT respondieron al incremento de luz, mientras que en ABH17 y GC no (Figura 7). Nuevamente se realiza el análisis desde el punto de vista de las tendencias ya que los coeficientes de variación y los intervalos de confianza reflejaron una dispersión alta, especialmente en g_s .

La disminución en el valor de EUR (Cuadro 4) es consecuencia del aumento en la intensidad de luz en un ambiente que tiene una cantidad fija de CO_2 (400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Las diferencias se debieron a que cada clon presentó una estrategia diferente, en cuanto a la evolución en conjunto de C_i y g_s . Los clones ABH17 y GC no respondieron. El primero no alteró el valor de g_s ni el de C_i , mientras que el segundo disminuyó su conductancia y por lo tanto es esperable que también su C_i , ya que se sigue consumiendo CO_2 . Por encontrarse limitados en este intervalo, se sabe que el PSL es menor o igual a 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, lo que no se aleja de los 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ propuesto para *E. nitens* por Whitehead y Beaddie (2004), pero tampoco descarta los propuestos por Larcher (2003) para especies leñosas de follaje persistente (entre 600 y 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para plantas creciendo a la luz y entre 100 y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para

sombra). Por otro lado, aquellos que si respondieron, es decir ABH23 y GT, tendieron a aumentar su valor de conductancia, por lo que pudieron ingresar más CO₂ y así aumentar la tasa de asimilación. En todos los casos la respuesta en An se dio en función del comportamiento de los estomas.

En síntesis, si se unen ambas respuestas se obtienen tres tipos de comportamientos (Cuadro 5). Por un lado, los clones ABH23 y GT se encontraron limitados por luz, no así por CO₂, por lo que para incrementar el valor de A se debería proporcionar más energía lumínica. Por otro ABH17 se comportó de forma opuesta, por lo que se beneficiaría del incremento de CO₂. Finalmente, GC, no respondió en ninguna de las dos condiciones por lo que a 400 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ de CO₂ y 800 μmol m⁻² s⁻¹ de luz, ya se habría alcanzado su tasa de asimilación neta máxima.

Cuadro 5. Resultado de la fase bioquímica medido a través de A en función de PPFD y CO₂.

Clon	Limitado por CO ₂	Limitado por intensidad de luz
ABH17	SI	NO
ABH23	NO	SI
GC	NO	NO
GT	NO	SI

Si o No indican si la respuesta en A se encontró limitada por CO₂ o por PPFD.

C. ANATOMÍA DE HOJA

Todas las hojas tuvieron igual valor de densidad estomática en el envés y únicamente los híbridos presentaron estomas en el haz (Figuras 9 y 10). Dado que GC y GT tienen mayor cantidad de poros, la posibilidad de ingresar CO₂ es mayor que la de ABH17 y ABH23. Los valores de densidad obtenidos para la cara abaxial se alejan de los 566 estomas por mm² de referencia de *E. grandis* propuesto por Tuffi et al. (2008) y tampoco hubo estomas en ambas caras. Posiblemente el ambiente de baja irradiancia pudo haber afectado la densidad y la presencia de estomas en ambas caras.

Los cortes histológicos permitieron visualizar diferencias a nivel de mesófilo. Si se considera el aspecto general (Figura 9), ABH23, GC y GT parecieran ser similares en cuanto a forma, y diferentes a ABH17. A su vez se encontraron diferencias en la proporción de cada uno de los tejidos.

Dado que el parénquima en empalizada facilita el ingreso de la luz hacia las capas más internas del mesófilo, se espera que cuanto mayor sea su

desarrollo, mayor cantidad de células podrán captar luz. El clon ABH17, fue el único que presentó una única fila con este tipo de células y posiblemente esto pueda explicar su valor bajo de ϕ_{PSII} y el alto de $\phi_{NPQ.slow}$, ya que por sus características sería menor el ingreso de luz a capas más internas del mesófilo. Las hojas de los híbridos presentaron un parénquima en empalizada más ordenado y compacto que ABH23, por lo que podrían distribuir mejor la luz en los tejidos.

El parénquima esponjoso, se caracteriza por presentar grandes espacios aéreos por los que difunde el CO_2 . Cuanta mayor sea su cantidad y su tamaño, menores serán las resistencias a la difusión. ABH17 fue el único que aumentó su A al aumentar la concentración de CO_2 . El corte transversal de su hoja contuvo una gran proporción de parénquima esponjoso que, si bien es inferior al de los híbridos en cantidad, contiene más espacios que facilitan la difusión. La falta de respuesta GC y GT puede verse influenciada por la poca ocurrencia de espacios aéreos.

D. PROPUESTAS

A partir de los resultados, se plantean una serie de recomendaciones que permitirían caracterizar aún más la actividad fotosintética. Por un lado, se requiere de curvas A vs PPF para conocer el punto de saturación lumínica de cada genotipo. De esta forma, no solo se conocerían los valores de A_{max} sino que también se dispondría de otra herramienta para definir el valor de actínica necesario para la medición de fluorescencia. Al mismo tiempo se podría analizar mejor la evolución del valor de ETR en función de la proximidad al valor de intensidad de saturación. Por otro lado, realizar las curvas A en función de CO_2 , permitirá obtener el valor de la tasa de carboxilación de la rubisco (V_{max}) y de esta forma se profundizará aún más en el comportamiento bioquímico.

Los resultados de la fase fotoquímica y los de asimilación podrían integrarse, si se utilizara el mismo flujo de fotones en las mediciones de fluorescencia y fotosíntesis. De esta forma se podría relacionar en forma directa la cantidad de energía destinada a ETR con A en una misma condición lumínica.

Para ajustar aún más algunos parámetros de partición de energía, podrían incluirse variables como la absorbancia y el contenido de clorofila y xantofilas. La absorbancia permitiría ajustar ETR a la condición particular de cada clon, mientras que la determinación de los pigmentos ayudaría a comprender las diferencias en la estructura del aparato fotosintético.

Si bien a través de la valoración del parénquima esponjoso se puede visualizar el grado de resistencia a la difusión del CO_2 , es importante conocer el valor de la conductancia del mesófilo (gm). Harley (1991) propone calcularla mediante una fórmula que incluye al valor de PSII y ETR o J_{max} , por lo que nuevamente se justificaría la realización de las curvas de asimilación neta y el ajuste en el valor de ETR.

VI. CONCLUSIONES

1. Los clones de *Eucalyptus* evaluados presentan diferencias en su actividad fotosintética, y esas diferencias se encuentran a nivel fotoquímico, bioquímico y anatómico.
2. Todos los clones presentaron rendimientos cuánticos potenciales del PSII similares (ϕ_{Po} y $\phi_{PSII.pot}$) al igual que similar cantidad de energía disipada a causa de la estructura (ϕ_{NO}).
3. La intensidad de luz actínica que permitió discriminar entre clones fue la más próxima a la irradiancia (PAR) bajo la cual crecieron las plantas.
4. Los parámetros de partición de la energía con mayor poder discriminante fueron: ϕ_{PSII} , ϕ_{NPQ} , $\phi_{NPQ.fast}$ y $\phi_{NPQ.slow}$.
5. Las diferentes proporciones de tejidos del mesófilo y su forma fueron consistentes con los resultados fotoquímicos y de asimilación.

VII. RESUMEN

En Uruguay se evalúan clones de *E. grandis* e híbridos con eucaliptos colorados de interés comercial. El objetivo del trabajo fue analizar el desempeño fotoquímico, la fijación de CO₂ y la anatomía foliar en dos clones comerciales de *Eucalyptus grandis* (ABH17 y ABH23) y dos híbridos con eucaliptos colorados, *E. grandis x camaldulensis* (GC) y *E. grandis x tereticoris* (GT). Se trabajó con plantas de un año creciendo en invernáculo en condiciones de baja irradiancia (PAR < a 100 μmol m⁻² s⁻¹). Se estudió la partición de energía con tres intensidades de luz actínica (255, 778 y 2800 μmol m⁻² s⁻¹) y se ajustó un protocolo de medición. La partición se calculó con los indicadores ΦPSII, ΦNPQ, ΦNO, ΦNPQ.fast y ΦNPQ.slow mediante análisis de quenching y relajación a 255 μmol m⁻² s⁻¹. También se midió la tasa de asimilación de CO₂ en dos concentraciones de CO₂ (400 y 800 μmol m⁻² s⁻²) y dos niveles de irradiancia (800 y 1600 μmol m⁻² s⁻²). Además, se estudió la anatomía del mesófilo y atributos estomáticos (densidad, distribución y tipo de estomas) en los cuatro clones. Los parámetros de partición de la energía más informativos fueron: φPSII φNPQ, φNPQ.fast y φNPQ.slow. Los clones presentaron mecanismos que permitieron administrar el exceso de energía y disminuir la fotoinhibición. La luz actínica que permitió identificar diferencias entre clones fue similar a la PAR bajo la cual crecieron las plantas (255 μmol m⁻² s⁻¹). Todos los clones mostraron la misma disipación basal (0,27 ≤ ΦNO ≤ 0,31), aunque existieron diferencias en la distribución de la energía. Los ejemplares de *E. grandis* (ABH17 y ABH23) destinaron la menor cantidad de energía a la transferencia de electrones (ΦPSII = 0,20) y presentaron igual valor de ΦNPQ.slow. En oposición el clon GT destinó la mayor cantidad de energía a la transferencia de electrones (ΦPSII) y obtuvo el menor valor de ΦNPQ.slow en la comparación. La respuesta de GC no se diferenció de la de los restantes clones. En cuanto a la asimilación de CO₂, se identificaron tres comportamientos. Los clones ABH23 y GT se encontraron limitados por la irradiancia y no por CO₂, mientras que ABH17 respondió en forma opuesta e incrementó el valor de A al duplicar el CO₂. Finalmente, GC no se encontró limitado por ninguno de los dos factores. Los híbridos presentaron parénquima en empalizada más compacto y un parénquima esponjoso con pocos espacios aéreos. Sin embargo, ABH17 mostró una mayor proporción de espacios aéreos en el mesófilo esponjoso que favoreció la difusión del CO₂.

Palabras clave: *Eucalyptus*; Híbridos; Fotosíntesis; Fluorescencia; Anatomía foliar.

VIII. SUMMARY

In Uruguay *Eucalyptus grandis* clones and red-gum clonal hybrids of commercial interest are studied. The aim of this job was to analyse the photochemical performance, the CO₂ fixation and the foliar anatomy in two commercial clones of *E. grandis* (ABH17 and ABH23) and two red-gum clonal hybrids. The experiment was done with one year old plants growing in a greenhouse in low radiation conditions (PAR < a 100 μmol m⁻² s⁻¹). The energy partitioning was studied with three intensities of actinic light and a measurement protocol was adjusted. The energy partitioning was calculated with the parameters ΦPSII, ΦNPQ, ΦNO, ΦNPQ.fast y ΦNPQ.slow by quenching and relaxation analyses at 255 μmol m⁻² s⁻¹. It also was measured the CO₂ fixation rate with two concentrations of CO₂ (400 and 800 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) and two levels of irradiance (800 and 1600 μmol m⁻² s⁻¹). The mesophyll anatomy and the stomatal attributes (density, distribution and types of stomata) in the four clones were studied as well. The most informative energy partitioning parameters were: φPSII φNPQ, φNPQ.fast y φNPQ.slow. The clones showed mechanism that allow the administration of the excess of energy and decrease the fotoinhibition. The actinic light treatment that let identify the differences between clones was similar to the PAR under which plants grow (255 μmol m⁻² s⁻¹). The clones showed the same basal heat dissipation (0,27 ≤ ΦNO ≤ 0,31), even thought there were differences in energy distribution. The *Eucalyptus grandis* (ABH17 and ABH23) destined the least energy to the electron transference (ΦPSII = 0,20) and showed the same value of ΦNPQ.slow. In contrast GT clone destined most energy to the electron transference (ΦPSII) and got the lower value of ΦNPQ.slow in the comparison. The response of GC was not different from the other clones. In connection with CO₂ assimilation three behaviours were identified. Clones ABH23 and GT were limited by irradiance and not by CO₂, while the ABH17 responded in the opposite way and increase A value when double CO₂. Finally, the GC was not limited by none of the two factors. The hybrids and ABH23 showed a compact palisade parenchyma and a spongy one with few air spaces. But nevertheless, ABH17 showed a higher proportion of airspaces in the spongy mesophyll that could favoured the diffusion of CO₂.

Key words: *Eucalyptus*, Hybrids, Photosynthesis, Chlorofill fluorescence, Foliar anatomy.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Aro E. M.; Virgin, I.; Anderson, B. 1994. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1143(2): 113-134.
2. Baker, N. R. 2008. Chlorophyll Fluorescence: a probe of Photosynthesis in vivo. *Plant Biology*. 59: 89-113.
3. Berenguer, H. D. P.; Alves, A.; Amaral, J.; Leal, L.; Monteiro, P.; De Jesus, C.; Pinto, G. 2018. Differential physiological performance of two Eucalyptus species and one hybrid under different imposed water availability scenarios. *Trees*. 32(2): 415-427.
4. Booth, T. H. 2013. Eucalypt plantations and climate change. *Forest Ecology and Management*. 301: 28-34.
5. Brussa, A. 1994. Eucalyptus: especies de cultivo más frecuentes en Uruguay y regiones de clima templado. Montevideo, Hemisferio Sur. 328 p.
6. Buchanan, B. B.; Grissem, W.; Jones, R. L. 2015. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 3rd. ed. Oxford, UK, John Wiley. 1264 p.
7. Cailly, A. L.; Rizza, F.; Genty, B.; Harbinson, J. 1996. Fate of excitation at PS II in leaves. The non-photochemical side. *Plant Physiology and Biochemistry*. 86(special issue): s.p.
8. D'ambrogio, A. 1986. *Manual de técnicas en histología vegetal*. Buenos Aires, Hemisferio Sur. 84 p.
9. Dellacasa, P.; Figarola, G. 2016. Estudio del estado hídrico y eficiencia en el uso del agua en clones de Eucalyptus grandis e híbridos interespecíficos. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 52 p.
10. Demming-Adams, B.; Adams, W. W. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 43: 599-626.
11. Esau, K. 1982. *Anatomía de las plantas con semilla*. Buenos Aires, Hemisferio Sur. 512 p.

12. Farquhar, G. D.; Sharkey, T. D. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*. 33: 317-345.
13. Genty, B.; Briantais, J. M.; Baker, N. R. 1989. The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*. 990(1): 87-92.
14. Harley, P. C.; Loreto, F.; Di Marco, G.; Sharkey, T. D. 1991. Theoretical considerations when estimating the mesophyll conductance to CO₂ flux by analysis of the response of photosynthesis to CO₂. *Plant Physiology* 98(4): 1429 - 1436.
15. Hendrickson, L.; Furbank, R. T.; Chow, W. S. 2004. A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research*. 82(1): 73-81.
16. Kalaji, H. M.; Schansker, G.; Ladle, J.; Goltsev, V.; Bosa, K.; Allakhverdiev, S. I.; Brestic, M.; Bussotti, F.; Calatayud, A.; Dąbrowski, P.; Elsheery, N. I.; Ferroni, L.; Guidi, L.; Hogewoning, S. W.; Jajoo, A.; Misra, A. N.; Nebauer, S. G.; Pancaldi, S.; Penella, C.; Poli, D.; Pollastrini, M.; Romanowska-Duda, Z. B.; Rutkowska, B.; Serôdio, J.; Suresh, K.; Szulc, W.; Tambussi, E.; Yanniccar, M.; Zivcak, M. 2014. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynthesis Research*. 122: 121-158.
17. _____; _____; Brestic, M.; Bussotti, F.; Calatayud, A.; Ferroni, L.; Goltsev, V.; Guidi, L.; Jajoo, A.; Li, P.; Losciale, P.; Mishra, V. K.; Misra, A. N.; Nebauer, S. G.; Pancaldi, S.; Penella, C.; Pollastrini, M.; Suresh, K.; Tambussi, E.; Yannicari, M.; Zivcak, M.; Cetner, M. D.; Samborska, I. A.; Stirbet, A.; Olsovska, K.; Kunderlikova, K.; Shelonzek, H.; Rusinowski, S.; Baba, W. 2017. Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynthesis Research*. 132: 13-66.
18. Kasajima, I.; Takahara, K.; Kawai-Yamada, M.; Uchimiya, H. 2009. Estimation of the relative sizes of rate constants for chlorophyll de-excitation processes through comparison of inverse fluorescence intensities. *Plant Cell Physiology*. 50(9): 1600-1616.
19. Kitajima, M.; Butler, W. L. 1975. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibono

- thymoquinone. *Biochimica et Biophysica Acta*. 376(1): 105-115.
20. Krall, J. P.; Edwards, G. E. 1992. Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves. *Physiologia Plantarum*. 86(1): 180-187.
 21. Kramer, D. M.; Johnson, G.; Kiirats, O.; Edwards, G. E. 2004. New fluorescence parameters for the determination of QA redox and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research*. 79(2): 209-2018.
 22. Krause, G. H.; Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42: 313-349.
 23. Larcher, W. 2003. *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. 4th. ed. Berlin, Springer. 513 p.
 24. Lazár, D. 2015. Parameters of photosynthetic energy partitioning. *Journal of Plant Physiology*. 175: 131-147.
 25. Long, S. P.; Humphries, S.; Falkowski, P.G. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 45: 633-662.
 26. Mc Cree, K. J. 1971. The action spectrum, absorptance and quantum yield oh photosynthesis in crop plants. *Agricultural Meteorology*. 9: 191-216.
 27. Martín, D. 2017. Producción vegetal: forestación. *Anuario estadístico agropecuario DIEA 2017*: 117-121.
 28. Melis, A. 1999. Photosystem II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends Plant Science*. 4(4): 130–35.
 29. Ort, D. R. 2001. When there is too much light. *Plant Physiology*. 125: 29-32.
 30. Oxborough, K.; Baker, N. R. 1997. Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosintetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of qP and Fv'/Fm'measuring Fo'. *Photosynthesis Research*. 54: 135-142.

31. Pallardy, S. G. 2008. *Physiology of Woody plants*. 14th. ed. Amsterdam, Elsevier. 454 p.
32. Quero, G.; Bonnacarre, V.; Fernández, S.; Silva, P.; Simondi, S.; Borsani, O. 2018. Light-use efficiency and energy partitioning in rice is cultivar dependent. (en línea). *Photosynthesis Research*. nov. 2018. Consultado 30 nov. 2018. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s11120-018-0605-x>
33. Sánchez-Díaz, M.; Aguirreolea, J. 2013. Absorción de agua por la raíz y transporte por el xilema. Balance hídrico de la planta. In: Azcón-Bieto, J.; Talón, M. eds. *Fundamentos de fisiología vegetal*. 2^a. ed. Madrid, McGraw-Hill. pp. 57-77.
34. Sefton, C. A.; Montagu, K.; Atwell, J. B.; Conroy, J. 2002. 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.
35. Taiz, L.; Zeiger, E.; Moller, I.; Murphy, A. 2010. *Plant Physiology and Development*. 6th. ed. Sunderland, Sinauer Associates. 761 p.
36. Tambussi, E.; Graciano, C. 2010. La fluorescencia modulada de la clorofila: método del pulso saturante. In: Fernández, M. E.; Gyenge J. E. eds. *Técnicas en medición en ecofisiología vegetal: conceptos y procedimientos*. Buenos Aires, INTA. pp. 119-128.
37. Tuffi, L. D.; Thadeo, M.; Iarema, L.; Strozi, R. M.; Ferreira F. A. 2008. Foliar anatomy and histochemistry in seven species of *Eucalyptus*. *Árvore*. 32(4): 769-779.
38. Whitehead, D.; Beadle, C. L. 2004. Physiological regulation of productivity and water use in *Eucalyptus*: a review. *Forest Ecology and Management*. 193: 113-140.
39. Wingenfeld, M. J.; Roux, J.; Slippers, B.; Hurley, B.; Garnas, J.; Myburgh, A. A.; Winnefeld, B. D. 2013. Established and new technologies reduce increasing pest and pathogen threats to *Eucalypt* plantations. *Forest Ecology and Management*. 301: 35-42
40. Yamori, W.; Hikosaka, K.; Way, D. A. 2013. Temperature response of photosynthesis in C₃, C₄ and CAM plants: temperature

acclimation and temperature adaptation. *Photosynthesis Research*. 119(1-2): 101-117.