

# NITRÓGENO FOLIAR COMO ESTIMADOR DE CLOROFILA EN UNA POBLACIÓN DE *LAURUS NOBILIS* DEL PARQUE NACIONAL DE LAS ISLAS ATLÁNTICAS, GALICIA (NO ESPAÑA)

Margarita Alonso Santos, M<sup>a</sup> José Rozados Lorenzo, M<sup>a</sup> Francisca Ignacio Quinteiro, Vicente Rozas Ortiz, Sonia Lamas Pose, David Chapela Rodríguez y M<sup>a</sup> Teresa Fontúrbel Lliteras

Centro de Investigaciones Ambientales. CINAM-Lourizán. Apdo. 127. 36080-PONTEVEDRA (España).  
Correo electrónico: malonso.cifal@siam-cma.org

## Resumen

Es conocida la estrecha relación entre la capacidad fotosintética y el contenido de nitrógeno foliar en especies forestales. El nitrógeno, constituyente básico de la clorofila y de las enzimas del ciclo del carbono, juega un papel determinante en la fotosíntesis. Como parte de un proyecto llevado a cabo en el Parque Nacional de las Islas Atlánticas, se estudia la relación entre el nitrógeno foliar y el contenido de clorofila a y b en hojas de laurel (*Laurus nobilis* L.). Para ello se han seleccionado 48 árboles, con una edad media de 52 años, en un bosque natural de esta especie en la Isla de Cortegada, situada en la ría de Arosa, Pontevedra. Se han realizado muestreos estacionales de hojas del último y penúltimo crecimiento, desde marzo de 2005 hasta enero de 2007, en las que se ha determinado la concentración ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de nitrógeno y de clorofila a y b. Se aplicaron técnicas de regresión lineal para relacionar el contenido de nitrógeno con el contenido de clorofila a ó b. Se discute la posible utilización del nitrógeno foliar como estimador del contenido de clorofila en hojas de laurel y su relación con la capacidad fotosintética.

Palabras clave: *Laurus nobilis*, Nitrógeno foliar, Clorofila, Rias Bajas

## INTRODUCCION

El nitrógeno es uno de los elementos más limitante para el crecimiento de las plantas en la mayoría de los ecosistemas (AERT & CHAPIN, 2000), en parte debido a que más del 50% del nitrógeno es utilizado en el aparato fotosintético (EVANS & SEEMAN, 1989; HIKOSAKA & TERESHIMA, 1996). Para cada especie, se ha observado una fuerte correlación positiva entre la capacidad fotosintética y el contenido de nitrógeno foliar. La pendiente de la recta de regresión entre estos dos parámetros es diferente en función de la especie estudiada (FIELD & MOONEY, 1986; EVANS, 1989)

y está ligada a la eficiencia en el uso del nitrógeno (PNUE = capacidad fotosintética por unidad de nitrógeno foliar), que ha sido señalado como un factor inherente a cada especie (PONS et al., 1994; HIKOSAKA et al., 1998). La variación entre especies de esta pendiente viene determinada por un conjunto de factores como la distribución de nitrógeno en el proceso fotosintético, la actividad específica de enzimas fotosintéticas, la conductancia y la difusión del  $\text{CO}_2$  a través de las membranas (LLOYD et al., 1992; HIKOSAKA et al., 1998; POORTER & EVANS, 1998; WESTBEEK et al., 1999). En especies forestales, REICH & WALTERS (1994) analizaron esta relación de la capacidad

fotosintética con el nitrógeno foliar en especies de la Amazonía; otros estudiaron las diferencias entre especies arbóreas caducifolias y perennifolias (RIPULLONE et al., 2003; REICH et al., 1995; TAKASHIMA et al. 2004); mientras que MEDHURST et al., (2005) analizaron la influencia debida al clareo en *Eucalyptus nitens*. EVANS (1989), para investigar la relación fotosíntesis-nitrógeno foliar, estableció que el nitrógeno implicado en la fotosíntesis se dividía en dos partes, una en forma de proteínas solubles y otra en los complejos proteína-pigmentos contenidos en los tilacoides de los cloroplastos. Esta división representa funcionalmente la fase oscura y luminosa de la fotosíntesis respectivamente. En los tilacoides, solamente se invierten 4 moles de nitrógeno por mol de clorofila, mientras que en el complejo pigmentos-proteínas es de 40 moles por mol de clorofila. Debido a esto, se han encontrado estrechas correlaciones entre la clorofila y el contenido de nitrógeno foliar. Esto último ha permitido que en algunos estudios se estime el contenido de nitrógeno foliar de diversas especies a partir de mediciones de clorofila hechas en campo (CHANG & ROBINSON, 2003). En la Isla de Cortegada existe una formación boscosa de *Laurus nobilis*, rica en biotipos lianoides, de características únicas en el continente europeo (COSTA et al., 2005). Es una masa arbolada prácticamente monoespecífica, bastante densa y que ocupa una superficie continua de más de 5 ha. Esta formación se ha desarrollado a lo largo del s. XX, sin manejo ni alteraciones de origen antrópico, a partir de individuos aislados que habían sido mantenidos por el hombre en las lindes de parcelas de cultivo (LAMAS Y ROZAS, 2007). Los objetivos de este trabajo han sido cuantificar el grado de correlación existente entre el contenido en clorofila y el nitrógeno foliar en hojas de este bosque de *Laurus nobilis* L. y establecer una ecuación que los relacione para esta especie, analizando la influencia de la fecha de medición y las condiciones de luz.

## MATERIAL Y METODOS

### Área de estudio

El estudio se realizó en una población de laurel (*Laurus nobilis* L.) en la Isla de Cortegada, en el interior de la ría de Arosa, pro-

vincia de Pontevedra. La temperatura media es de 14,9°C, con una amplitud térmica de 11,8°C y una precipitación media de 2000 mm. El estudio se llevó a cabo en tres bloques de 1600 m<sup>2</sup>, que se dispusieron abarcando la máxima variabilidad estructural de la masa. Cada bloque incluye 4 parcelas de 10x10 m, en cada una de las cuales se seleccionaron 4 árboles. Se realizaron muestreos estacionalmente (mar 05, jun 05, oct 05, ene 06, abr 06, jun 06, oct 06, ene 07), de hojas del último y penúltimo crecimiento, del tercio superior de la copa y orientadas al sur.

### Métodos analíticos

La determinación de nitrógeno total se realizó por el método Kjeldahl (HORNECK & MILLER, 1998) sobre muestra liofilizada. La clorofila se extrajo en fresco con dimetilsulfóxido a 60°C y se determinó espectrofotométricamente a 663 y 646 nm según LICHTENTHALER & WELLBURN (1983).

### Análisis estadístico de los datos

Se realizó un análisis de regresión lineal por grupos (fecha de muestreo), entre el nitrógeno y la clorofila a y b en las hojas del último y penúltimo crecimiento para comprobar la influencia de la fecha de muestreo en la regresión. Debido a la diferencia en las características estructurales de cada bloque (Tabla 1), el análisis se realizó para los individuos de cada uno de ellos (16 árboles por bloque).

## RESULTADOS Y DISCUSION

En el bloque 1, donde el bosque es mas homogéneo, con una densidad de individuos, de fustes y de individuos multifustales mayor que la de los bloques 2 y 3 (Tabla 1), y que representa bien la formación boscosa de *Laurus nobilis* presente en la Isla de Cortegada, el análisis de regresión lineal por grupos indicó una relación lineal significativa entre cada una de las clorofilas (a y b) y el nitrógeno foliar en cada fecha de muestreo en las hojas del penúltimo crecimiento (Tabla 2), que en el caso de la relación entre la clorofila a y el nitrógeno foliar, fue independiente de la fecha de muestreo (Tabla 4).

En las hojas del último crecimiento, la regresión lineal entre clorofila a y b con el nitrógeno

	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3
Densidad de fustes (n°. ha <sup>-1</sup> )	3375	2025	1825
Densidad de individuos (n°. ha <sup>-1</sup> )	2075	1650	1525
% de individuos multifustales	31,3	18,2	16,4
Área basal (m <sup>2</sup> .ha <sup>-1</sup> )	35,6	22,9	42,9
Índice medio de área foliar (LAI)	4,2	4,2	3,8
Diámetro medio (cm)	10,9	11,3	16,3
Altura media (m)	11,5	13,4	14,9

**Tabla 1.** Características estructurales del bosque de *Laurus nobilis* en los tres bloques estudiados de la Isla de Cortegada

Hojas penúltimo crecimiento							
Clorofila a ( Cla = b+ a.Nt)					Clorofila b ( Clb = b+ a.Nt )		
Fecha	n	R <sup>2</sup>	b	a	R <sup>2</sup>	b	a
Mar 05	16	0,779***	-1,613	0,414**	0,557***	-0,167	0,122**
Jun 05	16	0,502**	-1,656	0,366**	0,494**	-0,558	0,105**
Oct 05	16	0,398**	-1,286	0,388**	0,322*	-0,074	0,086*
Ene 06	16	0,729***	-2,02	0,398**	0,689***	-0,049	0,079**
Abr 06	16	0,733***	-0,515	0,307**	0,657***	-0,042	0,073**
Jun 06	16	0,626***	-0,708	0,309**	0,535**	-0,102	0,079**
Oct 06	16	0,530**	-0,350	0,408**	0,458**	-0,719	0,113**
Ene 07	16	0,747***	-2,123	0,411**	0,443**	-0,006	0,074**

**Tabla 2.** Datos de regresión lineal entre clorofila a (Cla (mg.g<sup>-1</sup>)) y clorofila b (Clb (mg.g<sup>-1</sup>)) con nitrógeno foliar (Nt (mg.g<sup>-1</sup>)), en hojas del penúltimo crecimiento de *Laurus nobilis* para el bloque1, en las distintas fechas de muestreo. Tamaño de la muestra (n), coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>), interceptación (b), pendiente (a) y nivel de significación (\* (P<0,05), \*\* (P<0,01), \*\*\* (P<0,001))

Hojas penúltimo crecimiento							
Clorofila a ( Cla = b+ a.Nt)					Clorofila b ( Clb = b+ a.Nt )		
Fecha	n	R <sup>2</sup>	b	a	R <sup>2</sup>	b	a
Mar 05	16	0,499***	-0,460	0,279**	0,411**	-0,082	0,086**
Jun 05	16				0,312*	-0,440	0,076*
Oct 05	16						
Ene 06	16	0,628***	-1,826	0,377**	0,358*	0,242	0,062**
Abr 06	16						
Jun 06	16	0,729***	-2,932	0,386**	0,513*	-0,456	0,086**
Oct 06	16	0,457**	-1,310	0,283**	0,379*	-0,177	0,066**
Ene 07	16	0,824***	-2,187	0,381**	0,572***	-0,171	0,080**

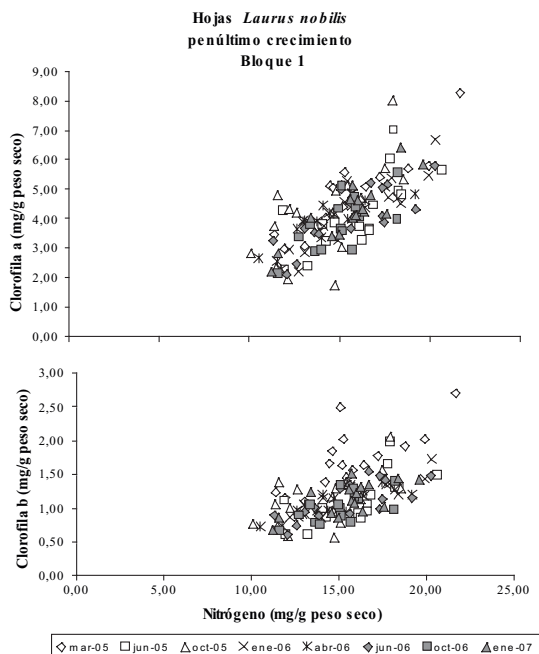
**Tabla 3.** Datos de regresión lineal entre clorofila a (Cla (mg.g<sup>-1</sup>)) y clorofila b (Clb (mg.g<sup>-1</sup>)) con nitrógeno foliar (Nt (mg.g<sup>-1</sup>)), en hojas del último crecimiento de *Laurus nobilis* para el bloque1, en las distintas fechas de muestreo. Tamaño de la muestra (n), coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>), interceptación (b), pendiente (a) y nivel de significación (\* (P<0,05), \*\* (P<0,01), \*\*\* (P<0,001))

Hojas último crecimiento	Clorofila a (Cla =b+a.Nt)				Hojas último crecimiento			
	gl	C.M.	F	P	gl	C.M.	F	P
Regresión entre grupos (fecha)	14	1,009	1,621	0,084 ns	14	5,426	6,446	0,000***
Residuo	112	0,623			112	0,842		
Hojas penúltimo crecimiento	Clorofila b (Clb =b+a.Nt)				Hojas último crecimiento			
	gl	C.M.	F	P	gl	C.M.	F	P
Regresión entre grupos (fecha)	14	0,404	7,244	0,000***	14	0,493	7,245	0,000***
Residuo	112	0,056			112	0,068		

**Tabla 4.** ANOVA de los coeficientes de regresión de los grupos (fecha de muestreo) para las rectas de regresión entre clorofila a y b con el nitrógeno foliar, en los dos tipos de hojas (penúltimo y último crecimiento)

no fue significativa en todas las fechas de muestreo (Tabla 3) y la pendiente de la recta en cada caso, fue inferior a la observada en hojas del penúltimo crecimiento. Varios estudios han mostrado que la distribución de nitrógeno en las hojas está influenciada por el ambiente de luz. En ambientes con alta irradiación, las hojas contienen mas nitrógeno en la Rubisco, y en ambien-

tes de baja irradiación lo contienen en el complejo proteínas-pigmentos (clorofila) (KOIKE et al., 1997; KIMURA et al., 1998); KITAOKA & KOIKE, (2005), en bosques de *Larix kaempferii* (Lamb.) encontraron incrementos de la razón clorofila/nitrógeno en especies de sotobosque durante la estación en la que los árboles permanecen con hoja y la radiación que alcanza el sotobosque es



**Figura 1.** Concentración de clorofila a y clorofila b en hojas del penúltimo crecimiento de *Laurus nobilis* (Bloque 1) en relación a su contenido de nitrógeno, en las distintas fechas de muestreo en la Isla de Cortegada, Parque Nacional das Illas Atlánticas

menor, este hecho podría explicar la independencia de la relación clorofila-nitrógeno en hojas del penúltimo crecimiento con respecto a la fecha de muestreo, debido a que éstas ocupan posiciones de sombra frente a las del último crecimiento que ocupan posiciones más soleadas, y también que las rectas de regresión tengan pendientes más altas. La clorofila b mostró también buenas correlaciones con el nitrógeno pero éstas difirieron entre fechas de muestreo. Las relaciones de la concentración de clorofila a y de clorofila b con la de nitrógeno foliar en hojas del penúltimo crecimiento, para el conjunto de todas las fechas se muestran en la figura 1.

### Agradecimientos

A la Xunta de Galicia, que ha financiado el proyecto PGIDTRFO502004PR, gracias al cual se ha podido realizar este trabajo. Al personal del Parque Nacional de las Islas Atlánticas y en especial a su Guarda Mayor R. Nogueira, por haber trasladado a la Isla material y personas siempre que se le ha solicitado. A la auxiliar de laboratorio M. Martínez, a los auxiliares de campo A. Pazos y E. Diz, y a los estudiantes de Química en prácticas de la U.S.C., así como a los alumnos en prácticas de ciclos superiores de los IES Manuel Antonio y Ricardo Mella de Vigo, y A Basella de Villanueva de Arosa por su colaboración.

### BIBLIOGRAFIA

- AERTS, R. & CHAPIN, F.S. III; 2000. The mineral nutrition of wild plant revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Adv. Ecol. Res.* 30: 1-67.
- CHANG, S.X. & ROBINSON, D.J.; 2003. Nondestructive and rapid estimation of hardwood foliar nitrogen status using the SPAD-502 chlorophyll meter. *Forest Ecol. Manage.* 181: 331-338.
- COSTA, M.; MORLA, C. Y SAINZ, H.; 2005. *Los Bosques Ibéricos. Una interpretación geobotánica*. 4ª ed. Ed. Planeta. Barcelona.
- EVANS, J.R.; 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C<sub>3</sub> plants. *Oecologia* 78: 9-19.
- EVANS, J.R. & SEEMAN, J.R.; 1989. The allocation of protein nitrogen in the photosynthetic apparatus: cost, consequences and control. In: W.R. Briggs (ed.), *Photosynthesis*: 183-205. New York.
- FIELD, C. & MOONEY, H.A.; 1986. The photosynthesis-nitrogen relationship in wild plants. In: T.J. Givnish (ed.), *On the Economy of Plant Form and Function*: 25-55. Cambridge University Press. Cambridge.
- HORNECK, D.A. & MILLER, R.O.; 1998. Determination of total nitrogen in plant tissue. In: P.K. Kalra (ed.), *Handbook of Reference Methods of Plant Analysis*: 75-85. CRC Press. Boca Raton.
- HIKOSAKA, K. & TERASHIMA, I.; 1995. A model of the acclimation of photosynthesis in the leaves of C-3 plants to sun and shade with respect to nitrogen use. *Plant Cell Environ.* 18: 605-618.
- HIKOSAKA, K. & TERASHIMA, I.; 1996. Nitrogen partitioning among photosynthetic components and its consequence in sun and shade plants. *Func. Ecol.* 10: 335-343.
- HIKOSAKA, K.; HANBA, Y.T.; HIROSE, T. & TERASHIMA, I.; 1998. Photosynthetic nitrogen-use efficiency in leaves of woody and herbaceous species. *Func. Ecol.* 12: 896-905.
- KIMURA, K.; ISHIDA, A.; UEMURA, A.; MATSUMOTO, Y. & TERASHIMA, I.; 1998. Effects of current-year and previous-year PPF on shoot gross morphology and leaf properties in *Fagus japonica*. *Tree Physiol.* 18: 459-466.
- KITAOKA, S. & KOIKE, T.; 2004. Invasion of broad-leaf tree species into a larch plantation: seasonal light environment, photosynthesis and nitrogen allocation. *Physiol. Plant.* 121: 604-611.
- KITAOKA, S. & KOIKE, T.; 2005. Seasonal and yearly variations in light use and nitrogen use by seedlings of four deciduous broad-leaved tree species invading larch plantations. *Tree Physiol.* 25: 467-475.
- KOIKE, T.; MIYASHITA, N.; TODA, H.; 1997. Effects of leaf structural characteristics in successions deciduous broad-leaved tree seedlings and their silvicultural meaning. *For. Resour. Environ.* 35: 9-25.

- LAMAS, S. Y ROZAS, V.; 2007. Crecimiento radial de las principales especies arbóreas de la Isla de Cortejada (Parque Nacional de las Islas Atlánticas) en relación con la historia y el clima. *Inv. Agrar.: Sist. Rec. For.* 16: 3-14.
- LARCHER, W.; 2003. *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*. 4<sup>th</sup> Edn. Springer-Verlag, Berlin.
- LICHTENTHALER, H.K. & WELLBURN, A.R.; 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 603: 591-592.
- LLOYD, J.; SYVERTSEN, J.P.; KRIEDEMANN, P.E. & FARQUHAR, G.D.; 1992. Low conductances for CO<sub>2</sub> diffusion from stoma to the sites of carboxylation in leaves of woody species. *Plant Cell Environ.* 15: 873-899.
- MEDHURST, J.L. & BEADLE, C.L.; 2005. Photosynthetic capacity and foliar nitrogen distribution in *Eucalyptus nitens* is altered by high-intensity thinning. *Tree Physiol.* 25: 981-991.
- PONS, T.L.; VAN DER WERF, A.; LAMBERS, H.; 1994. Photosynthetic nitrogen use efficiency of inherently low and fast-growing species: possible explanations for observed differences. In: J. Roy & E. Garnier (eds.), *A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions*: 61-77. SPB Academic publishing, The Hague.
- POORTER, H. & EVANS, J.R.; 1998. Photosynthetic nitrogen-use efficiency of species that differ inherently in specific area. *Oecologia* 116: 26-37.
- REICH, P.B. & WALTERS, M.B.; 1994. Photosynthesis-nitrogen relations in Amazonian tree species. II. Variation in nitrogen vis-à-vis specific leaf area influences mass and area-based expressions. *Oecologia* 97: 73-81.
- REICH, P.B.; KLOEPEL, B.D. & WALTERS, M.B.; 1995. Different photosynthesis-nitrogen relations in deciduous hardwood and evergreen coniferous tree species. *Oecologia* 104: 24-30.
- RIPULLONE, F.; GRASSI, G.; LAUTERI, M. & BORGUETTI, M.; 2003. Photosynthesis-nitrogen relationships: interpretation of different patterns between *Pseudotsuga menziesii* and *Populus euroamericana* in a mini-stand experiment. *Tree Physiol.* 23: 137-144.
- TAKASHIMA, T.; HIKOSACA, K. & HIROSE, T.; 2004. Photosynthesis or persistence: nitrogen allocation in leaves of evergreen and deciduous *Quercus* species. *Plant Cell Environ.* 27: 1047-1054.
- WESTBEEK, H.M.H.; PONS, T.L.; CAMBRIDGE, M.L. & ATKIN, O.K. 1999. Analysis of differences in photosynthetic nitrogen use efficiency of alpine and lowland *Poa* species. *Oecologia* 120: 19-26.