

APLICACIÓN DEL MEDIDOR PORTÁTIL DE CLOROFILA EN PROGRAMAS DE MEJORA DE TRIGO Y CEBADA

Águeda González.

Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural Agrario y Alimentario (IMIDRA)

Apdo. 127, 28800 Alcalá de Henares. E-mail: agueda.gonzalez@madrid.org

Resumen

Para estudiar el efecto de la sequía al final del ciclo del cultivo se ha valorado el contenido en clorofilas de tres hojas en distintos genotipos de trigo y cebada, así como su relación con el rendimiento final del cultivo. Para ello se realizó un ensayo de bloques al azar con tres repeticiones en el campo. Se han obtenido correlaciones significativas ($p < 0.001$) entre la concentración de clorofila de las hojas y los valores obtenidos con el SPAD-502. El contenido en clorofila de la hoja bandera fue el más alto de las hojas analizadas y estaba positivamente correlacionado con el peso de mil granos ($p < 0.01$). Nuestros resultados indican que el medidor de clorofila SPAD-502 puede ser muy útil en la selección de genotipos adaptados a unas condiciones agroclimáticas determinadas.

Palabras clave: Trigo, cebada, contenido en clorofila, rendimiento.

Summary

Use of the portable chlorophyll meter in wheat and barley breeding programmes

The chlorophyll contents of three leaves from plants of different genotypes of wheat and barley were determined to study the effect of drought at the end of the growth cycle, and to determine its influence on final yield. All plants were growing in the field in a randomised block trial with three replications. Significant ($p < 0.001$) relationships were recorded between the chlorophyll concentration of the leaves and the values obtained with the SPAD-502 meter. The chlorophyll content of the flag leaf was the greatest of all the leaves analysed and was positively correlated with the thousand grain weight ($p < 0.01$). The present results indicate that the SPAD-502 chlorophyll meter can be useful in the selection of genotypes adapted to certain agroclimatic conditions.

Key words: Wheat, barley, chlorophyll content, yield

Introducción

El rápido desarrollo de la agricultura convencional durante los últimos 60 años, así como el aumento en la producción de cereales grano, ha sido dependiente de una importante inversión en la mejora de plantas. Durante este periodo de tiempo, la agricultura ecológica se ha desarrollado mucho más lentamente. Sin embargo, la subida del precio de los aportes químicos, como abonos y herbicidas, el aumento del impacto del cambio climático y la necesidad de un sistema de agricultura sostenible están creando una gran oportunidad para tener en cuenta los objetivos específicos de interés en la agricultura ecológica (Wolfe *et al.* 2008).

La mejora para agricultura ecológica necesita estrategias específicas que utilicen diversidad genética para soportar o mejorar el amplio rango de condiciones y prácticas agrarias (Wolfe *et al.* 2008). Para desarrollar

variedades mejor adaptadas al sistema de cultivo ecológico es necesario seleccionar para un ambiente determinado, pero se ha hecho poca investigación en este sentido. Las variedades que se desarrollan en un sistema ecológico es necesario que se adapten bien a las condiciones agroambientales de la zona en que se van a cultivar por lo que la interacción genotipo por ambiente es primordial (Backes y Østergård 2008; Kristensen y Ericson 2008). En este contexto, la diversidad de condiciones agro-ecológicas y climatológicas junto con diferentes prácticas culturales requeridas en un sistema de cultivo ecológico, representan un considerable desafío para los mejoradores (Murphy *et al.* 2005).

Actualmente hay muy pocas variedades adaptadas a condiciones ecológicas. El interés creciente en cultivos ecológicos de cereales ha aumentado la demanda de variedades idóneas para este sistema de cultivo. Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos para la mejora

tradicional proporcionan información muy válida para la mejora en agricultura ecológica, especialmente para la mejora del rendimiento, es buena estrategia tener en cuenta los resultados de la mejora tradicional a la hora de plantear un programa de mejora del rendimiento de cereales en cultivo ecológico (Przystalski *et al.* 2008).

Aunque muchas de las características requeridas en las nuevas variedades son comunes para ambos sistemas de cultivo, hay caracteres que tienen especial relevancia al seleccionar para agricultura ecológica como la adaptación específica de las nuevas variedades y la calidad y estabilidad del rendimiento (Löschenberger *et al.* 2008).

La falta de agua es el principal factor limitante de la productividad de los cultivos en climas de tipo mediterráneo. Para aumentar la productividad de un cultivo es esencial asegurar la estabilidad del rendimiento frente a factores ambientales adversos como la sequía, que hace que la disponibilidad de agua por la planta sea menor y el rendimiento más bajo. El aumento del rendimiento potencial de los cereales ha sido importante en las últimas décadas como se ha demostrado en trigo (Sayre *et al.* 1997), en maíz (Ding *et al.* 2005) y en soja (Morrison *et al.* 1999), sin embargo el aumento del rendimiento en condiciones de sequía ha sido menor. Para reducir la diferencia entre el rendimiento potencial y el rendimiento en ambientes con sequía es necesario introducir en los genotipos caracteres fisiológicos que confieran tolerancia a la sequía y permitan progresar de forma eficaz en la mejora del rendimiento en ambientes en que la disponibilidad de agua por el cultivo es escasa. El conocimiento de los caracteres fisiológicos que limitan el rendimiento en condiciones de estrés ha mejorado en los últimos años (Ricards *et al.* 2002). Esto ha creado nuevas oportunidades para que los mejoradores de plantas puedan utilizar ciertas herramientas en la selección para el rendimiento del grano teniendo en cuenta caracteres fisiológicos que mejoran el rendimiento del grano en distintos ambientes (Reynolds *et al.* 1998, 1999).

El contenido en clorofilas juega un papel importante en las plantas cultivadas ya que está positivamente correlacionado con la fotosíntesis (Gummuluru *et al.* 1989), por tanto, la reducción en el contenido en clorofilas puede ser considerada como una respuesta de las plantas al estrés (Tenga *et al.* 1989). Esta reducción de la clorofila puede perjudicar el proceso fotosintético conduciendo a una reducción en la fijación de carbono, de ahí la importancia de conocer el contenido en clorofilas de las plantas cuando las condiciones medioambientales no son óptimas.

En trigo se han observado diferencias en la tasa de fotosíntesis neta entre cultivares a altas temperaturas y se ha visto que iba asociada con una bajada en la concentración de clorofila de la hoja durante el periodo de llenado del grano (Reynolds *et al.* 2000). En garbanzo se ha observado que el daño producido por el estrés en la fase reproductiva es menor cuando el contenido en clorofilas se mantiene alto al ir aumentando el estrés (Nayyar *et al.* 2005)

En los últimos años se ha obtenido una relación más directa entre el contenido en clorofilas de las hojas y el rendimiento en grano, al comprobar que la tasa de fotosíntesis neta está estrechamente asociada con la pérdida de clorofila durante el periodo de llenado del grano de los cereales. Además se ha observado la existencia de una asociación genética entre el contenido en clorofila y el rendimiento (Reynolds *et al.* 2000, Gutiérrez-Rodríguez *et al.* 2000). Esto explica la importancia creciente que va adquiriendo este carácter en la mejora de los cultivos de cereales.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1- Estudiar la relación entre los valores de clorofila estimados con el SPAD-502 y la cantidad de clorofilas de las hojas de los materiales estudiados. 2- Ver la variación en el contenido en clorofilas de las distintas hojas de una misma planta y 3- comprobar si el contenido en clorofilas de las hojas está relacionado con el rendimiento del cultivo.

Material y Métodos

En la Finca El Encín, de la Comunidad de Madrid, se cultivaron en campo dos cebadas (una variedad comercial, Reinette y una línea de mejora, CB502) y dos variedades de trigo (Arganda, trigo blando y Camacho, trigo duro) durante la campaña 2001-2002. El ensayo constaba de tres bloques y dos tratamientos, riego y estrés hídrico. Los bloques regados se mantuvieron a capacidad de campo y a los sometidos a estrés hídrico se les suprimió el riego cuando las plantas alcanzaron el estado 41 de la escala de Zadocks (Zadoks *et al.* 1974). En cada bloque las parcelas se distribuyeron al azar. El tamaño de cada parcela era de 5 m².

La siembra se realizó la primera semana de Noviembre.

Las estimas del contenido en clorofilas se realizaron en hojas intactas con un medidor portátil SPAD-502. Las medidas se hicieron en hojas bandera del tallo principal de cada repetición y en las hojas inmediatamente inferiores identificadas como hoja 2 y hoja 3. Una vez realizadas las medidas con el SPAD, se llevaron las hojas en que se realizaron las medidas al laboratorio para la extracción de clorofilas.

Para determinar el contenido en clorofila total se homogeneizó el tejido de la hoja en N,N-dimetilformamida (DMF) y se midió la absorbancia a 647,2 nm y 664 nm en un espectrofotómetro Helios α , en cubetas de vidrio, y se calculó la concentración de clorofila total utilizando los coeficientes de absorción específicos para clorofilas a y b según el método de Inskeep y Bloom (1985). Se hicieron tres muestreos desde que las plantas alcanzaron el estado de hoja bandera hasta el final del ciclo del cultivo. En cada muestreo se hicieron tres repeticiones por genotipo, utilizando dos rectángulos de 2.12 cm² de la parte central de las hojas del tallo principal en cada repetición.

Se consideraron todos los datos de forma conjunta en la recta de calibración, control y stress hídrico, al no observarse diferencias entre las rectas de regresión

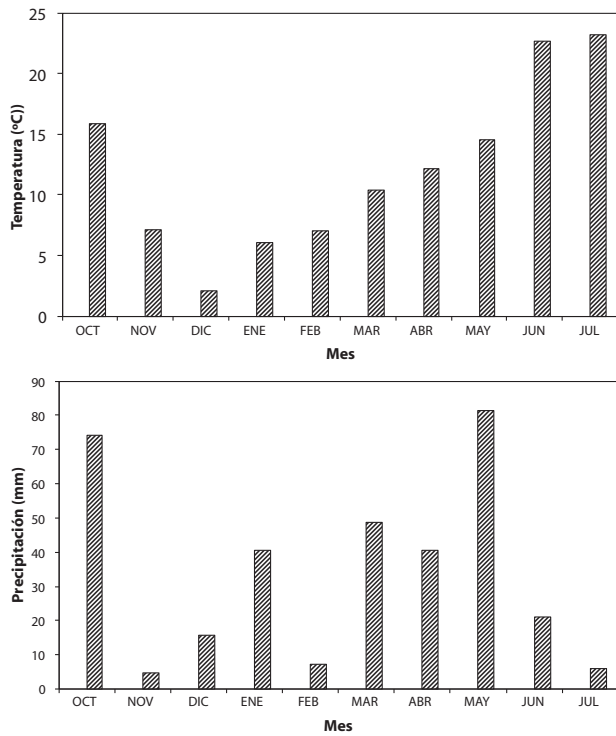


Figura 1. Datos de temperatura y precipitación mensuales registrados en la finca El Encín durante la campaña 2001-2002.

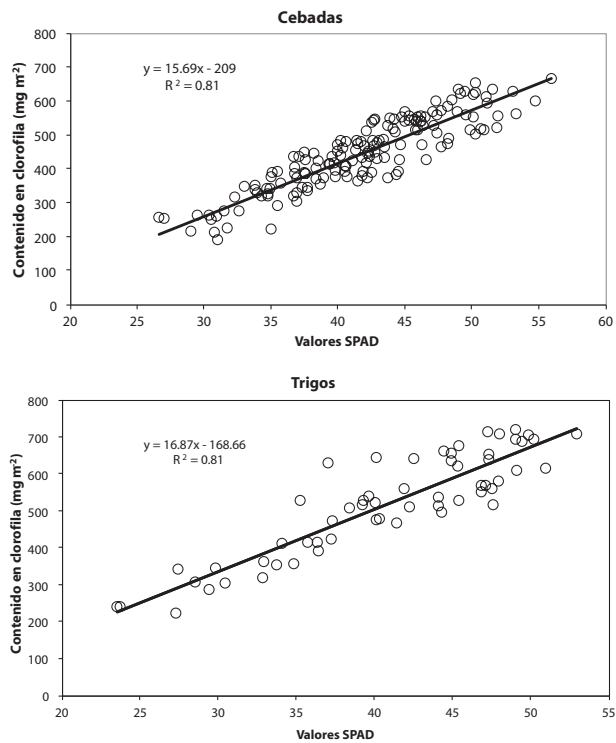


Figura 2. Contenido en clorofila de las hojas en relación a los valores SPAD obtenidos para trigos y cebadas cultivados en el campo la campaña 2001-2002.

considerando los tratamientos por separado (datos no presentados).

La correlación entre el contenido en clorofilas medido en el laboratorio y los valores SPAD correspondientes en cebadas se expresan mediante la ecuación : Clorofila (mg m^{-2}) = 15.68 (valores SPAD) – 209 y en trigo: Clorofila (mg m^{-2}) = 16.87 (valores SPAD) – 168.66.

Los días necesarios para la emergencia y madurez de la espiga se obtuvieron contando los días transcurridos desde la siembra hasta la emergencia y madurez del 50% de las espigas, estados 55 y 92 de la escala de Zadoks. El periodo de llenado del grano se obtuvo por diferencia entre los días empleados en alcanzar la madurez y los días empleados en alcanzar la emergencia de la espiga.

Cuando el cultivo estuvo maduro se cosecharon los 4 m² centrales de cada parcela para obtener el rendimiento del grano.

Los datos meteorológicos durante la campaña se resumen en la Figura 1.

Resultados

La relación entre el contenido en clorofila de las hojas y los valores SPAD se presentan en la Figura 2. Se observa que el coeficiente de correlación entre los valores SPAD y el contenido en clorofilas de las hojas fue muy significativo ($p < 0.001$), tanto para los trigos como para las cebadas. Estos resultados indican que la estima del contenido en clorofilas de las hojas de cereales con el SPAD es de gran utilidad en el proceso de selección de plantas de trigo y cebada y que se pueden utilizar las medidas con el SPAD para cuantificar el contenido en clorofilas de las hojas una vez obtenida la recta de calibrado correspondiente. Este método se utilizó para ver la variación en el contenido en clorofila de las tres últimas hojas de una misma planta de los trigos y cebadas incluidos en el ensayo, así como las diferencias cuando los materiales crecieron con riego o sin riego al final del ciclo del cultivo.

En la Tabla 1 se presentan los datos correspondientes al contenido en clorofilas de tres hojas de distintos genotipos de trigo y cebada en condiciones de riego y de estrés hídrico terminal. Las diferencias entre riego y estrés fueron significativas para las cebadas en las tres hojas, pero en los trigos esas diferencias no fueron significativas. Esto pudo deberse a que llovió durante el periodo de llenado del grano (Figura 1), que tuvo lugar entre la segunda quincena de Abril y primera de Junio, lo que hizo que el efecto del estrés fuera menor en los trigos Arganda y Camacho que en las cebadas Reinette y CB502. Las cebadas fueron más precoces, cuando llovió estaban en un estado más avanzado que los trigos y por tanto se habían tomado las muestras antes que en los trigos, con lo que el efecto del estrés hídrico se apreció más en el contenido en clorofilas de las cebadas.

Tabla 1. Contenido en Clorofila (mg m^{-2}) obtenido de las tres últimas hojas de dos trigos y dos cebadas cultivados en el campo en condiciones de riego y de estrés hídrico terminal.

Genotipo	Hoja Bandera		Hoja 2		Hoja 3		Clorofila total
	Riego	Estrés	Riego	Estrés	Riego	Estrés	
CB502	608	582	586	557	511	465	551 ab
Reinette	613	566	583	533	486	460	540 c
Arganda	579	582	553	538	523	512	548 bc
Camacho	636	624	573	574	517	501	571 a
Valor LSD para $p < 0.05$							
Genotipo (G)	22.12						
Tratamiento (T)	15.16						
Hoja (H)	18.64						
G x T	30.34						
G x H	37.29						
T x H	26.39						
G x T x H	52.61						

Tabla 2. Período de llenado del grano, rendimiento y peso de mil granos de dos cebadas y dos trigos cultivados en el campo en condiciones de riego y de estrés hídrico terminal.

Genotipo	P. llenado del grano (Días)			Peso del grano ($\text{g}/4\text{m}^2$)			Peso de mil granos (g)		
	Riego	Estrés	Media*	Riego	Estrés	Media*	Riego	Estrés	Media*
CB502	55	53	54 a	6957	6447	6702 a	49.43	47.49	48.33 a
Reinette	51	47	49 b	7627	5910	6768 a	45.96	44.06	45.17 b
Arganda	53	49	51 b	4323	3653	3988 b	40.25	39.90	40.33 c
Camacho	47	41	44 c	7600	5047	6323 a	49.61	43.20	46.50 b
Media**	52 a	48 b		6627a	5564a		46 a	43 b	
Valor LSD para $p < 0.05$									
Genotipo (G)	2.50			1571			1.78		
Tratamiento(T)	1.76			1111			1.26		
GxT	NS			NS			2.52		

*Los genotipos cuya media va seguida de la misma letra no son significativamente diferentes para un nivel de probabilidad del 5% según el test de Duncan.

**Los tratamientos cuya media va seguida de la misma letra no son significativamente diferentes para un nivel de probabilidad del 5% según el test de Duncan.

Entre genotipos si hubo diferencias significativas en cuanto a la clorofila total, siendo el trigo Camacho y la cebada CB 502 los que presentaron los valores más altos y el trigo Arganda y la cebada Reinette los más bajos (Tabla 1).

Las diferencias más importantes fueron las obtenidas para las distintas hojas de una misma planta. Esas diferencias fueron significativas para todos los genotipos estudiados. Tanto en riego como en estrés, el contenido en clorofila más alto fue el correspondiente a la HB, seguido de la hoja 2, siendo el contenido en clorofila más bajo el de la hoja 3.

En la Tabla 2 se presentan los datos fenológicos y de rendimiento para todos los materiales estudiados. Considerando los valores medios de riego y estrés se puede ver que CB502 fue la que tuvo el periodo de llenado del grano más largo tanto en riego como en estrés, el rendimiento también fue más alto, junto con Reinette y Camacho que no difieren significativamente entre ellos. Sin embargo el peso de mil granos fue significativamente más alto en la línea de mejora de cebada que en los otros genotipos estudiados.

Los coeficientes de correlación entre el contenido en clorofilas de las hojas y el rendimiento fueron: $r=0.27$, $r=0.12$ y $r=0.08$, para HB, hoja 2 y hoja 3. Estas correlaciones fueron positivas pero no significativas. Los coeficientes de correlación entre el contenido en clorofilas de las hojas y el peso de mil granos fueron: $r=0.50$, $p < 0.01$; $r=0.29$, $P < 0.1$; y $r=0.10$ ns para HB, hoja 2 y hoja 3 respectivamente. Al ver las correlaciones entre el rendimiento y el peso de mil granos con el contenido en clorofilas de las hojas se observa, en primer lugar, que esas correlaciones fueron más altas con el contenido en clorofilas de la hoja bandera que con el de la hoja 2, siendo las correlación más bajas con el contenido en clorofilas de la hoja 3. Por otra parte, los coeficientes de correlación fueron más altos con el peso de mil granos que con el rendimiento.

Discusión

En programas de mejora de cereales es necesario analizar un número elevado de genotipos por lo que para

que un carácter se pueda utilizar como criterio de selección en programas de mejora, es necesario que sea sencillo, fácil de medir y económico. Nuestros datos demuestran que la utilización del SPAD para medir las clorofilas de las hojas cumple esos objetivos ya que indica el contenido en clorofila de las hojas y una vez obtenida la recta de calibrado se pueden interpolar directamente los datos obtenidos con el SPAD para cuantificarla. Además, la medida con el SPAD no es destructiva con lo que no afecta al desarrollo del cultivo. Teniendo en cuenta que la hoja bandera es la que aporta más fotoasimilados al grano y que el contenido en clorofilas de hoja bandera es mayor que el de las hojas dos y tres (Tabla 1), se puede medir sólo en hoja bandera al seleccionar genotipos mejor adaptados a unas condiciones determinadas. La correlación encontrada entre contenido en clorofilas de la hoja bandera y el peso de mil granos fue más alta ($p < 0.01$) que la correlación encontrada con la hoja 2 ($p < 0.1$) y no significativa con la hoja 3. Estos resultados indican que la contribución de la hoja bandera al llenado del grano ha sido mayor que la de las otras dos hojas.

El rendimiento es un carácter muy complejo en el que influyen muchos factores por lo que al seleccionar materiales adaptados a climas de tipo mediterráneo es necesario tener en cuenta caracteres fenológicos, agronómicos, morfológicos y fisiológicos (González *et al.* 1999, González y Ayerbe 2009) que mejoren la adaptación del cultivo a la sequía. Sin embargo las medidas de clorofilas con el SPAD es un método interesante ya que es indicativo de la actividad fotosintética, al estar ésta relacionada con el contenido en clorofilas de las hojas (Gummuluru *et al.* 1989). En general la pérdida de clorofilas es una respuesta frecuente de las plantas a diversos tipos de estrés (Tenga *et al.* 1989, Tenga y Ormrod 1990, Reynolds *et al.* 2000), ligada en la mayor parte de los casos a una reducción del intercambio gaseoso. Nosotros hemos obtenido correlaciones significativas entre el contenido en clorofilas de las hojas y el peso de mil granos. Estos resultados indican que la mayor cantidad de clorofilas durante el periodo de llenado del grano ha contribuido a mejorar la calidad del grano, aumentando su peso unitario y consecuentemente el rendimiento del cultivo. Esto se aprecia más claramente en los resultados obtenidos para CB502 (Tabla 2), que posee el peso de mil granos y el rendimiento más alto de todos los genotipos estudiados en condiciones de estrés hídrico terminal. Para el trigo Arganda ocurre lo contrario, posee el peso de mil granos más bajo y el rendimiento más bajo en esas condiciones.

Referencias

- Backes G, Østergård H. 2008. Molecular markers to exploit genotype-environment interactions of relevance in organic growing systems. *Euphytica* 163:523-531.
- Ding L, Wang KJ, Jiang GM, Liu MZ, Niu SL, Gao LM. 2005. Post-anthesis changes in photosynthetic traits of maize hybrids released in different years. *Field Crops Research* 93:108-115.
- González A, Ayerbe L. 2009. Effect of terminal water stress on leaf epicuticular wax load, residual transpiration and grain yield in barley. *Euphytica* DOI: 10.1007/s10681-009-0027-0
- González A, Martín I, Ayerbe L. 1999. Barley yield in water-stress conditions. The influence of precocity, osmotic adjustment and stomatal conductance. *Field Crops Research* 62:23-34.
- Gummuluru S, Hobbs SLA, Jana S. 1989. Physiological responses of drought tolerant and drought susceptible durum wheat genotypes. *PhotoSynthetica* 23:479-485.
- Gutiérrez-Rodríguez M, Reynolds MP, Larque-Saavedra A. 2000. Photosynthesis of wheat in a warm, irrigated environment. II. Traits associated with genetic gains in yield. *Field Crops Research* 66:51-62.
- Inskeep WP, Bloom PR. 1985. Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in N, N-Dimethylformamide and 80% Acetona. *Plant Physiology* 77:483-485.
- Kristensen K, Ericson L. 2008. Importance of growth characteristics for yield of barley in different growing systems: will growth characteristics describe yield differently in different growing systems? *Euphytica* 163:367-380.
- Löschenberger F, Fleck A, Gausgruber H, Hetzendorfer H, Hof G, Lafferty J, Marn M, Neumayer A, Pfaffinger G, Birschtitzky J. 2008. Breeding for organic agriculture: the example of winter wheat in Austria. *Euphytica* 163:469-480.
- Morrison MJ, Voldeng HD, Cober ER. 1999. Physiological changes from 58 years of genetic improvement of short-season soybean cultivars in Canada. *Agronomy Journal* 91:685-689.
- Murphy K, Lammer D, Lyon S, Carter B, Jones SS. 2005. Breeding for organic and low-input farming systems: An evolutionary-participatory breeding method for inbred cereal grains. *Renewable Agriculture and Food Systems* 20:48-55.
- Nayyard H, Walia DP. 2004. Genotypic variation in wheat in response to water stress and abscisic acid-induced accumulation of osmolytes in developing grains. *Journal of Agronomy & Crop Science* 190:39-45.
- Przystalski M, Osman A, Thiemt EM, Rolland B, Ericson L, Østergård H, Levy L, Wolfe M, Büchse A, Piepho HP, Krajewski P. 2008. Comparing the performance of cereal varieties in organic and non-organic cropping systems in different European countries. *Euphytica* 163:417-433.
- Reynolds MP, Delgado MI, Gutiérrez-Rodríguez M, Larque-Saavedra A. 2000. Photosynthesis of

- wheat in a warm, irrigated environment. I. Genetic diversity and crop productivity. *Field Crops Research* 66: 37-50.
- Reynolds MP, Rajaram S, Sayre KD. 1999. Physiological and genetic changes of irrigated wheat in the post-green revolution period and approaches for meeting projected global demand. *Crop Science* 39: 1611-1621.
- Reynolds MP, Singh RP, Ibrahim A, Ageeb OAA, Larqué-Saavedra A, Quick JS. 1998. Evaluating physiological traits to complement empirical selection for wheat in warm environments. *Euphytica* 100: 85-94.
- Sayre KD, Rajaram S, Fischer RA. 1997. Yield potential progress in short bread wheats in northwest Mexico. *Crop Science* 37: 36-42.
- Tenga AZ, Ormrod DP. 1990. Diminished greenness of tomato leaves exposed to ozone and post-exposure recovery of greenness. *Environmental Pollution* 64: 29-41.
- Tenga AZ, Marie BA, Ormrod PD. 1989. Leaf greenness meter to assess ozone injury to tomato leaves. *HortScience* 24: 514.
- Wolfe MS, Baresel JP, Desclaux D, Goldringer I, Hoad S, Kovacs G, Löschenberger F, Miedaner T, Østergård H, Lammerts van Bueren ET. 2008. Developments in breeding cereals for organic agriculture. *Euphytica* 163: 323-346.
- Zadoks JC, Chang TT, Kozank CF. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14: 415-421.