

Solicitud de concesión de ayudas a la

Convocatoria de ayuda a proyectos de investigación liderados por jóvenes investigadores

1. Datos de identificación.

Título de la propuesta	Análisis de las principales fuentes de agua utilizadas por plantas de suelos yesosos
Nombre y apellidos del solicitante	Sara Palacio Blasco
Datos de contacto: e-mail y teléfono	s.palacio@ipe.csic.es 976 369393 (ext. 881144) 680 740198
Departamento/Instituto/Grupo de Investigación/Otros	Departamento de conservación de la biodiversidad y restauración de ecosistemas/ Instituto Pirenaico de Ecología (CSIC)
Dirección, código postal, provincia	Avda. Nuestra Señora de la Victoria s/n, Apdo. 64. 22700 – Jaca (HUESCA)

2. Memoria Técnica. Actividades y resultados de investigación

2.1. Introducción (Planteamiento, objetivos y justificación)

Debido a la gran solubilidad del yeso, los aljezares se forman en ambientes áridos [1], donde la sequía estival puede ser extrema. Por ello, el agua parece jugar un papel fundamental como determinante de la distribución y supervivencia de las plantas de estos sistemas [2]. La composición química de las plantas que forman las distintas bandas de vegetación características de las colinas de yesos [3] parece apoyar una compartimentación de los recursos hídricos del ecosistema (agua superficial y freática) entre plantas con distinta posición topográfica y distinta profundidad de raíz [2]. No obstante, se desconocen los patrones de uso del agua de estas comunidades.

A pesar de la extrema aridez de los yesos, hay especies (como *Helianthemum squamatum*) que logran florecer en plena sequía. Se desconoce de dónde obtienen el agua estas plantas, ya que sus raíces son someras. Un recurso hídrico prácticamente inexplorado es el agua de cristalización del yeso. En la estructura cristalina del yeso mineral, cada molécula de sulfato cuenta con dos moléculas de agua que, a temperaturas cercanas a 40°C (18°C con sales disueltas) [4], puede liberarse, pudiendo estar disponible para las plantas y otros organismos del ecosistema [1]. Pese a la importancia que podría tener esta nueva fuente de agua para la vida, nunca antes se ha estudiado su contribución al balance hídrico de los organismos.

Los objetivos generales de este proyecto fueron los siguientes:

1.- *Evaluar si hay diferencias en las fuentes de agua usadas por plantas con distinta posición topográfica a lo largo de las colinas de yesos, distinta especificidad al suelo de yeso y distinta profundidad de raíz.*

La hipótesis de trabajo se corresponde con el modelo propuesto por Guerrero-Campo et al (1999), según el cual las plantas de las zonas altas y laderas de las colinas usarían agua superficial únicamente (salvo aquellas con una raíz muy profunda); las plantas de zonas bajas y llanas de las colinas podrían acceder tanto al agua superficial como al agua freática (con la consiguiente carga de sales); mientras que las plantas de las depresiones salinas tendrían acceso principalmente a agua y nutrientes procedentes de infiltración (freáticos) muy salinizados.

2.- *Explorar la capacidad de las especies de los yesos de utilizar el agua estructural de las moléculas de yeso para mantener su actividad fenológica durante las épocas de mayor estrés hídrico.*

La hipótesis de trabajo es que ciertas especies, como *Helianthemum squamatum*, podrían aprovechar el agua estructural del yeso en las épocas de mayor sequía. Cabe esperar que este uso desaparezca en las épocas de buena disponibilidad hídrica.

2.2. Descripción de la ejecución- Metodología

Para abordar los objetivos del proyecto, se recolectaron en primavera (mayo) y verano (agosto) de 2012, fragmentos de madera de 5 individuos distintos de 10 especies leñosas con distinta profundidad de raíz y distinta posición en el gradiente topográfico de las colinas de yeso (Tabla 1) cercanas de Alfajarín (41° 31' 59"N, 0° 41' 9"W), Zaragoza. La comparación entre ambos muestreos permite ilustrar los cambios en el uso del agua por parte de las plantas en función del estrés hídrico. En cada muestreo se recolectaron también 5 muestras de suelo (a 0-10 y 10-20 cm de profundidad) en posiciones intermedias entre las plantas recolectadas en las distintas posiciones de la colina. En el caso de *H. squamatum*, se recolectaron además muestras de suelo a 0-10 y 10-20 cm de profundidad en contacto directo con las raíces de las 5 plantas excavadas. Las muestras se dispusieron inmediatamente en viales cerrados herméticamente y se congelaron con hielo seco en el campo, manteniéndose congeladas hasta su traslado al laboratorio de análisis donde se almacenaron a -20°C hasta ser analizadas.

Tabla 1. Principales características de las especies de estudio

Nombre	Posición topográfica	Especificidad al yeso	Profundidad de su raíz	Actividad fenológica en verano
<i>Lepidium subulatum</i>	Cima – parte alta de la ladera	Exclusiva	Somera (~ 1 – 1.5 m)	Baja
<i>Linum suffruticosum</i>	Cima – parte alta de la ladera	No exclusiva	Somera (~ 1 – 1.5 m)	Baja
<i>Helianthemum squamatum</i>	Cima – parte alta de la ladera	Exclusiva	Somera (~ 1 – 1.5 m)	Moderada
<i>Helianthemum syriacum</i>	Cima – parte alta de la ladera	No exclusiva	Somera (~ 1 – 1.5 m)	Moderada
<i>Ononis tridentata</i>	Parte baja de la ladera	Exclusiva	Muy profunda (≤ 4 m)	Moderada
<i>Gypsophila hispanica</i>	Parte baja de la ladera	Exclusiva	Muy profunda (≤ 2 m)	Alta
<i>Salsola vermiculata</i>	Fondo del valle	No exclusiva	Muy profunda	Alta
<i>Artemisia herba-alba</i>	Fondo del valle	No exclusiva	Somera (~ 1 – 1.5 m)	Moderada
<i>Suaeda pruinosa</i>	Depresión salina	No exclusiva	Somera (~ 1 – 1.2 m)	Alta
<i>Atriplex halimus</i>	Depresión salina	No exclusiva	Profunda	Alta

La extracción de la savia del xilema y el agua edáfica se llevó a cabo por el método de la destilación criogénica al vacío [5]. Las muestras de savia se extrajeron siguiendo el protocolo convencional, mediante inmersión en un baño a 120°C. En cambio, el agua edáfica se extrajo de manera secuencial, primero a baja temperatura (35°C), para extraer el agua libre, y luego a 120°C, para extraer el agua de cristalización del yeso. En ensayos preliminares se pudo determinar cómo, en los suelos de yeso, el exceso de deuterio del agua de cristalización (~65‰) difiere significativamente de los valores hallados en el agua edáfica libre (~18‰). También se observó cómo, a temperaturas intermedias (50°C) de extracción, se podía recuperar parte del agua de cristalización pero los resultados eran muy variables, sugiriendo que la destilación había sido incompleta o que el agua de cristalización se había mezclado con agua libre remanente. La capacidad del método de separar agua libre y de cristalización del yeso se evaluó también con muestras en las que el agua de cristalización tenía una composición isotópica conocida. Para obtener estas muestras de suelo de yeso modificado isotópicamente, se deshidrató suelo de yeso recolectado en el campo calentándolo a 120°C durante 3 días, obteniendo así basanita y anhidrita. Este suelo se rehidrató posteriormente incubándolo 3 días con agua de composición isotópica conocida: agua de nieve ($\delta^{18}\text{O}=-15.00\text{‰}$, $\delta^2\text{H}=-53.94\text{‰}$), agua hervida ($\delta^{18}\text{O}=+0.23\text{‰}$, $\delta^2\text{H}=-29.12\text{‰}$) y agua marcada con D_2O ($\delta^{18}\text{O}=-11.57\text{‰}$, $\delta^2\text{H}=+468.79\text{‰}$) obtenida preparando una dilución al 1:10.000 de D_2O (99% atom, Sigma - Aldrich) con agua del grifo. Las muestras se dejaron secar al aire durante tres días y seguidamente se rehidrataron con agua de composición diferente a la utilizada para marcar el agua de cristalización. Tras dejarlas secar nuevamente al aire durante 3 días, las muestras se extrajeron siguiendo el método descrito y se analizó su composición isotópica, demostrando la consistencia del método.

La composición isotópica de las muestras para ^{18}O y ^2H se determinó por espectrometría láser en los Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Lleida (Lleida, Spain) usando un Picarro L2120-i acoplado a un vaporizador de alta precisión A0211. Para cada muestra se inyectaron 6 réplicas de 1 μl en el vaporizador, manteniendo las 3 últimas inyecciones para realizar los cálculos. La incertidumbre de medida (determinada como el error estándar de muestras repetidas ($N = 20$) de una muestra de referencia no incluida en la calibración) fue de 0.05‰ y 0.17‰, para $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$, respectivamente.

La composición isotópica del agua de lluvia local se obtuvo a partir de los registros mensuales de la estación de Zaragoza, disponibles en la Global Network of Isotopes in Precipitation [6].

Para conocer la tasa de renovación del agua en plantas de *H. squamatum* sometidas a condiciones de sequía y poder descartar enriquecimientos isotópicos debidos a procesos de evaporación “in planta”, se llevó a cabo un experimento de sequía con 20 plantas de *H. squamatum* recolectadas en el campo (41°41’50”N, 0°44’42”W en mayo 2013) y transplantadas en macetas (0.006 m^3). El 16 de agosto de 2013, la mitad de las plantas se asignaron al tratamiento control (riego diario hasta capacidad de campo) y la otra mitad al tratamiento sequía (sin riego). El contenido hídrico de las macetas se midió cada día por gravimetría al medio día, comparándolo con el valor de los tiestos secos (tras 3 semanas al aire). A los 4 y 7 días tras el comienzo de los tratamientos se llevaron a cabo medidas del intercambio gaseoso de las plantas usando un Infrared Gas Analyzer (Walz GFS3000, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). El 23 de agosto de 2013 se cosecharon las plantas, calculando el peso fresco y seco de los tallos (secados a 60°C durante 48h) para poder calcular el contenido de agua total en el xilema del dosel. El tiempo de residencia medio del agua del xilema se calculó como el cociente entre el contenido total de agua en el xilema y la tasa de transpiración (calculada a nivel de la planta completa).

Las diferencias en la composición isotópica del xilema entre plantas de distintas posiciones del gradiente topográfico y distinta profundidad de raíz se evaluaron con modelos mixtos (GLMMs) usando REML como método de estimación. El factor “especie” se incluyó como aleatorio, mientras que la “estación” de muestreo (primavera/verano) y la “posición” o la “profundidad de raíz” se incluyeron como factores fijos. Las diferencias en la composición isotópica de la savia de *H. squamatum* en verano y primavera se analizaron mediante GLMs con “estación” como factor fijo. Las diferencias entre estaciones y fuentes de agua en la composición isotópica del agua del suelo y entre días

de muestreo, hora del día y tratamientos en los parámetros de intercambio gaseoso (A, E, Gtot, ci, WRT) se analizaron por modelos REML con “estación” y “fuente de agua” o “fecha”, “hora” y “tratamiento”, respectivamente, como factores fijos. Ambos modelos incluyeron el factor “individuo” como aleatorio para considerar la autocorrelación espacial entre muestras de suelo recolectadas bajo el mismo individuo, en el caso de los datos isotópicos, y el efecto de medidas repetidas en el tiempo, en el caso de los datos del experimento de sequía. Los análisis GLM (GLS) y REML se llevaron a cabo usando el paquete *nlme* de R. La contribución relativa de las distintas fuentes de agua a la composición de la savia del xilema se estimó usando el paquete *SIAR* de R, que resuelve modelos de mezcla para isótopos estables mediante modelos de estadística bayesiana. Todos los análisis se realizaron usando R 2.14.1 (R Core Team, 2012).

2.3. Resultados obtenidos (cumplimiento de objetivos)

Se han cumplido todos los objetivos inicialmente planteados en el proyecto e incluso se han podido realizar actividades, como el experimento de sequía, que no estaba inicialmente proyectadas. Los principales resultados obtenidos se detallan a continuación.

En primer lugar, se ha logrado caracterizar, tanto en primavera como en verano, las principales fuentes de agua que usan las plantas leñosas más relevantes de las comunidades de yesos a partir de la composición isotópica de su savia. Se confirma que las plantas de raíz profunda usan agua freática todo el año, mientras que las de raíz somera usan agua de lluvia en primavera y en verano tienen una composición que puede explicarse de manera mayoritaria con el uso del agua de cristalización del yeso, que puede llegar a constituir el 90% del agua utilizada. Este último resultado es realmente novedoso porque es la primera evidencia de que los organismos pueden usar esta fuente de agua, hasta ahora desconocida para la vida.

Para llegar a esta conclusión, ha sido fundamental el desarrollo del experimento de sequía que nos ha permitido desestimar explicaciones alternativas a nuestros resultados. La necesidad de hacer este experimento estaba en que los datos de composición isotópica que registramos para las plantas de raíz somera en verano daban valores de Deuterium-excess (una relación entre la composición de isótopos estables del agua: ^{18}O y Deuterio) muy negativos. El valor de referencia del agua de lluvia es en torno a 10 y las plantas de *H. squamatum* medidas daban valores de -40/-50. Estos valores tan negativos se pueden explicar: 1) por uso parcial de agua estructural del yeso (con valores

de -65); y por 2) procesos de evaporación "in planta" resultado de una regulación eficaz de cierre de estomas y altas temperaturas. Para descartar 2) era necesario medir la tasa de recambio del agua en estas plantas en condiciones de sequía, y su capacidad de control estomático. Los datos obtenidos demuestran que estas plantas son anisohídricas, i.e. no tienen gran capacidad de cerrar los estomas en condiciones de sequía, y el agua de toda la planta se renueva en pocas horas incluso en condiciones de sequía. Estos resultados nos permiten descartar 2) y refuerzan la veracidad de nuestra hipótesis de uso del agua de cristalización del yeso por parte de las plantas.

2.4. Conclusiones y valoración de la ejecución

Los resultados que hemos obtenido tienen un elevado interés para el conocimiento ecológico de los sistemas de yeso, pero sus implicaciones van mucho más allá de estos sistemas: este proyecto ha permitido obtener la primera evidencia experimental de que los seres vivos son capaces de utilizar el agua de cristalización de ciertos minerales, como el yeso, descubriendo así de una nueva fuente de agua para la vida. Dada la gran extensión de los terrenos de yeso a nivel mundial y las restricciones que imponen al desarrollo de la agricultura allí donde aparecen, nuestros resultados tienen relevancia a escala planetaria, permitiendo sentar las bases de nuevos mecanismos de reconversión ecológica de terrenos de yeso. Nuestros resultados son, además, fundamentales para comprender la vida en el yeso y, apoyados por la reciente constatación de que el yeso es un mineral muy común en Marte, constituyen una información muy valiosa para el área de la exobiología.

2.5. Publicaciones resultantes

Palacio S., Azorín J., Montserrat-Martí G., Ferrio J.P. 201? Drinking rocks - plants can use crystallisation water from gypsum. Science (enviado).

Palacio S., Montserrat-Martí G., Ferrio J.P. 201? Differential water use among semiarid plants with contrasting root depth and topographical position along gypsum hills. (en preparación para Oecologia)