



**Universitat**  
de les Illes Balears

Título: Interés del  $^{13}\text{C}$  como indicador de eficiencia en el uso del agua en vid

AUTOR: Andreu Mairata Pons

**Memoria del Trabajo de Fin de Máster**

Máster Universitario en **Biología aplicada**  
(Especialidad/Itinerario biología de las plantas)

de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Curso Académico **2019-2020**

Fecha: **4/10/2019**

Nombre Tutor del Trabajo: **Hipólito Medrano Gil**



## Índice

Abstract.....	1
Resumen .....	2
1. Introducción.....	3
2. Material y métodos .....	7
2.1 Diseño experimental .....	7
2.2 Intercambio de gases.....	9
2.3 Discriminación isotópica del carbono.....	10
2.4 Evaluación intra-cultivar.....	11
2.5 Análisis estadístico .....	12
3. Resultados.....	12
4. Discusión .....	23
5. Bibliografía.....	28

## Abstract

Water use efficiency (WUE) is a generic term to refer to water used in plant metabolism to water lost by the plant. Measuring directly on leaves, the intrinsic -or photosynthetic- WUE ( $WUE_i$ ) is defined as the ratio of the net  $CO_2$  assimilation and the stomatal conductance. On a more integrative scale over time, it is possible to analyze the isotopic carbon discrimination of a given tissue, and it has been shown that the  $^{12}C/^{13}C$  ratio is mathematically related to the average  $WUE_i$  when the C was fixed. Thus, the main objective of the present work was to observe if the isotopic proportion of  $^{13}C$  is a good indicator to analyze the variations in water use efficiency in comparison with  $WUE_i$ . For this purpose, different collections of genotypes in vines have been studied: Tempranillo in different locations, Tempranillo on different rootstocks (T- rootstocks), and genotypes of the Garnacha variety. The test was carried out on different plots (Roda, Vitis Navarra and La Granjera) during the summer of 2018. In all cases, the plants were cultivated without irrigation, with a total of 39 genotypes. This study constitutes a first comparative approximation between two parameters, and shows that the use of isotopic carbon discrimination can be an alternative parameter to measure WUE in the field, due to it is a parameter that reflects the average water state over a longer period of time. Besides, dry mass carbon isotope composition reflects greater discrimination between different locations respect  $WUE_i$ .

## Resumen

La Eficiencia en el Uso del Agua (EUA) es un término genérico para describir o cuantificar como las plantas hacen un uso más o menos productivo del agua. A escala de segundos, midiendo directamente en las hojas, la EUA intrínseca (EUA<sub>i</sub>) se define como la asimilación neta de CO<sub>2</sub> entre la conductancia estomática al agua. A otra escala más integradora en el tiempo, es posible analizar la discriminación isotópica de carbono de un tejido determinado, y ha sido demostrado que la proporción <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C está relacionada matemáticamente con la EUA<sub>i</sub> promedio en el momento en el que el C estructural fue fijado. Por este motivo, el objetivo principal de este trabajo ha sido observar si la proporción isotópica de <sup>13</sup>C es un buen indicador para analizar variaciones de eficiencia en el uso del agua en comparación con EUA<sub>i</sub>. Para ello, se han estudiado diferentes colecciones de genotipos en vid: Tempranillo en diferentes localizaciones, Tempranillo sobre distintos portainjertos (T-portainjertos), y genotipos de la variedad Garnacha. El ensayo se ha realizado en distintas parcelas (Roda, Vitis Navarra y La Granjera), durante el verano del 2018. En todos los casos, las plantas han sido cultivadas en secano, con un total de 39 genotipos. Este estudio constituye una primera aproximación comparativa entre dos parámetros, y muestra que la utilización de la discriminación isotópica de carbono puede ser un parámetro alternativo a las medidas directas en campo de la EUA<sub>i</sub>, puesto que es un parámetro que refleja la media del estado hídrico durante un periodo de tiempo más largo. Además, la discriminación en el <sup>13</sup>C refleja una mayor discriminación entre distintas localizaciones respecto a la EUA<sub>i</sub>.

**Palabras clave:** ratio de isótopos de carbono, eficiencia en el uso del agua, portainjertos, genotipos.

## 1. Introducción

La vid es un cultivo mediterráneo tradicional con una larga historia que completa su ciclo biológico de abril a octubre, con fuertes necesidades hídricas los meses más secos del año (entre junio y agosto). El cultivo de viña se localiza principalmente en zonas semi-áridas lo que provoca una necesidad de riego que implica la sobre-explotación de acuíferos y hace prever situaciones de conflicto económico y ambiental (Medrano et al., 2015a; Flexas et al., 2010). Empeorando la situación, el cambio climático provoca una mayor frecuencia de sequías y olas de calor unidas a una mayor imprevisibilidad de lluvia, con un régimen cada vez más torrencial de la precipitación, lo que reduce el agua utilizable por la planta (Jones et al., 2012; Collins et al., 2013), por lo que el déficit hídrico podría convertirse en el principal factor limitante en la producción y calidad del vino en zonas semi-áridas (Chaves et al., 2007). En consecuencia, los datos actuales y las futuras predicciones señalan la importante necesidad de mejorar la eficiencia en el uso del agua (EUA) para llevar una práctica sostenible de la viticultura.

España es el país con más superficie dedicada a la vid del mundo y el tercer con mayor producción de vino (OIV, 2018), predominantemente bajo clima mediterráneo donde la superficie de viñedo regada aumenta y se encuentra ya en torno al 40%. Por lo tanto, la optimización del uso de agua de riego (EUA) es un tema de mucho interés para la sostenibilidad ambiental y económica del cultivo.

La eficiencia en el uso del agua (EUA) en la vid es, por tanto, tema de gran presencia en la investigación aplicada y fundamental (Medrano et al., 2010). Las mejoras de dicha eficiencia se encauzan mayoritariamente por vías agronómicas, mediante el riego deficitario controlado cuyos efectos están ampliamente documentados y su aplicación muy extendida (Sadras, 2009; Romero et al., 2010). Junto a estas vías, recientes trabajos de investigación demuestran las diferencias en la eficiencia en el uso del agua entre variedades de vid (Bota et al. 2016; Tomas et al 2014, Van Leeuwen et al., 2012).

Los resultados favorables en selección genética en agricultura, la existencia de una amplísima diversidad de variedades cultivadas de vid (Ibáñez et al., 2015; Guo et al., 2012) y el continuo avance en genómica (Laucou et al., 2011) ofrecen al género *Vitis* un mayor abanico genético para adaptar a la vid a situaciones de mayor estrés hídrico (Carbonell et al., 2013). Estos antecedentes sumados al continuo avance tecnológico

ofrecen las herramientas necesarias para ayudar a reducir el consumo de agua de riego (Sadras, 2009).

La ruta de investigación en España para mejorar el uso del agua en vid destinado a la elaboración de vino ha sido tradicionalmente la mejora a través de la selección clonar, y unos pocos experimentos sobre la producción de nuevas variedades mediante cruzamientos dirigidos. La razón principal para que se favorezcan el desarrollo de programas de selección clonar está relacionado con el marco legal de protección de vino. Las Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) y las Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP) constituyen el sistema utilizado en España para el reconocimiento de calidad diferenciada. Ambos tipos de protección constan de una lista detallada de variedades autorizadas para ser cultivadas en un territorio específico. Por este motivo, la obtención de nuevas variedades requeriría un largo proceso administrativo y aceptación por las juntas reguladoras y los consumidores. En cambio, la selección de clones dentro de cualquier variedad autorizada es inmediatamente aceptada por la figura de protección, además de ofrecer el certificado de plantas sanas (Ibáñez et al., 2015).

La variedad de Tempranillo y Garnacha son de las más cultivadas a nivel estatal, con un total de 300.000 ha aproximadamente entre las dos (Ibáñez et al., 2015). Hay muy pocos estudios sobre la EUA entre clones, pero se sabe que hay genotipos más adaptados a la sequía que otros.

Dentro de nuestro grupo de investigación, la variabilidad genética en la EUA ha sido estudiada y medida, desde los trabajos iniciales de Bota et al. (2003) hasta posteriores trabajos de Tomas et al. (2014) y Bota et al. (2016). Posteriormente se ha iniciado el estudio de la variabilidad genética dentro de la variedad Tempranillo (Tortosa et al., 2016; 2019; Medrano et al., 2018), que han demostrado la existencia de variabilidad entre clones de Tempranillo.

Por otra parte, se ha postulado que el uso de portainjertos tolerantes a la sequía en vid puede ayudar a minimizar el efecto de las restricciones de agua a través de una mejor absorción y transporte de agua (Soar et al., 2006) y a controlar la transpiración de la planta a través de la señalización química (Stoll et al., 2000) y la señalización hidráulica (Vandeleur et al., 2009).

Uno de los problemas en la selección de genotipos de mayor EUA es la medida de este parámetro en la vid. El concepto de EUA refleja el balance entre el carbono fijado y el agua utilizada. Este balance se puede medir a distintos niveles desde flujos instantáneos de gases, a nivel de planta y producción (Pou et al., 2011). A nivel de hoja, la ratio entre el CO<sub>2</sub> asimilado ( $A_N$ ), la transpiración (E) y la conductancia estomática ( $g_s$ ) determinan la “eficiencia en el uso del agua instantánea ( $A_N/E$ ,  $EUA_{inst}$ )”. Estos valores de EUA en hoja están fuertemente influenciados por las condiciones ambientales de medida (particularmente la temperatura, radiación y humedad ambiental) que determinan el valor de la transpiración (E). En este sentido se define la “eficiencia intrínseca en el uso del agua ( $A_N/g_s$ ,  $EUA_i$ )” (Fisher y Turner, 1978) que está determinada por factores que la planta puede controlar como la fotosíntesis y la conductancia. En este nivel, se puede medir fácilmente la eficiencia, pero siempre en intervalos cortos y puntuales.

Estas determinaciones en hoja debemos tomarlas como representativas la planta y de todo su ciclo. Sin embargo, hay situaciones en que resultan representativas y otras en que no lo son, como se ha demostrado en vides cultivadas en maceta (Tomas et al., 2014). Aun siendo un criterio de selección con fundamento fisiológico claro, las variaciones diarias y estacionales de la  $EUA_i$  son amplias y muy oscilantes, y los valores que podemos determinar son siempre “instantáneos”. Para superar estas limitaciones, se ha propuesto la determinación en la biomasa de la abundancia de isótopos estables de carbono, en particular el <sup>13</sup>C como indicadores de la EUA (Bchir et al., 2016; De Souza et al., 2005).

El carbono y otros isótopos estables se encuentran en la atmósfera a una concentración conocida. Los procesos fotosintéticos discriminan entre el isótopo <sup>12</sup>C y el <sup>13</sup>C en la asimilación del carbono, por este motivo recientemente ha aumentado su interés para múltiples propósitos (Santesteban et al., 2015). El isótopo de <sup>13</sup>C se encuentra en la masa seca de la planta debido al proceso de fijación de CO<sub>2</sub> producido con la fotosíntesis. La difusión de <sup>12</sup>C y <sup>13</sup>C entre la atmósfera y los cloroplastos son distintos, debido a la discriminación contra el <sup>13</sup>C en la reacción de Ribulosa Bifosfato carboxilasa/oxidasa (RuBisCo). Esta discriminación se atenúa cuando la concentración de CO<sub>2</sub> en los cloroplastos disminuye debido al cierre estomático. Se demostró que la cantidad diferencial de isótopos de carbono en la materia seca de las plantas da como



resultado una estimación integradora de la relación entre la tasa de fotosíntesis y la apertura del estoma ( $EUA_i$ ) durante un período de crecimiento determinado (Farquhar y Richards, 1984). Por lo tanto, la ratio de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ) refleja el promedio de la  $EUA_i$  en la obtención de la biomasa para la masa seca analizada.

Tradicionalmente, en vid, se usaban muestras de hoja o bayas para analizar el  $\delta^{13}\text{C}$  ya que los resultados eran similares (De Souza et al., 2005), pero se observó que las hojas no eran un buen tejido debido a que el carbono fijado en ellas provenía de momentos previos del estrés hídrico estival (Chaves et al., 2007). Últimamente se ha demostrado que es mejor medir el  $\delta^{13}\text{C}$  en bayas ya que parece un buen indicador del estado hídrico en el momento de su formación (Bchir et al., 2016). Esto es debido a que la acumulación de azúcares en el fruto se produce mayoritariamente durante los procesos de envero y de maduración de la uva (julio - agosto), momento en el cual las viñas suelen padecer déficit hídrico en condiciones mediterráneas (Sabir et al., 2010).

Anteriormente, el  $\delta^{13}\text{C}$  y  $EUA_i$  han sido utilizados en distintos de trabajos (Tortosa et al., 2016; Gaudillère et al., 2002; Bchir et al., 2016) como indicadores de la eficiencia en el uso del agua en vid.

El objetivo principal es observar si la proporción isotópica de  $^{13}\text{C}$  es un buen indicador para analizar variaciones de eficiencia en el uso del agua en comparación con  $EUA_i$ . Esta comparación de criterios de selección se realizará determinando la variabilidad entre cultivares de Tempranillo en diferentes localizaciones, Tempranillo sobre distintos portainjertos, y clones de la variedad Garnacha.



**Fotografía 1.** Parcela de vid en Vitis Navarra

## **2. Material y métodos**

### **2.1 Diseño experimental**

El experimento se ha realizado entre parcelas distintas: Roda (Haro, La Rioja, España, 42°32'58.3"N 2°54'46.2"W), en Vitis Navarra (Vergalijo, Merindad de Olite, Navarra, España, 42°28'59.4"N 1°49'39.9"W, Foto. 1) y en La Granjera (Logroño, La Rioja, España, 42°26'46.7"N 2°30'41.4"W). La recolección de datos se ha llevado a cabo durante el verano del 2018. Las tres localizaciones presentan un clima similar, pero Vitis Navarra presenta valores de evapotranspiración potencial acumulada (ET<sub>o</sub>) y de integral térmica acumulada (IT) más elevados y una menor precipitación acumulada, indicando un clima ligeramente más árido, seguido de La Granjera y Roda. La Granjera se caracteriza por tener una alta precipitación acumulada en los meses de mayo a julio. En general, Vitis Navarra representa un clima mediterráneo seco, y Roda y La Granjera se podrían representar con un clima con influencia atlántica y con una mayor precipitación en los meses estivales (Tabla 1).

**Tabla 1.** Evapotranspiración potencial acumulada (ETo), Integral térmica acumulada (IT) y precipitación acumulada durante los meses de mayo a septiembre del 2018 en Vitis Navarra, Roda y La Granjera.

Mes	Eto (mm)	IT (°C)	Precipitación (mm)
<b>Vitis Navarra</b>			
Mayo	125	149	31,6
Junio	153	276	48,3
Julio	185	387	55,7
Agosto	165	372	6,4
Septiembre	119	300	16,6
<b>Total:</b>	<b>747</b>	<b>1494</b>	<b>148,6</b>
<b>Roda</b>			
Mayo	101	99	47,5
Junio	127	224	27,1
Julio	161	335	98,7
Agosto	154	319	0
Septiembre	114	262	44,9
<b>Total:</b>	<b>657</b>	<b>1239</b>	<b>218,2</b>
<b>La Granjera</b>			
Mayo	113	138	65,6
Junio	137	272	39,3
Julio	169	371	117,6
Agosto	167	386	0
Septiembre	113	302	45,4
<b>Total:</b>	<b>699</b>	<b>1469</b>	<b>267,9</b>

En el estudio se compararon 12 clones de Garnacha, 16 de Tempranillo y 11 Tempranillos sobre distintos portainjertos (Tabla 2). Sobre los portainjertos hay un único genotipo de Tempranillo (clon Ia) y todos los clones de Garnacha y Tempranillo están sobre el portainjerto 110R. El experimento con los clones de Garnacha y los Tempranillos sobre distintos portainjertos (T-portainjertos) se localiza en Vitis Navarra.

En cambio, 10 genotipos de Tempranillo se localizan en Roda y 6 en La Granjera (La Rioja). A nivel estadístico los clones de Tempranillo se agrupan en un solo grupo, pero en las figuras se indica el campo experimental. En todos los casos, las plantas están cultivadas en secano con un marco de plantación similar en todas las parcelas (1,5 x 2m). En total se han analizado 39 genotipos con 5 réplicas por genotipo.

**Tabla 2.** Lista de la colección de genotipos y clones: Tempranillo, Garnacha y Tempranillo sobre distintos portainjertos (T-portainjertos) en los distintos campos experimentales

Tempranillo		Garnacha	T - portainjertos
Roda	La Granjera	Vitis Navarra	Vitis Navarra
108	232	ARA 24	110R
137	1048	ARA 4	140RU
156	1052	ENTAV 136	420A
166	1078	EV11	RG2
178	1084	EV13	RG3
203	1371	EV14	RG4
215		EV15	RG6
243		GB 141	RG7
336		RJ21	RG8
		VNQ	RG9
			SO4
<b>Subtotal:</b>			
10	6	11	12

## 2.2 Intercambio de gases

La fotosíntesis neta en la hoja ( $A_N$ ) y la conductancia estomática ( $g_s$ ) se han medido una vez por planta en una hoja madura completamente expuesta al sol. Las mediciones se han realizado entre las 10:00 y la 13:00 (hora local) utilizando (Foto. 2) un analizador de intercambio de gases por infrarrojos (Li-6400, Li-cor Inc., Lincoln, Nebraska, USA). La concentración de  $CO_2$  dentro de la cámara es de  $400 \mu\text{mol } CO_2 \text{ mol}^{-1}$  al aire. La radiación fotosintéticamente activa (RFA) está sobre los niveles de saturación ( $1000 \mu\text{moles fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Se ha medido a temperatura ambiente, con una oscilación en la

temperatura de la hoja de 32 a 42 °C. La eficiencia en el uso del agua intrínseca (EUA<sub>i</sub>) se ha calculado como la ratio entre la asimilación neta de CO<sub>2</sub> (A<sub>N</sub>) y la conductancia estomática (g<sub>s</sub>). Este parámetro es muy dependiente de las condiciones ambientales y representa el estado hídrico del momento de medida.



**Fotografía 2.** Analizador de intercambio de gases por infrarrojos (Li-6400) en el campo.

### 2.3 Discriminación isotópica del carbono

El  $\delta^{13}\text{C}$  ha sido analizado en uva madura con una determinación por planta, en los mismos individuos analizados en EUA<sub>i</sub>. Se ha partido de una mezcla de bayas sin pepitas y se han puesto a secar en el horno a 90°C durante 7-8 días. Posteriormente, se han triturado las muestras en un molinillo y se han preparado alícuotas de 2 mg ( $\pm$  0,1 mg) de polvo de uva (Foto. 3A). Las muestras han sido combustionadas en un analizador elemental (Thermo Flash EA 1112 Series, de la Universidad de las Islas Baleares, España), donde el CO<sub>2</sub> es separado por cromatografía y es inyectado directamente a un espectrómetro de masas con relación de isótopos de flujo continuo (Thermo Finnigan Delta Plus, de la Universidad de las Islas Baleares, España) (Foto. 3B). El  $\delta^{13}\text{C}$  ha sido calculado mediante la fórmula establecida por Farquhar y Richards (1984):

$$\delta^{13}\text{C} = (R_s - R_b) / R_b \cdot 1000$$

donde  $R_s$  es la ratio  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de la muestra y  $R_b$  (Vienna-Pee Belemnite) es la ratio de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  usado a nivel internacional. El  $\delta^{13}\text{C}$  obtenido es un buen indicador de la eficiencia en el uso del agua de acuerdo con Fraquhar y Richards (1984), por lo que una discriminación baja de  $^{13}\text{C}$  se relaciona con una baja concentración de  $\text{CO}_2$  a los cloroplastos, y esto directamente con una conductancia estomática limitada, que es condición fisiológica típica del estrés hídrico, y por lo tanto una elevada EUA.



**Fotografía 3.** Material necesario para hacer alícuotas de polvo de uva (A): molinillo, pinzas, espátula y cápsulas. Analizador elemental y espectrómetro de masas con relación de isótopos de flujo continuo (B).

## 2.4 Evaluación intra-cultivar

La evaluación de la EUA intra-cultivar en los dos parámetros ( $\delta^{13}\text{C}$  e intercambio de gases) se ha analizado por dos vías: una en base a una comparación de la posición relativa, de mayor a menor valor dentro de cada grupo. Para ello, se ha utilizado el valor medio de cada genotipo (Tabla 3) en  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\text{EUA}_i$ . Por otra parte, se ha utilizado el porcentaje residual, que es un valor que representa la diferencia entre el valor real y el teórico extraído de la ecuación de correlación entre cada parámetro y el valor de  $g_s$ . Dicha diferencia se divide por el valor teórico y se expresa en %. En este caso se ha calculado el porcentaje residual en cada genotipo para  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\text{EUA}_i$  en función de la conductancia estomática ( $g_s$ ) como queda representado en la Figura 3. En los genotipos de Garnacha no se obtuvo una relación significativa, por lo que se ha usado el promedio del grupo para calcular el valor teórico obtenido (Tabla 3). En ambos porcentajes, un valor positivo indica que el valor obtenido es más elevado que el teórico, y por lo tanto la eficiencia es superior.

## 2.5 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se han realizado mediante el software R versión 3.1.1 (R Core Team, 2017). La correlación entre parámetros se ha calculado mediante el test de Pearson. Los datos de  $EUA_i$  y de  $\delta^{13}C$  se han analizado por separado. En cada caso no se cumplía la normalidad y/o homogeneidad de varianzas. Las diferencias entre grupos y clones se han analizado mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis ( $\alpha = 0,05$ ) y el post-hoc respectivo (test de Dunn) con corrección automática del nivel de significación ( $p\text{-valor} = \alpha/2$ ).

## 3. Resultados

Los resultados obtenidos en el conjunto de genotipos medidos cubren una determinación de las tasas de intercambio de gases en hoja (fotosíntesis ( $A_N$ ), conductancia estomática ( $g_s$ ) y  $EUA_i$  ( $A_N/g_s$ )), en el verano del 2018 y el análisis del  $\delta^{13}C$  en muestras de bayas de las mismas plantas. En la Tabla 3 se muestran los resultados de conductancia estomática ( $g_s$ ), fotosíntesis neta ( $A_N$ ) y  $EUA_i$  y de  $\delta^{13}C$ , en todos los genotipos y clones analizados. Además, se indica el campo experimental (C.E.), los datos promedio en cada parcela y se señalan las diferencias estadísticas entre genotipos y entre localizaciones.

En cuanto a las localizaciones, se ha calculado los valores promedio del conjunto de genotipos de Tempranillo de cada localización y ensayo. Analizando los valores promedio, se observa diferencias significativas entre las tres localizaciones para  $g_s$  y  $A_N$ . Para  $A_N/g_s$  y  $\delta^{13}C$  los datos de La Grajera muestran diferencias significativas respecto a Roda y Vitis Navarra. Entre estas dos últimas localizaciones las diferencias no son significativas.

El efecto varietal ha sido analizado comparando Garnacha y Tempranillo. Los resultados muestran en Garnacha valores significativamente diferentes a Tempranillo en  $A_N$  y  $^{13}C$  pero no en  $g_s$  y  $A_N/g_s$ .

Respecto a la variabilidad intra-cultivar (Tabla 3) en el  $\delta^{13}C$ , el cultivo con mayor diferencia entre genotipos es el Tempranillo con diferencias de  $\delta^{13}C$  de 4,4%, seguido por los distintos T-portainjertos (4%) y Garnachas (3%). Respecto a la  $EUA_i$ , la clase con

mayor diferencia entre genotipos es para el cultivo de Tempranillo ( $\Delta 65 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ), seguido por el grupo de Tempranillo sobre distintos portainjertos ( $\Delta 40,6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ) y Garnachas ( $\Delta 29,4 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ). En la fotosíntesis neta ( $A_N$ ) el grupo de Garnacha presenta una media de valor más alta ( $16,3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ) con muy poca variación entre genotipos ( $3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ). En cambio, los Tempranillos y T-portainjertos presentan medias más bajas ( $14 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ), pero con una variación entre genotipos de  $7,2 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$  en T-portainjertos y  $15,4 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$  en Tempranillo. Respecto a la conductancia estomática ( $g_s$ ) los tres grupos tienen valores medios muy similares, pero el grupo de Garnacha tiene un valor medio  $0,238 \text{ mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  y una variabilidad de  $0,08 \text{ mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . En cambio, T-portainjertos y Tempranillo tienen una variabilidad de  $0,299$  y  $0,356 \text{ mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  respectivamente.

Analizando las diferencias entre clones (Tabla 3), se distinguen tres grupos claramente definidos respecto a la discriminación isotópica de carbono en Tempranillo, liderado con un primer grupo con alto  $\delta^{13}\text{C}$  formado por los genotipos 232, 1048 y 1052. Posteriormente hay un grupo intermedio de 10 genotipos, y finalmente un grupo con un  $\delta^{13}\text{C}$  bajo liderado por el genotipo 137, seguido por el 156 y 108. En relación a la  $\text{EUA}_i$ , se sigue el mismo patrón de tres grupos encabezados por un primer grupo de dos genotipos con alta eficiencia formado por el clon 1048 y 1052, seguido con un grupo intermedio formado por 8 genotipos con valores intermedios, finalizando con un grupo final de 6 genotipos, formado (de mayor a menor  $\text{EUA}_i$ ) 215, 108, 166, 156, 243 y 137.

Respecto a los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  entre la clase de Tempranillo en distintos portainjertos, destaca el genotipo RG2 con una discriminación baja, seguido del 1103P y SO4. Este grupo destacado va seguido por un grupo intermedio de 6 clones, que termina por un grupo con alta discriminación formado por tres clones: 110R, 140RU y el genotipo RG8, con un valor destacado. En referencia al intercambio de gases ( $\text{EUA}_i$ ), se distinguen tres grupos. El primer grupo de valores elevados está formado por cuatro genotipos, destacando los clones RG2, RG9, RG7, seguido del clon 1103P con un valor sensiblemente más bajo. Este grupo va seguido por seis genotipos intermedios, finalizando con grupo con baja  $\text{EUA}_i$  de dos genotipos, formado por el RG8 y 140RU, que destaca por su bajo valor.



El  $\delta^{13}\text{C}$  y la  $\text{EUA}_i$  en la variedad Garnacha se distinguen tres grupos claramente diferenciados en ambos parámetros. En la discriminación isotópica, destacan por su alto valor los genotipos EV11, EV13 y EV14, seguido por un grupo de 7 clones con valores intermedios, finalizando con el clon ENTAV141 que destaca en este grupo por su alta discriminación. Respecto a la  $\text{EUA}_i$ , destaca el genotipo ENTAV136 por su alta  $\text{EUA}_i$  y los genotipos EV15, EV13, EV14, RJ21 y ARA24 por su bajo valor.

En los grupos de T-portainjertos y Tempranillos la conductancia estomática ( $g_s$ ) y la fotosíntesis neta ( $A_N$ ) cumplen una misma distribución en los sub-grupos estadísticos que  $\text{EUA}_i$ . En cambio, esta distribución no se cumple en Garnacha.

**Tabla 3.** Valores medios y desviaciones estándar (n=5) de discriminación isotópica del C,  $\delta^{13}\text{C}$ ; conductancia estomática ( $g_s$ ), fotosíntesis ( $A_N$ ) y  $\text{EUA}_i$  ( $A_N/g_s$ ) en los genotipos y clones estudiados. Se indica el campo experimental (C.E.): Roda (R), La Granjera (G) y Vitis Navarra (VN), y las diferencias estadísticas entre parcelas (mayúsculas) e intra-cultivares (minúsculas).

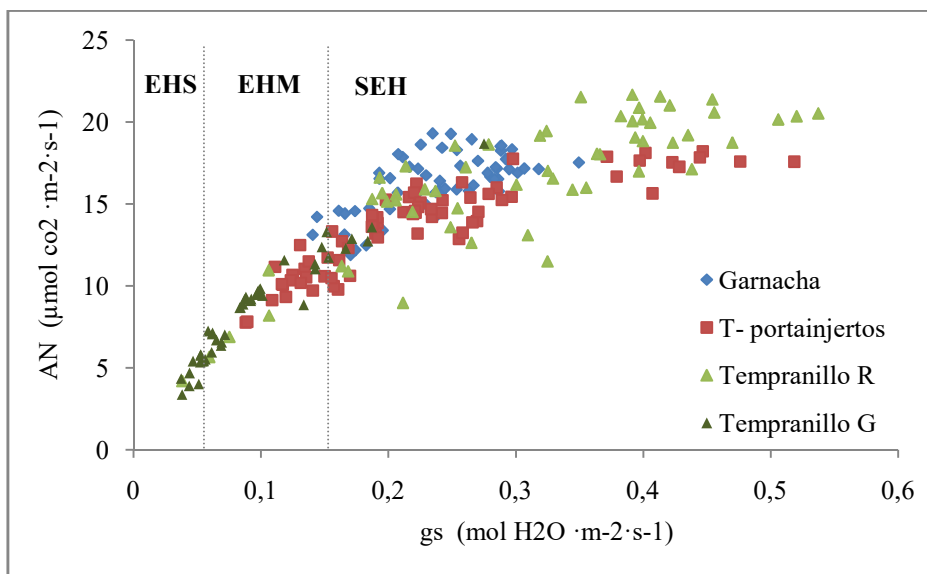
Clase	C.E.	$g_s$ ( $\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$A_N$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$A_N/g_s$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ )	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
<b>Tempranillo</b>					
232	G	0,046 ± 0,01 a	4,3 ± 1,0 a	93,7 ± 14,2 a	-22,7 ± 0,8 a
1048	G	0,064 ± 0,01 ab	6,7 ± 1,2 a	105,9 ± 7 a	-23,2 ± 0,1 a
1052	G	0,082 ± 0,02 ab	8,3 ± 1,8 a	102,3 ± 4,1 a	-23,2 ± 0,8 a
1078	G	0,101 ± 0,05 ab	8,5 ± 3,4 a	88 ± 10 a	-23,9 ± 0,7 a
1084	G	0,129 ± 0,05 b	10,2 ± 2,7 b	85,8 ± 21,7 a	-24,1 ± 0,6 a
1371	G	0,151 ± 0,07 b	12,3 ± 4,0 b	86,1 ± 12,9 a	-25,8 ± 2,3 a
Promedio:		0,095 ± 0,050 C	8,5 ± 3,2 C	95,1 ± 14 A	-23,7 ± 1,3 A
203	R	0,237 ± 0,04 a	15,4 ± 0,7 a	66,4 ± 9,3 ab	-24,5 ± 0,5 a
336	R	0,211 ± 0,14 a	12,6 ± 6,0 a	71,9 ± 21,5 a	-24,7 ± 0,9 ab
178	R	0,230 ± 0,10 a	15,5 ± 4,0 a	73,2 ± 17,6 a	-24,9 ± 0,7 ab
6	R	0,211 ± 0,03 a	16,7 ± 1,3 a	79,6 ± 5 a	-24,9 ± 0,8 ab
243	R	0,422 ± 0,06 a	19,7 ± 2,0 a	47,2 ± 5,7 ab	-25,6 ± 0,6 ab
215	R	0,267 ± 0,04 a	14,7 ± 1,6 a	55,4 ± 7,4 ab	-26 ± 0,8 ab
166	R	0,400 ± 0,05 a	19,7 ± 1,7 a	49,4 ± 2 ab	-26,2 ± 0,2 ab
108	R	0,400 ± 0,07 a	19,4 ± 2,5 a	49,4 ± 9 ab	-26,6 ± 0,3 ab
156	R	0,402 ± 0,03 a	19,2 ± 1,9 a	47,9 ± 4,8 ab	-26,6 ± 0,4 ab
137	R	0,377 ± 0,11 a	15,2 ± 4,7 a	40,5 ± 3,1 b	-27,1 ± 0,9 b
Promedio:		0,308 ± 0,120B	16,4 ± 4,2 B	59,1 ± 17 C	-25,7 ± 1,1B
<b>T – portainjertos</b>					
RG2	VN	0,139 ± 0,04 cd	11,0 ± 2,1 b	80,6 ± 12,4 a	-25,4 ± 0,7 a

1103 P	VN	0,165 ± 0,02 bcd	12,1 ± 1,5 abc	73,9 ± 4,7 ab	-26,3 ± 0,3 ab
SO4	VN	0,199 ± 0,05 abcd	13,3 ± 1,6 abc	69,3 ± 10,7 abc	-26,4 ± 0,7 ab
RG6	VN	0,203 ± 0,02 abcd	14,5 ± 0,6 abc	71,6 ± 5,4 abc	-26,7 ± 0,4 abc
RG7	VN	0,136 ± 0,02 d	10,2 ± 1,0 c	76,5 ± 11,5 a	-26,8 ± 0,4 abc
RG9	VN	0,143 ± 0,05 cd	10,9 ± 2,3 b	79,3 ± 11,9 a	-26,9 ± 0,8 abc
RG4	VN	0,259 ± 0,03 abc	14,8 ± 0,9 abc	57,7 ± 5,5 abc	-27,1 ± 0,9 abc
RG3	VN	0,280 ± 0,07 abcd	14,8 ± 1,2 abc	55 ± 11,8 abc	-27,4 ± 0,4 abc
420A	VN	0,237 ± 0,04 abcd	15,0 ± 1,8 ab	63,9 ± 7,1 abc	-27,7 ± 0,3 abc
110R	VN	0,221 ± 0,02 abcd	14,7 ± 1,2 abc	66,8 ± 6,2 abc	-28 ± 0,4 bc
140RU	VN	0,438 ± 0,04 a	17,4 ± 0,9 a	40 ± 3,7 c	-28,5 ± 0,5 bc
RG8	VN	0,394 ± 0,08 ab	17,3 ± 1,0 a	45,1 ± 7,4 bc	-29,4 ± 0,3 c
Promedio:		0,229 ± 0,101A	13,6 ± 2,7A	65,6 ± 15,1 BC	-27,2 ± 1,1 B
<b>Garnacha</b>					
EV11	VN	0,232 ± 0,04 a	15,2 ± 1,0 a	66,5 ± 5,3 ab	-24 ± 0,7 a
EV13	VN	0,266 ± 0,05 a	16,4 ± 2,3 a	63,6 ± 9,7 b	-24,2 ± 0,2 a
EV14	VN	0,243 ± 0,06 a	15,3 ± 1,9 a	63,5 ± 5,1 b	-24,2 ± 0,6 a
ENTAV 136	VN	0,190 ± 0,03 a	16,7 ± 1,5 a	88,6 ± 5,7 a	-24,6 ± 0,3 ab
ARA 4	VN	0,212 ± 0,05 a	17,0 ± 2,7 a	81,6 ± 7,9 ab	-24,8 ± 0,4 ab
ARA 2	VN	0,204 ± 0,04 a	16,1 ± 1,8 a	79,8 ± 7,2 ab	-24,8 ± 0,7 ab
ARA 24	VN	0,285 ± 0,04 a	16,7 ± 0,7 a	59,2 ± 6,5 b	-24,8 ± 0,1 ab
RJ21	VN	0,277 ± 0,02 a	17,1 ± 1,8 a	61,8 ± 1,9 b	-24,9 ± 0,2 ab
VNQ	VN	0,232 ± 0,01 a	17,8 ± 1,4 a	77 ± 5,3 ab	-25,2 ± 0,3 ab
EV15	VN	0,258 ± 0,04 a	16,3 ± 1,7 a	64 ± 6,4 b	-25,8 ± 0,6 ab
ENTAV 141	VN	0,205 ± 0,04 a	14,8 ± 1,5 a	73,5 ± 10,9 ab	-27 ± 0,6 b
Promedio:		0,238 ± 0,048 AB	16,3 ± 1,8 B	70,1 ± 11 B	-24,9 ± 0,9 B

Cuando se relaciona la fotosíntesis ( $A_N$ ) y la conductancia estomática ( $g_s$ ) de las réplicas de cada clon en las diferentes colecciones estudiadas (Fig. 1) se observa la elevada correlación entre ambos parámetros de carácter logarítmico o de saturación (a partir de  $g_s > 0,25-0,3 \text{ mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) ya descrita en anteriores trabajos (Flexas et al., 2013; Flexas et al., 2004; Waren, 2007; Tortosa et al., 2019). Si se analiza la gráfica en función del estado hídrico propuesto por Medrano et al. (2002) se obtiene un grupo pequeño con valores propios de un estrés hídrico severo (EHS,  $g_s < 0,05 \text{ mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) formado por los clones de Tempranillo de La Granjera. En el estrés hídrico moderado (EHM,  $g_s < 0,15 \text{ mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) hay, mayoritariamente, clones de Tempranillo sobre distintos portainjertos (T-portainjertos) y Tempranillo, con pocas réplicas de Garnacha localizadas a unos valores altos de  $g_s$  ( $\approx 0,15 \text{ mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). En el rango de sin estrés hídrico (SEH) se encuentran la mayoría de réplicas de Garnacha, concentradas en el cambio de pendiente de la curva, en un rango estrecho de

valores de conductancia ( $0,15$  a  $0,3 \text{ mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Además, se localizan un gran número de réplicas de T-portainjertos y Tempranillos a lo largo de todos los valores de  $g_s$ , hasta un máximo de  $0,53 \text{ mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . En general, observamos muchos individuos en el rango de sin estrés hídrico.

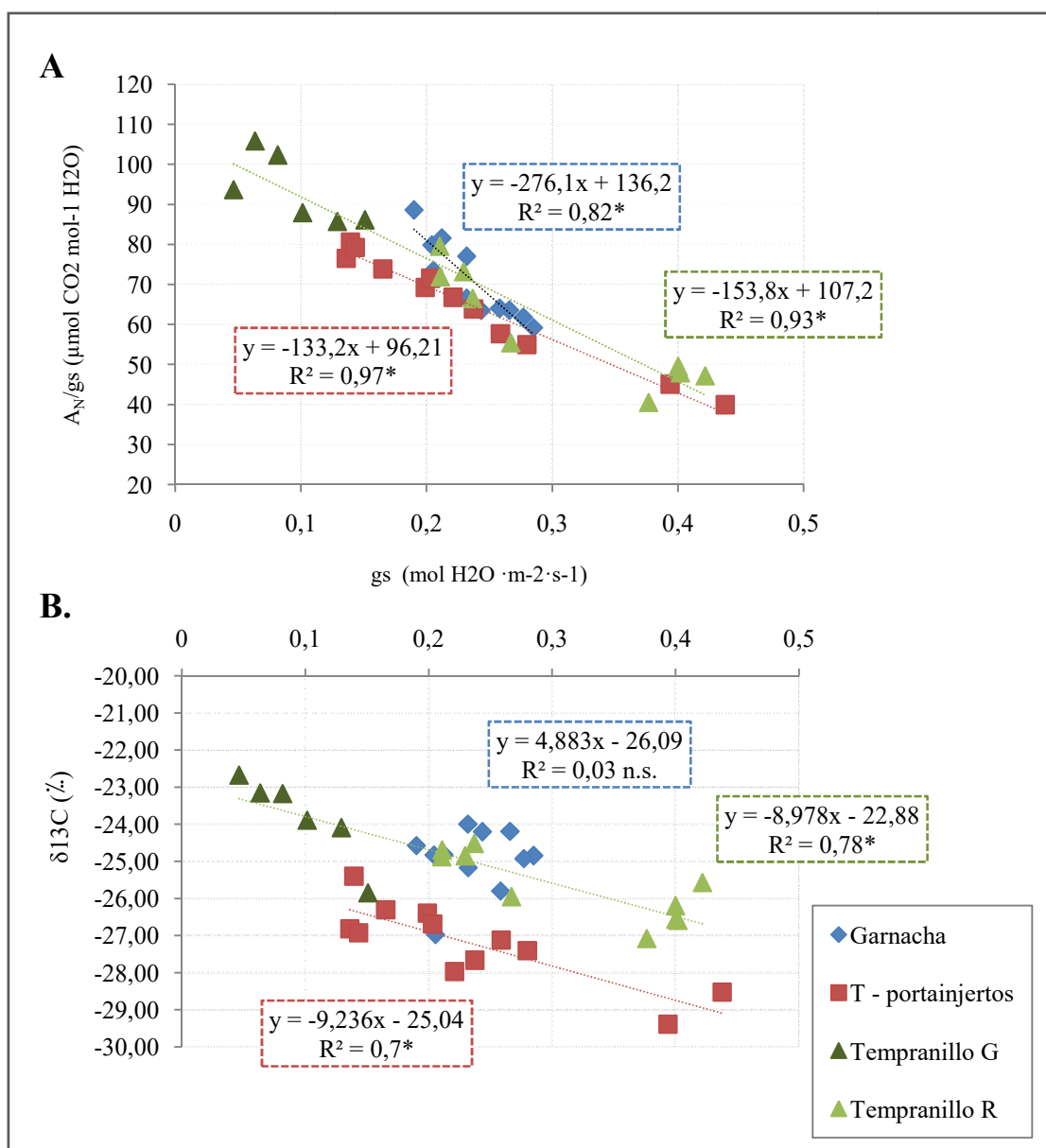
Se observa que en los mismos valores de  $g_s$  las Garnachas tienen, en general, tasas de  $A_N$  más elevadas que los otros dos grupos. El Tempranillo sobre portainjertos se caracteriza por no tener datos de conductancia baja ( $g_s < 0,1 \text{ mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Los genotipos de la variedad de Tempranillo se distribuyen a lo largo de toda la curva, formando los puntos en ambos extremos. Además, estos se distinguen de los portainjertos por tener un valor más alto de fotosíntesis ( $A_N$ ) a conductancias entre  $0,3$  y  $0,5 \text{ mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .



**Figura 1.** Relación entre valores de la tasa de fotosíntesis ( $A_N$ ) y la conductancia estomática ( $g_s$ ) en los tres grupos analizados (Tempranillo en Roda (Tempranillo R) y La Granjera (Tempranillo G), Tempranillo sobre distintos portainjertos (T-portainjertos) y Garnacha) zonificando la gráfica en función del estrés hídrico (EHS: estrés hídrico severo; EHM: estrés hídrico moderado; SEH: sin estrés hídrico).

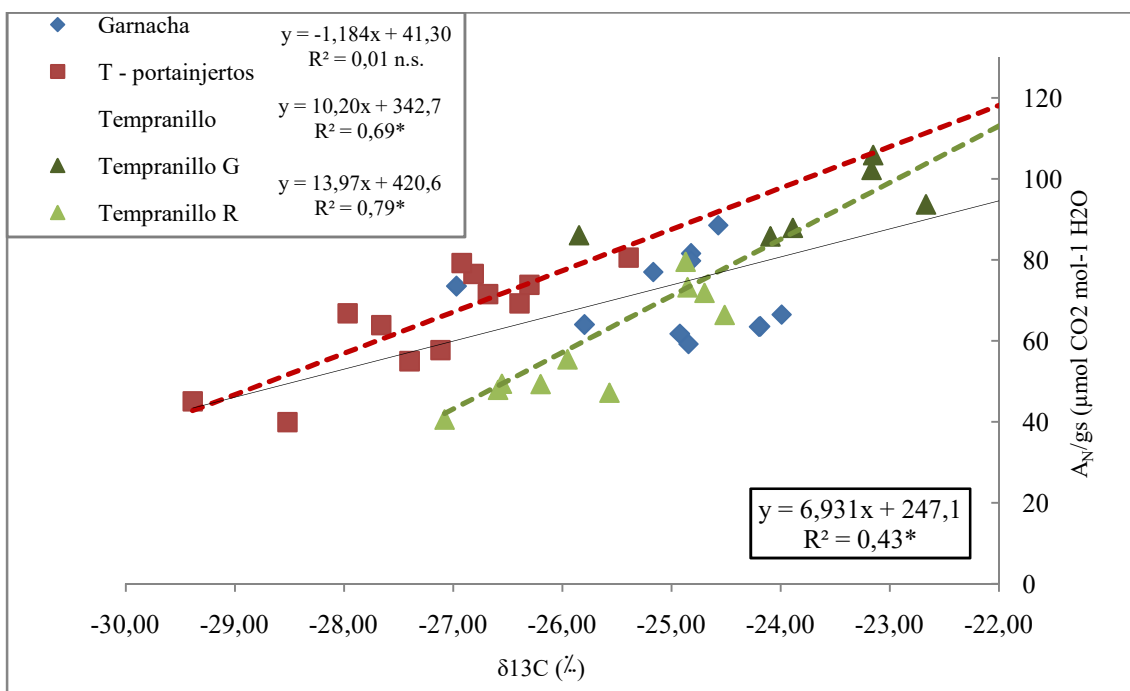
La conductancia estomática ( $g_s$ ) es un parámetro que se relaciona bien con la  $EUA_i$  y el  $\delta^{13}\text{C}$  (Fig. 2) en todos los genotipos estudiados, menos para los clones de Garnacha (Fig. 2B). Además, en la relación  $EUA_i$ - $g_s$  los clones de Garnacha tienen una pendiente

más pronunciada, obteniendo un rango de eficiencia relativamente grande con poca variación de  $g_s$  (Fig. 2A). Se destaca que los grupos Tempranillo en distintos portainjertos (T-portainjerto) y los clones de Tempranillo tienen una pendiente similar en ambas relaciones, pero con unos valores generales más elevados de eficiencia y menos discriminación isotópica en los clones de Tempranillo. Además, destacan los genotipos de Tempranillo de La Granjera, los cuales obtienen en ambos casos (Fig. 2A y B) las posiciones con mayor EUA, con unos valores muy relacionados a  $g_s$ .



**Figura 2.** Relación de la conductancia estomática ( $g_s$ ) y la  $EUA_i$  (A) y respecto a  $\delta^{13}C$  (B), en toda la colección vegetal (Tempranillo sobre distintos portainjertos (T-portainjertos) y clones de Garnacha y Tempranillo en La Granjera (Tempranillo G) y Roda (Tempranillo R)) con la ecuación de la línea de tendencia, el valor de  $R^2$  y la significancia (\* = p-valor  $\leq 0,01$ ; n.s. = no significativo).

Comparando los datos de  $\delta^{13}C$  y la  $EUA_i$  ( $A_N/g_s$ ) de estos genotipos, se observa una correlación positiva entre los dos parámetros (Fig. 3). Aunque los diferentes grupos no tienen el mismo ajuste, se ha obtenido un coeficiente de determinación general de 0,43 ( $n=39$ ). En los clones de Garnacha no hay relación entre los dos parámetros ( $R^2=0,1$ ), con valores de  $EUA_i$  muy similares entre genotipos. En cambio, Tempranillo sobre distintos portainjertos ( $R^2=0,69$ ) y los genotipos y clones de la variedad Tempranillo ( $R^2=0,79$ ) tienen una correlación positiva entre los valores de  $\delta^{13}C$  y  $A_N/g_s$ . Se observa que los clones de Garnacha se concentran en un rango de  $EUA_i$  estrecho (60-90  $\mu\text{mol CO}_2\text{mol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ ), pero con una variación de  $\delta^{13}C$  (‰) notable. Además, hay una mayor discriminación de  $^{13}C$  en el grupo de Tempranillo sobre distintos portainjertos comparado con los clones de Tempranillo en los mismos valores de eficiencia. Se observa que los genotipos Tempranillo de La Granjera se localizan en una zona con baja discriminación isotópica y alta  $EUA_i$ .



**Figura 3.** Representación del promedio por genotipo de  $\delta^{13}\text{C}$  y la  $\text{EUA}_i$  en cada genotipo de Tempranillo en Roda (Tempranillo R) y La Granjera (Tempranillo G), Garnacha y Tempranillo sobre distintos portainjertos (T-portainjertos) con la ecuación de la línea de tendencia, el valor de  $R^2$  y la significancia (\* = p-valor  $\leq 0,01$ ; n.s. = no significativo).

Para facilitar la identificación de los genotipos más y menos eficientes en el uso del agua en los dos parámetros se ha calculado el valor de posición relativa respecto al valor medio para los valores de discriminación de carbono y de  $\text{EUA}_i$  ( $\text{A}_\text{N}/\text{g}_\text{s}$ ) y, por otra parte, el porcentaje residual (Tabla 4) calculado a partir del valor real y el esperable para la misma conductancia estomática en función de las ecuaciones de correlación correspondientes (Fig. 2).

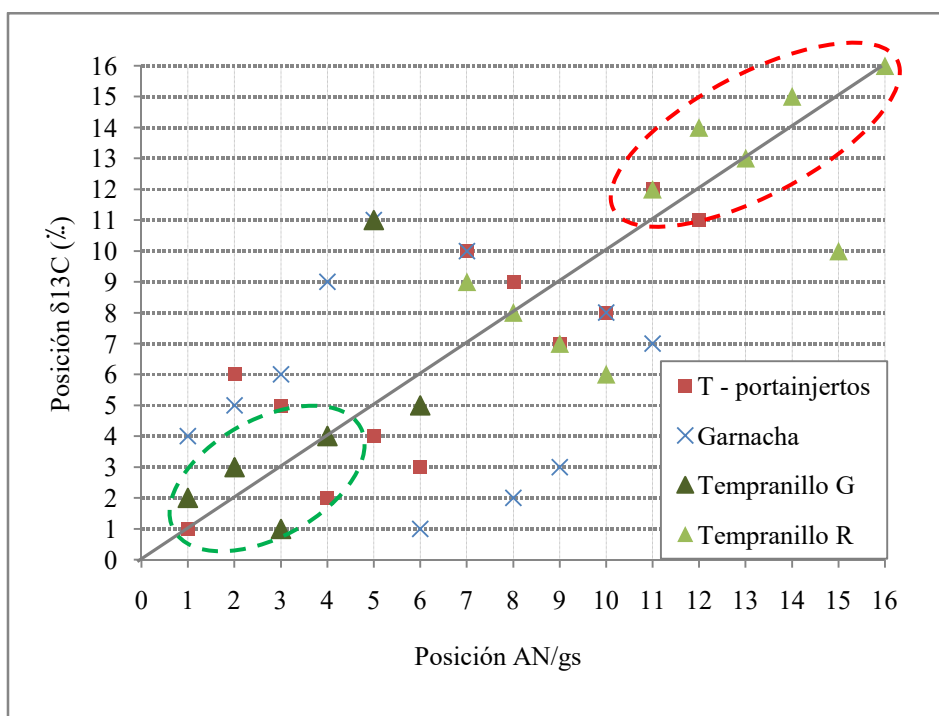
**Tabla 4.** Posición relativa y porcentaje residual calculado (valor observado respecto al esperado) en la conductancia estomática determinada ( $\text{g}_\text{s}$ ) para la discriminación isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y la  $\text{EUA}_i$  ( $\text{A}_\text{N}/\text{g}_\text{s}$ ) de toda la colección de genotipos y clones: Tempranillo, Garnacha y Tempranillo sobre distintos portainjertos (T-portainjertos) y el campo experimental (C.E.): Roda (R), La Granjera (G) y Vitis Navarra (VN).

Clase	C.E.	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)		$\text{A}_\text{N}/\text{g}_\text{s}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ )	
		% Residual	Posición	% Residual	Posición
<b>Tempranillo</b>					
232	G	2,7	1	-6,4	3
1048	G	1,3	2	8,7	1
1052	G	1,9	3	8,1	2
1078	G	-0,4	4	-4,0	4
1084	G	-0,2	5	-1,8	6
203	R	-6,7	6	-6,1	10
336	R	2,0	7	-3,9	9
178	R	0,3	8	1,8	8
6	R	0,3	9	6,3	7
243	R	-0,4	10	11,5	15
1371	G	4,1	11	2,5	5
215	R	-2,7	12	-16,2	11
166	R	1,0	13	8,1	13

108	R	-0,3	14	8,3	12
156	R	-0,4	15	5,7	14
137	R	-3,1	16	-17,7	16
<b>T - portainjertos</b>					
RG2	VN	3,5	1	3,8	1
1103P	VN	1,0	2	-0,5	4
SO4	VN	1,8	3	-0,6	6
RG6	VN	0,9	4	3,5	5
RG7	VN	-2,0	5	-2,0	3
RG9	VN	-2,1	6	2,8	2
RG4	VN	1,1	7	-6,5	9
RG3	VN	0,8	8	-6,7	10
420A	VN	-1,6	9	-1,1	8
110R	VN	-3,3	10	0,1	7
140RU	VN	1,9	11	5,4	12
RG8	VN	-2,5	12	3,0	11
<b>Garnacha</b>					
EV11	VN	3,8	1	-7,9	6
EV13	VN	3,0	2	1,2	8
EV14	VN	3,0	3	-7,9	9
ENTAV13	VN	1,5	4	5,8	1
ARA4	VN	0,5	5	5,1	2
ARA2	VN	0,5	6	0,0	3
ARA24	VN	0,4	7	3,0	11
RJ21	VN	0,1	8	3,4	10
VNQ	VN	-0,9	9	6,7	4
EV15	VN	-3,5	10	-1,4	7
ENTAV14	VN	-8,2	11	-7,5	5

La Figura 4 representa la posición relativa (Tabla 4) en ambos parámetros ( $\delta^{13}\text{C}$  y la  $\text{EUA}_i$ ) en toda la colección. En la variedad de Tempranillo, se observa que los clones con mejor y peor posición en los dos parámetros son coincidentes (extremos de la línea de regresión). Los genotipos con mayor EUA en los dos parámetros (de mayor a menor) son el 1048, 232, 1052 y 1078. En cambio, los de menor EUA en ambos parámetros son el 137, 156, 108, 166 y 215. En el tempranillo sobre distintos portainjertos, el genotipo con mayor EUA relacionando los dos parámetros es el RG2, seguido del 1103P. Los clones peor clasificados en este grupo son el 140RU y RG8. Los clones peor clasificados en este grupo son el 140RU y RG8. En general, si interpretamos como coincidentes (similares) los genotipos con valores de  $\pm 3$  en la posición relativa, se observa que los genotipos de Garnacha son los menos coincidentes, con solo 5 de 12 genotipos. En cambio, los T-portainjertos todos los genotipos están en una posición

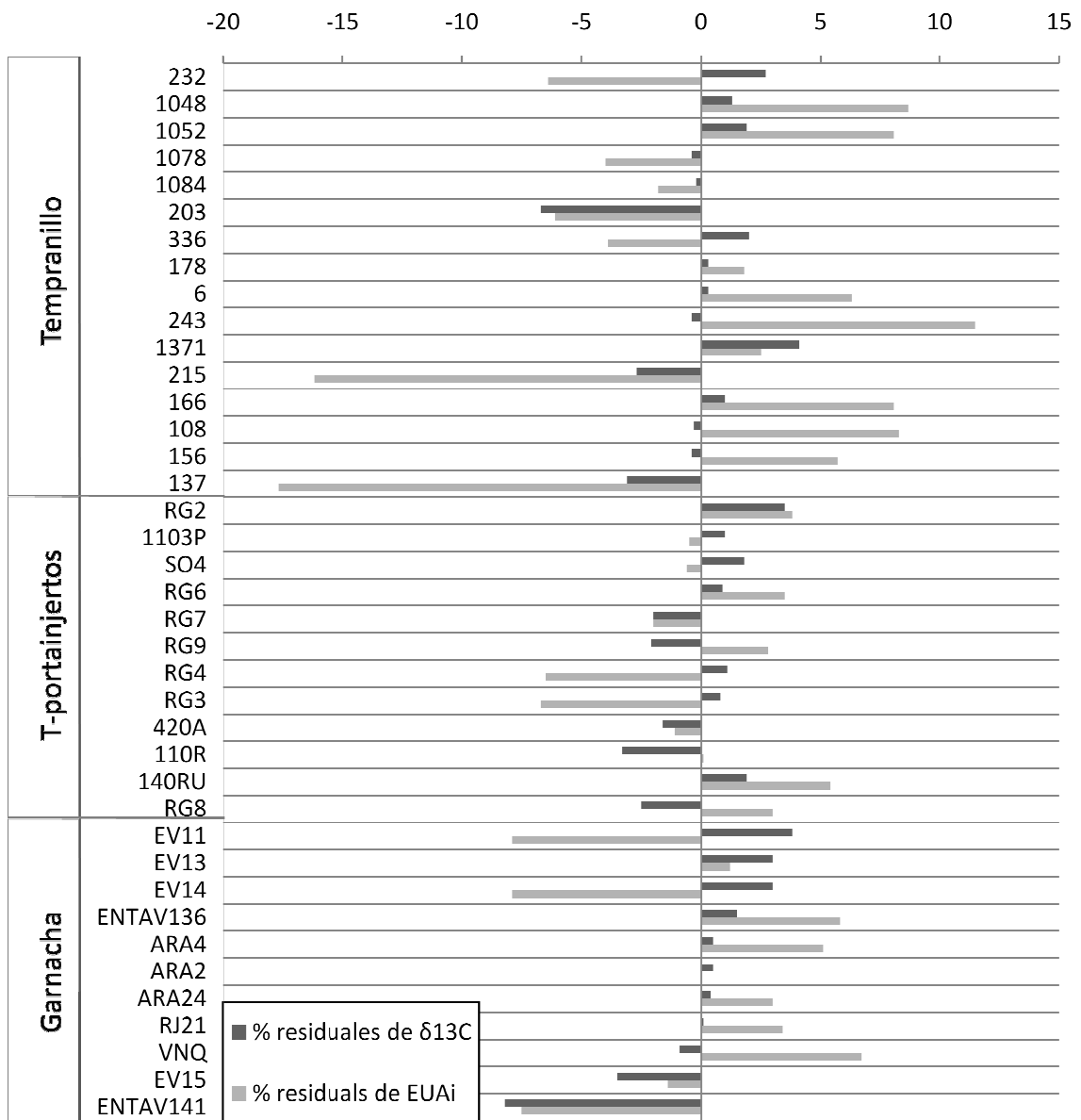
similar para los dos parámetros. En el resto de los genotipos de Tempranillo hay coincidencia en 13 de 16.



**Figura 4.** Representación de la posición relativa de los genotipos de Tempranillo en Roda (Tempranillo R) y La Granjera (Tempranillo G), Garnacha y Tempranillo sobre distintos portainjertos (T-portainjertos) en la discriminación isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y la  $\text{EUA}_i$  ( $\text{A}_\text{N}/\text{g}_\text{s}$ ).

En la Figura 5 se representan los porcentajes residuales en  $\text{EUA}_i$  (A) y la discriminación isotópica de  $^{13}\text{C}$  (B) respecto a  $\text{g}_\text{s}$ , de cada cultivar (Tabla 4). Se observa que los porcentajes residuales en  $\delta^{13}\text{C}$  se distribuyen en positivos y negativos en función de la posición relativa del genotipo (por encima o por debajo del valor esperado). Si interpretamos una concordancia en los porcentajes residuales como una coincidencia de signo, se observa una variabilidad entre parcelas. Los genotipos de T-portainjertos tienen una discrepancia máxima del 58%, que en los restantes de Tempranillo es del 31% y la Garnacha la discrepancia es mínima, con solo el 25%. En general, un 62% del total de los genotipos (39) son de signo coincidente en los porcentajes residuales en ambos parámetros.





**Figura 5.** Representación de los porcentajes residuales de la  $EUA_i$  (A) y de la discriminación isotópica de  $^{13}C$  (B) de los genotipos de Tempranillo, Garnacha y Tempranillo sobre distintos portainjertos (T-portainjertos) ordenados en función a la posición relativa en cada cultivar (Tabla 4).

## 4. Discusión

La selección de genotipos en base a la EUA presenta serias limitaciones que tienen que ver sobre todo con las dificultades de estimar la EUA de la planta entera en base a medidas concretas en distintos órganos o momentos de su ciclo. En pasadas investigaciones se ha demostrado esta dificultad en distintas variedades de vid y en diferentes tratamientos (Tomás et al., 2012; 2014; Bota et al., 2016; Medrano et al., 2010).

En anteriores trabajos se ha demostrado la existencia de variabilidad genética en la EUA determinada en base a valores instantáneos de  $EUA_i$  entre variedades de vid y entre clones de la variedad Tempranillo (Tortosa et al., 2016). La demostración de esta variabilidad abre el camino para iniciar un proceso de selección que permita identificar genotipos de mayor (o menor) EUA, y en este sentido recientes trabajos (Tortosa et al., 2019) muestran que en base a medidas instantáneas de la EUA en hoja pueden identificarse genotipos de mayor y menor EUA, con cierta consistencia entre distintos años y en distintas localizaciones.

Sin embargo, otros criterios de selección como el valor del  $\delta^{13}C$  presentan, al menos conceptualmente, la ventaja de ofrecer un valor integral del promedio de la EUA en el periodo de acumulación de biomasa en un órgano determinado (Farquhar y Richards, 1984; Bchir et al., 2016; Gaudillère et al., 2012; Santesteban et al., 2015), aunque su representatividad resulte a veces cuestionable (Tomas et al., 2014).

En el presente estudio se ha determinado el valor del  $\delta^{13}C$  en bayas de diferentes genotipos de vid y se han comparado respecto a los valores de la  $EUA_i$  en envero-maduración en diferentes clones y genotipos de vid y en distintas localizaciones. En ambos parámetros los valores están en el mismo rango de valores obtenidos en distintas investigaciones previas (Gaudillère et al., 2002; Tomàs et al., 2014, 2012; Tortosa et al., 2016). El trabajo pretende analizar la relación entre los valores de  $\delta^{13}C$  con respecto a los de la  $EUA_i$  de cada genotipo y analizar hasta qué punto los valores de discriminación isotópica son representativos de la EUA tomando como indicador de dicha EUA, los valores de  $A_N/g_s$ .

Respecto a la curva de relación universal (Fig. 1) entre la conductancia estomática y la fotosíntesis neta (Flexas et al., 2013; Flexas et al., 2004; Waren, 2007; Tortosa et al., 2019) los valores obtenidos siguen la distribución esperable, aunque la abundancia de puntos es mayor en la zona de ausencia de estrés hídrico. En esta distribución, la variedad Garnacha destaca por los valores altos de  $A_N$  para los mismos valores de  $g_s$ , lo que indica valores de  $EUA_i$  más elevados de acuerdo con su reputación de alta resistencia a la sequía y mayor economía del agua (Martorell et al., 2015).

Habitualmente, la conductancia estomática ( $g_s$ ) es un parámetro que determina la  $EUA$  con valores de  $R^2$  muy altos (Bota et al., 2016), por lo que se correlaciona bien con la  $EUA_i$ . La relación de  $g_s$  respecto a la  $EUA_i$  (Fig. 2A) sigue una clara correlación negativa muy definida (Tortosa et al., 2019), con pocas diferencias entre parcelas (efecto también observado en la Figura 1). En general, toda la colección de clones y genotipos se posicionan en una recta conjunta, con una ligera variación entre variedades y parcelas. En cambio, estas pequeñas diferencias se acentúan en la relación de  $g_s$  con la discriminación isotópica de  $^{13}C$  (Fig. 2B). En este caso, el efecto entre cultivares en una misma localización (Garnacha y T-portainjertos) y de localización en diferentes parcelas (Tempranillos de Roda y La Grajera) queda más diferenciado que en la relación  $EUA_i/g_s$ . En este caso parece que los valores de  $\delta^{13}C$  discriminan mejor las diferencias.

En la correlación entre los valores de  $\delta^{13}C$  y  $EUA_i$  (Fig. 3) se observa una buena correspondencia para el grupo de Tempranillo sobre distintos portainjertos (T-portainjertos) y para los demás genotipos y clones de Tempranillo, que siguen una línea de regresión común para las dos localizaciones. Esta situación se refleja también en el trabajo de Tomàs et al. (2012). En cambio, en los genotipos de Garnacha esta relación no se cumple, obteniendo una nube de puntos con poca variación en el rango de  $EUA_i$  (60-80  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ), pero una diferencia notable en los valores de  $\delta^{13}C$  (de -27 a -23,5 ‰). Esta falta de relación puede ser debida a las características singulares de cada planta muestreada dentro del cultivo (Martorell et al., 2015; Chaves et al., 2010), que se traducen en una mayor oscilación de los valores de  $EUA_i$  probablemente por variaciones locales en la disponibilidad hídrica. Al igual que en la Figura 2, el parámetro de  $\delta^{13}C$  muestra además una diferenciación de parcelas en genotipos de Tempranillo. En cambio, este mismo efecto no está reflejado en referencia a los datos de

EUA<sub>i</sub> (también representado en la Figura 2A). La EUA<sub>i</sub> es un parámetro que no siempre refleja la EUA de la planta entera (Tomàs et al., 2014), ya que su valor es muy variable dentro de una misma planta y dependiente de las condiciones ambientales (Medrano et al., 2015b). Por lo que para realizar el análisis comparativo de los dos parámetros un solo muestreo de la EUA<sub>i</sub> puede resultar limitado. Además, en base a la regresión general (línea negra) se podría deducir que una oscilación del 6% en discriminación del <sup>13</sup>C, provoca una variación de 60 μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O en A<sub>N</sub>/g<sub>s</sub>. Esta deducción tiene en cualquier caso un valor relativo puesto que la regresión tiene un valor relativamente bajo (R<sup>2</sup>=0,43).

En este estudio, los datos de δ<sup>13</sup>C señalan diferencias en la EUA entre parcelas y/o cultivos que en la EUA<sub>i</sub> no se ha observado (Fig. 2 y 3). Este efecto puede ser debido a que los datos de EUA<sub>i</sub> son representativos del momento de medida, y por lo tanto a las condiciones ambientales y el estado hídrico de la planta en ese momento. En cambio, la discriminación isotópica de <sup>13</sup>C es un parámetro acumulativo en el tiempo de formación de la masa seca analizada (Santesteban et al., 2015; Chaves et al., 2007). Por este motivo, se eligió analizar bayas en la etapa de envero y maduración (síntesis y acumulación de azúcares), ya que es la etapa donde la planta suele padecer déficit hídrico (julio-agosto) y se observan los distintos comportamientos en cuanto a los valores de EUA (Bchir et al., 2016).

Respecto a la búsqueda de genotipos con mayor eficiencia en uso del agua (EUA) en los distintos grupos analizados, se observa una buena relación entre la posición relativa en ambos parámetros en los grupos de Tempranillo, especialmente en los genotipos con mejor y peor EUA (Fig. 4). Comparando diferentes variedades de vid, Bota et al. (2016) muestran coincidencias de rango similares. Este mismo efecto se observa en los porcentajes residuales (Fig. 5) donde, en general, los genotipos con mejor y peor posición relativa en EUA coinciden en ambos parámetros. Además, el porcentaje residual de EUA<sub>i</sub> tiende a un error más elevado debido a la alta variabilidad de este parámetro (Medrano et al., 2015b).

Para identificar los genotipos con mayor y peor eficiencia en ambos parámetros se han comparado las posiciones relativas y los porcentajes residuales, escogiendo los genotipos con valores coincidentes en δ<sup>13</sup>C y EUA<sub>i</sub>. Se concluye que en la colección de

Tempranillos, los genotipos 232 y 1048 coinciden en valores altos de la EUA y el 137 coincide por su valor bajo. En referencia a los genotipos de Garnacha, no hay ningún genotipo claro con alta EUA coincidente entre los distintos parámetros. Aun así, los genotipos ENTAV136 y ARA4 están bien calificados en referencia a  $A_N/g_s$ , y los EV11, EV13 y EV14 a  $\delta^{13}C$ . En cambio, el genotipo con menor EUA en Garnacha es el ENTAV141. Respecto a los T-portainjertos, el genotipo RG2 tiene un comportamiento con una clara tendencia de mayor EUA, y el RG8 como menos.

Los presentes resultados muestran una notable diferencia en ambos parámetros entre los genotipos con mayor y peor EUA ( $45-90 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$  en  $EUA_i$  y 3‰ en  $\delta^{13}C$ ) que, a gran escala, supondría una gran diferencia a nivel de utilización del agua disponible en suelo. Queda por comprobar si estas diferencias entre EUA además de tienen un componente genético identificable, o bien, están influenciadas por distintas condiciones edáficas de cada parcela, por lo que se necesita más años de determinación conjunta de la  $EUA_i$  y la  $\delta^{13}C$  para esclarecer con mayor seguridad un efecto neto del genotipo.

Por otra parte, el presente trabajo muestra que la utilización de la discriminación isotópica de carbono puede ser un parámetro alternativo a las medidas directas en campo de la  $EUA_i$ . Puesto que este parámetro refleja la media del estado hídrico durante un tiempo más largo, el período de síntesis de la masa seca de la muestra utilizada podría resultar una alternativa interesante en los programas de selección. Aun así, son necesarias más investigaciones comparativas entre los dos parámetros para confirmar la mayor o menor capacidad de discriminación de cada una de las dos vías de estimación de la EUA. Por otra parte, el análisis de discriminación del isótopo  $^{13}C$  es un criterio muy interesante porque requiere un simple muestreo representativo de bayas, y ofrece valores integrados de la EUA en unos periodos de 1-2 meses que coincide con el de mayor probabilidad de estrés hídrico en campo. Sin embargo, el muestreo “in situ” de la  $EUA_i$  comporta una considerable influencia de las condiciones ambientales concretas del día de medida y resulta más complejo y engorroso de medir. El uso del  $^{13}C$ , tiene la ventaja de poder ampliar mucho más el número de muestras manejables y un procesamiento más cómodo con un coste relativamente reducido.

Este estudio constituye una primera aproximación comparativa que muestra además la ventaja de una mayor capacidad de discriminación en el  $^{13}\text{C}$  en cuanto a reflejar las distintas localizaciones de muestreo.

La valoración comparativa definitiva requiere mayor amplitud de muestreos y un análisis más amplio que permita concluir sobre la efectividad de cada uno de estos dos criterios de selección en la mejora de la EUA en vid.

## 5. Bibliografía

- Bchir, A., Escalona, J. M., Gallé, A., Hernández-Montes, E., Tortosa, I., Braham, M., & Medrano, H. (2016). Carbon isotope discrimination ( $\delta^{13}\text{C}$ ) as an indicator of vine water status and water use efficiency (WUE): Looking for the most representative sample and sampling time. *Agricultural water management*, 167, 11-20.
- Bota, J., Medrano, H., & Stasyk, O. (2003). Effect of drought on carbon partitioning in grapevine plants. In *Jornadas GESCO, 13., 2003, Montevideo, Uruguay.* Universidad de la República; INIA.
- Bota, J., Tomás, M., Flexas, J., Medrano, H., & Escalona, J. M. (2016). Differences among grapevine cultivars in their stomatal behavior and water use efficiency under progressive water stress. *Agricultural Water Management*, 164, 91-99.
- Carbonell-Bejerano, P., Santa María, E., Torres-Pérez, R., Royo, C., Lijavetzky, D., Bravo, G., ... & Martínez-Zapater, J. M. (2013). Thermotolerance responses in ripening berries of *Vitis vinifera* L. cv Muscat Hamburg. *Plant and Cell Physiology*, 54(7), 1200-1216.
- Chaves, M. M., Santos, T. P., Souza, C. D., Ortuño, M. F., Rodrigues, M. L., Lopes, C. M., ... & Pereira, J. S. (2007). Deficit irrigation in grapevine improves water-use efficiency while controlling vigour and production quality. *Annals of Applied Biology*, 150(2), 237-252
- Chaves, M. M., Zarrouk, O., Francisco, R., Costa, J. M., Santos, T., Regalado, A. P., ... & Lopes, C. M. (2010). Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Annals of botany*, 105(5), 661-676.
- Collins, M., Knutti, R., Arblaster, J., Dufresne, J. L., Fichet, T., Friedlingstein, P., ... & Shongwe, M. (2013). Long-term climate change: projections, commitments and irreversibility. In *Climate Change 2013-The Physical Science Basis: Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 1029-1136). Cambridge University Press.
- De Souza, C. R., Maroco, J. P., dos Santos, T. P., Rodrigues, M. L., Lopes, C. M., Pereira, J. S., & Chaves, M. M. (2005). Impact of deficit irrigation on water use

efficiency and carbon isotope composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of field-grown grapevines under Mediterranean climate. *Journal of Experimental Botany*, 56(418), 2163-2172.

Farquhar, G. D., & Richards, R. A. (1984). Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Functional Plant Biology*, 11(6), 539-552.

Fischer, R. A., & Turner, N. C. (1978). Plant productivity in the arid and semiarid zones. *Annual Review of Plant Physiology*, 29(1), 277-317.

Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., & Sharkey, T. D. (2004). Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant biology*, 6(03), 269-279.

Flexas, J., Galmés, J., Gallé, A., Gulías, J., Pou, A., RIBAS-CARBO, M., ... & Medrano, H. (2010). Improving water use efficiency in grapevines: potential physiological targets for biotechnological improvement. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, 106-121.

Flexas, J., Niinemets, Ü., Gallé, A., Barbour, M. M., Centritto, M., Diaz-Espejo, A., ... & Rosselló, F. (2013). Diffusional conductances to CO<sub>2</sub> as a target for increasing photosynthesis and photosynthetic water-use efficiency. *Photosynthesis research*, 117(1-3), 45-59.

Gaudillère, J. P., Van Leeuwen, C., & Ollat, N. (2002). Carbon isotope composition of sugars in grapevine, an integrated indicator of vineyard water status. *Journal of experimental Botany*, 53(369), 757-763.

Gibberd, M. R., Walker, R. R., Blackmore, D. H., & Condon, A. G. (2001). Transpiration efficiency and carbon-isotope discrimination of grapevines grown under well-watered conditions in either glasshouse or vineyard. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(3), 110-117.



- Guo, D., Zhang, J., Liu, C., Zhang, G., Li, M., & Zhang, Q. (2012). Genetic variability and relationships between and within grape cultivated varieties and wild species based on SRAP markers. *Tree genetics & genomes*, 8(4), 789-800.
- Ibáñez, J., Carreño, J., Yuste, J., & Martínez-Zapater, J. M. (2015). Grapevine breeding and clonal selection programmes in Spain. In *Grapevine breeding programs for the wine industry* (pp. 183-209). Woodhead Publishing.
- Jones, G. V., Reid, R., & Vilks, A. (2012). Climate, grapes, and wine: structure and suitability in a variable and changing climate. In *The Geography of Wine* (pp. 109-133). Springer, Dordrecht.
- Laucou, V., Lacombe, T., Dechesne, F., Siret, R., Bruno, J. P., Dessup, M., ... & Santoni, S. (2011). High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management. *Theoretical and Applied Genetics*, 122(6), 1233-1245.
- Martorell, S., Diaz-Espejo, A., Tomàs, M., Pou, A., El Aou-ouad, H., Escalona, J. M., ... & Medrano, H. (2015). Differences in water-use-efficiency between two *Vitis vinifera* cultivars (Grenache and Tempranillo) explained by the combined response of stomata to hydraulic and chemical signals during water stress. *Agricultural Water Management*, 156, 1-9.
- Medrano, H., Escalona, J. M., Bota, J., Gulías, J., & Flexas, J. (2002). Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of botany*, 89(7), 895-905.
- Medrano, H., Pou, A., Tomàs, M., Martorell, S., Escalona, J. M., Gulias, J., & Flexas, J. (2010, August). Improving water use efficiency in grapevines: agronomic and biotechnological approaches. In *XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on the 931* (pp. 97-107).
- Medrano, H., Tomás, M., Martorell, S., Escalona, J. M., Pou, A., Fuentes, S., Jaume, F., & Bota, J. (2015a). Improving water use efficiency of vineyards in semi-arid regions. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(2), 499-517.

- Medrano, H., Tomás, M., Martorell, S., Flexas, J., Hernández, E., Rosselló, J., ... & Bota, J. (2015b). From leaf to whole-plant water use efficiency (WUE) in complex canopies: limitations of leaf WUE as a selection target. *The Crop Journal*, 3(3), 220-228.
- Medrano, H., Tortosa, I., Montes, E., Pou, A., Balda, P., Bota, J., & Escalona, J. M. (2018). Genetic improvement of grapevine (*Vitis vinifera* L.) water use efficiency: variability among varieties and clones. In *Water Scarcity and Sustainable Agriculture in Semiarid Environment* (pp. 377-401). Academic Press.
- OIV. (2018). Aspectos sobre la coyuntura mundial, Abril de 2018.
- Parry, M. A. J., Madgwick, P. J., Carvalho, J. F. C., & Andralojc, P. J. (2007). Prospects for increasing photosynthesis by overcoming the limitations of Rubisco. *The Journal of Agricultural Science*, 145(1), 31.
- Pou, A., Gulías, J., Moreno, M., Tomàs, M., Medrano, H., & Cifre, J. (2011). Cover cropping in *Vitis vinifera* L. cv. Manto Negro vineyards under Mediterranean conditions: Effects on plant vigour, yield and grape quality. *OENO One*, 45(4), 223-234.
- Romero, P., Fernández-Fernández, J. I., & Martínez-Cutillas, A. (2010). Physiological thresholds for efficient regulated deficit-irrigation management in winegrapes grown under semiarid conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61(3), 300-312.
- Sabir, A., Kafkas, E., & Tangolar, S. (2010). Distribution of major sugars, acids, and total phenols in juice of five grapevine (*Vitis* spp.) cultivars at different stages of berry development. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8(2), 425-433.
- Sadras, V. O. (2009). Does partial root-zone drying improve irrigation water productivity in the field? A meta-analysis. *Irrigation Science*, 27(3), 183-190.
- Santesteban, L. G., Miranda, C., Barbarin, I., & Royo, J. B. (2015). Application of the measurement of the natural abundance of stable isotopes in viticulture: a review. *Australian journal of grape and wine research*, 21(2), 157-167.

- Soar, C. J., Dry, P. R., & Loveys, B. R. (2006). Scion photosynthesis and leaf gas exchange in *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz: mediation of rootstock effects via xylem sap ABA. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *12*(2), 82-96.
- Stoll, M., Loveys, B., & Dry, P. (2000). Hormonal changes induced by partial rootzone drying of irrigated grapevine. *Journal of experimental botany*, *51*(350), 1627-1634.
- Tomás, M., Medrano, H., Pou, A., Escalona, J. M., Martorell, S., Ribas-Carbó, M., & Flexas, J. (2012). Water-use efficiency in grapevine cultivars grown under controlled conditions: effects of water stress at the leaf and whole-plant level. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *18*(2), 164-172.
- Tomás, M., Medrano, H., Escalona, J. M., Martorell, S., Pou, A., Ribas-Carbó, M., & Flexas, J. (2014). Variability of water use efficiency in grapevines. *Environmental and Experimental Botany*, *103*, 148-157.
- Tortosa, I., Escalona, J. M., Bota, J., Tomas, M., Hernandez, E., Escudero, E. G., & Medrano, H. (2016). Exploring the genetic variability in water use efficiency: evaluation of inter and intra cultivar genetic diversity in grapevines. *Plant Science*, *251*, 35-43.
- Tortosa, I., Escalona, J. M., Douthe, C., Pou, A., Garcia-Escudero, E., Toro, G., & Medrano, H. (2019). The intra-cultivar variability on water use efficiency at different water status as a target selection in grapevine: Influence of ambient and genotype. *Agricultural Water Management*, *223*, 105648.
- Vandeleur, R. K., Mayo, G., Shelden, M. C., Gilliam, M., Kaiser, B. N., & Tyerman, S. D. (2009). The role of plasma membrane intrinsic protein aquaporins in water transport through roots: diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. *Plant Physiology*, *149*(1), 445-460
- Van Leeuwen, C., Roby, J. P., Alonso-Villaverde, V., & Gindro, K. (2012). Impact of clonal variability in *Vitis vinifera* Cabernet franc on grape composition, wine

quality, leaf blade stilbene content, and downy mildew resistance. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(1), 19-24.

Warren, C. R. (2007). Stand aside stomata, another actor deserves centre stage: the forgotten role of the internal conductance to CO<sub>2</sub> transfer. *Journal of Experimental Botany*, 59(7), 1475-1487.