



Universitat de Lleida

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria
Departamento de Producción Vegetal y Ciencia Forestal

**EMPLEO DE TÉCNICAS NO DESTRUCTIVAS EN LA
SINTOMATOLOGÍA DE LA RESPUESTA DE LA
VEGETACIÓN ARBÓREA DE INTERÉS FORESTAL A
DISTINTOS FACTORES ABIÓTICOS DE ESTRÉS**

Memoria presentada por

José Javier Peguero Pina

para optar al grado de Doctor por la Universitat de Lleida

Directores: Dr Eustaquio Gil Pelegrín (C.I.T.A. de Aragón)
Dr. Fermín Morales Iribas (E.E.A.D. – C.S.I.C.)

Zaragoza
Mayo 2008

Agradecimientos

Tengo la convicción, no sé si acertada o equivocada, de que hay momentos en la vida de una persona que hacen que el futuro personal cambie irremediamente. Personalmente, uno de esos momentos fue el día que empecé a trabajar en la Unidad de Recursos Forestales del C.I.T.A. (por aquel entonces S.I.A.) de Aragón. He de confesar que jamás pensé que un Bioquímico acabaría haciendo una Tesis Doctoral sobre ecofisiología forestal, aunque también tengo que decir que la experiencia ha sido muy satisfactoria y enriquecedora, tanto desde un punto de vista personal como profesional. Por lo tanto, tengo que agradecer la ayuda prestada por todas aquellas personas con las que he tenido el placer de trabajar y, sobre todo, aprender a desenvolverme en el mundo científico. A todos ellos, muchas gracias.

En primer lugar quiero agradecer a Eustaquio Gil y Fermín Morales la dirección de esta Tesis. Su intensa dedicación y ayuda en el planteamiento de las hipótesis y en el desarrollo de los trabajos experimentales ha sido fundamental para la consecución de este trabajo. Eustaquio ha sido mi guía a través del fascinante universo de la ecología funcional, siendo el motor que ha proporcionado una inagotable energía en el planteamiento de hipótesis y experimentos. Fermín me ha proporcionado las bases teóricas y prácticas de gran parte de las técnicas empleadas en esta Tesis, además de ser parte fundamental en el planteamiento de los trabajos. El trabajo en equipo y el constante apoyo que ambos me han proporcionado han constituido la piedra angular sobre la que se ha edificado esta Tesis. Espero seguir teniendo la oportunidad de colaborar y compartir proyectos con ambos en el futuro.

Agradezco a la Unidad de Recursos Forestales del C.I.T.A. de Aragón todo el apoyo y facilidades que me han dado para poder realizar este trabajo. Desde aquí mi más profundo agradecimiento a Eduardo, Leyre, Carmen, Jesús, Manuel, Pepín y especialmente a Chema, mi compañero de fatigas durante los últimos tiempos. También me gustaría recordar a otros compañeros con los que, durante más o menos tiempo, he tenido la satisfacción de compartir horas de laboratorio y campo, especialmente a Marta, María, Sonia, Santi, Mónica y, especialmente, a Carmen. Por último, no me quiero olvidar de las personas que me encontré durante mis primeros años aquí, especialmente a Jordán, Sergio, Chechu, Miguelón, Hocine y Kiko. Con

algunos de ellos he pasado momentos memorables, tanto dentro como fuera del trabajo.

Agradezco el apoyo económico y humano prestado por la Dirección General del Medio Natural del Departamento de Medio Ambiente del Gobierno de Aragón, especialmente a Enrique Martín. Sin su apoyo habría sido imposible llegar hasta aquí. También quiero expresar mi agradecimiento a los compañeros del Unidad de Salud de los Bosques: Nieves, Laura, Félix, David, Ángela y el resto del personal, ya que con gente de esa calidad humana y profesional es un placer colaborar.

Quiero expresar mi agradecimiento al equipo de Javier y Monona Abadía, de la Estación Experimental de Aula Dei – C.S.I.C. por el apoyo prestado para la realización de una parte importante del trabajo experimental de esta Tesis. Me gustaría agradecer especialmente la ayuda prestada por Ruth para el manejo del HPLC.

También me gustaría mencionar a otros investigadores con los que he tenido el placer de colaborar y de los que he tenido la posibilidad de aprender muchas cosas, especialmente a Ismael Moya y Jaume Flexas.

A mis padres, Joaquín y Esperanza y a toda mi familia, tíos y primos, por darme todo su cariño y apoyo, tanto en los momentos buenos como en los malos. También me gustaría recordar a mis abuelos, que han formado parte de mi vida y han influido tanto en mí.

A ti, Marta, quiero agradecerte tu apoyo constante, tu paciencia y los ánimos que siempre me das. Es difícil expresar en pocas palabras todo lo que me has ayudado. Contigo todo resulta más fácil, gracias por estar siempre a mi lado.

Por último, en este capítulo de agradecimientos no podían faltar de ninguna manera nombres como Miguel Ángel, Jorge G., Luis, Víctor, Gustavo y Yolanda, Gonzalo y Ana, Jorge y Pilar, Tomás y M^a Carmen, Miguel, Dani, etc., por los grandes momentos vividos durante todos estos años y por los que nos quedan por vivir. Además, quiero agradecer de manera muy especial a las personas con las que tantas y tantas horas hemos compartido alegrías y tristezas tras las mesas del Serón: Jorge S., Leonor y Rakel. Los cuatro hemos compartido viajes, juergas, alegrías y alguna que otra pena. Habéis estado presentes en los momentos más importantes de mi vida durante todos estos años, muchas gracias por estar siempre ahí.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo 1. Introducción general.....	1
Capítulo 2. Comportamiento fisiológico de dos poblaciones de abeto blanco (<i>Abies alba</i> Mill.) bajo condiciones climáticas contrastadas cerca del límite suroccidental de distribución de la especie.....	29
Capítulo 3. La fluorescencia de clorofila en el clorénquima cortical de la corteza: un nuevo indicador no destructivo de daño por helada en ramas de <i>Pinus sylvestris</i> L....	51
Capítulo 4. Funcionamiento diferencial del aparato fotosintético de tres especies mediterráneas del género <i>Quercus</i> bajo condiciones de estrés hídrico intenso.....	71
Capítulo 5. Fotoquímica, medida a distancia del índice de reflectancia fisiológico y estado de de-epoxidación del ciclo de las xantofilas en <i>Quercus coccifera</i> bajo condiciones de sequía intensa.....	93
Capítulo 6. Análisis temporal de la cinética de los cambios en la reflectancia en el verde, la fluorescencia de clorofila y el ciclo de las xantofilas durante cambios bruscos en la intensidad lumínica.....	121
Capítulo 7. Análisis detallado de la eficiencia potencial máxima del PSII a través de las hojas de <i>Quercus coccifera</i> : existencia de un gradiente vertical con bajas eficiencias en la parte más interna del mesófilo.....	139
Capítulo 8. Conclusiones generales y futuras líneas de investigación.....	157
Bibliografía.....	167

RESUMEN

Esta Memoria, aunque estructurada en varias partes, tiene, como eje común, el empleo y puesta a punto de diversas técnicas basadas en la fluorescencia de clorofila y la reflectancia espectral para el estudio de procesos de decaimiento forestal o procesos donde la vegetación se ve sometida a diversos estreses. La primera parte de la Memoria se ocupa de dos de los recientes fenómenos de decaimiento observados en Aragón. Concretamente, en el capítulo 2 se estudia el comportamiento fisiológico de ramas y acículas de una población en decaimiento y de una población sana de *Abies alba*, cercanas pero climáticamente contrastadas. En este capítulo se analiza la influencia que ha podido tener la combinación del estrés climático con factores locales, tales como desordenes nutricionales, en este episodio de decaimiento. El capítulo 3 se enmarca dentro del decaimiento de *Pinus sylvestris* observado en la provincia de Teruel. La posible vinculación de este fenómeno con daños por helada sirvió como base para la puesta a punto de la medida de fluorescencia de clorofila para testar la resistencia a temperaturas de congelación de los tejidos vivos del *cambium*. La segunda parte de la Memoria se ocupa del estudio del funcionamiento de la vegetación esclerófila mediterránea frente al estrés hídrico y lumínico. El desarrollo de nuevas herramientas de detección de diversos estreses basadas en la reflectancia espectral y en la fluorescencia de clorofila es uno de los aspectos de los que se ocupa esta parte de la Memoria. En el capítulo 4 se estudia el comportamiento diferencial del fotosistema II de tres especies esclerófilas mediterráneas (*Quercus coccifera*, *Q. suber* y *Q. ilex*) frente al estrés hídrico y en las consecuencias que puede tener ante un escenario de incremento de la aridez. El capítulo 5 se ocupa del estudio de los cambios del PRI en *Q. coccifera* frente al estrés hídrico. La elección de esta especie se basa en su extraordinaria resistencia al déficit hídrico, en sus mecanismos de fotoprotección y en su importancia como especie formadora de paisaje en el área mediterránea. En el capítulo 6 se profundiza en el conocimiento de los cambios a corto plazo en la señal del PRI en *Q. coccifera* frente a un súbito incremento en la radiación solar incidente. La última parte de la Memoria (capítulo 7) tiene en cuenta diversos aspectos metodológicos relacionados con las medidas de fluorescencia de clorofila, discutiéndose la influencia de la longitud de onda de la luz de excitación y detección del instrumento en los parámetros obtenidos. Finalmente, en el capítulo 8 se hace un resumen de las principales conclusiones de este trabajo y se exponen las futuras líneas de investigación.

RESUM

Aquesta Memòria, encara que estructurada en diverses parts, té, com eix comú, l'ocupació i posada a punt de diverses tècniques basades en la fluorescència de clorofil·la i la reflectància espectral per a l'estudi de processos de decaïment forestal o processos on la vegetació es veu sotmesa a estrès. La primera part de la Memòria s'ocupa de dues dels recents fenòmens de decaïment observats a Aragó. Concretament, en el capítol 2 s'estudia el comportament fisiològic de branques i fulles d'una població en decaïment i d'una població sana de *Abies alba*, properes però climàticament contrastades. En aquest capítol s'analitza la influència que ha pogut tenir la combinació de l'estrès climàtic amb factors locals, tals com desordenis nutricionals, en aquest episodi de decaïment. El capítol 3 s'emmarca dintre del decaïment de *Pinus sylvestris* observat en la província de Terol. La possible vinculació d'aquest fenomen amb danys per gelada ha servit per a la posada a punt de la mesura de fluorescència de clorofil·la per a testar la resistència a temperatures de congelació dels teixits vius del *cambium*. La segona part de la Memòria s'ocupa de l'estudi del funcionament de la vegetació esclerofil·la mediterrània enfront de l'estrès hídric i lumínic. El desenvolupament de noves eines de detecció de l'estrès basades en la reflectància espectral i en la fluorescència de clorofil·la és un dels aspectes dels quals s'ocupa aquesta part de la Memòria. En el capítol 4 s'estudia el comportament diferencial del fotosistema II de tres espècies esclerofil·las mediterrànies (*Quercus coccifera*, *Q. suber* i *Q. ilex*) enfront de l'estrès hídric i en les conseqüències que pot tenir davant un escenari d'increment de la aridez. El capítol 5 s'ocupa de l'estudi dels canvis del PRI en *Q. coccifera* enfront de l'estrès hídric. L'elecció d'aquesta espècie es basa en la seva extraordinària resistència al dèficit hídric, en els seus mecanismes de fotoprotecció i en la seva importància com espècie formadora de paisatge en l'àrea mediterrània. En el capítol 6 s'aprofundeix en el coneixement dels canvis a curt termini en el senyal del PRI en *Q. coccifera* enfront d'un sobtat increment en la radiació solar incident. L'última part de la Memòria (capítol 7) té en compte diversos aspectes metodològics relacionats amb les mesures de fluorescència de clorofil·la, discutint-se la influència de la longitud d'ona de la llum d'excitació i detecció de l'instrument en els paràmetres obtinguts. Finalment, en el capítol 8 es fa un resum de les principals conclusions d'aquest treball i s'exposen les futures línies d'investigació.

SUMMARY

Although this report is structured in several parts, it has in common the development and use of various techniques based on chlorophyll fluorescence and spectral reflectance for studying forest decline or processes where vegetation is subjected to various stresses. The first part of the report deals with two of the recent forest decline episodes observed in Aragón. Specifically, Chapter 2 shows the physiological performance of branches and needles in two nearby but climatically contrasting populations of *Abies alba*. This chapter discusses the influence of a combination of climatic stress with local factors such as nutritional disorders, in this decline episode. Chapter 3 is included in the decline of *Pinus sylvestris* observed in Teruel province. Frost damage as the possible causing factor of this phenomenon served as a basis for the development of chlorophyll fluorescence to test freezing tolerance in cambial living tissues. The second part of the report deals with the study of the performance of Mediterranean sclerophyllous vegetation to water and light stress. The development of new tools for the detection of various stresses based on spectral reflectance and chlorophyll fluorescence measurements is a matter included in this part of the report. Chapter 4 shows the differential photosystem II performance in three Mediterranean evergreen sclerophyllous species (*Quercus coccifera*, *Q. ilex* and *Q. suber*) under drought stress conditions and the possible consequences of this performance before a scene of increasing aridity. Chapter 5 deals with the study of changes in the PRI in *Q. coccifera* under drought stress conditions. This species was selected because its extraordinary resistance to water deficit, its photoprotection mechanisms and its importance as a species forming landscape in the Mediterranean area. Chapter 6 studies in depth the short-term changes in the PRI signal in *Q. coccifera* due to a sudden increase in PPFD. The last part of the report (Chapter 7) takes into account various methodological issues related to the measurement of chlorophyll fluorescence, showing the influence of the excitation and detection wavelengths of the instrument on the parameters obtained. Finally, Chapter 8 provides a summary of the main conclusions of this work and outlines future research.

CAPÍTULO 1

Introducción general

1.1. Introducción.....	2
1.2. Efectos del cambio climático sobre la vegetación de la Península Ibérica.....	4
1.3. El decaimiento forestal.....	6
1.3.1. Antecedentes históricos.....	6
1.3.2. El decaimiento forestal en la Península Ibérica.....	7
1.3.3. El decaimiento forestal en Aragón.....	9
1.4. La paradoja de la “seca” de los robles perennifolios mediterráneos.....	9
1.5. Estrategias de la vegetación frente a la sequía.....	11
1.6. La vegetación esclerófila mediterránea: ¿un grupo funcional homogéneo?.....	13
1.6.1. La esclerofilia y su posible influencia en la resistencia a la sequía.....	13
1.6.2. Vulnerabilidad a la cavitación por estrés hídrico en la vegetación mediterránea.....	17
1.6.3. El caso de las “dos encinas”.....	18
1.6.4. La diversidad de la vegetación mediterránea y el cambio global.....	19
1.7. El decaimiento de <i>Pinus sylvestris</i> L.: algo más que el clima.....	20
1.7.1. Presencia de <i>Pinus sylvestris</i> en la Península Ibérica.....	20
1.7.2. El decaimiento de <i>Pinus sylvestris</i> en la Sierra de los Filabres (Almería).....	21
1.7.3. El decaimiento de <i>P. sylvestris</i> en el Sistema Ibérico de la provincia de Teruel.....	22
1.8. El decaimiento de <i>Abies alba</i> Mill. en el Pirineo español: influencia del incremento de la aridez en el comportamiento fisiológico de la especie.....	24
1.9. Objetivos e hipótesis de la Tesis. Estructura de la Memoria.....	25

1.1. Introducción

“Nadie se baña en el río dos veces porque todo cambia en el río y en el que se baña”. Quinientos años antes de nuestra Era, Heráclito de Éfeso expresa con esta frase su concepción de la realidad natural como una entidad sometida a un continuo cambio. Los cambios constantes eran para este pensador los rasgos más básicos de la Naturaleza. Frente a esta visión, cada vez más consolidada, existe una obsoleta concepción fijista que concibe la Naturaleza como una acuarela enmarcada y colgada de un museo.

Muchas razones justifican la consideración del paisaje como una realidad en continuo cambio. Sobresalen por su importancia la existencia de cambios drásticos en el clima, con periodos extremadamente fríos (glaciaciones) seguidos de periodos más cálidos (interglaciares). Los efectos de una glaciación sobre el paisaje son absolutamente drásticos, produciendo fuertes modificaciones en la vegetación existente. El avance de los hielos desde el norte hacia latitudes meridionales y desde las cordilleras hacia las zonas de piedemonte desplaza la flora a medida que se reorganizan las relaciones ecológicas. En ese avance desaparecen elementos de la flora y la fauna, apareciendo otros nuevos como consecuencia del aislamiento en refugios donde la especie, subespecie o raza ha conseguido perdurar.

Sin embargo, aunque es absolutamente conocida la existencia de esta alternancia de períodos fríos y cálidos, parece que en la cabeza del observador de la Naturaleza ha anidado la idea de que tales fenómenos ocurrieron en el pasado y que forman parte de la protohistoria de nuestro paisaje. Además, es frecuente que estos fenómenos se contemplen como hechos drásticos, casi instantáneos, más que como ciclos lentos y prolongados en continua evolución. Ambos errores han contribuido a conformar una imagen fijista del paisaje.

Como ejemplo de estas alteraciones cíclicas en el clima entre glaciaciones baste señalar dos episodios de profundo efecto sobre la vegetación acaecidos en fechas mucho más próximas. El primero es el episodio conocido como el “calentamiento medieval”, entre los siglos IX y XIII, cuando parece que se registraron temperaturas superiores a las actuales. Este periodo fue sucedido por la denominada “pequeña edad del hielo” entre los siglos XV y XIX, episodio en el que las temperaturas sufrieron un fuerte descenso. Este episodio frío dejó testimonio en la

vegetación, como atestiguan las series de crecimiento obtenidas en pinos de Andalucía que soportaron semejante descenso térmico y que aún sobreviven. En el Prepirineo, los hayedos con boj (*Buxus sempervirens*) podrían ser consecuencia de la sustitución del quejigo (*Quercus faginea*) por el haya (*Fagus sylvatica*) a lo largo de este periodo frío. El avance del abeto (*Abies alba*) hacia posiciones más meridionales en los valles pirenaicos (abetares con boj) puede que responda al mismo fenómeno.

Por otro lado, la geología tampoco contribuye a la estabilidad de las condiciones ecológicas. La propia naturaleza de la corteza, formada por placas en continua construcción y creación, fuerza el afloramiento de nueva materia a través de los procesos volcánicos que se producen en el contacto de estas placas. Además de formar nuevo relieve, las erupciones contribuyen al aporte de gases de efecto invernadero, uno de los agentes causales del cambio global en las condiciones climáticas.

Por último, el hombre, o la sociedad por él formada, es un factor de modificación tan intenso y rápido que en lo práctico deja pequeño, paradójicamente, a cualquier causa astronómica, geológica o biológica. Basta consultar cualquier trabajo sobre la historia de un territorio para detectar profundas modificaciones en la fisonomía del paisaje como consecuencia del efecto del ser humano. La colonización romana, la reconquista, la desamortización y los profundos cambios producidos recientemente como resultado del abandono de la tierra, han dado tantas veces la vuelta al paisaje que hace que roce lo absurdo la búsqueda de referencias fijas en el mismo.

A pesar de todas estas evidencias de cambio, tanto la ciencia como la gestión forestal aún parecen estar centradas en el estudio de una realidad inmutable. Sin embargo, una realidad tan cambiante exige a la ciencia que pretenda estudiarla un enfoque mucho más amplio, flexible y tolerante con cualquier información que permita desentrañar las razones que justifican el actual paisaje. La propia Ecología, una de las disciplinas más integradoras de las Ciencias Naturales, parece “quedarse corta” ante esta demanda. Ya se habla de Ecogeografía, cuando los aspectos históricos, territoriales y antrópicos necesitan ser incorporados.

Frente a esta necesidad de máxima integración se presenta este conjunto de trabajos, consecuencia del estudio de diferentes aspectos muy concretos de la fisiología de diferentes especies leñosas de importancia en el paisaje forestal

aragonés e involucradas, como actores principales, en estos procesos de dinamismo vegetal a los que cada vez estamos más acostumbrados. Mi formación como Licenciado en Bioquímica me permitía adaptar mis esquemas de pensamiento de un modo fácil a mecanismos moleculares concretos. Mi menor familiarización con la ubicación de estos mecanismos en niveles de organización progresivamente más elevados y complejos – hasta alcanzar la escala de paisaje – me ha exigido un mayor esfuerzo. Sin embargo, una vez contemplada en su conjunto, considero que lo más fascinante ha sido la necesidad de adaptar en todo momento el enfoque de mi pensamiento. Sirva esta introducción general como manera de evidenciar que este recorrido vital a través de un paisaje en cambio puede hacerse desde la Bioquímica, siempre y cuando se tengan como compañeros de viaje otros profesionales que conocen cómo orientarse en medio de lo que para mí era, al principio, un horizonte sin referencias.

En esta introducción general trataré de clarificar los principales procesos ecológicos o ecogeográficos que enmarcan mis trabajos acerca de la fisiología de las plantas leñosas. Estos procesos son identificables como propios y concretos, ya que siempre tienen algo peculiar que los diferencia. Sin embargo, y en definitiva, tienen todos que ver con la necesidad de explicar qué justifica el evidente cambio que sufre en la actualidad el paisaje vegetal ibérico, en especial cuando este cambio lleva implícita la muerte masiva de poblaciones importantes de distintas especies arbóreas o arbustivas.

1.2. Efectos del cambio climático sobre la vegetación de la Península Ibérica

La Península Ibérica, considerada junto a otros países del Sur de Europa como un paradigma de mediterraneidad, ha constituido una referencia clásica en el estudio del efecto de la sequía estival sobre la vida de las plantas. En este universo mediterráneo, afectado por la combinación de altas temperaturas y escasas precipitaciones durante el verano, las plantas leñosas, que no pueden “escapar” del estrés hídrico mediante un ciclo de vida corto circunscrito a los periodos favorables del año, deben reducir la superficie transpirante en los momentos más críticos o producir hojas capaces de tolerar un alto grado de sequía ambiental o fisiológica. Por lo tanto,

la flora leñosa mediterránea constituye, en sus distintas formas y grados de xeromorfismo, un ejemplo de adaptación a la existencia de este periodo estival seco y cálido.

Sin embargo, la severidad y la frecuencia de las sequías extremas registradas a lo largo de las últimas décadas empieza a resultar preocupante, llegando a cuestionarse la capacidad de respuesta de la vegetación ante un progresivo incremento de la aridez, tal como predicen diferentes modelos climáticos (IPCC 2001). Es necesario aceptar que el futuro de muchas especies animales y vegetales, así como de algunas prácticas tradicionales en el uso del paisaje mediterráneo puede estar en serio peligro. Por lo tanto, el estudio de los procesos de decaimiento forestal asociados a episodios agudos de sequía o a un incremento crónico de la aridez va más allá de un mero ejercicio académico.

Uno de los efectos ecológicos esperables ante este escenario de cambio climático es una fuerte reducción en la ganancia neta de carbono de los sistemas forestales, mediado por un descenso en la capacidad de crecimiento del arbolado como consecuencia de un incremento de la tasa de respiración (asociado al incremento de temperatura) y un acortamiento del periodo vegetativo útil durante el verano (asociado a la mayor severidad de la aridez estival). Por otro lado, el aumento de la concentración de CO₂ atmosférico puede condicionar la capacidad fotosintética de las plantas leñosas. Aunque a corto plazo puede ser un factor que incremente la asimilación neta de CO₂ (Ceulemans & Mousseau 1994), a largo plazo podría ocasionar una regulación a la baja de la fotosíntesis debido a una disminución de la actividad de la enzima Rubisco (Van Oosten *et al.* 1992), ocasionada posiblemente por una retroalimentación negativa debido al exceso de carbohidratos (Sage *et al.* 1989).

El desarrollo de nuevas herramientas metodológicas que permitan diagnosticar el rendimiento fotosintético de las plantas bajo condiciones de sequía fisiológica puede contribuir a aumentar nuestra capacidad de investigación y, como consecuencia, nuestro conocimiento de la respuesta de las plantas a un aumento crónico y progresivo de la aridez. Por otro lado, el cambio progresivo del clima podría conllevar la sustitución progresiva de unas especies vegetales por otras, alterándose así la composición actual de las comunidades vegetales de la flora mediterránea.

1.3. El decaimiento forestal

1.3.1. Antecedentes históricos

El masivo decaimiento forestal registrado en el Hemisferio Norte desde los años 50 del siglo XX puede ser consecuencia del proceso de cambio climático. De hecho, estos procesos de muerte masiva del arbolado son cada vez más frecuentes, argumento utilizado para justificar su vínculo con la alteración crónica de los principales factores climáticos, especialmente con el aumento de la intensidad y frecuencia de los episodios “secos”.

Desde una perspectiva histórica, se empezaron a registrar episodios de decaimiento masivo del arbolado durante los años 70 y 80 del siglo XX en Europa Central y en el Noroeste de América. Estos procesos afectaban a masas dominadas por géneros muy diferentes (*Quercus* L., *Pinus* L., *Abies* Mill. o *Populus* L.) pero con síntomas bastante parecidos e inespecíficos: defoliación y decoloración de la copa, aparición de cambios morfológicos y arquitectónicos en las ramas, profusa producción de brotes epicórmicos o adventicios, muerte generalizada de las raíces, reducción de la tasa de crecimiento o senescencia precoz (Hertel 1988, Brasier *et al.* 1993, Brasier 1996, Sánchez *et al.* 2000).

Algunos de estos procesos de decaimiento tuvieron una gran repercusión social, como sucedió con el sufrido por diferentes especies del género *Quercus* (Lewis & Oliveira 1979, Donabauer & Ciesla 1992, Biocca *et al.* 1993, Dwyer *et al.* 1995, Oak *et al.* 1996, Rizzo & Garbelotto 2003). Esa repercusión se vio amplificada en aquellos lugares donde estaban sufriendo daños (Eisenhauer 1991, Luisi *et al.* 1993, Scortichini *et al.* 1993, Sicoli *et al.* 1998). Esta preocupación social se canalizó a través de diferentes congresos internacionales específicos y aceleró la búsqueda de una explicación a lo que se consideraba un proceso de etiología única, a pesar de que afectaba a áreas geográficas diferentes, en situaciones ecológicas distintas, que incluía tanto hábitats húmedos como secos (Donabauer & Ciesla 1992).

Entre las explicaciones “universales” destaca la vinculación del decaimiento con factores antropogénicos, concretamente a través del efecto de la precipitación ácida (Schütt & Cowling 1985) o concentraciones elevadas de ozono (Schmieden & Wild 1995). Sin embargo, hoy en día difícilmente puede sostenerse que la polución

atmosférica, en cualquiera de sus formas, sea causa única de la gran diversidad de procesos que afectan a los bosques de medio mundo (Thomas *et al.* 2002). En otras ocasiones se ha explicado el proceso como la consecuencia inmediata del ataque de patógenos (Brasier 1992, Appel 1995, Führer 1998, Sánchez *et al.* 2002).

Otra explicación a la masiva mortalidad del arbolado se basa en la aparición de desórdenes funcionales consecuencia de la influencia negativa de diferentes factores abióticos. Alteraciones puntuales en el clima, en forma de episodios agudos con registros excepcionales (como es el caso de las sequías agudas) o conformando una tendencia crónica asociada a un proceso global de cambio son los principales argumentos que subyacen a las interpretaciones abióticas. Führer (1998) llegó a sugerir que el decaimiento de los robles, en general, era la consecuencia de un desorden hídrico y de sus efectos sobre el funcionamiento de los árboles, con independencia de cualquier matización impuesta por las condiciones locales y a pesar de que el proceso pueda ser considerado como un fenómeno multifactorial. Otros muchos investigadores coinciden en considerar a la sequía como el principal, sino único, factor que explicaría el decaimiento de las especies del género *Quercus*, especialmente en las de carácter méxico (Tainter *et al.* 1984, Bréda 2000, Corcuera *et al.* 2004a). Algunos episodios de decaimiento masivo de robledales centroeuropeos también se interpretaron como el efecto combinado de sequías severas y temperaturas invernales aberrantes (Auclair *et al.* 1992), esto último a través de su efecto sobre la pérdida de conductividad hidráulica del xilema por embolia inducida por procesos de hielo-deshielo (Pockman & Sperry 1997, Davis *et al.* 1999).

1.3.2. El decaimiento forestal en la Península Ibérica

En el caso concreto de la Península Ibérica ya se mencionan fenómenos de muerte masiva de arbolado que afectaban a la encina (*Quercus ilex* L.) y al alcornoque (*Q. suber* L.), desde los años 50 del siglo XX, enmascarados con otros fenómenos de mortalidad masiva de castaños, olmos, etc., y que fueron explicados a partir de la acción única de patógenos muy agresivos (*Endothia parasitica*, *Phytophthora cinnamomi* Rands, *P. cambivora* y *Ceratocystis ulmi*). El decaimiento registrado en masas de estas especies fue especialmente intenso entre 1989 y 1999, con un pico en

1993 y 1994. En la actualidad el proceso continúa, afectando cada vez más a un espectro mayor de especies y géneros de leñosas de importancia forestal.

La temprana detección en las raíces de los árboles afectados de *P. cinnamomi* fortaleció la idea de que se trataba de la manifestación epidémica de una enfermedad, con evidente origen biótico (Tuset 2004). Sin embargo, muy pocos patógenos pueden matar a un árbol si no está previamente debilitado por otras causas, ya que el decaimiento de un árbol debe ser concebido como la pérdida irreversible de su vitalidad, una vez sobrepasado el umbral de resistencia máxima al estrés genéticamente programado (Shigo 1993, 1994). Entre los factores que de una manera general pueden debilitar a un árbol y llevarlo ante situaciones irreversibles de tolerancia al estrés se sitúan sin duda los de naturaleza climática.

De hecho, la acumulación de evidencias empíricas que apoyan la idea de un origen climático de los episodios de decaimiento registrados en la Península Ibérica ha sido notable (Peñuelas *et al.* 2001, Corcuera *et al.* 2004a, 2004b). Fernández-Cancio *et al.* (2004) también defienden que en casi toda España el decaimiento masivo de diferentes especies leñosas de importancia forestal parece tener su origen en factores climáticos, y, más en concreto, en un incremento de la aridez fisiológica que ha sufrido y sufre la vegetación como consecuencia del descenso pluviométrico (sequías acumuladas desde 1980) y, sobre todo, del aumento de la temperatura. Mientras que las sequías pluviométricas, en el contexto actual, serían agudas y transitorias, las de origen térmico podrían desencadenar una situación de cambio crónico en el paisaje.

Estos mismos autores aportaron una “cronología” de procesos de decaimiento, presentados en paralelo con fases climáticas especialmente severas que han afectado a los registros en las últimas décadas. Esta **sincronía** entre el decaimiento y los eventos climáticos excepcionales es uno de los principales soportes de la explicación climática (Manrique & Fernández-Cancio 2000, Martínez-Vilalta & Piñol 2002, Tardif *et al.* 2003, Corcuera *et al.* 2004a, 2004b). Esta sincronía tiene una imagen especular en la evidente **reversibilidad** del proceso, al recuperarse la vegetación, tanto a escala individual como poblacional en periodos de mayor pluviometría (Gil *et al.* 2004). Esta reversibilidad es otro de los ejes sobre los que descansa la hipótesis climática (Aït-Bachir *et al.* 2000, Martínez-Vilalta & Piñol 2002).

1.3.3. El decaimiento forestal en Aragón

El paisaje forestal aragonés ha sufrido tres procesos importantes de decaimiento forestal. Así, se han producido muertes masivas de ejemplares de abeto blanco (*Abies alba* Mill.) en diferentes áreas del Pirineo central y occidental, así como de pino albar (*Pinus sylvestris* L.) en el Sistema Ibérico de Teruel. Además, los años 90 del siglo XX fueron testigos de fenómenos de marchitamiento masivo de montes bajos de diferentes especies de *Quercus* L., en lo que se consideró un ejemplo más del síndrome de la “seca” peninsular. El estudio de estos tres procesos, contemplados siempre en un contexto global, ha permitido distinguir dos dinámicas en la influencia del clima en el aumento del número de episodios de decaimiento masivo del arbolado:

- una tendencia crónica en la expresión del cambio de condiciones, lo que parece estar generando un desplazamiento de la frontera entre el mundo mediterráneo y el eurosiberiano.
- un aumento en la frecuencia de episodios agudos de sequía severa e intensa.

Sin embargo, y a pesar de que esta afirmación sea lógica y estadísticamente demostrable, todavía no se ha completado un retrato perfecto de la situación. Por lo tanto, profundizar en las causas últimas de un proceso tan complejo como es la muerte masiva y simultánea de los árboles en masas aparentemente sanas es un objetivo básico en la ecología aplicada.

1.4. La paradoja de la “seca” de los robles perennifolios mediterráneos

El decaimiento de especies del género *Quercus* en España presenta una peculiaridad que hace cuestionar la evidente influencia climática en el proceso. La “seca” de los robles perennifolios mediterráneos podría ser considerada como un ejemplo de paradoja ecológica, debido a que la gran mayoría de estudios sobre mortalidad masiva de especies del género *Quercus* se registran en especies de naturaleza métrica, menos tolerantes a la sequía que sus congéneres de ambientes xéricos (Cavender-Bares & Holbrook 2001).

No obstante, a lo largo de estos años las dos especies más afectadas por el decaimiento han sido *Quercus ilex* y *Q. suber* (Fernández-Cancio *et al.* 2004). Estas dos especies, junto con *Q. coccifera*, son representantes “genuinas” de la flora leñosa mediterránea (Corcuera *et al.* 2002) y con una resistencia probada a la sequía, al menos en lo relativo a la cavitación del xilema inducida por estrés hídrico (Tyree & Cochard 1996, Corcuera *et al.* 2004b). Concretamente, *Q. coccifera* constituye un ejemplo paradigmático de especie con una resistencia extrema a la cavitación por estrés hídrico (Vilagrosa *et al.* 2003a). Sin embargo, otras especies presentes en el territorio y más sensibles a la sequía, como *Q. petraea* y *Q. robur*, no han sufrido semejante proceso de decaimiento. Esta aparente paradoja exige una explicación más compleja a través del conocimiento más preciso de la historia del paisaje y de su uso por parte del hombre, además del análisis crítico de la condición de “grupo funcional” de las especies de *Quercus* vinculadas tradicionalmente al clima mediterráneo.

En lo relativo a la primera cuestión, una característica habitual de muchas de las poblaciones de robles perennifolios mediterráneos es la baja calidad de los suelos sobre los que se desarrollan, hasta el punto de haberse sugerido este hecho como motivo que justificaría la mortandad de muchas especies mediterráneas en los episodios agudos de sequía de comienzos de los años 90 (Lloret & Siscart 1995). La degradación de estos suelos suele ser consecuencia de la repetición a lo largo de la historia de ciclos de sobreexplotación y abandono del paisaje. En muchos casos, la presencia de una especie perennifolia en condiciones climáticas más propensas al desarrollo de robles caducifolios de transición está determinada por esta pobreza del suelo (García-López *et al.* 2002), que impide que se pueda sostener una alta actividad vegetativa y una relativamente alta transpiración - como sería propia de estos robles - al no alcanzarse los niveles de retención de agua suficientes en estos suelos tan poco desarrollados. De hecho, históricamente hablando, uno de los procesos más significativos ocurridos en la Cuenca Mediterránea ha sido la sustitución de los bosques caducifolios de media montaña por bosques perennifolios mediterráneos (Reille & Pons 1992, Marañón *et al.* 1999).

La explotación abusiva, bajo circunstancias que reclamaban el desarrollo de áreas abiertas para pasto, seguida de momentos de abandono de la actividad agraria, como el que ahora se vive en buena parte de España, sitúan a los montes en condiciones extremas, llevándolos en ocasiones a generar respuestas de tipo “umbral” (Carrión *et al.* 2001). Estas respuestas muy bien se pueden asociar a procesos

masivos de decaimiento, cuando el sistema ecológico alcanza uno de esos umbrales. En el caso que nos ocupa, la degradación del suelo hizo inviable la recuperación del territorio por las especies originales, al situarse la capacidad de retención de agua por debajo de las necesidades mínimas requeridas por estas especies para sobrellevar el verano. La ocupación por especies perennifolias menos exigentes en agua ha sido la solución posible, siempre que la precipitación media se haya mantenido cercana a los valores típicos de climas con veranos más húmedos que los mediterráneos. En episodios especialmente críticos (años 1992, 1993, 1994) ni tan siquiera especies menos exigentes en agua y más tolerantes a la sequía pudieron sostener su biomasa en pie, produciéndose una mortandad masiva (Thomas & Hartmann 1996, Peñuelas *et al.* 2000).

Por lo tanto, y a pesar de la aparente rotundidad de las primeras clasificaciones bioclimáticas, donde las especies de robles perennifolios mediterráneos aparecen como paradigma de especies absolutamente apropiadas para la supervivencia bajo condiciones de mediterraneidad, la realidad paisajística se evidencia mucho más enrevesada. La pregunta es, por lo tanto, hasta qué punto la aparente similitud existente dentro de la vegetación leñosa mediterránea esconde, efectivamente, diferentes formas de enfrentarse a la falta de agua. En la sección 1.5 se realiza una descripción de las estrategias que puede desarrollar la vegetación para sobrellevar el déficit hídrico. Posteriormente, en la sección 1.6, se profundiza sobre aspectos relacionados con la convergencia morfológica y funcional de la vegetación leñosa mediterránea.

1.5. Estrategias de la vegetación frente a la sequía

La consideración de la sequía estival como modeladora del paisaje requiere de importantes matizaciones, ya que en ningún caso puede entenderse que la vegetación responda de manera única ante este factor limitante. Es cierto, desde luego, que la disponibilidad hídrica está considerada como el principal factor que afecta la actividad de las plantas en ecosistemas mediterráneos (Mitrakos 1980, Di Castri 1981, Blondel & Aronson 1999), al producirse en un periodo donde la actividad fotosintética debería ser máxima (Corcuera *et al.* 2002). Las altas temperaturas y la baja precipitación en verano reducen la disponibilidad de agua en el suelo y aumentan la demanda

evaporativa durante una gran parte del potencial periodo de crecimiento de la planta (Mediavilla & Escudero 2003). Esta falta de agua o déficit hídrico es la tensión o estrés que actúa sobre las plantas, produciendo diferentes tipos de respuesta en los organismos. En las plantas, las repuestas o mecanismos para afrontar esta situación han sido denominados estrategias, que son características de cada especie (Larcher 2003, Valladares *et al.* 2004).

La clasificación y denominación de estas estrategias, establecidas por varios autores durante las dos últimas décadas del siglo XX, tienen características comunes. Así, las especies que completan el ciclo vital antes del periodo de estrés han sido clasificadas como especies que evaden (Levitt 1980, Turner 1986), evitan (Kozlowski *et al.* 1991, Jones 1992) o eluden (Larcher 2003) el estrés hídrico. En algunas especies leñosas de pequeño porte (p.ej. terófitos y geófitos), estrechamente vinculadas a las variantes más áridas del clima mediterráneo, se produce una masiva reducción de la superficie transpirante en los meses de mayor estrés hídrico (caducifolia estival), mecanismo que es interpretado como una forma extrema de **evasión** temporal del estrés (Nilsen & Muller 1981, Comstock & Ehleringer 1986, Lev-Yadun & Ne'eman 2004).

Sin embargo, gran parte de la flora leñosa mediterránea de mayor porte (arbustos y árboles) es perennifolia, lo que implica que la sequía estival debe ser soportada mientras el vegetal conserva aún todo el follaje. Estas especies deben desarrollar mecanismos que les habiliten para sobrellevar estos momentos de máximo estrés con su superficie foliar intacta, en espera de momentos más apropiados para la recuperación de su máxima capacidad funcional (Corcuera *et al.* 2005b).

Así, algunas plantas son capaces de **evitar** que las hojas lleguen a deshidratarse a pesar de que las condiciones ambientales promuevan una fuerte pérdida de agua. Esta capacidad ha sido denominada como estrategia de evitación del estrés (Levitt 1980, Jones 1992, Larcher 2003), estrategia de tolerancia al estrés con alto potencial hídrico (Turner 1986) o estrategia de aplazamiento de la deshidratación (Kozlowski *et al.* 1991). Estas especies previenen o minimizan los efectos de la sequía en los tejidos, ya que éstos son muy sensibles a la deshidratación (Contenido Hídrico Relativo letal > 50%). Las especies que siguen esta estrategia se caracterizan por un mantenimiento de altos potenciales hídricos en el xilema, minimizando la pérdida de agua al efectuar el cierre estomático a valores altos de Contenido Hídrico Relativo (en

adelante CHR), lo que les permite minimizar las pérdidas de agua. Por otro lado, estas especies se caracterizan por su gran capacidad de absorción de agua a través del sistema radicular. Esto se consigue con (i) una alta conductividad hidráulica, (ii) el desarrollo de raíces profundas, densas y con alto peso específico, (iii) una alta relación entre superficie de absorción y superficie transpirante (biomasa radical / biomasa aérea) y (iv) un sistema radical dual (Valladares *et al.* 2004).

Otras especies son incapaces de evitar las pérdidas de agua, aunque son capaces de resistir un alto grado de deshidratación celular sin sufrir daños irreversibles, conformando la estrategia de **tolerancia** al estrés. Las especies que aparentan desarrollar esta estrategia son conocidas como especies tolerantes al estrés hídrico (Levitt 1980), tolerantes al estrés con bajo potencial hídrico (Turner 1986, Jones 1992) o tolerantes a la deshidratación (Kozlowski *et al.* 1991, Larcher 2003). Estas especies pueden mantener un bajo potencial hídrico en el xilema, con cierre estomático a valores bajos de CHR, ya que sus tejidos presentan una alta resistencia a la deshidratación (CHR letal < 25%). Para ello, estas especies han desarrollado xilemas altamente resistentes a la cavitación por estrés hídrico (Vilagrosa *et al.* 2003a). Por otro lado, estas especies presentan mecanismos de ajuste osmótico, una alta elasticidad de pared celular (Corcuera *et al.* 2002) y una gran resistencia a la disfuncionalidad de la membrana celular. Desde el punto de vista metabólico, estas especies tienen la capacidad de acumular sustancias osmoprotectoras, desarrollar sistemas antioxidantes y presentar una gran estabilidad en la composición de los pigmentos fotosintéticos (Chaves *et al.* 2003).

1.6. La vegetación esclerófila mediterránea: ¿un grupo funcional homogéneo?

1.6.1. La esclerofilia y su posible influencia en la resistencia a la sequía

El clima mediterráneo y la vegetación esclerófila perennifolia, de hojas pequeñas (Traisier *et al.* 2004), han sido históricamente contemplados como un sólido binomio por parte de los geobotánicos (Di Castri 1981, Breckle 2002). En este sentido, el Zonobioma IV o “zonobioma de los bosques y matorrales esclerófilos” abarca diferentes áreas de la Tierra bajo la influencia de climas de tipo mediterráneo (Breckle

2002). En Eurasia, este zonobioma comprende los bosques esclerófilos y la *macchia* (Giovannini *et al.* 1992); en Norteamérica el *chaparral* californiano y el *encinal* (Peinado *et al.* 1997); en Sudamérica el *matorral* chileno y el *espinal* (Montenegro *et al.* 2004); en Sudáfrica las formaciones de *fynbos* (Campbell & Berger 1988) y, por último, la *mallee* (Robinson *et al.* 2006) y el *kwongan* australianos (Yates *et al.* 2007). Mientras que las hojas de elevado peso foliar específico y gran tamaño – megaesclerófilas – son comunes en la pluvisilva tropical y ecuatorial (Medina *et al.* 1990), las hojas “microesclerófilas” – pequeñas y densas – han sido consideradas como una adaptación a los veranos cálidos y secos que caracterizan el clima del “Zonobioma de la Región Árida, de inviernos húmedos”, o Región Fitoclimática Mediterránea en la clasificación de Walter (Breckle 2002).

La convergencia morfológica existente dentro de la vegetación mediterránea ha sido asociada con una convergencia fisiológica (Kummerov 1973). En este sentido, Walter (1985) consideró que la esclerofilia debía ser interpretada como un mecanismo que aumentaría la capacidad de las hojas para disminuir radicalmente la transpiración mediante el cierre estomático cuando los recursos hídricos escasean. Este mecanismo permitiría a las plantas sobrevivir a los meses de sequía sin sufrir alteraciones graves en el contenido hídrico plasmático. De este modo, siguiendo los postulados de Walter, muchos autores han conseguido establecer correlaciones entre características foliares y morfológicas mediante comparaciones interespecíficas, estableciendo grupos funcionales dentro de las especies analizadas.

Por ejemplo, Tenhunen *et al.* (1981) encontró, bajo condiciones de estrés hídrico, un descenso al mediodía en las tasas de transpiración y en la fotosíntesis neta de las hojas de *Arbutus unedo* y *Q. ilex*, dos especies características de la vegetación esclerófila mediterránea. Por otro lado, Acherar & Rambal (1992) compararon las relaciones hídricas y la respuesta al estrés hídrico de dos especies mediterráneas perennifolias (*Q. ilex* L. y *Q. suber* L.) y dos caducifolias (*Q. afares* Pomel. y *Q. faginea* Will.). Estos autores encuentran que el descenso al mediodía en la conductancia estomática en respuesta al estrés hídrico es mucho más rápido en las especies caducifolias que en las perennifolias, indicando que las primeras son mucho más sensibles a la sequía edáfica. En términos de resistencia a la sequía, los robles caducifolios evitan el estrés hídrico del suelo mediante el rápido cierre de sus estomas, a expensas de reducir considerablemente la asimilación neta de CO₂, mientras que los robles perennifolios son capaces de mantener la actividad fotosintética a potenciales

hídricos bajos. Por lo tanto, según estos autores, los robles mediterráneos perennifolios poseen una serie de características morfo-funcionales comunes (profundidad de raíces, área foliar limitada, etc.) que les permiten mantener un balance positivo de carbono con unas tasas de transpiración relativamente altas durante los periodos de sequía. En este sentido, Corcuera *et al.* (2002) compararon parámetros derivados de las curvas presión-volumen de diecisiete especies del género *Quercus* pertenecientes a fitoclimas contrastados: perennifolias mediterráneas (*Q. agrifolia*, *Q. chrysolepis*, *Q. coccifera*, *Q. ilex* subsp. *ballota*, *Q. ilex* subsp. *ilex* y *Q. suber*), caducifolias nemorales (*Q. alba*, *Q. laurifolia*, *Q. nigra*, *Q. petraea*, *Q. robur*, *Q. rubra* y *Q. velutina*) y caducifolias nemoro-mediterráneas (*Q. cerris*, *Q. faginea*, *Q. frainetto* y *Q. pyrenaica*). Estos autores aseguran que existe una homogeneidad funcional dentro de los tres grupos fitoclimáticos estudiados, que se caracteriza por la distinta respuesta al estrés hídrico desde el punto de vista ecofisiológico. Por un lado, las especies de robles mediterráneos desarrollan mecanismos para evitar una excesiva pérdida de agua celular, cuando el potencial hídrico disminuye, a través de un alto módulo de elasticidad de pared celular. Por el contrario, las especies de robles nemorales tienden a mantener la presión de turgencia a costa de perder una mayor cantidad de agua celular. Por último, las especies nemoro-mediterráneas presentan un comportamiento intermedio entre los otros dos grupos de robles. Además, Corcuera *et al.* (2002) encuentran una alta relación entre el índice de esclerofilia y el módulo de elasticidad de pared, aunque sin relación funcional conocida.

Desde el punto de vista de este autor, la consideración de la vegetación mediterránea como una unidad por el hecho de tener la esclerofilia como característica común es muy discutible. En primer lugar, existe una gran variación florística entre las diversas regiones influenciadas por el clima mediterráneo. En este sentido, las similitudes entre un bosque de *Q. ilex* de la Península Ibérica (Corcuera *et al.* 2004b) y un paisaje de brezales en Australia (Specht 1979) son, a mi juicio, escasas.

Así, Lo Gullo & Salleo (1988) encontraron diferentes estrategias de resistencia a la sequía en tres especies esclerófilas mediterráneas (*Olea oleaster*, *Ceratonia siliqua* y *Laurus nobilis*) que crecían bajo las mismas condiciones ambientales. Por un lado, *O. oleaster* se considera una especie tolerante a la sequía. Por otro lado, las otras dos especies se consideran evitadoras de la sequía, *C. siliqua* mediante una estrategia de derroche de agua y *L. nobilis* mediante una estrategia de ahorro de agua. Además, Martínez-Vilalta *et al.* (2003) encontraron diferentes estrategias en el uso del

agua en tres especies esclerófilas perennifolias que co-habitan en un encinar del Noreste de España. Mientras que *Quercus ilex* L. y *Arbutus unedo* L. presentaban un gran control estomático sobre las pérdidas de agua por estrés hídrico, *Phillyrea latifolia* L. exhibía una baja vulnerabilidad de su xilema a la embolia, lo que le permitía mantener un flujo de savia alto a potenciales hídricos más bajos que las otras dos especies.

De hecho, contrariamente a lo que algunos autores habían sugerido (Poole & Miller 1975, Turner 1994), Salleo & Nardini (2000) demostraron que la esclerofilia no podía ser considerada como un mecanismo para evitar el estrés hídrico, siendo etiquetada dicha característica como un mero epifenómeno debido a la gran cantidad de radiación solar incidente en la región mediterránea (Ogaya & Peñuelas 2006). De hecho, la esclerofilia también se vincula con otras variables que poco o nada tienen que ver con la supervivencia en hábitats áridos, como el gran espesor del limbo foliar o la abundancia de esclerénquima (Medina *et al.* 1990). En este sentido, Verdú *et al.* (2003) postulan que la esclerofilia se originó dentro de la vegetación tropical durante la era Terciaria, en épocas muy anteriores a la implantación definitiva de las condiciones propias del actual clima mediterráneo (Valladares *et al.* 2004).

Llegados a este punto es necesario preguntarse por el sentido de la esclerofilia como característica foliar común de la vegetación mediterránea. Medina *et al.* (1990) encontraron que el contenido en nutrientes, el área foliar específica y el espesor de la lámina foliar de algunas especies de la pluvisilva de la cabecera de Río Negro eran comparables con los valores registrados en las hojas esclerófilas de las regiones mediterráneas. Sin embargo, los autores concluyeron que este tipo de hojas, morfológicamente clasificables como esclerófilas, estaban lejos de ser consideradas como tolerantes a la sequía. Como alternativa, propusieron que era la escasez de nutrientes la razón de esta morfología. En la misma dirección señalan Campbell & Berger (1988) tras estudiar la vegetación capense de las montañas sudafricanas, ya que encontraron que muchas de las características de las plantas que conforman este tipo de vegetación (*fynbos*), entre las que se incluía la esclerofilia, se asociaban más a gradientes de fertilidad edáfica que a gradientes de disponibilidad hídrica. Más recientemente, Gonçalves-Alvim *et al.* (2006) encontraron que la baja concentración en macronutrientes era el factor que más influía en el desarrollo de caracteres esclerófilos en las hojas de *Qualea parviflora*, un árbol caducifolio de la sabana brasileña.

1.6.2. Vulnerabilidad a la cavitación por estrés hídrico en la vegetación mediterránea

Más recientemente se ha incorporado otro elemento de comparación en lo relativo al funcionamiento comparado de las especies leñosas. Tal conjunto de caracteres conforman la “imagen hidráulica” de la especie, aspecto que ha permitido avanzar de modo señalado en el conocimiento de las relaciones entre el vegetal y el medio en el contexto del “continuo suelo-planta-atmósfera” (Gil-Pelegrín *et al.* 2005). Entre los aspectos que, dentro de este contexto, mejor expresan la capacidad de las plantas para superar periodos prolongados de sequía destaca la resistencia del xilema a la embolia por exceso de tensión hídrica (Tyree & Ewers 1991, Sperry *et al.* 2002), lo que provocaría un daño funcional irreversible y, en último término, la muerte del arbolado (Davis *et al.* 2002, Martínez-Vilalta & Piñol 2002, Esteso *et al.* 2006a). A partir del estudio de la respuesta de la planta ante tensiones en el xilema se establece la “curva de cavitación” de esa especie o población, de cuyo análisis puede extraerse una información detallada del comportamiento de esa planta ante la sequía (Hacke *et al.* 2006).

Asumiendo que la resistencia a una sequía prolongada debe formar parte de los atributos de una leñosa mediterránea, estas especies deberían mostrar una tendencia común en lo relativo a la vulnerabilidad de su xilema a la embolia. Sin embargo, tampoco este atributo permite sacar conclusiones evidentes en lo relativo a la condición de “grupo funcional” del árbol o arbusto mediterráneo.

Así, por un lado, Maherali *et al.* (2004), al comparar leñosas procedentes de diferentes tipos de vegetación, encontraron que las procedentes de las zonas más secas (desiertos y áreas mediterráneas) presentaban una tendencia a alcanzar el 50% de pérdida de conductividad por embolia a potenciales hídricos de 6 a 7 veces más negativos que aquellas plantas características de los hábitats más húmedos. En la misma dirección, Tyree & Cochard (1996) concluyen que las especies de *Quercus* de las zonas más secas del sur de Europa (*Quercus ilex* y *Q. suber*) son menos vulnerables que sus congéneres de los climas templado-húmedos de latitudes más septentrionales (*Q. robur* y *Q. petraea*). Por otra parte, se ha podido comprobar que *Q. coccifera*, la especie del género que ocupa sin duda los hábitats más secos del sur de

Europa, presenta una excepcionalmente alta resistencia a la cavitación por estrés hídrico (Vilagrosa *et al.* 2003a). Por lo anteriormente dicho, cabría pensar que, de un modo definitivo, este atributo – la resistencia a la embolia inducida por sequía – agrupa a las leñosas propias del Zonobioma IV, caracterizado por la presencia de vegetación esclerófila (Walter 1985), en un grupo coherente.

Sin embargo, las evidencias empíricas cuestionan esta aseveración. Así, Maherali *et al.* (2004) pusieron en evidencia que, a pesar de las tendencias medias, la variabilidad dentro del grupo de las leñosas mediterráneas era muy alta, con valores en cuanto al potencial hídrico responsable de inducir el 50% de pérdida de conductividad que oscilaban entre los -2 MPa a los -10 MPa. Por su parte, Matzner *et al.* (2001) demuestran que *Quercus wislizenii*, una especie perennifolia mediterránea de California, alcanza un 50% de pérdida de conductividad tras alcanzarse potenciales entre 1 y 1,6 MPa solamente, cuestionando la consideración *Q. wislizenii* como una especie tolerante a la sequía si atendemos a este atributo. Por estas razones cabe preguntarse hasta qué punto podemos seguir considerando a la vegetación esclerófila mediterránea como un grupo homogéneo desde el punto de vista fisiológico.

1.6.3. El caso de las “dos encinas”

Un ejemplo directo de la discordancia entre caracteres morfológicos en taxones próximos genéticamente y la resistencia a la sequía lo ofrecen las “dos encinas”, que cubren buena parte de la región circunmediterránea de Europa y el Norte de África. En efecto, *Quercus ilex*, considerada como la principal especie constituyente del bosque perennifolio y esclerófilo en la región Mediterránea (*Quercetum ilicis*, ver Breckle 2002), se presenta como uno de los casos más sorprendentes de discordancia entre características morfológicas y funcionales.

De acuerdo con estudios botánicos y fitogeográficos, *Q. ilex* incluye dos subespecies con una distribución geográfica claramente diferenciada (Lumaret *et al.* 2002). Por un lado, *Q. ilex* L. subsp. *ilex* ocupa áreas costeras en el norte del Mediterráneo (desde Grecia hasta Francia), sobre sustratos preferentemente calizos y bajo climas suaves, húmedos, sin heladas tardías ni sequías intensas. Por otro lado, *Q. ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp. ocupa áreas con ambientes más continentales, fríos y térmicos en el norte de África y la Península Ibérica (Blanco *et al.* 1997). Según

Lumaret *et al.* (2002), el origen de tal diferenciación podría estar en el aislamiento sufrido por las poblaciones ancestrales existentes en Europa durante las glaciaciones. La colonización postglacial de esta especie, según estos autores, probablemente comenzó a partir de tres refugios situados cada uno en las Penínsulas Ibérica, Itálica y Balcánica. La temprana diferenciación genética entre las dos subespecies se produciría en respuesta a las contrastadas condiciones climáticas de sus respectivas áreas geográficas (Lumaret *et al.* 2002).

Varios autores han realizado estudios incidiendo en el comportamiento diferencial de estas dos subespecies desde el punto de vista fisiológico. Así, Corcuera *et al.* (2004b) establece que la vulnerabilidad a la cavitación del xilema de las dos subespecies es muy distinta. Mientras que *Q. ilex* subsp. *ilex* presenta valores de PLC₅₀ alrededor de -3 MPa, *Q. ilex* ssp. *ballota* presenta valores de PLC₅₀ alrededor de -5,5 MPa. Esto señala una adaptación del xilema de *Q. ilex* ssp. *ballota* en respuesta a las condiciones climáticas propias de su área de distribución. Sin embargo, *Q. ilex* subsp. *ilex*, propia de lugares donde la restricción hídrica en verano es menor, ha desarrollado un xilema menos resistente a la cavitación por estrés hídrico. La constatación de diferencias funcionales tan grandes entre dos *taxa*, considerados hasta ahora como dos subespecies, con grandes vínculos genéticos y similitudes morfológicas, es un ejemplo que pone en cuestión la homogeneidad funcional dentro de la vegetación esclerófila perennifolia típica del área mediterránea.

1.6.4. La diversidad de la vegetación mediterránea y el cambio global

La riqueza florística de la región mediterránea podría esconder una gran disparidad de respuestas frente al estrés hídrico, a pesar de sus semejanzas morfológicas. Por lo tanto, el análisis detallado del comportamiento a lo largo de un periodo de sequía sigue estando de actualidad, ya que es aventurado considerar como válida cualquier conclusión previa sobre el vínculo entre estructura y función en este proceso.

Durante los últimos 50 años, el área bajo influencia mediterránea de la Península Ibérica ha experimentado un incremento en la temperatura del aire y la evapotranspiración, una mayor frecuencia de periodos de sequía estival intensa y un descenso en la humedad relativa del aire (Piñol *et al.* 1998, IPCC 2001). Tal y como

hemos apuntado, el comportamiento de las distintas especies que forman la flora de este territorio frente a este aumento en la aridez será distinto. Este hecho jugará un papel de vital importancia en la supervivencia y crecimiento de estas especies y, como consecuencia, en la formación del paisaje.

En conclusión, los procesos de decaimiento, que son una de las causas que producen cambios en la arquitectura del paisaje, asociados a cambios en las condiciones climáticas, estarán muy influenciados por el comportamiento fisiológico de cada especie.

1.7. El decaimiento de *Pinus sylvestris* L.: algo más que el clima

1.7.1. Presencia de *P. sylvestris* en la Península Ibérica

Entre los ejemplos del papel clave de los factores de predisposición sobre el decaimiento forestal pueden aportarse los casos de decaimiento de *Pinus sylvestris* en la Península Ibérica que se están registrando en la actualidad. En efecto, desde comienzos del siglo XXI se asiste a una muerte masiva de ejemplares en casi toda el área de distribución de la especie en España. El estudio de este proceso, o procesos, que aún sigue abierto, ha permitido confirmar la drástica importancia de ciertas condiciones previas en las masas como razón última de su actual situación. Para comprender estas condiciones debemos comprender antes algunos aspectos básicos sobre la presencia de la especie en este territorio.

Según Breckle (2002), dentro de su extensa área de distribución, la especie ha sido vinculada genuinamente a los climas propios del Zonobioma VIII o Zonobioma de la Taiga, bajo condiciones de clima boreal. Sin embargo, y por el efecto modelador del clima ejercido por el relieve, esta especie coloniza regiones mucho más meridionales, ocupando las laderas de los principales sistemas montañosos del centro y sur de Europa (Alpes, Cárpatos, Balcanes, Pirineos y Sistema Ibérico, entre otros). En la Península Ibérica esta especie alcanza su posición más meridional, con representación en cotas elevadas de Sierra Nevada (Granada, España) a una latitud de 37° N.

El papel de esta especie en el paisaje forestal español trasciende, sin embargo,

de su posible presencia natural en el territorio (Costa *et al.* 1997), ya que diferentes circunstancias históricas han favorecido su extensión a costa de otras especies forestales, consideradas de menor interés (Valladares *et al.* 2004). Por un lado, *Pinus sylvestris*, junto a otras especies de pinos, ha sido utilizada masivamente a lo largo del siglo XX como árbol para repoblar áreas deforestadas en España (Ortigosa *et al.* 1990). En otros casos, la política económica de siglos pasados ha perjudicado a la especie, en momentos en que la ganadería tenía un carácter estratégico y la necesidad de pastos provocó la tala indiscriminada de muchas zonas previamente ocupadas por este árbol (Querol 1995).

1.7.2. El decaimiento de *P. sylvestris* en la Sierra de los Filabres (Almería)

En algunas zonas en decaimiento la presencia de la especie está explicada por la repoblación artificial de la zona durante el siglo XX. Un caso representativo de esta situación es la Sierra de los Filabres, que se extiende de este a oeste por la zona central de la provincia de Almería. Se trata de un enclave de montaña con un amplio rango altitudinal (entre 300 y 2168 m a.s.l), que tiene un efecto directo sobre las condiciones climáticas que a lo largo de este gradiente se generan. La parte inferior de este sistema montañoso estaría sometida a condiciones semiáridas (hasta los 800 m) pero a partir de 1650 m las condiciones se harían sub-húmedas (Rivas-Martínez 1987).

Hay que resaltar que desde 2002 se viene observando un proceso de decaimiento progresivo en estas masas. La falta de un agente causal de origen biótico que justificara la situación del pinar llevó a buscar una explicación de tipo climático. Para ello se realizó una simulación de la potencialidad climática del lugar mediante la aplicación del sistema informático GENPT (Fernández Cancio & Manrique 2001). Como primera conclusión, hay que destacar que la precipitación media estimada en la Sierra de los Filabres es de 387 mm (con un mínimo absoluto de 288 mm entre 1962 y 1989), por debajo de los 428 mm que, de media, se registran anualmente en las zonas con presencia natural o naturalizada de pino albar en España (Gandullo & Sánchez Palomares 1994), tanto más cuando el periodo árido estival es superior a tres meses. Este matiz es clave en la comprensión de la distribución mundial de la especie, asociada a los bosques aciculiperennifolios ya descritos por Walter (cf. Breckle 2002) y

situados en las variantes húmedas del zonobioma VI o, de un modo característico, en el zonobioma VIII. Una prolongada aridez estival (superior a tres meses) sería, en principio, incompatible con esta asignación de condiciones típicas para la especie considerada. Parece ser que la estabilidad aparente de esas masas (hasta alcanzar su estado de decaimiento actual) y la posibilidad de supervivencia en momentos tan extremos puede justificarse por la innivación y la reserva de agua en el suelo si se consigue alcanzar situaciones de superávit hídrico.

Ante esta acumulación de evidencias cabe preguntarse cómo pudo ser elegida una especie como *Pinus sylvestris* para su uso en la reforestación de las parte altas de este lugar. Cuando se eligió la zona para ser repoblada con pino albar (hace unos 30-40 años), la información climática disponible por los repobladores, en los años 60-70, procedía de estaciones meteorológicas con series de datos no mucho más antiguas que 1950, y que reflejaban un periodo temporal muy próximo a la fecha de plantación. La elección de un período de datos entre 1950-1970, considerado posteriormente como uno de los periodos más lluviosos del milenio, indujo probablemente a un error en la elección de la especie de repoblación.

La baja precipitación anual no es el único parámetro que resalta una evolución negativa de las posibilidades de supervivencia de la especie. En efecto, el estudio de las variables climáticas indicó que entre 1970 y 1980 se inició una perturbación climática amplia en toda la zona suroriental de la Península Ibérica, que ha conducido no sólo a un descenso de la precipitación sino también a un aumento de las temperaturas (0,5 °C en las mínimas y 1 °C en las máximas) y de su oscilación y, por lo tanto, un aumento general de la aridez. Este hecho aumentaría la evapotranspiración y la precoz fusión de la nieve, disminuyendo el posible superávit hídrico tan necesario para la supervivencia de estas poblaciones de pino albar.

1.7.3. El decaimiento de *P. sylvestris* en el Sistema Ibérico de la provincia de Teruel

Como se ha sugerido anteriormente, en algunas ocasiones la presencia actual del pino albar en la Península Ibérica es consecuencia indirecta de los cambios en la explotación antrópica del territorio. En el Sistema Ibérico se ha favorecido durante siglos la extensión masiva del pasto en zonas potencialmente ocupadas por bosques

(Querol 1995). El posterior y muy reciente abandono de estos pastos ha permitido la reocupación del paisaje por parte de *P. sylvestris*, muchas veces sobre condiciones de suelo altamente degradadas. En este sentido hay que resaltar que estas poblaciones de *P. sylvestris* se asientan, en muchos casos, sobre suelos someros de naturaleza calcárea con profundidades de sólo 10-30 cm (Catalán-Bachiller *et al.* 1991) con escasa fracturación de la roca madre que permita al sistema radicular del pino albar profundizar en busca de agua, lo que hace que sean más sensibles al estrés hídrico.

Buena parte de estas masas han sufrido episodios de decaimiento a lo largo de las últimas décadas, siendo el más espectacular el ocurrido a lo largo del invierno de 2002, que afectó a unas 14000 ha. de pino albar. Este proceso se caracterizó por amarillamiento de las acículas con posterior atabacamiento, seguido por una defoliación severa de la copa del árbol. Aunque el proceso ocurrió de forma aguda y severa, existen varios indicios que revelan la existencia de un cierto grado de estrés crónico en estas poblaciones.

La combinación de suelos pobres y un clima crítico en ocasiones para la especie justifican este episodio. Por una parte, esta zona está dominada por un clima demasiado seco para tratarse de un dominio de pinar de *P. sylvestris* típico, cuya precipitación media anual debería ser el doble de la registrada en la estación. Además, el régimen de precipitaciones de la zona es altamente irregular, lo que condiciona aún más la disponibilidad regular de recursos hídricos por parte del árbol. Bajo estas condiciones puede ser crítico el papel de los suelos como amortiguadores de la oferta de agua, de un modo parecido a la situación descrita para el caso anterior (Sierra de Filabres). En definitiva, el fenómeno de decaimiento de estas masas de pino albar nos hace retomar el modelo de Manion (1991), estableciendo factores de predisposición de tipo climático, edáfico e histórico como elementos que comprometen el crecimiento y la supervivencia a largo plazo de estos ejemplares, haciéndolos más sensibles a cambios bruscos en las condiciones climáticas que impliquen la aparición de un déficit hídrico.

1.8. El decaimiento de *Abies alba* Mill. en el Pirineo español: influencia del incremento de la aridez en el comportamiento fisiológico de la especie

Durante los años 70 y 80 del siglo XX se comenzaron a detectar procesos de decaimiento en masas de abeto blanco (*Abies alba* Mill.) en Europa Central (Bert 1993). La mayor parte de los investigadores concluyeron que la contaminación atmosférica era el factor desencadenante (Skelly & Innes 1994). Sin embargo, Cramer (1984), entre otros, no estaba de acuerdo con estas teorías y sacó a la luz informes previos de decaimiento de *A. alba* durante el siglo XX que coincidían con episodios de sequías severas. Así, la sequía podría actuar como un factor de predisposición (*sensu* Manion 1991) en el decaimiento del abeto blanco, incluso cerca del límite septentrional de distribución de la especie, donde es esperable que los niveles de estrés hídrico sean mucho más bajos que en las poblaciones meridionales.

En la parte más occidental del Pirineo español el decaimiento del abeto blanco comenzó a mediados de los años 80, coincidiendo con periodos de intensa sequía en la parte final del verano (Camarero 2003). Este episodio de decaimiento ha continuado hasta la actualidad, estando relacionado con la prolongación del periodo de estrés hídrico en la parte final del verano. El papel potencial del clima como un factor contribuyente al decaimiento en el Pirineo español se refuerza por el hecho de que las poblaciones estudiadas constituyen el límite suroccidental de distribución de la especie en Europa, donde el estrés hídrico puede restringir el crecimiento del árbol. La presencia de bosques de *P. sylvestris* cerca de las poblaciones afectadas indica la xericidad existente en estas poblaciones, constituyentes de formaciones transicionales entre la vegetación atlántica y la mediterránea (Ceballos & Ruiz de la Torre 1979).

El aumento de xericidad detectado en áreas donde encontramos poblaciones de *A. alba* en claro proceso de decaimiento pone en relieve el papel del clima como un posible factor desencadenante en el decaimiento del abeto blanco en el Pirineo. Ahora bien, ¿de qué manera influye el estrés hídrico en el funcionamiento de una especie característica de climas donde el agua no es un recurso limitante? Estudios fisiológicos previos han demostrado que, en coníferas, una disminución de la humedad relativa del aire originada por un aumento de la xericidad causa una disminución en la fotosíntesis neta y en la conductancia estomática (Sandford & Jarvis 1986, Grieu *et al.* 1988). La

limitación de la actividad fotosintética tiene como consecuencia una disminución en la capacidad de crecimiento del árbol, comprometiendo a largo plazo la supervivencia del mismo. Es de esperar que las poblaciones de *A. alba* del Pirineo español, que están bajo una gran influencia mediterránea, estén bajo unas condiciones de menor humedad relativa del aire y, por lo tanto, de un mayor grado de sequía atmosférica. Este hecho hace que estas poblaciones, situadas en el límite suroccidental de distribución de la especie en Europa, sean especialmente sensibles a ligeros cambios en las condiciones climáticas, que pueden alterar de manera dramática el comportamiento fisiológico de la especie.

Por lo tanto, la conjunción de factores de predisposición de tipo climático (aumento de la xericidad) junto con la implicación de otros factores locales forman un escenario en donde la capacidad de crecimiento y, por lo tanto, de supervivencia a largo plazo del abeto blanco se ven claramente mermadas.

1.9. Objetivos e hipótesis de la Tesis. Estructura de la Memoria.

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido el empleo y puesta a punto de nuevas técnicas no destructivas para el estudio de la vegetación arbórea de interés forestal sometida a distintos factores abióticos de estrés. Básicamente, estas nuevas técnicas se basan en las medidas de fluorescencia de clorofila y reflectancia espectral. El empleo generalizado de estas técnicas en distintas especies forestales sometidas a diversos factores abióticos de estrés (hídrico, térmico, lumínico, nutricional, etc.) requiere incidir en el significado fisiológico de los parámetros medidos, ya que sólo un profundo conocimiento de los procesos subyacentes a la variación de dichos parámetros permitirá una correcta interpretación de los resultados obtenidos. En este sentido, la calibración con otras técnicas más comúnmente utilizadas en la realización de este tipo de estudios (como pueden ser las medidas de intercambio de gases o el análisis de pigmentos fotosintéticos, entre otras) ha sido uno de los principales objetivos a cubrir en este trabajo. De esta manera, la obtención de índices que permitan un rápido, preciso y sencillo diagnóstico del estado de vigor de la vegetación se ha constituido como uno de los principales ejes sobre los que se vertebra este trabajo.

El trabajo descrito anteriormente se ha realizado a partir del estudio de diversos de diversos estreses ambientales en ecosistemas mediterráneos y la problemática del decaimiento de masas forestales, todo ello bajo el contexto del cambio global que está produciendo un aumento de la temperatura y una disminución de las precipitaciones. En este trabajo se analizan las posibles consecuencias que puede tener el cambio global en el funcionamiento fisiológico de la vegetación leñosa mediterránea y su relación con los fenómenos de decaimiento forestal.

De esta manera, la primera parte de esta Memoria (capítulos 2 y 3) se ocupa de los recientes fenómenos de decaimiento observados en *A. alba* y *P. sylvestris*, dos especies que en la Península Ibérica alcanzan sus límites geográficos y ecológicos de distribución.

En el **capítulo 2** se estudia el comportamiento fisiológico de ramas y acículas de una población en decaimiento (Paco Ezpela, sitio E) y de una población sana (Gamueta, sitio G) de *A. alba*, localizadas en lugares cercanos pero con características climáticas contrastadas. La pérdida de verdor y la posterior defoliación en los ejemplares de la población en decaimiento sirvió como hipótesis de partida para buscar indicadores de daño a escala fotosintética y fotoquímica. De esta manera, en este capítulo se analiza la influencia que ha podido tener la combinación del estrés climático con factores locales, tales como desordenes nutricionales, en este episodio de decaimiento.

El **capítulo 3** se enmarca dentro del reciente proceso de decaimiento observado en las masas de *P. sylvestris* de la provincia de Teruel. La posible vinculación de este fenómeno con daños por helada ha servido como base para el planteamiento de este capítulo. Su principal objetivo ha sido la puesta a punto de la medida de fluorescencia de clorofila en los tejidos vivos del *cambium*, como una nueva herramienta de diagnóstico de la respuesta de los mismos a temperaturas de congelación. La comparación con otras técnicas más extendidas es también objeto del presente capítulo.

La segunda parte de la Memoria (capítulos 4, 5 y 6) se ocupa del estudio del funcionamiento de la vegetación esclerófila mediterránea frente al estrés hídrico y lumínico. El desarrollo de nuevas herramientas basadas en la reflectancia espectral y

en la fluorescencia de clorofila para la detección del nivel de estrés hídrico también es uno de los aspectos de los que se ocupa esta parte de la Memoria.

En el **capítulo 4** se realiza un estudio comparado del comportamiento de tres especies congenéricas típicas de la vegetación esclerófila mediterránea: *Quercus suber*, *Q. ilex* y *Q. coccifera*. Estas tres especies presentan solapamientos en sus respectivas áreas de distribución pero muestran una clara tendencia a ocupar predominantemente determinadas zonas según el grado de aridez de las mismas. En este sentido, *Q. suber* ocuparía zonas menos áridas y *Q. coccifera* ocuparía zonas más áridas, quedando *Q. ilex* en una situación intermedia. Este hecho hizo pensar en la existencia de un comportamiento diferencial de las tres especies frente al estrés hídrico a nivel del fotosistema II. En este capítulo se profundiza en las diferentes estrategias que presenta el fotosistema II de estas especies frente a un periodo prolongado de estrés hídrico y en las consecuencias que puede tener ante un escenario de incremento de la aridez.

En el **capítulo 5** se profundiza en el estudio de los cambios en la reflectancia espectral (concretamente en el PRI) de una de estas especies, *Q. coccifera*, utilizando para ello un sensor pasivo, en condiciones de campo, durante un ciclo de sequía estival intensa (a potenciales hídricos donde casi no existe información acerca de los cambios fisiológicos experimentados por las plantas). Los cambios en el PRI se compararon con los cambios en parámetros fotosintéticos y fotoquímicos, con el objetivo de obtener una mayor información acerca del significado fisiológico de estos cambios en el PRI. La elección de esta de *Q. coccifera* como especie modelo se basa en su extraordinaria resistencia al déficit hídrico, en sus mecanismos de fotoprotección y en su importancia como especie formadora de paisaje en el área mediterránea. En el **capítulo 6** se profundiza en el conocimiento de los cambios a corto plazo en la reflectancia en la parte verde del espectro en *Q. coccifera* frente a un súbito incremento en la radiación solar incidente. La existencia de estudios previos que relacionaban los cambios de reflectancia a 505 nm con la formación de zeaxantina hizo pensar en una posible relación de este pigmento con la reflectancia a 505 nm. El posible uso de índices reflectométricos basados en esta longitud de onda permitiría estudiar de manera pasiva y a distancia el nivel de disipación térmica del exceso de energía lumínica, con independencia de otros factores que sí influyen en la reflectancia a 531 nm, tales como la generación del ΔpH trans-tilacoidal y fenómenos de

reordenamiento cloroplástico en respuesta a cambios en la intensidad lumínica (Gamon *et al.* 1990).

Por otra parte, el **capítulo 7** tiene en cuenta diversos aspectos metodológicos relacionados con las medidas de fluorescencia de clorofila. La obtención de distintos resultados en función del modelo comercial de fluorímetro utilizado sirvió como hipótesis de partida para discutir la influencia de la longitud de onda de la luz de excitación y detección del instrumento en los parámetros de fluorescencia obtenidos. Además, la diferente capacidad de penetración de la luz en función de su longitud de onda ha servido para estudiar la eficiencia fotosintética de las diferentes capas de células de hojas de *Quercus coccifera* L., utilizando la eficiencia potencial máxima del PSII (F_v/F_M) como el parámetro medido de fluorescencia de clorofila.

Finalmente, en el **capítulo 8** se hace un resumen de los resultados obtenidos y se exponen las principales conclusiones de este trabajo.

CAPÍTULO 2

Comportamiento fisiológico de dos poblaciones de abeto blanco (*Abies alba* Mill.) bajo condiciones climáticas contrastadas cerca del límite suroccidental de distribución de la especie

2.1. Introducción.....	30
2.2. Material y métodos.....	33
2.2.1. Lugares de estudio	33
2.2.2. Crecimiento, potencial hídrico y conductividad hidráulica.....	35
2.2.3. Medidas de intercambio de gases y fluorescencia de clorofila.....	36
2.2.4. Análisis de pigmentos fotosintéticos.....	37
2.2.5. Reflectancia espectral.....	38
2.2.6. Análisis de nutrientes.....	38
2.2.7. Análisis estadístico.....	39
2.3. Resultados.....	39
2.3.1. Crecimiento, potencial hídrico y conductividad hidráulica.....	39
2.3.2. Intercambio de gases.....	40
2.3.3. Fluorescencia de clorofila, pigmentos fotosintéticos y reflectancia espectral.....	41
2.3.4. Concentración de nutrientes en las acículas.....	46
2.4. Discusión.....	48
2.5. Conclusiones.....	50

2.1. Introducción

El abeto blanco (*Abies alba* Mill.) alcanza en la Península Ibérica el límite suroccidental de distribución de la especie (Figura 2.1, Jalas *et al.* 1999). En el Pirineo español las poblaciones de *A. alba* con las tasas más altas de productividad se encuentran habitualmente por encima de los 1200 m de altitud sobre el nivel del mar (s.n.m.), en fondos de valle o laderas orientadas al N/NO sobre suelos relativamente poco profundos (Vigo & Ninot 1987).

En la cordillera pirenaica el abeto blanco forma bosques oroborealoides transicionales hacia la planicaducifolia en poblaciones monoespecíficas (*Goodyero-Abietetum albae* Bolós 1957) sobre suelos formados por pizarras y otras rocas silíceas (Conesa i Mor 1997). Por otra parte, el abeto blanco forma poblaciones mixtas con *Fagus sylvatica* L. (*Scillo-Fagetum sylvaticae* Br.-Bl. 1952) en la zona más occidental de la cordillera pirenaica, constituyendo los bosques más nemorales de dicha cordillera (Vigo & Ninot 1987, Blanco *et al.* 1997). Estas poblaciones de abeto blanco bajo condiciones mélicas se integran dentro del área principal de distribución de la especie en el Pirineo español. Por otro lado, existen poblaciones de abeto blanco situadas en la cara Sur del Pirineo y en el Prepirineo bajo unas condiciones de mayor xericidad que las anteriores y sobre sustratos calizos (Conesa i Mor 1997), junto a *Pinus sylvestris* y *Buxus sempervirens* (*Buxo-Abietetum albae* Vigo 1974). Se puede considerar, por lo tanto, que estas últimas poblaciones habitan en los límites ecológicos de la especie. Estas poblaciones marginales son las que constituyen el límite suroccidental de distribución del abeto blanco en Europa, lo que las hace más susceptibles a un incremento de la xericidad, en comparación con aquéllas localizadas en lugares más mélicos dentro de la cordillera pirenaica. Además, la expansión del abeto blanco durante el siglo XX debido al abandono del uso agrícola de la tierra (Carcaillet & Muller 2005) ha incrementado el número de estas poblaciones.

Existe una clara tendencia al calentamiento en los sistemas montañosos de Europa Occidental, fenómeno que se ha venido detectando de manera evidente desde los años 40 del siglo XX. Este hecho ha tenido como consecuencia que estas últimas décadas hayan sido mucho más cálidas que cualquier otra desde que existen registros (Díaz & Bradley 1997). En el Pirineo Central, la temperatura media se ha incrementado alrededor de 0,8 °C en la estación meteorológica de "Pic du Midi" (2862 m s.n.m.) entre 1882 y 1970 (Bücher & Dessens 1991). En conclusión, el fuerte calentamiento

climático detectado en los Pirineos durante el siglo XX ha producido un incremento en la aridez, lo que puede afectar al crecimiento y supervivencia a largo plazo de las poblaciones de abeto blanco localizadas cerca del límite suroccidental de distribución de la especie (Camarero & Gutiérrez 2004, Macias *et al.* 2006). Sin embargo, pocos estudios han profundizado en los mecanismos que subyacen tras la diferente respuesta al clima de poblaciones cercanas en el espacio pero bajo contrastadas condiciones biogeográficas (poblaciones centrales frente a poblaciones marginales) y climáticas (sitios másicos frente a sitios xéricos). Una aproximación fisiológica podría contribuir a explicar cuáles son los principales mecanismos involucrados en la respuesta diferencial de las poblaciones de abeto blanco bajo condiciones tan contrastadas.

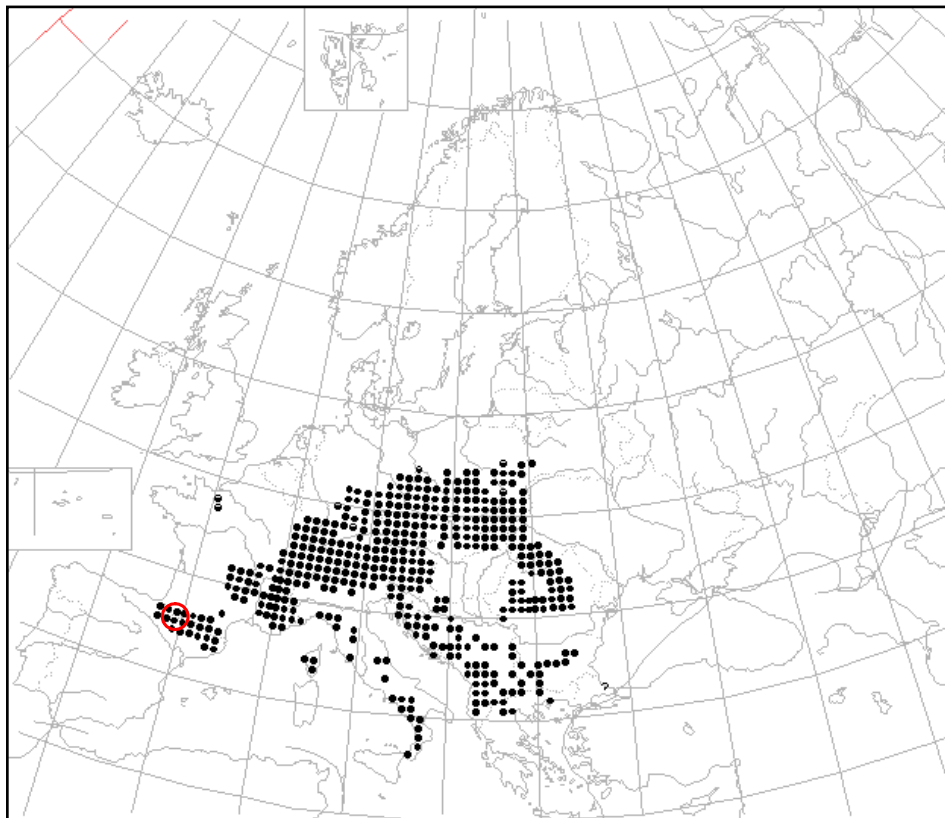


Figura 2.1. Mapa de distribución de *A. alba* en Europa. El círculo rojo señala la localización aproximada de las poblaciones estudiadas. Fuente: *Atlas Florae Europaeae*.

El principal objetivo de este estudio fue la caracterización fisiológica de dos poblaciones de abeto blanco con unas tasas de crecimiento muy distintas (Camarero *et al.* 2003) y muy diferentes desde el punto de vista climático y biogeográfico (Figura 2.2). Una de ellas puede ser considerada como representante genuina de las poblaciones de abeto blanco bajo condiciones méxicas, características del área principal de distribución de esta especie dentro del Pirineo. La otra es una población de abeto blanco que vive bajo unas condiciones de mayor xericidad, en una localización marginal cerca del límite suroccidental de distribución de la especie.



Figura 2.2. Localización de las dos poblaciones de estudio: Paco Ezpela y Gamueta. Mapa elaborado a partir del programa Google Earth.

El estudio fisiológico comparado incluyó la medida de parámetros fotosintéticos, fotoquímicos, reflectancia espectral, pigmentos fotosintéticos y análisis nutricional completo en acículas de ambas poblaciones de abeto blanco. Esta evaluación del funcionamiento fisiológico de ambas poblaciones permitirá valorar las consecuencias que tendrán, desde un punto de vista ecofisiológico, un incremento de

la temperatura y la evapotranspiración en el desarrollo futuro de las poblaciones marginales de abeto blanco que están creciendo cerca del límite ecológico de la especie.

2.2. Material y métodos

2.2.1. Lugares de estudio

Para la realización de este estudio se seleccionaron dos poblaciones cercanas pero climáticamente contrastadas de *A. alba* en la cordillera pirenaica occidental: Paco Ezpela (sitio E) y Gamueta (sitio G) (Figura 2.2). Estos sitios fueron seleccionados por sus contrastadas condiciones climáticas y diferentes características de vigor (Tabla 2.1). Ambas poblaciones estaban localizadas en el mismo valle a una distancia de 16 km. El clima se describió utilizando datos diarios procedentes de las estaciones climáticas más próximas localizadas a 1 km de distancia de los lugares de muestreo (sitio E, Ansó, 42° 45' N, 0° 49' O, 820 m s.n.m., periodo 1997-2003; sitio G, Linza, 42° 57' N, 0° 49' O, 1330 m s.n.m., periodo 2002-2003). Se caracterizó el microclima (temperatura y humedad relativa) de los lugares de muestreo durante la parte central del verano (cuando se realizaron las medidas fisiológicas) utilizando un *datalogger* Hobo Pro RH/Temp (Onset Computer Bourne, MA) para cada sitio de estudio. El *datalogger* se colocó dentro de un protector solar en la parte más alta de la copa del árbol. Se recogieron registros de temperatura y humedad relativa cada 6 min durante Agosto de 2002.

La precipitación total anual y estival en el sitio G fue mucho más alta que en el sitio E, lo que confirma la mayor influencia mediterránea en el sitio E (Tabla 2.1). Las diferencias microclimáticas confirmaron que el mes de Agosto de 2002, momento en el que se hicieron la mayor parte de las medidas fisiológicas, fue más seco y caluroso en el sitio E. Durante este mes, los intervalos de temperatura fueron de 7,0-29,9 °C y 4,6-24,4 °C en los sitios E y G respectivamente (Figura 2.4). El sitio E presentaba una variabilidad diaria más alta en cuanto a la humedad relativa, alcanzando valores mínimos del 20% durante 7 días consecutivos (Figura 2.4). La densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) fue similar en ambos sitios (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Características de las poblaciones de *A. alba* estudiadas (Ezpela y Gamueta). El potencial hídrico antes del amanecer (PWP) y al mediodía (MWP) es el de los brotes. Las diferencias significativas entre sitios ($P \leq 0,05$) se indican con letras distintas.

	EZPELA	GAMUETA
Latitud (N) / Longitud (O)	42° 45' / 0° 51'	42° 54' / 0° 47'
Altitud (m s.n.m.)	940	1350
Orientación / pendiente (°)	NE / 27	NO / 23
Sustrato	Calizo	Calizo
T media anual / estival ¹ (°C)	9,1 / 16,6	8,9 / 14,1
Precip. total anual / estival (mm)	1004 / 122	2353 / 280
PPFD ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ²	1762,5 \pm 62,5	1737,5 \pm 62,5
Longitud del brote (mm)	43,1 \pm 3,9 a	65,3 \pm 4,7 b
Longitud de las acículas (mm)	11,4 \pm 0,5 a	19,4 \pm 0,6 b
Anchura de anillo (mm)	1,12 \pm 0,07 a	2,73 \pm 0,11 b
PWP (MPa)	-0,52 \pm 0,07 a	-0,53 \pm 0,06 a
MWP (MPa)	-1,43 \pm 0,01 a	-1,43 \pm 0,01 a
Cavitación (%)	0	0

¹Desde el 1 de Julio hasta el 30 de Septiembre

²PPFD medido al mediodía en Agosto de 2002

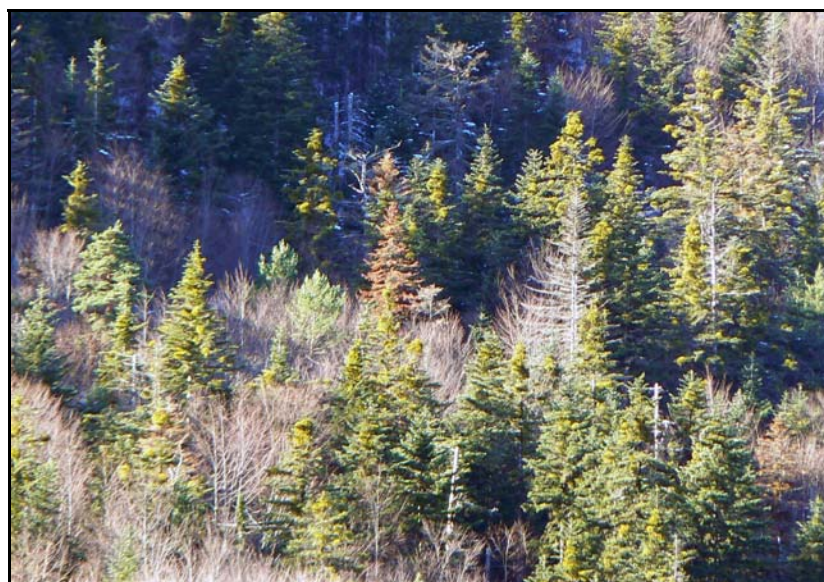


Figura 2.3. Fotografía de Paco Ezpela, la población donde se encuentran los ejemplares de *A. alba* en proceso de decaimiento.

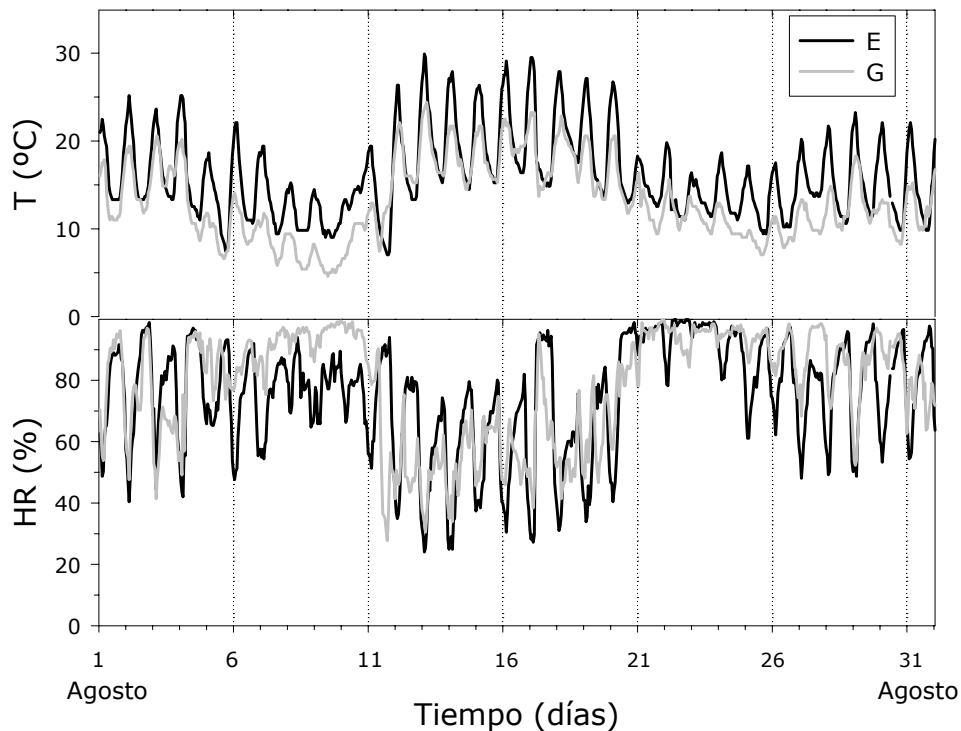


Figura 2.4. Temperatura (T) y humedad relativa (HR) durante Agosto de 2002 en los sitios E (líneas negras) y G (líneas grises).

2.2.2. Crecimiento, potencial hídrico y conductividad hidráulica

Con el objetivo de comprobar la existencia de posibles diferencias en el crecimiento entre ambos lugares de estudio, se midió el crecimiento primario anual, para el periodo 1993-2002, de 10 ramas muestreadas de la parte media de la copa de 10 árboles por sitio. El crecimiento radial se estimó, para el mismo periodo, cogiendo 2 *cores* para los mismos árboles a 1,3 m de altura. Los *cores* se lijaron y los anillos de crecimiento se dataron siguiendo procedimientos dendrocronológicos estándar. La anchura del anillo de crecimiento se midió, con una precisión de 0,01 mm, mediante un sistema de medida semiautomático LINTAB (Frank Rinn, Heidelberg, Alemania). Finalmente, se midió la longitud de las acículas muestreadas de la parte central de cada brote anual. Se midieron 10 acículas para cada crecimiento anual en cada sitio, para el periodo 1993-2002.

Por otra parte, con el objetivo de evaluar el estado hídrico de los árboles en el campo durante el verano, se midió el potencial hídrico (en MPa) antes del amanecer y al mediodía en 3 ramas del año en curso de la parte externa media de la copa, en 3 árboles diferentes para cada sitio. Las medidas se tomaron durante un periodo sin precipitaciones (7-8 de Agosto de 2002). Se usó una cámara de presión tipo Scholander siguiendo el procedimiento metodológico descrito por Turner (1988). Por último, para comprobar si se había producido embolia en ramas del año en curso, se midió la conductividad hidráulica en 5 ramas escindidas de 5 árboles por sitio antes y después de provocar la ruptura de una posible embolia, tal y como describen Sperry *et al.* (1988).

2.2.3. Medidas de intercambio de gases y fluorescencia de clorofila

Se realizaron medidas de intercambio de gases en el campo en acículas no escindidas durante el verano de 2002 para evaluar el estado fotosintético de los árboles de los sitios G y E. Al final del periodo vegetativo (Agosto) se midió la asimilación neta de CO₂ (A, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y la conductancia estomática (g_s , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en acículas del año en curso (0 años, 2002), acículas jóvenes (1 año, 2001), y acículas maduras (3 años, 1999) de 5 árboles por sitio. Las medidas se realizaron a las 8, 10 y 12 h (hora solar). Los parámetros fotosintéticos se obtuvieron utilizando un sistema portátil de análisis de intercambio de gases por infrarrojos (CIRAS-1, PP-Systems, Herts, Reino Unido) con una pinza automática para coníferas (PLC-C, PP-Systems, Herts, Reino Unido). La PPFD se midió a las mismas horas con un sensor de luz ELE (Quantum Sensor SKP 2000, Skye Instruments Ltd, Powys, Reino Unido) situado junto al borde la copa de cada árbol donde se habían realizado las medidas.

Las medidas de fluorescencia de clorofila se realizaron en el campo en acículas no escindidas antes del amanecer, a las 8 y a las 12 h (hora solar) con un fluorímetro portátil PAM 2000 (Heinz Walz, Effeltrich, Alemania). Las medidas se hicieron en acículas del año en curso (0 años, 2002), acículas jóvenes (1 año, 2001), y acículas maduras (3 años, 1999) de 5 árboles por sitio. La metodología seguida fue la descrita por Morales *et al.* (2000). Se midió la fluorescencia de clorofila mínima (F_0) y máxima (F_M) en condiciones de oscuridad antes del amanecer. Para realizar las medidas de F_0

y F_M a las 8 y 12h (hora solar) las acículas se cubrieron con una bolsa de plástico negra y se mantuvieron en oscuridad durante un periodo de 30 minutos. La fluorescencia estacionaria (F_S) se midió después de que se destaparan las acículas, con la cantidad de PPFD que había en ese momento en cada sitio. Posteriormente se utilizó un segundo pulso de luz saturante de luz blanca para determinar la fluorescencia máxima con las acículas adaptadas a la luz (F'_M). Las acículas se cubrieron de nuevo con una bolsa de plástico negra para medir la fluorescencia basal después de la inducción (F'_0). La fluorescencia variable en la oscuridad (F_V) se define como $F_M - F_0$, mientras que la fluorescencia variable en las acículas adaptadas a la luz (F'_V) se define como $F'_M - F'_0$. La relación F_V/F_M estima la eficiencia potencial máxima del fotosistema II (PSII) en la oscuridad. Las eficiencias real (Φ_{PSII}) e intrínseca ($\Phi_{exc.}$) del PSII fueron estimadas como $(F'_M - F_S)/F'_M$ y (F'_V/F'_M) , respectivamente. El *quenching* fotoquímico (qP) se calculó como $(F'_M - F_S)/F'_V$. El *quenching* no-fotoquímico (NPQ) se calculó como $(F_M / F'_M) - 1$, utilizando los valores de F_M del sitio G antes del amanecer como valores control. La tasa de transporte electrónico (ETR) se calculó mediante el método descrito por Krall & Edwards (1992), donde Φ_{PSII} se multiplica por PPFDF, por 0,5 (debido a que dos fotones son necesarios para excitar un electrón, asumiendo que se produce una distribución equitativa de la excitación entre los fotosistemas I y II) y por 0,84, que está considerado como el coeficiente de absorbancia foliar más común para las plantas C_3 (Björkman & Demmig 1987), incluyendo *A. alba*.

2.2.4. Análisis de pigmentos fotosintéticos

Para determinar la existencia de posibles diferencias en la concentración de pigmentos fotosintéticos entre las acículas de los sitios G y E, se recogieron muestras de acículas de las ramas donde previamente se habían realizado las medidas de fluorescencia de clorofila, antes del amanecer, a las 8 y a las 12 h (hora solar). Las medidas se hicieron en acículas del año en curso (0 años, 2002), acículas jóvenes (1 año, 2001), y acículas maduras (3 años, 1999) de 5 árboles por sitio. Las acículas se envolvieron en papel de aluminio y se congelaron en nitrógeno líquido, para ser almacenadas posteriormente a -20 °C. Los pigmentos de las acículas fueron extraídos tal y como describe Abadía & Abadía (1993). Los pigmentos extraídos se filtraron a través de un filtro hidrófobo de 45 μ m y se analizaron mediante un método de HPLC

(Larbi *et al.* 2004) basado en el desarrollado por De las Rivas *et al.* (1989). La relación entre la concentración de (anteraxantina + zeaxantina) / (violaxantina + anteraxantina + zeaxantina) se abrevió como (A+Z)/(V+A+Z).

2.2.5. Reflectancia espectral

La reflectancia espectral es una herramienta rápida y no destructiva que permite detectar el estrés en plantas en un número de muestras muy elevado (Carter & Knapp 2001). Para la realización de estas medidas se utilizó un Sistema de Análisis Espectral UniSpec (PP Systems, Herts, Reino Unido) para medir la reflectancia espectral de las acículas de los sitios G y E en un rango de longitudes de onda desde los 306 hasta los 1138 nm. Se siguió un procedimiento similar al descrito previamente por Richardson & Berlyn (2002). El índice de reflectancia fisiológico (PRI) se calculó como:

$$\text{PRI} = (R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570})$$

donde R_{531} y R_{570} representan, respectivamente, la reflectancia de las acículas a 531 y 570 nm, siendo ésta última la longitud de onda usada como referencia (Gamon *et al.* 1997, Evain *et al.* 2004). Este parámetro no se ha utilizado tan ampliamente como la fluorescencia de clorofila para estimar el nivel de estrés al que está sometida la planta, a pesar de que se correlaciona muy bien con el estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas ((A+Z)/(V+A+Z)) y con cambios en el ΔpH trans-tilacoidal (Gamon *et al.* 1997). Por este motivo el PRI podría ser usado como un parámetro complementario del análisis de la fluorescencia de clorofila y de los pigmentos fotosintéticos.

2.2.6. Análisis de nutrientes

Para determinar si había diferencias nutricionales entre las acículas de los sitios G y E, se analizó al final del periodo vegetativo el estado nutricional de las acículas del año en curso (0 años, 2002), acículas jóvenes (1 año, 2001), y acículas maduras (3 años, 1999) utilizadas para el resto de las medidas fisiológicas. En cada

sitio se seleccionaron 2 sub-parcelas circulares de 30 m de diámetro, localizadas a una distancia de 100 m una de otra, que incluían los árboles donde se habían realizado las medidas fisiológicas. Se recogieron las acículas de 5 ramas de los 5 árboles situados más cerca del centro de cada sub-parcela. Para cada sub-parcela se mezcló la cantidad total de muestra. El nitrógeno (N) se determinó con un Analizador Elemental de Nitrógeno NA2100 (Thermoquest, Milán, Italia). Las muestras se secaron y se disolvieron en HNO₃ y HCl siguiendo el procedimiento AOAC (Asociación Oficial de Químicos Analíticos, Washington DC, Estados Unidos). El calcio (Ca) (después de la adición de lantano), el magnesio (Mg), el hierro (Fe), el manganeso (Mn), el cobre (Cu) y el cinc (Zn) se determinaron mediante espectrometría de absorción atómica de llama. El potasio (K) se determinó mediante espectrometría de emisión de llama y el fósforo (P) mediante el método espectrofotométrico del molibdato-vanadato.

2.2.7. Análisis estadístico

Todos los valores que aparecen en las gráficas y tablas de este capítulo están expresados como valor medio \pm error estándar. Las comparaciones entre los valores medios de los sitios G y E se realizaron utilizando el test no paramétrico *U* de Mann-Whitney, debido a que los datos obtenidos no presentaban una distribución normal.

2.3. Resultados

2.3.1. Crecimiento, potencial hídrico y conductividad hidráulica

En termino medio, los ejemplares de *A. alba* del sitio E crecían menos que los del sitio G (Tabla 2.1). Los potenciales hídricos medidos antes del amanecer y al mediodía no presentaban diferencias significativas entre los sitios G y E (Tabla 2.1). No hubo pérdida de conductividad hidráulica en ninguno de los dos sitios antes y después de perfusiones repetidas, indicando que la cavitación nativa era despreciable (Tabla 2.1).

2.3.2. Intercambio de gases

Los valores medios de la fotosíntesis neta (A) y de la conductancia estomática (g_s) en el sitio E fueron significativamente más bajos ($P \leq 0,05$) que en el sitio G (Figura 2.5), especialmente en acículas del año en curso y de un año de edad a las 8 y 10 h (hora solar). Además, la tendencia del sitio E a presentar unos valores más bajos de A no se debía completamente al descenso en g_s , por lo que la eficiencia intrínseca en el uso del agua (WUE , estimada como el cociente A/g_s) fue más baja para el sitio E en acículas del año en curso y de un año de edad a las 8 h. (hora solar) (Figura 2.5).

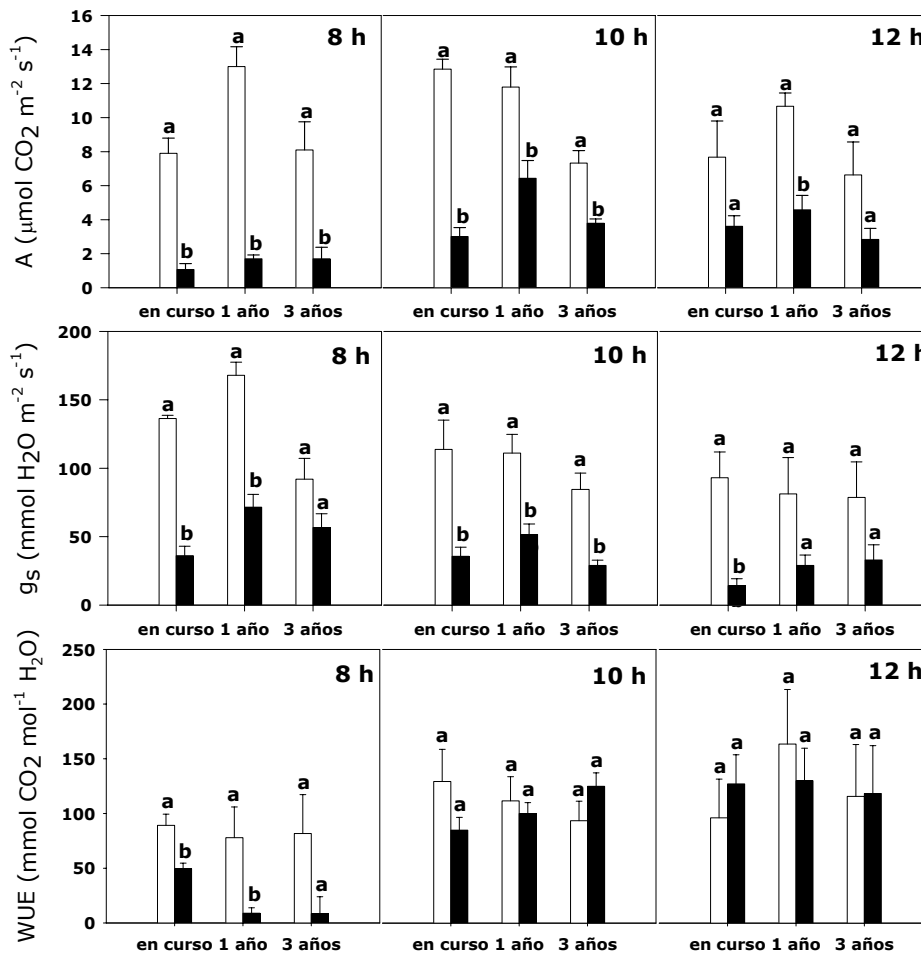


Figura 2.5. Fotosíntesis neta (A), conductancia estomática (g_s) y eficiencia intrínseca en el uso del agua (WUE) en acículas del año en curso (2002, 0 años), jóvenes (2001, 1 año) y maduras (1999, 3 años) de los sitios G (barras blancas) y E (barras negras). Los valores medios para cada sitio fueron comparados para las 8, 10 y 12 h (hora solar). Las diferencias significativas ($P \leq 0,05$) se indican mediante letras diferentes.

2.3.3 Fluorescencia de clorofila, pigmentos fotosintéticos y reflectancia espectral

Se encontró un descenso significativo en la eficiencia potencial máxima del fotosistema II (F_v/F_M) en el sitio E, especialmente en acículas del año en curso y en acículas jóvenes (Figura 2.6). Este hecho fue debido a un incremento en F_0 antes del amanecer de 2,1, 1,6 y 1,5 veces en las acículas del año en curso, jóvenes y maduras, respectivamente, en relación con las del sitio G (datos no mostrados). Los valores de F_M del sitio E no presentaban diferencias significativas con respecto al sitio G. Por esta razón, los valores de *quenching* no fotoquímico (NPQ) del sitio E se calcularon utilizando sus propios valores de F_M . En contraste con la situación del sitio E, los valores de F_v/F_M del sitio G estaban alrededor de 0,8 para acículas del año en curso, jóvenes y maduras (Figura 2.6).

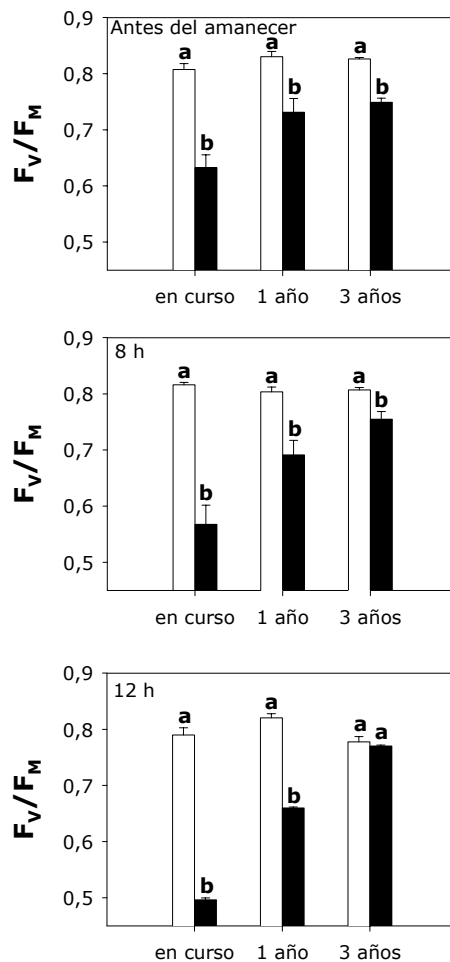


Figura 2.6. Eficiencia potencial máxima del PSII (F_v/F_M) en acículas del año en curso (2002, 0 años), jóvenes (2001, 1 año) y maduras (1999, 3 años) de los sitios G (barras blancas) y E (barras negras). Símbolos como en Figura 2.5.

Tanto la eficiencia real (Φ_{PSII}) como intrínseca ($\Phi_{exc.}$) del PSII fueron significativamente más altas ($P \leq 0,05$) a las 8 y a las 12 h. (hora solar) en el sitio G, en comparación con el sitio E (Figura 2.7).

El *quenching* fotoquímico (qP) fue ligeramente más bajo y el *quenching* no fotoquímico (NPQ) ligeramente más alto en el sitio E que en el sitio G, aunque las diferencias no eran significativas en todos los casos (Figura 2.8), a pesar de que el nivel de PPFD era similar en ambos sitios (Tabla 2.1).

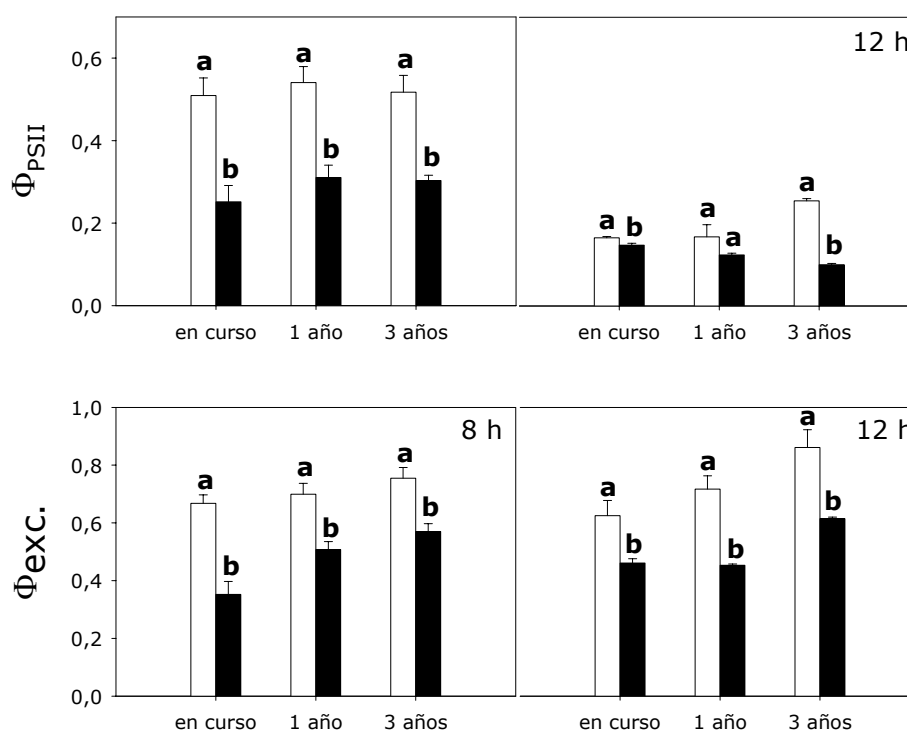


Figura 2.7. Eficiencias real (Φ_{PSII}) e intrínseca ($\Phi_{exc.}$) del PSII en acículas del año en curso (2002, 0 años), jóvenes (2001, 1 año) y maduras (1999, 3 años) de los sitios G (barras blancas) y E (barras negras). Símbolos como en Figura 2.5.

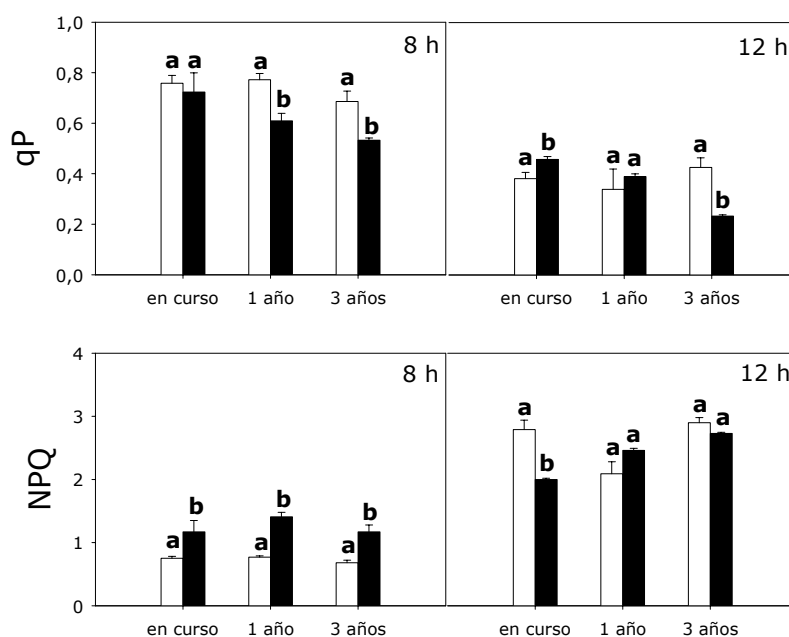


Figura 2.8. *Quenching* fotoquímico (qP) y *quenching* no fotoquímico en acículas del año en curso (2002, 0 años), jóvenes (2001, 1 año) y maduras (1999, 3 años) de los sitios G (barras blancas) y E (barras negras). Símbolos como en Figura 2.5.

Respecto a los pigmentos fotosintéticos, las concentraciones en acículas del año en curso y en acículas jóvenes fueron menores que en acículas maduras para ambos sitios. Las concentraciones de clorofila a, clorofila b y β -caroteno y la relación clorofila a / clorofila b fueron menores para las acículas del sitio E que para el sitio G (Tabla 2.2). En general, las concentraciones de los pigmentos fotosintéticos del sitio E eran más bajas que en el sitio G, para acículas de la misma edad (Tabla 2.2). Estas diferencias se hacían más pronunciadas en acículas del año en curso y en acículas jóvenes. La relación $(A+Z)/(V+A+Z)$ alcanzó valores más altos en el sitio E que en el sitio G al mediodía (Figura 2.9), aunque el nivel de PPFD era similar en ambos sitios (Tabla 2.2).

El índice de reflectancia fisiológico (PRI) en el sitio G era significativamente ($P \leq 0,05$) más alto que en el sitio E, excepto en acículas de 3 años de edad a las 12 h (hora solar) (Figura 2.10). En el sitio E se encontraron relaciones lineales entre el PRI y el estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas $[(A+Z)/(V+A+Z)]$ ($R^2=0,65$; $F=7,55$; $P=0,05$; Figura 2.10), y entre el PRI y el cociente ETR/A ($R^2=0,75$; $F=11,89$; $P=0,03$; Figura 2.9). Sin embargo, estas correlaciones con

el PRI no eran estadísticamente significativas para el sitio G ni con ETR/A ($R^2=0,03$; $F=0,13$; $P=0,74$) ni con (A+Z)/(V+A+Z) ($R^2=0,28$; $F=1,58$; $P=0,28$) (Figura 2.10).

Tabla 2.2. Concentración de pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{mol m}^{-2}$) en acículas del año en curso (2002, 0 años), jóvenes (2001, 1 año) y maduras (1999, 3 años) de los sitios E y G. Los valores medios para cada sitio fueron comparados para acículas de 0, 1 y 3 años. Símbolos como en Tabla 2.1.

	Edad de las acículas (años)	Sitio E	Sitio G
Neoxantina	0	11,5 ± 1,0 a	12,7 ± 0,5 a
	1	16,2 ± 1,4 a	20,1 ± 1,9 a
	3	22,1 ± 1,9 a	26,1 ± 1,7 a
Luteína	0	50,2 ± 3,0 a	50,8 ± 2,8 a
	1	62,1 ± 4,2 a	70,7 ± 5,8 a
	3	77,9 ± 5,2 a	90,0 ± 4,7 a
β -caroteno	0	14,1 ± 1,7 a	21,7 ± 2,5 b
	1	16,8 ± 1,5 a	18,8 ± 1,5 a
	3	14,5 ± 1,8 a	23,6 ± 2,2 a
Chl b	0	89,0 ± 3,0 a	101,0 ± 3,9 b
	1	120,8 ± 9,1 a	156,2 ± 13,3 b
	3	160,4 ± 10,6 a	193,8 ± 10,4 a
Chl a	0	265,4 ± 20,1 a	330,1 ± 13,2 b
	1	352,9 ± 25,8 a	508,9 ± 40,2 b
	3	456,9 ± 34,0 a	591,0 ± 32,1 b
Chl a/Chl b	0	2,9 ± 0,0a	3,3 ± 0,0 b
	1	2,9 ± 0,1a	3,3 ± 0,0 b
	3	2,8 ± 0,1a	3,0 ± 0,0 b
V+A+Z	0	31,8 ± 2,1 a	28,3 ± 1,4 a
	1	38,8 ± 1,8 a	39,3 ± 3,3 a
	3	39,0 ± 3,6 a	42,6 ± 2,4 a

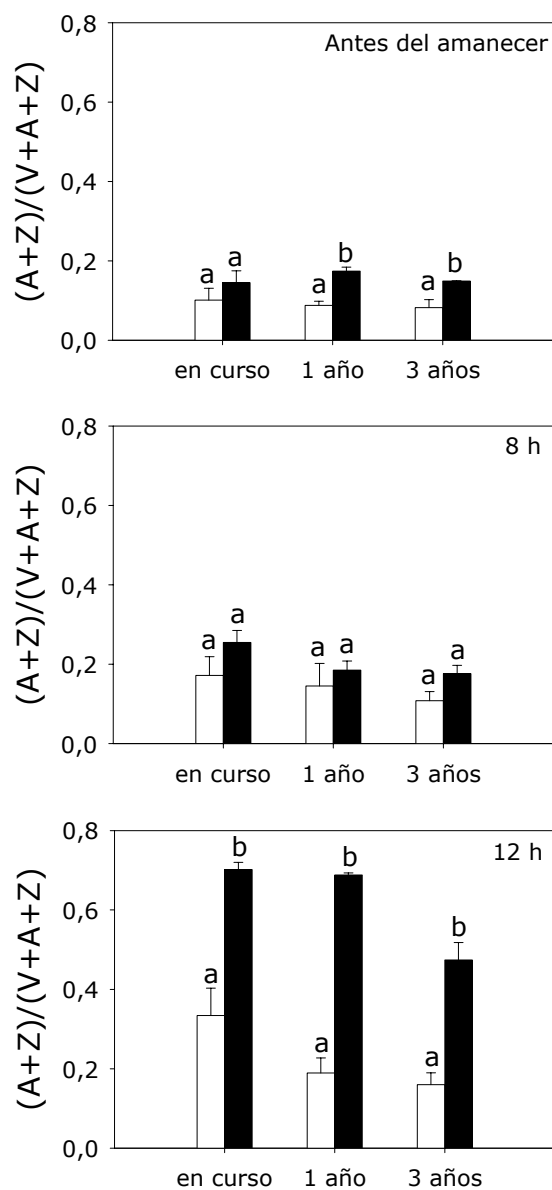


Figura 2.9. Estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas $[(A+Z)/(V+A+Z)]$ en acículas del año en curso (2002, 0 años), jóvenes (2001, 1 año) y maduras (1999, 3 años) de los sitios G (barras blancas) y E (barras negras). Símbolos como en Figura 2.5.

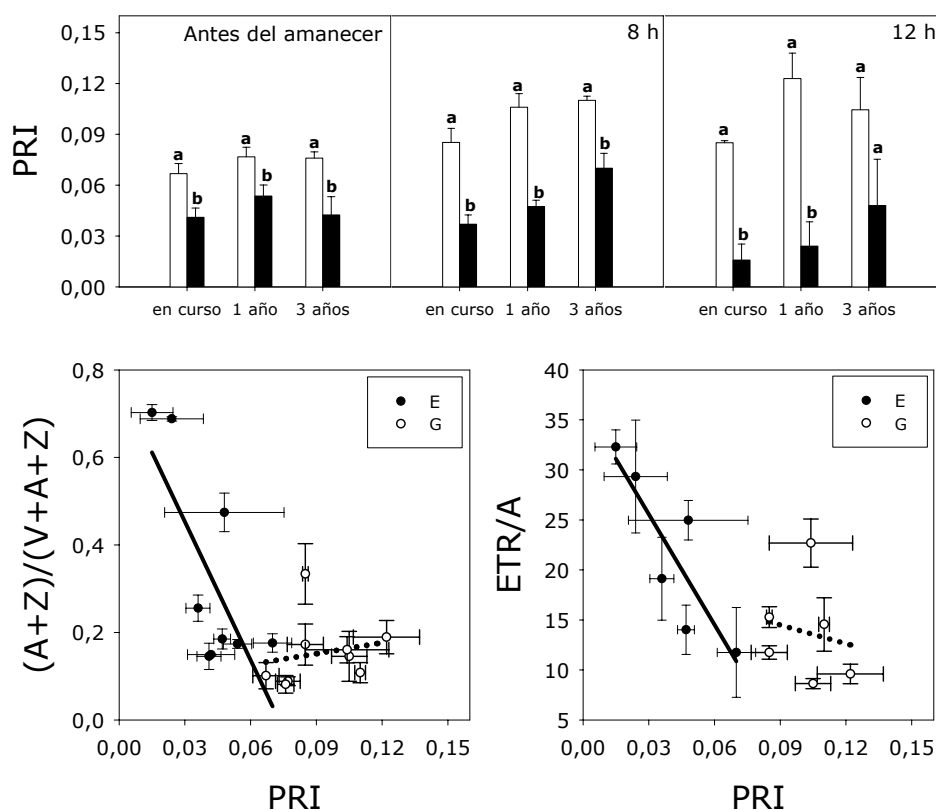


Figura 2.10. Valores medios del índice de reflectancia fisiológico (PRI, gráficos situados en la parte superior) en acículas del año en curso (2002, 0 años), jóvenes (2001, 1 año) y maduras (1999, 3 años) de los sitios G (barras blancas). Los gráficos situados en la parte inferior representan las relaciones existentes entre el PRI y el estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas $[(A+Z)/(V+A+Z)]$, y entre el PRI y la relación ETR/A. Las líneas discontinuas y continuas corresponden a las relaciones lineales para los sitios G (símbolos blancos) y E (símbolos negros), respectivamente.

2.3.4. Concentración de nutrientes en las acículas

Las concentraciones de N, P, K y Mn fueron más altas para las acículas del sitio G que para las acículas del sitio E (Tabla 2.3). Las concentraciones medias de Ca y Zn no fueron significativamente distintas entre los sitios G y E, mientras que las concentraciones de Mg y Fe fueron más altas para las acículas del sitio E, en comparación con las acículas de la misma edad del sitio G (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Concentración de nutrientes (N, P, Ca, Mg y K en % de peso seco, y Fe, Mn, Cu y Zn in mg kg⁻¹ de peso seco) en acículas del año en curso (2002, 0 años), jóvenes (2001, 1 año) y maduras (1999, 3 años) de los sitios E y G. Símbolos como en Tabla 2.1.

	Edad de las acículas (años)	Sitio E	Sitio G
N	0	1,44 ± 0,04 a	1,61 ± 0,04 b
	1	1,41 ± 0,01 a	1,76 ± 0,05 b
	3	1,36 ± 0,06 a	1,82 ± 0,04 b
P	0	0,10 ± 0,00 a	0,20 ± 0,00 b
	1	0,07 ± 0,00 a	0,15 ± 0,00 b
	3	0,07 ± 0,00 a	0,12 ± 0,00 b
Ca	0	1,04 ± 0,01 a	1,11 ± 0,03 a
	1	2,27 ± 0,02 a	1,94 ± 0,03 b
	3	2,31 ± 0,25 a	2,77 ± 0,10 a
Mg	0	0,22 ± 0,02 a	0,16 ± 0,03 a
	1	0,29 ± 0,02 a	0,17 ± 0,00 b
	3	0,19 ± 0,09 a	0,14 ± 0,01 a
K	0	0,28 ± 0,10 a	0,84 ± 0,02 b
	1	0,17 ± 0,04 a	0,91 ± 0,02 b
	3	0,28 ± 0,16 a	0,82 ± 0,00 b
Fe	0	100,7 ± 34,3 a	67,4 ± 0,4 b
	1	112,3 ± 10,1 a	85,1 ± 1,6 b
	3	165,3 ± 0,5 a	111,4 ± 6,8 b
Mn	0	8,4 ± 5,6 a	84,0 ± 3,4 b
	1	61,8 ± 12,4 a	101,8 ± 6,9 b
	3	261,9 ± 118,3 a	118,8 ± 1,8 b
Zn	0	38,4 ± 3,6 a	35,9 ± 0,4 a
	1	46,1 ± 8,2 a	30,8 ± 0,2 a
	3	94,6 ± 18,5 a	25,7 ± 0,1 b

2.4. Discusión

Las acículas de los ejemplares del sitio G presentaban valores en los parámetros fisiológicos relacionados con la actividad fotosintética típicos de una población de abeto blanco en condiciones óptimas de crecimiento (Guehl *et al.* 1991, Körner 1995). Sin embargo, las acículas del sitio E mostraban parámetros fisiológicos muy diferentes de aquéllos encontrados para las acículas del sitio G.

Las concentraciones de los principales nutrientes en ejemplares del sitio G corresponden a unas acículas con un estado nutricional óptimo (Bergmann 1993). Las acículas del año en curso del sitio E mostraban valores nutricionales típicos de árboles desarrollados sobre sustratos calizos: altas concentraciones de Ca, bajas concentraciones de P y K y una deficiencia extrema de Mn (especialmente en acículas del año en curso y en acículas jóvenes) (Tabla 2.3). Es en estos tres últimos nutrientes donde se observan las mayores diferencias entre ambos sitios. En este sentido, algunos autores han encontrado alteraciones similares en la concentración de nutrientes en ejemplares de *A. alba* plantados sobre sustrato básico (González-Cascón *et al.* 1985, Bergmann 1993). Estas alteraciones tenían su origen en la baja disponibilidad de P y Mn, y en el antagonismo entre el Ca y el K en estos suelos.

Los niveles relativamente bajos de $(A+Z)/(V+A+Z)$ antes del amanecer en ambos sitios (Figura 2.9) indicaban que la disminución en F_V/F_M en acículas del año en curso y acículas jóvenes del sitio E (Figura 2.6) no tenía su origen en la retención nocturna de formas de-epoxidadas de los pigmentos del ciclo de las xantofilas, pudiendo estar relacionada con la deficiencia en Mn (Tabla 2.3), tal y como describen Val *et al.* (1995). Además, la baja relación Chl a/Chl b de las acículas del año en curso y el incremento en F_0 de las acículas del año en curso y de las acículas jóvenes del sitio E apoyan esta idea (Abadía *et al.* 1986, Val *et al.* 1995).

Estos hallazgos concuerdan con las diferencias encontradas en la fotosíntesis neta (A) y en la conductancia estomática (g_s) entre las acículas de los sitios E y G, especialmente por el acentuado descenso en A encontrado en el sitio E. Debido a este marcado descenso en A, el cociente ETR/A aumentaba en el sitio E, en comparación con los valores del sitio G, porque había un exceso de transporte electrónico que no iba destinado a la fijación de CO_2 (Figura 2.10). La falta de equilibrio entre estos dos procesos puede generar un ΔpH trans-tilacoidal, lo que puede tener un efecto en los

valores de PRI. Estos hechos podrían explicar las relaciones lineales existentes entre PRI - ETR/A y $PRI-(A+Z)/(V+A+Z)$ en el sitio E, y la ausencia de esas mismas relaciones en el sitio G (Figura 2.10).

Por otra parte, una mayor sequía atmosférica puede causar directamente el cierre estomático y, como consecuencia, una disminución directa en la asimilación neta de CO₂ en *A. alba*, especialmente en acículas del año en curso (Guehl & Aussenac 1987). En este estudio, el cierre estomático repentino, en respuesta a una disminución en la disponibilidad de agua en el suelo, ocurría incluso antes de que se produjera un descenso significativo en el potencial hídrico de la planta antes del amanecer. La gran sensibilidad de *A. alba* al estrés hídrico se ve confirmada por su bajo control estomático del intercambio de gases, en comparación con otros abetos mediterráneos (Guehl *et al.* 1991, Aussenac 2002). Por lo tanto, *A. alba* podría ser considerado como una especie que evita el estrés hídrico (*sensu* Levitt 1980), con una gran sensibilidad a las restricciones pero con una teórica capacidad para resistir periodos severos de sequía a través de un rápido cierre estomático (Aussenac 2002). La sequía atmosférica causada por unas condiciones microclimáticas adversas induce un cierre estomático muy rápido en otras coníferas semejantes (Sandford & Jarvis 1986, Grieu *et al.* 1988). Los bajos niveles de conductancia estomática y fotosíntesis neta encontrados en el sitio E sugieren que un alto déficit en la presión de vapor en este lugar podría limitar la fotosíntesis y, como consecuencia, el crecimiento de los ejemplares de *A. alba* existentes. Además, el cierre estomático no tuvo su origen en la existencia de un bajo potencial hídrico en el xilema porque dicho parámetro, tanto al amanecer como al mediodía, no presentaba diferencias significativas entre los sitios G y E (Tabla 2.1).

El marcado descenso de la fotosíntesis neta en las acículas jóvenes del sitio E fue mayor que el esperado por el cierre estomático, lo que implica una baja eficiencia intrínseca en el uso del agua en el sitio E. Este hecho es muy importante en las coníferas, debido a que las acículas jóvenes son las que llevan a cabo la mayor parte de la asimilación neta de CO₂ (Beyschlag *et al.* 1994). El fuerte descenso de la fotosíntesis neta en el sitio E podría estar causado por los bajos valores de F_v/F_m y Φ_{PSII} encontrados, en comparación con los valores medidos para el sitio G (Figuras 2.6 y 2.7). Este descenso en la fotosíntesis neta tiene como consecuencia una disminución en la capacidad de crecimiento de los ejemplares de *A. alba* del sitio E, en comparación con los del sitio G.

Las características fisiológicas de estas poblaciones de *A. alba* que presentan características de vigor contrastadas sugieren que el clima podría actuar como un factor discriminante en el desarrollo de las poblaciones situadas en localizaciones marginales, bajo condiciones de xericidad similares a las existentes en el sitio E. El clima en el sitio E se hallaba bajo una clara influencia mediterránea, mientras que el clima en el sitio G se caracterizaba por una mayor influencia atlántica y por la existencia de unas condiciones ambientales más méxicas. Este gradiente climático, desde el sitio más xérico (Ezpela) hasta el sitio más húmedo (Gamueta), estaba causado por diferencias geográficas y topográficas, correspondiendo a la transición latitudinal y altitudinal entre la vegetación mediterránea y eurosiberiana observada en la cordillera pirenaica (Vigo & Ninot 1987). De esta manera, el sitio E representa una población de *A. alba* que ocupa un hábitat extremo para esta especie, muy diferente de las condiciones típicas del óptimo ecológico de la especie (muy similares a las observadas en el sitio G).

2.5. Conclusiones

Las poblaciones de abeto blanco localizadas en el límite ecológico de la especie, bajo condiciones más xéricas (por ejemplo, el sitio E), pueden ser mucho más sensibles a un cambio climático que aquéllas situadas en el núcleo de su área de distribución, bajo condiciones más méxicas (por ejemplo, el sitio G), tal y como se ha sugerido para otras especies (Brubaker 1986, Gaston 2003).

Este hecho podría explicar las diferencias encontradas en los parámetros de crecimiento, fotosintéticos, fotoquímicos y nutricionales entre los ejemplares de *A. alba* de los sitios E y G. La drástica reducción de la asimilación neta de CO₂ debido a un incremento en la aridez causa una disminución en el crecimiento.

En este estudio se concluye que un futurible aumento de la temperatura y un aumento de la frecuencia de sequías intensas en los Pirineos podrían causar una acusada pérdida de productividad en aquellas poblaciones de abeto blanco localizadas cerca del límite ecológico de la especie.

CAPÍTULO 3

La fluorescencia de clorofila en el clorénquima cortical de la corteza: un nuevo indicador no destructivo de daño por helada en ramas de *Pinus sylvestris* L.

3.1. Introducción.....	52
3.2. Material y métodos.....	54
3.2.1. Material vegetal y lugar de estudio	54
3.2.2. Exposición a temperaturas de congelación y estimación de la tolerancia a las mismas.....	57
3.2.3. Medidas de fluorescencia de clorofila.....	58
3.2.4. Liberación de electrolitos.....	59
3.2.5. Visual scoring.....	59
3.2.6. Reflectancia espectral.....	60
3.2.7. Análisis de pigmentos.....	60
3.2.8. Análisis estadístico.....	61
3.3. Resultados.....	61
3.4. Discusión.....	67
3.5. Conclusiones.....	69

3.1. Introducción

El daño inducido por helada es uno de los principales factores limitantes que pueden explicar la distribución mundial de las especies vegetales (Ameglio *et al.* 2001, Corcuera *et al.* 2005), debido a la gran cantidad de superficie terrestre que está sometida a temperaturas inferiores al punto de congelación (Beck *et al.* 2004). Para sobrellevar el daño inducido por helada, las especies vegetales tienen que soportar las bajas temperaturas sin que se produzcan procesos de congelación en la célula y, como consecuencia, estrés hídrico a nivel celular (Repo *et al.* 2006).

Con respecto a las coníferas, especialmente en las especies del género *Pinus*, las consecuencias últimas en relación a la supervivencia de la planta dependen de cuál sea el tejido afectado. De esta manera, una pérdida imprevisible de follaje después de un daño importante puede no tener ninguna consecuencia en el crecimiento en las especies del género *Pinus* (Glynn & Lindelöw 2002, Juknys *et al.* 2003). Sin embargo, cuando el daño afecta de manera importante a los tejidos vivos de la parte interior de la corteza del brote, el cambium y el floema (Lu *et al.* 2003), éste impedirá una posterior producción de yemas (Court-Picon *et al.* 2004). Este hecho tendrá consecuencias fatales para la supervivencia del árbol en su conjunto, en ausencia de rebrotes epicórmicos por debajo de las zonas afectadas (Del Tredici 2001, Burrows *et al.* 2003). Por estas razones, varios autores han puesto un especial interés en estudiar el grado de resistencia de la parte interna de la corteza de las coníferas expuestas a temperaturas de congelación.

Numerosas técnicas se han utilizado para identificar el valor de temperatura umbral en el que se produce un daño irreversible por helada en la parte interna de la corteza. Algunas de ellas se han venido empleando ampliamente en varios tejidos vegetales, concretamente:

- El visual scoring (VS) de los cambios de color debidos a daños por helada (O'Neill *et al.* 2001, Luoranen *et al.* 2004).
- Los cambios en las tasas de liberación de electrolitos (EL) por cambios en la permeabilidad de la membrana celular debidos a la formación de hielo dentro de la célula (Luoranen *et al.* 2004, Joosen *et al.* 2006, Lu *et al.* 2007).

- El análisis térmico diferencial, basado en la detección de una exoterma que es el resultado de un incremento de la diferencia de temperatura entre el tejido que se congela y una referencia (Hacker & Neuner 2007).

Algunas técnicas alternativas han sido específicamente diseñadas para cuantificar los daños inducidos por helada y el endurecimiento respecto a la helada en tejidos vivos del tallo, concretamente:

- El análisis de la impedancia eléctrica (Repo *et al.* 2000a, 2000b).
- El análisis de cambios reflectométricos con el tiempo (Sparks *et al.* 2001).
- La medida del espectro visible-infrarrojo cercano (Sundblad *et al.* 2001).

Sin embargo, la mayoría de estas técnicas presentan varias desventajas, tales como un excesivo consumo de tiempo, la subjetividad en la detección de los cambios visuales o la necesidad de un equipamiento complejo. Por lo tanto, tal y como describen Repo *et al.* (2000a), no existe todavía un método fácil y rápido para la cuantificación de la tolerancia a las temperaturas de congelación que pueda ser utilizado ampliamente en ecología forestal o en programas de mejora.

Los parámetros derivados de la medida de la fluorescencia de clorofila, especialmente la eficiencia potencial máxima del fotosistema II (PSII) (estimada a través de la relación F_v/F_M), han sido ampliamente utilizados como indicadores de estrés por helada en varios tejidos que contienen clorofila (Westin *et al.* 1995, Binder & Fielder 1996, Rose & Haase 2002, Perks *et al.* 2004, Puértolas *et al.* 2005, Bigras & Bertrand 2006). En estos casos los descensos en la ratio F_v/F_M estaban causados por un incremento en la fluorescencia mínima en la oscuridad (F_0), como fluorescencia “muerta” o adscrita a clorofila libre como ocurre con otros estreses abióticos (Morales *et al.* 2001), que está reflejando casi con toda seguridad la muerte celular (Neuner & Buchner 1999). Esta técnica permite a los investigadores la cuantificación del nivel de estrés por helada en un gran número de muestras. La cuestión que surge ahora es si esta técnica puede ser usada en los tejidos internos de la corteza del tallo. En este sentido, varios autores han demostrado la existencia de actividad fotosintética en el clorénquima cortical de la corteza del tallo en una amplia variedad de especies leñosas, incluyendo las especies del género *Pinus* (Pfanz 1999, Pfanz *et al.* 2002, Aschan & Pfanz 2003, Ivanov *et al.* 2006, Wittmann *et al.* 2006, Wittmann & Pfanz

2007). Así, este hecho nos permite estudiar si los daños inducidos por temperaturas de congelación podrían suponer cambios en los parámetros derivados de la medida de la fluorescencia de clorofila en coníferas y otras especies vegetales.

Por lo tanto, el principal objetivo de este capítulo fue la valoración del empleo de la fluorescencia de clorofila en estos tejidos que contienen clorofila (el clorénquima cortical de la corteza) como una herramienta útil para el estudio de la tolerancia a los daños por helada en tejidos vivos de la parte interior de la corteza del brote, utilizando las acículas como un órgano de referencia en la respuesta del PSII a daños por helada. Además, para testar la fiabilidad de esta técnica, las técnicas de EL y VS se usaron como referencia para la cuantificación de los daños por helada sufridos por el tejido en su conjunto.

Con este propósito se estudió la tolerancia a la helada de acículas y tallos – dos órganos fotosintéticos – de una población de pino albar (*Pinus sylvestris* L.) localizada cerca de su límite meridional de distribución (40° 30' N, 0° 36' E, 1650 m s.n.m., Teruel, España) (Figuras 3.1 y 3.2). La razón que justifica la elección de *P. sylvestris* para la realización de este estudio es que es una especie expuesta periódicamente a temperaturas por debajo del punto de congelación (Hurme *et al.* 2000), lo cual implica una gran variación en las condiciones climáticas a las que está sometida (Alía *et al.* 2001). Además, aunque Repo *et al.* (2000b) estudió la tolerancia a la helada en tallos y acículas de varias poblaciones de *P. sylvestris* localizadas cerca de su límite septentrional de distribución, a día de hoy no se tiene constancia de la existencia de datos acerca de la tolerancia a la helada de las poblaciones más meridionales de *P. sylvestris*, como lo son aquéllas localizadas en la Península Ibérica.

3.2. Material y métodos

3.2.1. Material vegetal y lugar de estudio

Se seleccionó una población de *P. sylvestris* localizada en el Sistema Ibérico (40° 30' N, 0° 36' O, 1650 m s.n.m., Teruel, España, Figuras 3.1 y 3.2) para la exposición del material vegetal a temperaturas de congelación. En este estudio se utilizaron acículas del año en curso y ramas muestreadas de la parte media de la copa de diferentes árboles. Las muestras se almacenaron en una bolsa negra de plástico

dentro de un refrigerador termoeléctrico a 4 °C y fueron transportadas al laboratorio inmediatamente después de que fueron recogidas. El estudio se llevó a cabo durante Agosto de 2006 (en verano, cuando son esperables unos valores mínimos de tolerancia a la helada) y Enero de 2007 (en invierno, cuando son esperables unos valores máximos de tolerancia a la helada) para testar y comprobar la fiabilidad de las técnicas utilizadas.

La temperatura se monitorizó en el bosque con el propósito de describir el ambiente térmico bajo el que se desarrolla la población de *P. sylvestris* estudiada (Figura 3.3). Las temperaturas diarias mínima, media y máxima en el bosque fueron monitorizadas utilizando cuatro *datalogger* Hobo Pro RH/Temp (Onset Computer Bourne, MA, Estados Unidos). Los *datalogger* se colocaron dentro de un protector solar en la parte más baja del la copa del árbol a 5 m por encima del suelo. Las medidas se recogieron cada 30 min durante el periodo que va desde Julio de 2006 hasta Febrero de 2007.

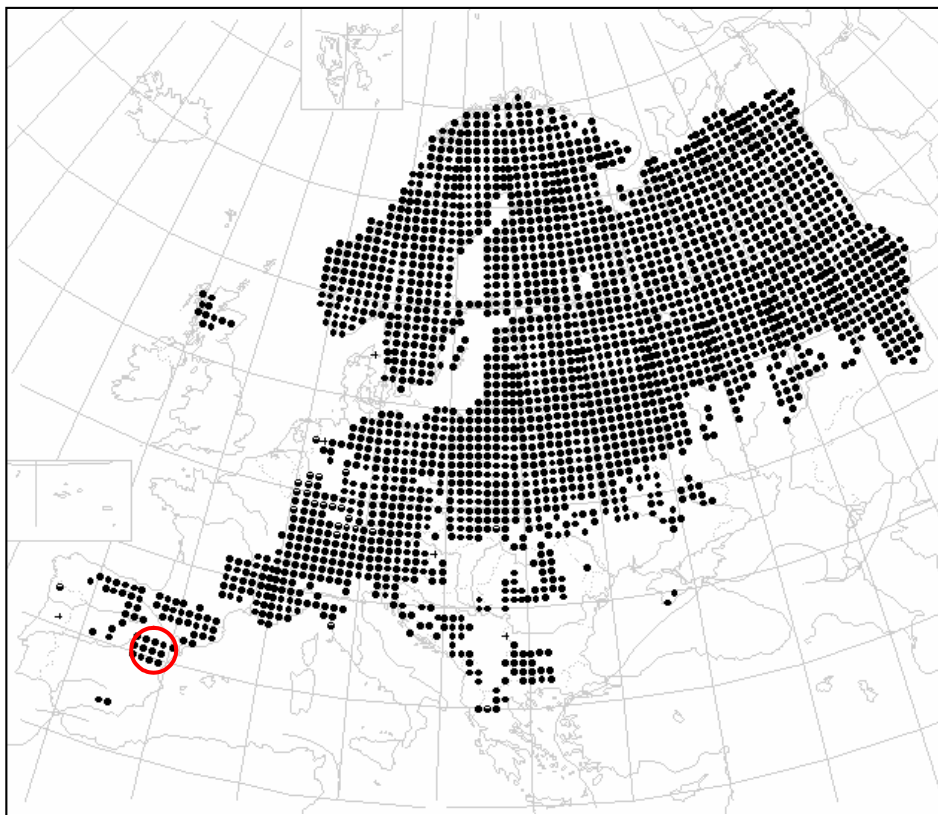


Figura 3.1. Mapa de distribución de *P. sylvestris* en Europa. El círculo rojo señala la localización aproximada de la población estudiada. Fuente: *Atlas Florae Europaeae*.



Figura 3.2. Parte superior: localización exacta de la población de *P. sylvestris* estudiada (mapa elaborado a partir del programa Google Earth). Parte inferior: ejemplares de *P. sylvestris* pertenecientes a la población estudiada.

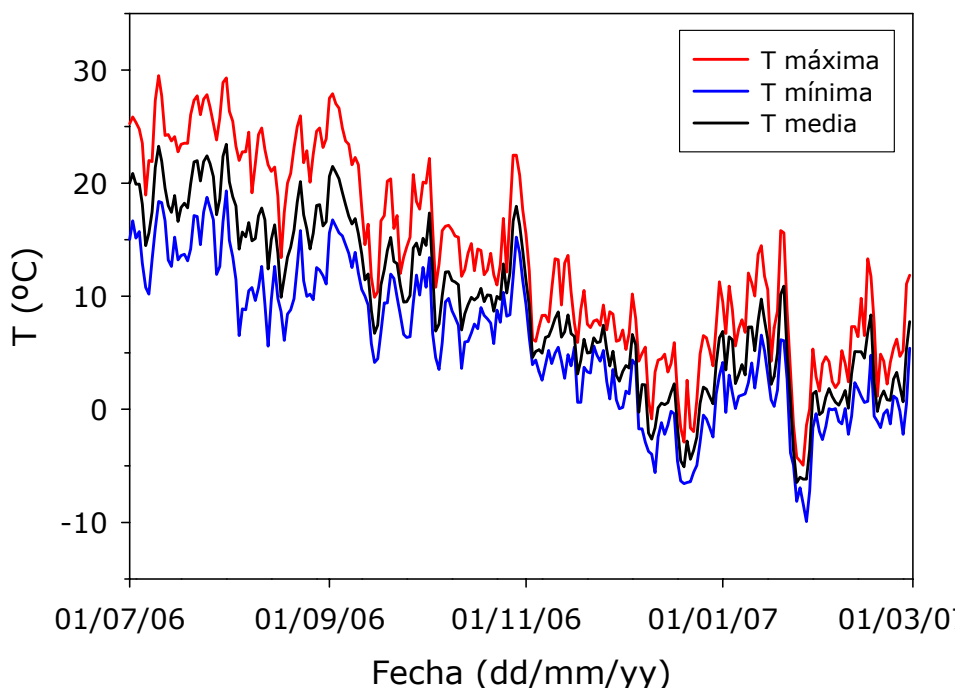


Figura 3.3. Temperaturas mínima, media y máxima desde Julio de 2006 hasta Febrero de 2007 en las poblaciones de *P. sylvestris* estudiadas.

3.2.2. Exposición a temperaturas de congelación y estimación de la tolerancia a las mismas

Los perfiles de temperatura se realizaron en un congelador comercial modificado, estableciendo las tasas de enfriamiento a través de un controlador industrial (PMA Prozess-und Maschinen-Automation GmbH Mod. KS90, Alemania) con un sistema de calentamiento con convección forzada. Las temperaturas de congelación se obtuvieron mediante el funcionamiento en continuo del motor del congelador. La homogeneidad térmica se alcanzó gracias a un sistema de micro-ventiladores colocado dentro de la cámara. Este dispositivo proporcionaba una estabilidad térmica de ± 0.1 °C sobre la temperatura fijada durante todo el perfil térmico estudiado (Esteso-Martínez & Gil-Pelegrín 2004). Las muestras (10 ramas y 10 brotes por temperatura estudiada) fueron expuestas a varias temperaturas de congelación entre -2 y -25 °C. La tasa de enfriamiento fue de 5 °C hora⁻¹ y el tiempo de exposición a cada temperatura de congelación fue de 1 hora. Este dispositivo no era capaz de hacer descender la temperatura por debajo de -25 °C, por lo que los perfiles de temperatura entre -30 y -80 °C tuvieron que llevarse a cabo mediante el empleo de

un congelador comercial CHF 250/80 (Ing. Climas, Barcelona, España) equipado con un controlador de temperatura digital tipo PID, utilizando el procedimiento experimental descrito anteriormente. En todos los ensayos la temperatura control fue 4 °C.

La tolerancia de acículas y tallos a las distintas temperaturas de congelación estudiadas fue calculada mediante cuatro métodos: fluorescencia de clorofila, EL, NDVI y VS de los daños. El valor de temperatura umbral de tolerancia a las temperaturas de congelación se estimó como el punto de inflexión de la función sigmoïdal logística:

$$y = [A / (1 + e^{B(C-x)})] + D$$

donde x e y se refieren a la temperatura de exposición y al valor de la variable utilizada para la estimación de la tolerancia a la helada, respectivamente. A y D definen las asíntotas de la función, y B es la pendiente en el punto de inflexión C (Repo *et al.* 2000a).

3.2.3. Medidas de fluorescencia de clorofila

Las medidas de fluorescencia de clorofila se realizaron en acículas y en el clorénquima cortical de la corteza a temperatura ambiente, tras la exposición de los tejidos a las diferentes temperaturas de congelación. Para ello se utilizó un fluorímetro portátil con modulación en la amplitud del pulso FMS II (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, Reino Unido). Los tejidos vegetales se cubrieron con una bolsa negra y se mantuvieron en oscuridad durante 30 min para estimar la fluorescencia de clorofila mínima (F_0) y máxima (F_M) en condiciones de oscuridad. F_0 se midió encendiendo la luz modulada de medida con una PPFD de $0,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la superficie del tejido vegetal medido. F_M se midió con un pulso de 0,8 s de $6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca sobre la superficie del tejido vegetal medido. El protocolo experimental utilizado para el análisis de F_0 fue esencialmente el descrito por Genty *et al.* (1989) con algunas modificaciones. Éstas consistían fundamentalmente en la presencia de una luz rojo-lejano ($7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en las medidas de F_0 para oxidar completamente el lado aceptor del PSII (Belkhdja *et al.* 1998a, Morales *et al.* 1998). La eficiencia potencial máxima del PSII en condiciones de oscuridad se calculó como F_V/F_M (Morales *et al.* 1991, Abadía *et al.* 1999), siendo $F_V = F_M - F_0$.

3.2.4. Liberación de electrolitos

Tras la exposición a las diferentes temperaturas de congelación, dos fragmentos de 1 cm de longitud de las partes inferior y superior de la rama se cortaron y descortezaron (10 ramas por cada temperatura testada) para examinar la liberación de electrolitos. En el caso de las acículas, se cortó una sección de 1 cm de longitud de la parte central de cada acícula (16 acículas por brote y 10 brotes por cada temperatura testada) para examinar la liberación de electrolitos. Las muestras (ramas y acículas) se lavaron en agua destilada, siendo cada muestra colocada individualmente dentro de un tubo de ensayo con 12 ml de agua destilada. Los tubos fueron incubados durante 24 horas a 4 °C para minimizar la actividad microbiana en el tejido. La conductividad eléctrica de la disolución resultante se midió a temperatura ambiente después de la primera incubación con un conductímetro (Conductimeter Basic 30, Crison Instruments S.A., España). Tras la realización de las primeras medidas, los tubos fueron incubados durante 20 min a 96 °C para asegurar la completa liberación de electrolitos por daño en el tejido. La segunda medida de conductividad eléctrica se realizó después de que las muestras alcanzaran la temperatura ambiente. La tasa relativa de liberación de electrolitos (EL) fue calculada como el cociente entre la primera y la segunda medida de conductividad eléctrica.

3.2.5. Visual scoring

Tras la exposición a las diferentes temperaturas de congelación, las muestras fueron envueltas en papel de filtro humedecido y colocadas en una cámara de cultivo a 20 °C. Las muestras se rociaban diariamente con agua para evitar artefactos causados por una posible deshidratación de las mismas. El nivel de daño se midió tras permanecer las muestras 7 días en la cámara de cultivo. En cada rama el daño fue cuantificado como el cociente entre la superficie dañada, cuando el *cambium* y el floema estaban marrones, y la superficie total de la rama. Las acículas fueron clasificadas como dañadas si estaban marrones o vivas si estaban verdes. El daño en acículas o ramas fue expresado como amarronamiento relativo y calculado como la relación entre el total de tejido marrón respecto al total de la muestra analizada (Luoranen *et al.* 2004).

3.2.6. Reflectancia espectral

La precisión en la medida de VS puede ser mejorada mediante la medida de los cambios de reflectancia en una banda espectral cercana a los 700 nm, una técnica fácil y de bajo coste que permite estimar la concentración foliar de clorofila (Gitelson *et al.* 1996, Carter & Knapp 2001). De esta manera, se hicieron medidas de reflectancia espectral en la parte interna de la corteza para cuantificar el VS en las ramas. No se hicieron medidas de reflectancia espectral en acículas porque sólo mostraban dos categorías claramente diferenciables en las medidas de VS (verdes/vivas o marrones/dañadas). Por lo tanto, se consideró que el VS en acículas era lo suficientemente preciso para cuantificar visualmente el grado de daño por helada en las acículas de *P. sylvestris*.

Después de realizar las medidas de VS, se midió la reflectancia espectral en la parte interior de la corteza entre 306 y 1138 nm, utilizando un sistema de análisis espectral Unispec (PP Systems, Herts, Reino Unido). Se siguió un procedimiento similar al descrito por Richardson & Berlyn (2002). Tras realizar las medidas de reflectancia espectral se calculó el Índice de Vegetación Diferencial Normalizado (NDVI), un índice espectral fuertemente correlacionado con la concentración de clorofila en tejidos verdes (Richardson *et al.* 2002):

$$\text{NDVI} = (R_{750} - R_{705}) / (R_{750} + R_{705})$$

donde R_{750} y R_{705} representan, respectivamente, la reflectancia a 750 y 705 nm., siendo la primera la longitud de onda usada como referencia (Gamon *et al.* 1995, Peñuelas & Filella 1998).

3.2.7. Análisis de pigmentos

Para valorar si los cambios observados en el NDVI se correspondían con cambios en el contenido en clorofila, se muestrearon 5 fragmentos de 1 cm² de la corteza cortical de las ramas de *P. sylvestris* por cada temperatura de congelación testada, antes (control, -5, -10, y -20 °C) y después (-25, -30 y -80 °C) del fuerte descenso en NDVI observado en el estudio realizado durante la época estival (ver sección 3.3. Resultados). Los fragmentos se pesaron y se almacenaron a -20 °C. Los

pigmentos se extrajeron posteriormente con acetona en presencia de ascorbato sódico y almacenados posteriormente, tal y como se describe en Abadía & Abadía (1993). Los extractos obtenidos se filtraron a través de un filtro de 0,45 μm de diámetro y analizados espectrofotométricamente de acuerdo con el procedimiento descrito por Lichtenthaler (1987). La concentración total de clorofila (Chl a+b) se expresó en relación al peso del fragmento muestreado, en nmol Chl g^{-1} de corteza cortical.

3.2.8. Análisis estadístico

La fiabilidad del modelo logístico sigmoidal utilizado para la estimación de los valores de tolerancia a las temperaturas de congelación, las relaciones lineales entre los valores de tolerancia a la helada obtenidos con diferentes técnicas, y la relación lineal entre el NDVI y el contenido total de clorofila se evaluaron mediante el análisis del coeficiente de regresión y del P-valor obtenido.

3.3. Resultados

La Figura 3.4 muestra la evolución de los valores de F_V/F_M , durante el verano y el invierno, en el clorénquima cortical de la corteza y en las acículas de *P. sylvestris* sometidos a diferentes temperaturas de congelación. De acuerdo con esta técnica y siguiendo el modelo de regresión logístico sigmoidal, la tolerancia a las temperaturas de congelación en el tallo aumentó desde $-24,8\text{ }^\circ\text{C}$ ($R^2=0,99$; $P<0,01$) en verano hasta $-43,9\text{ }^\circ\text{C}$ ($R^2=0,99$; $P<0,01$) en invierno, mientras que la tolerancia a las temperaturas de congelación en las acículas aumentó desde $-4,1\text{ }^\circ\text{C}$ ($R^2=0,98$; $P<0,01$) en verano hasta $-27,5\text{ }^\circ\text{C}$ ($R^2=0,99$; $P<0,01$) en invierno (Tabla 3.1).

La evolución de la EL en tallos y acículas de *P. sylvestris* expuestos a diferentes temperaturas de congelación durante el verano y el invierno se muestra en la Figura 3.5. Siguiendo el modelo de regresión logístico sigmoidal y utilizando EL como técnica de medida, la tolerancia a las temperaturas de congelación en el tallo aumentó desde $-28,8\text{ }^\circ\text{C}$ ($R^2=0,94$; $P<0,01$) en verano hasta $-45,8\text{ }^\circ\text{C}$ ($R^2=0,89$; $P<0,01$) en invierno, mientras que la tolerancia a las temperaturas de congelación en

las acículas aumentó desde $-5,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($R^2=0,92$; $P=0,0105$) en verano hasta $-25,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($R^2=0,97$; $P<0,01$) en invierno (Tabla 3.1).

La Figura 3.6 muestra la evolución del VS en tallos y acículas de *P. sylvestris* expuestos a diferentes temperaturas de congelación durante el verano y el invierno. De acuerdo con esta técnica y siguiendo el modelo logístico sigmoideal, la tolerancia a las temperaturas de congelación en el tallo fue $-26,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante el verano ($R^2=0,99$; $P<0,01$) (Tabla 3.1). Los datos obtenidos de VS en tallos durante el invierno no permitieron obtener un valor preciso de tolerancia a las temperaturas de congelación, de acuerdo con el modelo teórico propuesto (ver sección 3.2.2). Por otro lado, la tolerancia a las temperaturas de congelación en las acículas aumentó desde $-8,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($R^2=0,99$; $P<0,01$) durante el verano hasta $-25,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($R^2=0,99$; $P<0,01$) durante el invierno (Tabla 3.1).

La evolución del NDVI en los tallos de *P. sylvestris* expuestos a diferentes temperaturas de congelación durante el verano y el invierno se muestra en la Figura 3.7. De acuerdo con los datos de NDVI obtenidos y siguiendo el modelo de regresión logístico sigmoideal, la tolerancia a las temperaturas de congelación aumentó desde $-24,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($R^2=0,96$; $P<0,01$) durante el verano hasta $-43,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($R^2=0,88$; $P<0,01$) durante el invierno (Tabla 3.1). La correlación encontrada en este trabajo entre los valores de NDVI en el tallo y contenido total de clorofila en la corteza cortical del tallo fue estadísticamente significativa ($R^2=0,84$; $P<0,01$) (datos no mostrados).

Para verificar la fiabilidad de F_V/F_M como un buen parámetro estimador de la aclimatación al frío en acículas y tallos de *P. sylvestris*, se compararon, utilizando modelos lineales, los valores de tolerancia a las temperaturas de congelación obtenidos con EL y aquéllos obtenidos con fluorescencia de clorofila y VS. Las relaciones entre la fluorescencia de clorofila y la EL ($R^2=0,98$; $P<0,01$; Figura no mostrada) fue estadísticamente significativa y más fuerte que aquélla encontrada entre el VS y la EL ($R^2=0,99$; $P=0,027$; Figura no mostrada). Estos datos indicaban que F_V/F_M es un indicador más preciso del daño por helada que el VS, cuando ambas técnicas se comparaban con la EL como la técnica más extendida en la estimación de tolerancia a las temperaturas de congelación.

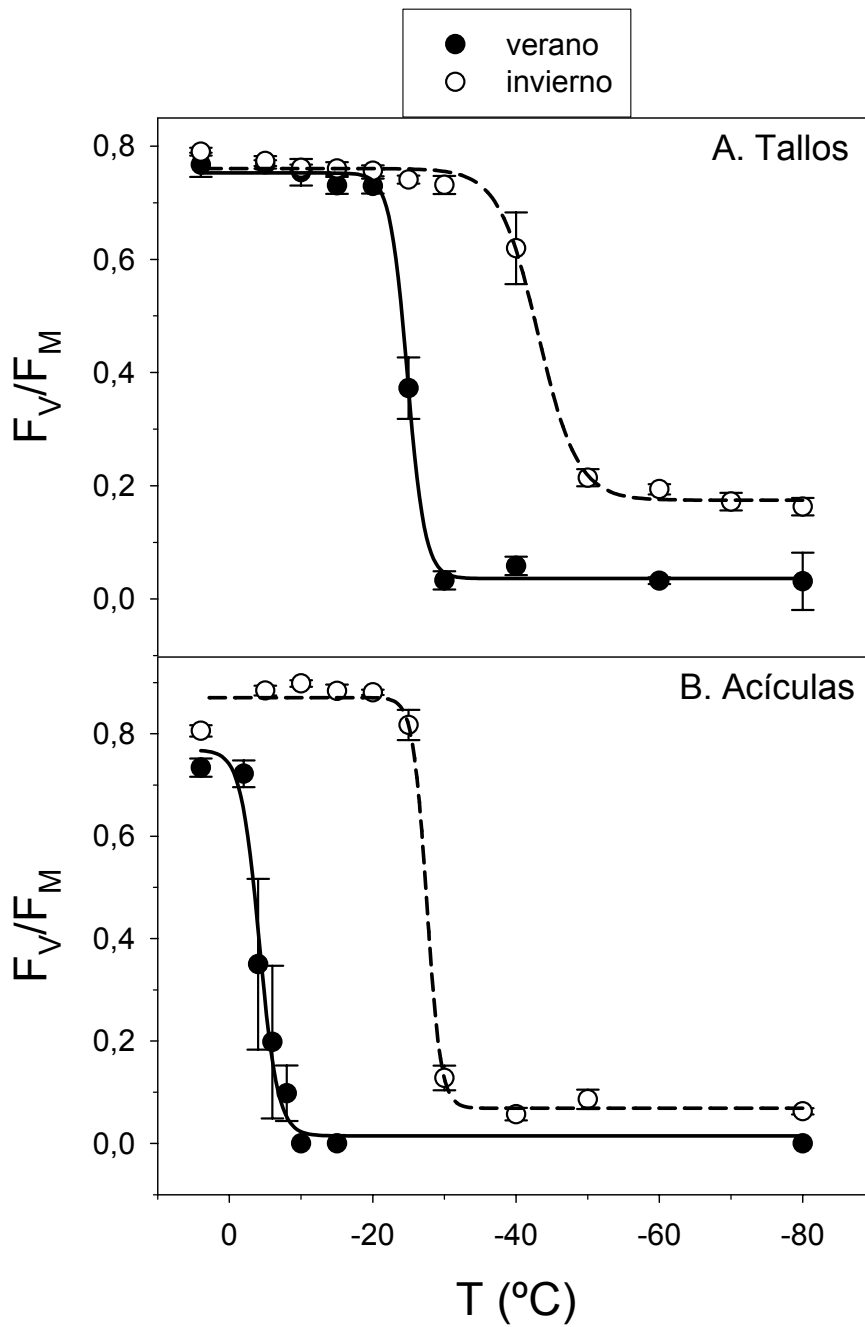


Figura 3.4. Relaciones entre la temperatura (°C) y la eficiencia potencial máxima del PSII (F_V/F_M) durante el invierno (símbolos blancos) y durante el verano (símbolos negros) en (A) tallos y (B) acículas de *P. sylvestris*. Las barras de error indican el error estándar del valor medio.

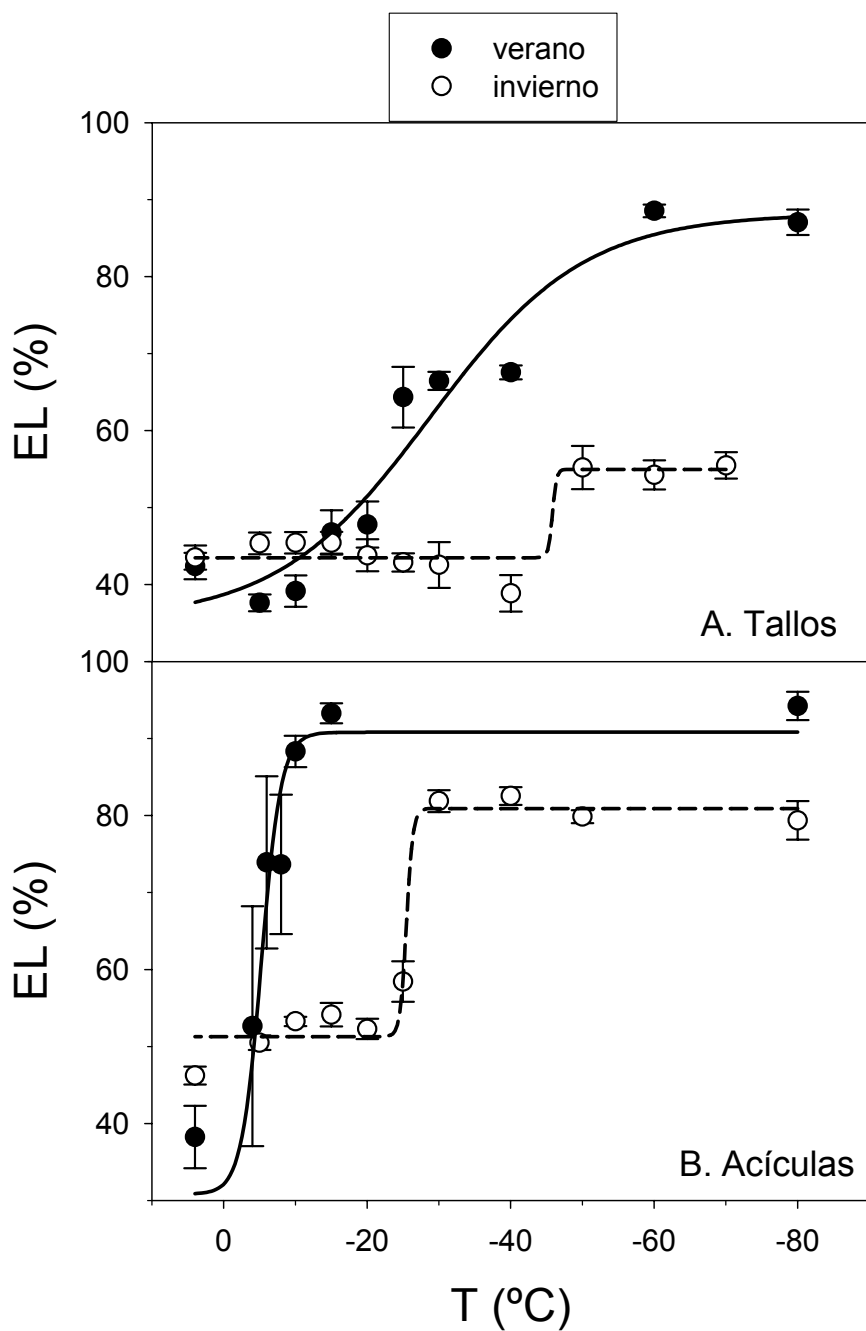


Figura 3.5. Relaciones entre la temperatura (°C) y la liberación de electrolitos (EL, %) durante el invierno (símbolos blancos) y durante el verano (símbolos negros) en (A) tallos y (B) acículas de *P. sylvestris*. Las barras de error indican el error estándar del valor medio.

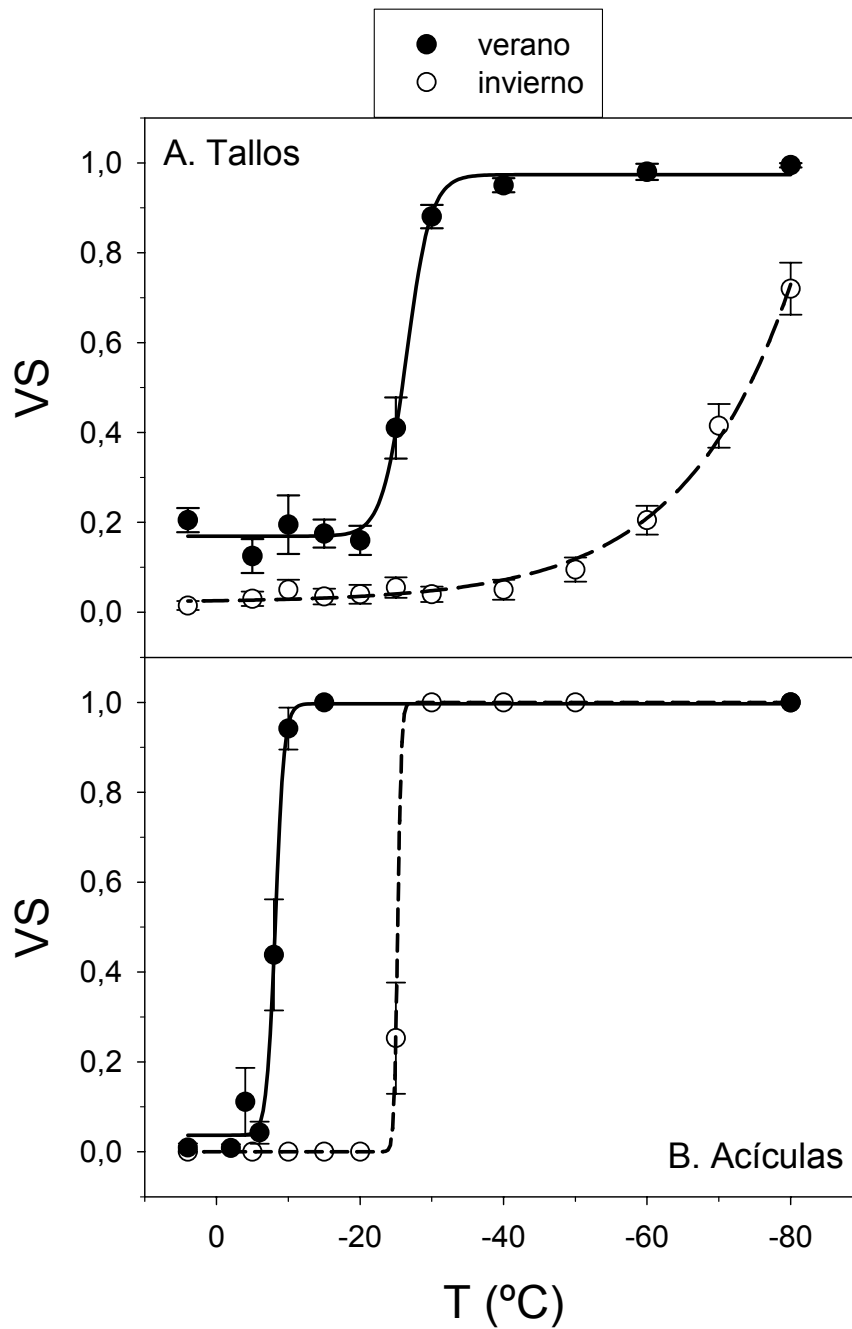


Figura 3.6. Relaciones entre la temperatura (°C) y el visual scoring (VS) durante el invierno (símbolos blancos) y durante el verano (símbolos negros) en (A) tallos y (B) acículas de *P. sylvestris*. Las barras de error indican el error estándar del valor medio.

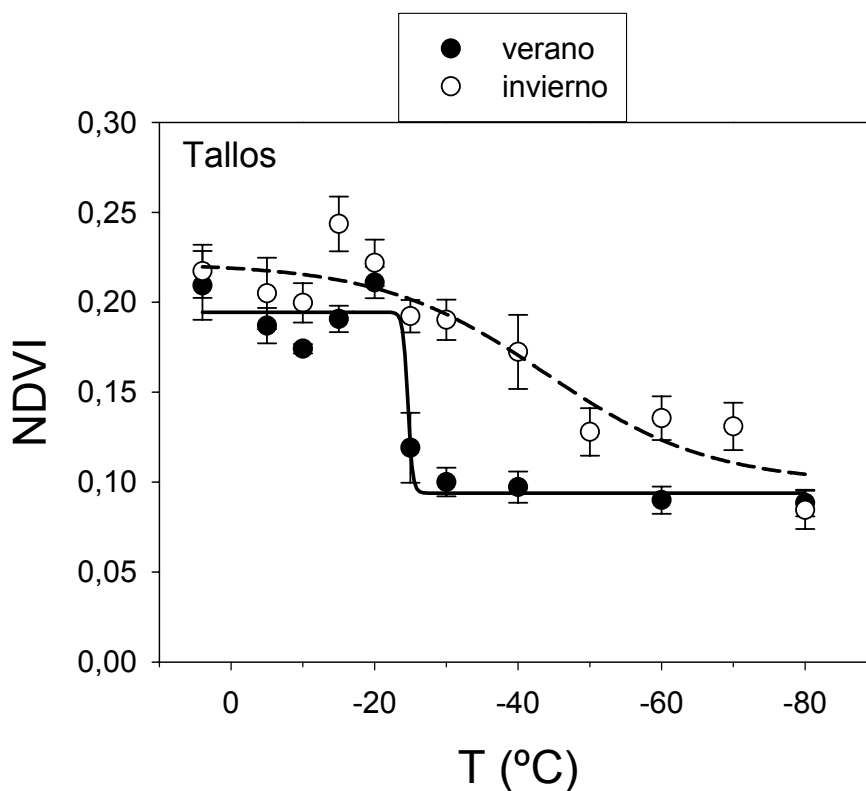


Figura 3.7. Relaciones entre la temperatura (°C) y el índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI) durante el invierno (símbolos blancos) y durante el verano (símbolos negros) en tallos de *P. sylvestris*. Las barras de error indican el error estándar del valor medio.

Tabla 3.1. Valores de tolerancia a las temperaturas de congelación (°C) en tallos y acículas de *P. sylvestris* durante el verano y el invierno estimadas a partir de las diferentes técnicas experimentales utilizadas (ver sección 3.2 para más detalles).

Técnica	Tolerancia a temperaturas de congelación (°C)			
	Tallos		Acículas	
	Verano	Invierno	Verano	Invierno
F_V/F_M	-24,8	-43,9	-4,1	-27,5
EL	-28,8	-45,8	-5,2	-25,5
VS	-26,5	-	-8,2	-25,2
NDVI	-24,6	-43,8	-	-

3.4. Discusión

En este capítulo se han comparado diferentes técnicas aplicadas al estudio de la resistencia a la helada en acículas y tallos de una población de *P. sylvestris* localizada cerca de su límite meridional de distribución (40° 30' N, 0° 36' E, 1650 m s.n.m., Teruel, España). Los valores estimados de tolerancia a las temperaturas de congelación fueron muy similares, independientemente de la técnica empleada y, tal y como era de esperar, más altos en invierno que en verano, tanto en acículas como en tallos (Tabla 3.1). Además, las correlaciones entre los valores de tolerancia a la helada estimados a partir de los valores de F_V/F_M y aquéllos estimados a partir de las medidas de EL y VS eran muy altas, indicando que la fluorescencia de clorofila es un indicador excelente y no destructivo de los daños por helada en acículas y tallos. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de las medidas de VS y NDVI en tallos deben ser estadísticamente reinterpretados para poder encontrar el punto de inflexión de la función logística sigmoideal, ya que la aplicación de este modelo estadístico no permite deducir el valor de temperatura umbral a la cuál se produce de manera irreversible el daño por helada en la parte interna de la corteza a partir de estas variables. En este sentido, hay que tener cuidado en la aplicación de determinados análisis estadísticos en este tipo de estudios.

Hay que resaltar que, aunque la fluorescencia de clorofila ha sido utilizada para estimar la tolerancia a la helada en acículas (Binder & Fielder 1996), no hay constancia de que la medida de F_V/F_M en el clorénquima cortical de la corteza haya sido utilizada para la estimación de la tolerancia a las temperaturas de congelación. Ivanov *et al.* (2006) encontraron ligeros descensos en los valores de F_V/F_M (aproximadamente hasta 0,6) en el clorénquima cortical de la corteza de poblaciones de *P. sylvestris* de localizaciones mucho más frías (63° 50' N, 20° 20' E, Umea, Suecia) que nuestra población de estudio. Estos descensos eran debidos a procesos fotoinhibitorios invernales, sin daños irreversibles en el clorénquima. Por el contrario, en este estudio se han alcanzado valores de F_V/F_M de 0,00 en tallos afectados por temperaturas de congelación, indicando que estos descensos eran mucho más intensos que aquéllos debidos a procesos fotoinhibitorios invernales sin daños irreversibles. Por lo tanto, la interpretación de los valores experimentales proporcionados por las medidas de fluorescencia de clorofila no puede conducir, de ninguna de las maneras, a interpretaciones erróneas en este tipo de estudios. Este hecho es una de las principales ventajas que tiene el empleo de esta técnica.

Además, la fluorescencia de clorofila puede usarse en el campo para el estudio de episodios de muerte masiva del arbolado en los que los daños por helada puedan ser el factor desencadenante. Así, esta técnica permite a los investigadores distinguir si las acículas y/o la parte interna de la corteza están dañados o no. De hecho, las poblaciones de *P. sylvestris* localizadas en el Sistema Ibérico han sufrido recientemente un episodio muy severo de muerte masiva. Este fenómeno se caracterizó por un amarronamiento en las acículas seguido por una defoliación muy intensa de la copa del árbol, síntomas que podrían estar en consonancia con daños inducidos por helada. Sin embargo, en este capítulo se ha demostrado que este episodio de muerte masiva no era atribuible a daños por helada, porque el nivel de tolerancia a las temperaturas de congelación alcanzado durante el invierno en estas poblaciones, tanto en acículas como en tallos (Tabla 3.1), imposibilitaba la existencia de posibles daños debido al efecto de las temperaturas mínimas alcanzadas en el bosque (Figura 3.3), a pesar de los síntomas que presentaban los ejemplares afectados. Una posibles explicación a este episodio de muerte masiva podría ser una embolia en los vasos de xilema inducida por un alto número de ciclos de hielo-deshielo, tal y como demuestran Mayr *et al.* (2006). Este asunto será objeto de futuras investigaciones.

Con independencia de los aspectos técnicos, los resultados obtenidos indicaban que el nivel de tolerancia a las temperaturas de congelación alcanzado en esta población de *P. sylvestris* era más alto en tallos que en acículas, lo que indica que la aclimatación al frío varía en función del órgano y tipo de tejido, además de la especie, procedencia y temperatura de exposición durante el periodo de aclimatación (Zhang *et al.* 2003, Beck *et al.* 2004, Li *et al.* 2004). En este sentido, el grado de tolerancia a la helada encontrado en acículas de *P. sylvestris* de la población estudiada era mucho más bajo (aprox. -26 °C) que el descrito por Taulavuori *et al.* (1997) y Repo *et al.* (2000b) (aprox. -100 °C). Sin embargo, el nivel de tolerancia a la helada encontrado en tallos durante el invierno (aprox. -44 °C) estaba mucho más próximo al descrito por Repo *et al.* (2000b) (aprox. -46 °C). Parece que, a la luz de estos resultados, la aclimatación al frío en el clorénquima cortical de la corteza está menos influenciada por las condiciones ambientales, tales como la temperatura y el fotoperiodo, que en las acículas. Así, es probable que la prolongación del periodo vegetativo durante el otoño pueda retrasar el comienzo del proceso de aclimatación al frío en las acículas de los ejemplares de *P. sylvestris* de la población estudiada, debido

a la existencia de condiciones climáticas más benignas que las existentes en las localizaciones más septentrionales de *P. sylvestris* (Larcher 2003).

La existencia de una respuesta diferencial a la aclimatación al frío entre las acículas y el tallo puede estar originada por la gran importancia de la corteza cortical en el funcionamiento fisiológico de *P. sylvestris*. En el caso de la fotosíntesis foliar, el papel de las acículas que sobreviven al periodo invernal, como tejidos fotosintéticos durante los años sucesivos, está fuertemente limitado en coníferas perennifolias (Beyschlag *et al.* 1994, Öquist & Huner 2003, Ivanov *et al.* 2006). Sin embargo, la función principal del clorénquima de la corteza parece ser la re-fijación del CO₂ respirado, más que la fijación externa de CO₂, manteniendo un balance de carbono positivo desde la parte final del otoño hasta el comienzo de la primavera (Langenfeld-Heyser *et al.* 1996, Ivanov *et al.* 2006, Wittmann *et al.* 2006). En este sentido, Ivanov *et al.* (2006) sugirieron que la preservación de la actividad fotosintética en los cloroplastos de los tejidos vivos del tallo puede tener un efecto significativo en la recuperación del aparato fotosintético, tras la depresión invernal, en las acículas pre-existentes.

3.5. Conclusiones

En este capítulo se ha demostrado que la fluorescencia de clorofila en el clorénquima cortical de la corteza es una técnica fácil, rápida, no destructiva y precisa, que puede ser utilizada en la caracterización de la vitalidad del *cambium* bajo temperaturas de congelación en el tallo de *P. sylvestris* y otras especies leñosas que posean este tejido fotosintético. Esta técnica permite establecer el valor de temperatura umbral a la que se producen daños irreversibles por helada en diferentes tejidos vegetales, incluyendo la parte interna de la corteza.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el nivel de tolerancia a las temperaturas de congelación en el tallo parece estar menos condicionado por las condiciones ambientales que en acículas, lo que podría deberse al importante papel del clorénquima cortical de la corteza en el funcionamiento fisiológico de esta especie.

Futuros estudios tendrán que considerar si la fluorescencia de clorofila puede ser una técnica precisa para la evaluación de la tolerancia al estrés cuando las plantas se ven afectadas por otro tipo de estreses (por ejemplo, sequía y altas temperaturas).

CAPÍTULO 4

Funcionamiento diferencial del aparato fotosintético de tres especies mediterráneas del género *Quercus* bajo condiciones de estrés hídrico intenso

4.1. Introducción.....	72
4.2. Material y métodos.....	77
4.2.1. <i>Material vegetal y condiciones experimentales</i>	77
4.2.2. <i>Potencial hídrico, intercambio de gases y medidas de fluorescencia de clorofila</i>	78
4.2.3. <i>Análisis de pigmentos fotosintéticos</i>	79
4.2.4. <i>Análisis estadístico</i>	80
4.3. Resultados.....	80
4.3.1. <i>Cambios en el intercambio de gases asociados al estrés hídrico</i>	80
4.3.2. <i>Cambios en la fluorescencia de clorofila y en los pigmentos fotosintéticos asociados al estrés hídrico</i>	82
4.4. Discusión.....	87
4.5. Conclusiones.....	91

4.1. Introducción

Las especies vegetales que crecen bajo las condiciones ambientales típicas del clima mediterráneo deben enfrentarse a periodos de sequía estival, siendo ésta una de las principales restricciones al crecimiento en este tipo de fitoclimas (Corcuera *et al.* 2002, 2004b). Las altas temperaturas y la escasa precipitación estival reducen la disponibilidad de agua edáfica e incrementan las tasas de evapotranspiración durante gran parte del potencial periodo de crecimiento de la planta (Mediavilla & Escudero 2003, Corcuera *et al.* 2005a).

Por estas razones, estas especies vegetales tienen que desarrollar mecanismos para sobrevivir al déficit hídrico, mediante estrategias de evitación o de tolerancia al estrés inducido por la falta de agua (Lo Gullo & Salleo 1988). El cierre estomático, como procedimiento para evitar una excesiva pérdida de agua, ayuda a regular su consumo de una manera muy efectiva (Conard *et al.* 1997, Jarvis & Davies 1997). De acuerdo con lo propuesto por Burghardt & Riederer (2006), una vez que el aporte de agua desde el suelo está muy limitado o completamente restringido y una vez que se han cerrado los estomas, las posibilidades de supervivencia de una planta dependerán de una manera crítica de su capacidad para ahorrar el recurso hídrico antes de que se alcancen estados de deshidratación susceptibles de provocar daños irreversibles (Sperry 2000, Brodribb & Holbrook 2004).

El cierre de estomas no es, por lo tanto, el único recurso que debe utilizar la planta en un contexto de aridez prolongada, ya que la regulación de las pérdidas de agua a la atmósfera en condiciones de sequía prolongada exige el desarrollo de otros mecanismos (Cavender-Bares *et al.* 2007). En este sentido, la reducción del tamaño de la hoja (Corcuera *et al.* 2002, Traisier *et al.* 2004), el desarrollo de barreras pasivas que evitan eficazmente la transpiración, como la cutícula o la peridermis (Kerstiens 1996, Vilagrosa *et al.* 2003b), o la pérdida parcial o total del área transpirante (Pataki *et al.* 1998, Ackerly 2004a) son respuestas típicas de la vegetación xeromórfica mediterránea. A largo plazo, estas respuestas están asociadas a cambios en la capacidad conductora del xilema, a través de cambios morfológicos o anatómicos (Villar-Salvador *et al.* 1997, Corcuera *et al.* 2004b).

A pesar de estos mecanismos de ahorro de agua, si el periodo de sequía es demasiado largo se pueden generar potenciales hídricos en el xilema capaces de

inducir cavitación asociada a un exceso de tensión en la columna (Pockman & Sperry 2000) y, como consecuencia, un fallo hidráulico con consecuencias fatales para la planta (Maherali *et al.* 2004). Por lo tanto, la supervivencia de las especies vegetales en climas áridos se podría relacionar con la resistencia de su xilema a la cavitación inducida por la tensión hídrica (Davis *et al.* 1998, Hacke *et al.* 2000, Pockman & Sperry 2000). En este sentido, Maherali *et al.* (2004) encontraron que el potencial hídrico al cuál las plantas pierden el 50 % de su conductividad hidráulica máxima es 6-7 veces más negativo en aquellas especies propias de los tipos de vegetación más áridos, entre los cinco tipos comparados por estos autores (bosques tropicales lluviosos, bosques tropicales secos, bosques templados, formaciones mediterráneas y desiertos).

Muchas de estas características, si no todas, pueden encontrarse en distintas especies típicas de la flora mediterránea del sur de Europa, que se caracteriza por la presencia de vegetación esclerófila perennifolia de hojas pequeñas (Breckle 2002). Así, muchos autores han considerado que esta convergencia morfológica encontrada dentro de la vegetación mediterránea (Di Castri 1981, Breckle 2002) define un grupo fisonómico concreto (Traisier *et al.* 2004), que ha sido identificado como un grupo fisiológico común por varios autores (Kummerov 1973, Corcuera *et al.* 2002). En este sentido, cuando algunos autores compararon especies del género *Quercus* procedentes de hábitats mediterráneos y templados, se encontraron altas correlaciones entre caracteres foliares morfológicos y fisiológicos, lo que permitió el establecimiento de grupos funcionales dentro de las especies analizadas (Tenhunen *et al.* 1981, Acherar & Rambal 1992, Sisó *et al.* 2001, Corcuera *et al.* 2002).

Dentro la vegetación esclerófila perennifolia pueden incluirse *Quercus coccifera* L., *Quercus ilex* ssp. *ballota* (Desf.) Samp y *Quercus suber* L., como ejemplo de tres especies leñosas de hojas pequeñas, tradicionalmente incluidas dentro de la denominada vegetación “genuinamente mediterránea”, entre los subtipos propuestos para la Península Ibérica (Allué-Andrade 1990, Breckle 2002). De hecho, estas especies son capaces de sobrevivir incluso en las áreas más xéricas de este territorio (Martín-Albertos *et al.* 1998). En las Figuras 4.1, 4.2 y 4.3 se pueden observar, respectivamente, los mapas de distribución de *Q. coccifera*, *Q. ilex* ssp. *ballota* y *Q. suber* en la Península Ibérica.

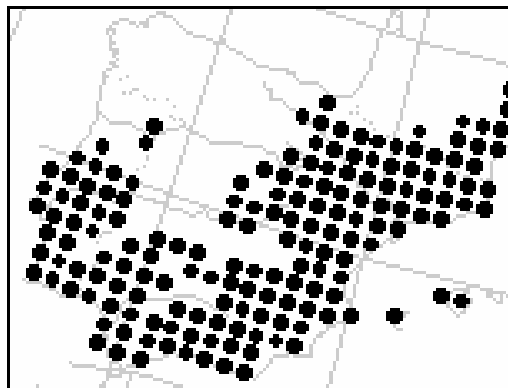


Figura 4.1. Mapa de distribución de *Q. coccifera* en la Península Ibérica. Fuente: *Atlas Florae Europaeae*.

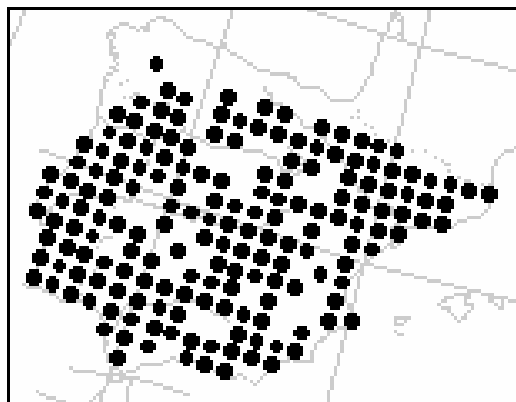


Figura 4.2. Mapa de distribución de *Q. ilex ssp. ballota* en la Península Ibérica. Fuente: *Atlas Florae Europaeae*.

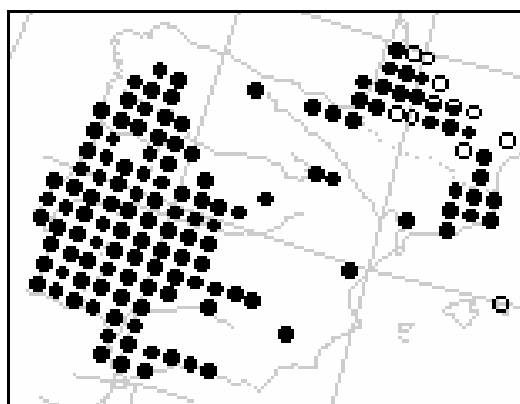


Figura 4.3. Mapa de distribución de *Q. suber* en la Península Ibérica. Fuente: *Atlas Florae Europaeae*.

Entre las características fisiológicas comunes a las tres especies, Corcuera *et al.* (2002) encuentran que todas tienen un alto módulo de elasticidad en los tejidos foliares, lo que garantiza la posibilidad de generar potenciales hídricos foliares más bajos que otras especies de climas más templados y así competir más eficazmente por el recurso hídrico edáfico. Además, las tres presentan un cierre estomático completo cuando alcanzan potenciales hídricos foliares en torno a los -3 MPa (Mediavilla & Escudero 2003, Vilagrosa *et al.* 2003a), con un área foliar media y unas tasas de transpiración cuticular claramente más bajas que las propias de las especies del género *Quercus* propias de hábitats mésicos (Kerstiens 1996, Esteso-Martínez *et al.* 2006b). Por otro lado, estas tres especies muestran una alta resistencia a la cavitación inducida por estrés hídrico (Tyree & Cochard 1996, Vilagrosa *et al.* 2003a, Corcuera *et al.* 2005a), en relación con la encontrada para otras especies de robles marcescentes de climas de transición (Corcuera *et al.* 2006, Esteso-Martínez *et al.* 2006a), o en robles caducifolios de climas templado-húmedos (Tyree & Cochard 1996). Por lo tanto, estas tres especies son capaces de sobrevivir a periodos de sequía intensa debido a que son capaces de desarrollar potenciales hídricos en hoja superiores al mínimo para producir el cierre estomático, pero inferiores a los críticos capaces de inducir cavitación en el xilema. En definitiva, *Q. coccifera*, *Q. ilex* subsp. *ballota* y *Q. suber* pueden considerarse como especies con un gran “margen de seguridad”, en el sentido dado a este término por Brodribb & Holbrook (2004).

Tras el cierre estomático, las plantas minimizan las pérdidas de agua a expensas de una reducción en las tasas de asimilación neta de CO₂. Bajo tales condiciones, cuando la luz que alcanza la superficie de la hoja supera ampliamente la que puede destinarse a procesos fotosintéticos (Demmig-Adams & Adams 1992, Demmig-Adams & Adams 1996), se produce el aumento en el ΔpH intratilacoidal y en el grado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas, lo que constituye un mecanismo de protección basado en la disipación del exceso de energía lumínica en forma de calor (Demmig-Adams & Adams 1992, Demmig-Adams & Adams 1996, Niyogi 1999, Li *et al.* 2000, Demmig-Adams & Adams 2006). Este mecanismo de fotoprotección varía a lo largo del día, así como en respuesta a la temperatura y a los estreses nutricionales e hídricos (Demmig-Adams & Adams 1992, Morales *et al.* 2006).

La existencia de distintos mecanismos de fotoprotección hace que la cadena de transporte electrónico del fotosistema II (PSII) sea relativamente insensible a la sequía (Cornic & Briantais 1991, Havaux 1992, Tourneux & Peltier 1995). No existen

evidencias de que un exceso de energía lumínica produzca un daño importante en plantas sometidas a estrés hídrico, a juzgar por la falta de efectos conocidos de la sequía en la eficiencia potencial máxima del PSII, estimada a partir de la relación F_V/F_M de las medidas de fluorescencia de clorofila tras adaptación a la oscuridad (Epron & Dreyer 1992, Havaux 1992, Epron & Dreyer 1993, Faria *et al.* 1998, Flexas & Medrano 2002a, Morales *et al.* 2006).

Los descensos significativos encontrados en la relación F_V/F_M , como consecuencia de procesos fotoinhibitorios, se asocian en su mayoría al efecto de las bajas temperaturas (Groom *et al.* 1991, Corcuera *et al.* 2005b, Baquedano & Castillo 2006) o a potenciales hídricos muy negativos causados por una extrema aridez (Balaguer *et al.* 2002), todos ellos unidos a un marcado descenso en la concentración de clorofila. En estos casos, el papel de un menor tamaño de la antena del PSII en el proceso de fotoprotección parece ser poco importante (Baroli *et al.* 2003), pudiendo considerarse este proceso fotoinhibitorio como una manifestación de daño (Morales *et al.* 2006). Vilagrosa (2002) documenta la primera evidencia de descensos en F_V/F_M mediados por la sequía sin cambios en la concentración de clorofila en *Q. coccifera*, confirmándose después en otras especies mediterráneas (Galmés *et al.* 2007). La necesidad de sobrevivir en ambientes afectados por sequías prolongadas e intensas podría haber inducido la génesis de este mecanismo especial de fotoprotección en las especies donde ha sido descrito.

Llegados a este punto, la cuestión que surge es cómo se ven afectados los parámetros relacionados con la fotosíntesis y la eficiencia del PSII por el estrés hídrico, en el intervalo de valores de potencial hídrico que se sitúan entre el cierre de estomas definitivo y el valor crítico de tensión en el xilema que induce la pérdida de conductividad hidráulica por cavitación. El principal objetivo de este capítulo ha sido investigar si *Q. coccifera*, *Q. ilex* ssp. *ballota* y *Q. suber* presentan descensos antes del amanecer de los valores de F_V/F_M mediados por el déficit hídrico y si tal descenso – entendido como una fotoinhibición – refleja daños asociados a la luz o, por el contrario, constituye un mecanismo adicional de fotoprotección. El amplio “margen de seguridad” hidráulico de estas especies (en el sentido dado por Brodribb & Holbrook 2004) hace de ellas un excelente material vegetal para la investigación de estos procesos.

4.2. Material y métodos

4.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

Para este estudio se utilizaron plantas de *Q. coccifera*, *Q. ilex* ssp. *ballota* y *Q. suber* de 5 años de edad. En el caso de la coscoja, las bellotas procedían de masas de esta especie localizadas en la Sierra de Luna (Zaragoza). Las bellotas de encina y de alcornoque fueron suministradas por el Centro de Mejora Forestal “El Serranillo” (Ministerio de Medio Ambiente), a partir de recolecciones en las Regiones de Procedencia “Alcarria-Serranía de Cuenca” y “Montes de Toledo”, respectivamente. Las plantas se cultivaron en macetas de plástico de 6,3 litros de capacidad (0,197 m de diámetro y 0,207 m de altura), usando un sustrato ácido compuesto por turba negra, arena y tierra a partes iguales.

Tres semanas antes de dar comienzo al experimento de sequía, las macetas se introdujeron en un invernadero de policarbonato alveolar de muy alta transparencia (superior al 90 % en el rango de radiación fotosintéticamente activa), lo que garantizó un flujo de 1300 μmoles de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ al mediodía. Un sistema de enfriamiento termostatzado por evaporación forzada de agua garantizó un régimen térmico dentro de los límites normales en un verano medio en el clima mediterráneo del NE de la Península Ibérica. El empleo de un invernadero parcialmente climatizado evitó que eventos de precipitación inesperados a lo largo del ciclo de sequía afectaran al desarrollo del experimento.

Las primeras medidas, correspondientes al estado de máxima hidratación, se realizaron el 10 de septiembre de 2003. A partir de esta fecha se interrumpió el riego y comenzó el ciclo de sequía (11 de septiembre), distribuyéndose las medidas a lo largo del mismo según aumentaba el déficit hídrico en las plantas. En el caso de *Q. coccifera*, las medidas se realizaron los días 12, 16, 18, 20 y 22 del mencionado mes. En el caso de *Q. ilex* ssp. *ballota*, las fechas fueron el 11, 14, 17, 19 y 22 del mismo mes. Por último, en el caso de *Q. suber*, se eligieron los días 11, 15, 17, 18 y 19 de septiembre para la realización de las medidas. En todos los casos las medidas fueron realizadas en 5 hojas diferentes de otras tantas plantas.

4.2.2. Potencial hídrico, intercambio de gases y medidas de fluorescencia de clorofila

El potencial hídrico antes de amanecer (PWP, -MPa) y al mediodía (MWP, -MPa) fue medido en brotes de *Q. coccifera*, *Q. ilex* ssp. *ballota* y *Q. suber* mediante el empleo de una cámara de presión tipo Scholander (Scholander *et al.* 1965), respetando el protocolo metodológico descrito por Turner (1988) para evitar errores en la medida.

Las medidas de intercambio de gases se realizaron a la 8 y 12 h (hora solar) en hojas del año completamente expandidas de las tres especies en estudio, mediante un equipo portátil de medida de fotosíntesis y transpiración (CIRAS-1, PP Systems, Reino Unido). Se registró la tasa neta de captación de CO₂ (A) y la conductancia estomática (g_s), variables a partir de las que se calculó la eficiencia intrínseca en el uso del agua (WUE = A / g_s). Todas las medidas se realizaron a concentraciones externas de CO₂ previamente prefijadas (C_a = 350 ppm), con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) entre 800 y 1300 μmoles fotones m⁻² s⁻¹ y a la humedad relativa ambiental.

Los parámetros relativos a la fluorescencia de clorofila se midieron en hojas del año completamente desarrolladas y unidas al brote de las tres especies en estudio, antes de amanecer y al mediodía solar, con un fluorímetro portátil PAM 2000 (Heinz Walz, Effeltrich, Alemania). Las plantas se taparon con una tela negra, manteniéndose en la oscuridad durante 30 min., para estimar la fluorescencia de clorofila mínima (F₀) y máxima (F_M), antes del amanecer y al mediodía. F₀ se midió mediante el encendido de una luz modulada a 6 kHz, con una PPFD por debajo de 0,1 μmol fotones m⁻² s⁻¹ en la superficie de la hoja. F_M se midió a 20 kHz con un pulso saturante de luz blanca de 6000 μmol fotones m⁻² s⁻¹ durante 1 s. El valor de fluorescencia en el estado estacionario (F_S) se midió al mediodía, cuando la PPFD era 1300 μmol fotones m⁻² s⁻¹, aproximadamente. Posteriormente se aplicó un segundo pulso saturante de luz blanca para determinar la fluorescencia máxima en el estado adaptado a la luz (F'_M). Por último, las hojas se taparon de nuevo con una tela completamente negra con el objetivo de determinar la fluorescencia mínima después de la inducción (F'₀). El protocolo experimental utilizado para el análisis del quenching de la fluorescencia de clorofila fue, esencialmente, el descrito por Genty *et al.* (1989) con algunas modificaciones. Estos cambios estaban relacionados con las medidas de F₀ y F'₀, las

cuáles se midieron en presencia de una luz rojo-lejano ($7 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) utilizada para oxidar completamente el lado aceptor del fotosistema II (PSII) (Belkhdja *et al.* 1998a, Morales *et al.* 1998). La eficiencia potencial máxima del PSII en oscuridad se calculó como F_v/F_M (Morales *et al.* 1991, Abadía *et al.* 1999). Las eficiencias real (Φ_{PSII}) e intrínseca ($\Phi_{\text{exc.}}$) del PSII se calcularon como $(F'_M - F_S) / F'_M$ y $(F'_M - F'_0) / F'_M$, respectivamente (Genty *et al.* 1989, Harbinson *et al.* 1989). El *quenching* fotoquímico (qP) se calculó como $(F'_M - F_S) / (F'_M - F'_0)$, de acuerdo con van Kooten & Snee (1990). La fracción de luz absorbida que es disipada por la antena del PSII ($1 - \Phi_{\text{exc.}}$) también fue estimada (Demmig-Adams *et al.* 1996, Morales *et al.* 1998). Hay que resaltar que recientemente se han descrito otras aproximaciones alternativas para la desactivación térmica, produciendo tasas de disipación ligeramente más altas, que sólo pueden ser aplicadas en un limitado número de casos que cumplan una serie de criterios (Kornyeyev & Hendrickson 2007). Las tasas de transporte electrónico (ETR) se estimaron de acuerdo con Krall & Edwards (1992), multiplicando Φ_{PSII} por PPFD por 0,5 (porque se asume una distribución equitativa de la energía de excitación entre los fotosistemas I y II) y por 0,84, que se considera el coeficiente de absorbancia foliar más común para las plantas C_3 (Björkmann & Demmig 1987), incluyendo *Q. coccifera* y *Q. ilex* spp. *ballota* (Morales *et al.* 2002).

4.2.3. Análisis de pigmentos fotosintéticos

Inmediatamente después de la realización de las medidas de fluorescencia de clorofila (antes de amanecer y al mediodía), se recogieron discos de la misma hoja sobre la que se habían realizado tales medidas, empleando para ello un sacabocados de sección conocida. Estos discos se envolvieron en papel de aluminio y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Los discos se almacenaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior procesado, todavía envueltos en el papel de aluminio. Los pigmentos fotosintéticos fueron extraídos posteriormente con acetona en presencia de ascorbato sódico y almacenados hasta análisis según se describe en Abadía y Abadía (1993). Los extractos se descongelaron en hielo, se filtraron a través de un filtro de $0,40 \mu\text{m}$ y se analizaron mediante HPLC, siguiendo un método isocrático (Larbi *et al.* 2004). Todos los reactivos y disolventes utilizados eran de calidad HPLC.

La composición de los pigmentos fotosintéticos (incluyendo la cantidad total de pigmentos del ciclo de las xantofilas, V+A+Z) se presentan de manera concisa, a excepción de las interconversiones dentro del ciclo de las xantofilas, que se presentan de una manera detallada durante todo el periodo de sequía (ver sección 4.3. Resultados). Simplificando, se presentan solamente la concentración de los pigmentos fotosintéticos a tres potenciales hídricos representativos: plantas bien regadas (condiciones control), en el potencial hídrico de pérdida de turgencia (alrededor de -3 MPa para las tres especies investigadas, de acuerdo con Corcuera *et al.* (2002)) y en el momento en el que el estrés hídrico fue más intenso (cerca de -7 MPa).

4.2.4. Análisis estadístico

Como respuesta a la distribución no normal de los datos recogidos, la significación estadística de los resultados se analizó mediante el empleo de procedimientos no paramétricos (Kruskall-Wallis).

4.3. Resultados

4.3.1. Cambios en el intercambio de gases asociados al estrés hídrico

Tanto la fotosíntesis neta (A) como la conductancia estomática (g_s) descendieron en *Q. coccifera*, *Q. ilex* ssp. *ballota* y *Q. suber* a las 8 y a las 12 h (hora solar), a medida que lo hacía el potencial hídrico durante el ciclo de sequía (Figura 4.4). Al final del mismo, cuando el potencial hídrico alcanzaba valores en torno a -7 MPa, la fotosíntesis neta (A) y la conductancia estomática (g_s) alcanzaron valores casi residuales.

La eficiencia intrínseca en el uso del agua (WUE, calculada como el cociente entre A y g_s) se vio incrementada para *Q. suber* hasta que los PWP y MWP llegaron a -3 MPa (Figura 4.4). WUE en *Q. ilex* ssp. *ballota* a las 8 h (hora solar) aumentó hasta un PWP de -2 MPa aproximadamente (Figura 4.4). Sin embargo, una vez los valores de PWP y MWP fueron inferiores a -3 MPa, la WUE descendió de un modo significativo tanto en *Q. suber* como en *Q. ilex* ssp. *ballota*. Por otro lado, *Q. coccifera*

presentó valores de WUE mayores que *Q. suber* y *Q. ilex* ssp. *ballota* al comienzo del ciclo ($P < 0,05$), aunque esta eficiencia disminuyó posteriormente y de modo gradual a medida que el déficit hídrico en la planta se hizo más patente en momentos más avanzados del ciclo de sequía.

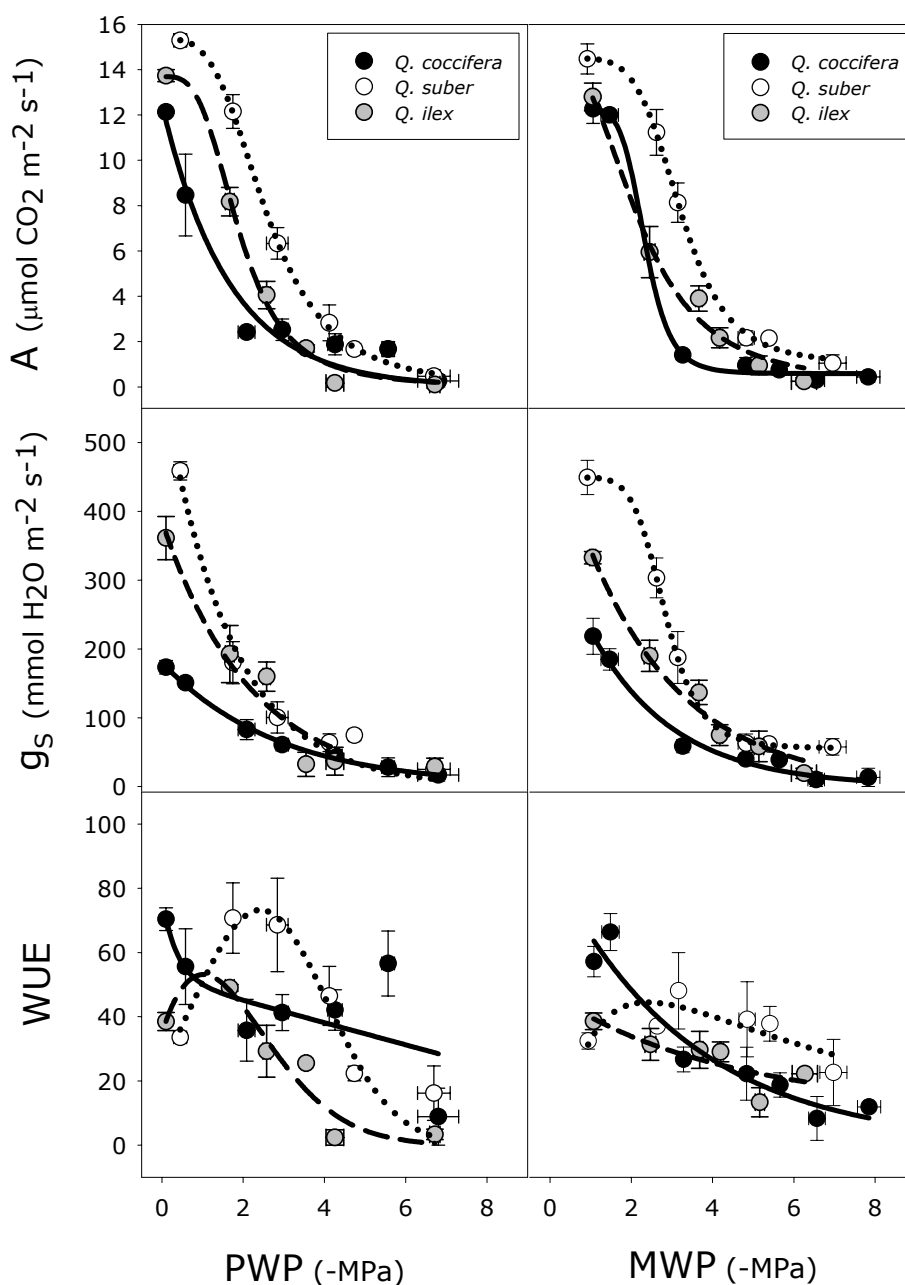


Figura 4.4. Evolución temporal de la fotosíntesis neta (A), de la conductancia estomática (g_s) y de la eficiencia intrínseca en el uso del agua (WUE) para *Q. coccifera* (en negro), *Q. ilex* ssp. *ballota* (en gris) y *Q. suber* (en blanco) a las 8 h (izquierda) y al mediodía (derecha) (hora solar) con el potencial hídrico antes del amanecer (PWP) y al mediodía (MWP). Las barras de error indican el error estándar del valor medio.

4.3.2. Cambios en la fluorescencia de clorofila y en los pigmentos fotosintéticos asociados al estrés hídrico

Los valores antes de amanecer del estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas $[(A+Z)/(V+A+Z)]$ y de la eficiencia potencial máxima del PSII (F_V/F_M) no mostraron cambios significativos en el caso de *Q. suber* (Figura 4.5). Al mediodía se produjo la conversión de violaxantina (V) a anteraxantina (A) y zeaxantina (Z) e incluso un ligero descenso de F_V/F_M (tras 30 min de relajación en oscuridad) una vez alcanzados potenciales hídricos inferiores a -5 MPa.

Sin embargo, este patrón de cambio no fue común en las tres especies, ya que *Q. coccifera* y *Q. ilex* ssp. *ballota* ofrecieron imágenes distintas a la descrita para *Q. suber* a lo largo del ciclo de sequía. Así, a partir de potenciales hídricos antes de amanecer por debajo de -3 MPa, se produjo una retención nocturna de las formas de-epoxidadas del ciclo de las xantofilas (A+Z), asociándose este hecho a un descenso gradual de la relación F_V/F_M antes de amanecer (Figura 4.5). En los últimos momentos del ciclo de sequía (en torno a los -7 MPa) casi todo el conjunto de los pigmentos del ciclo VAZ se encontraba en su forma de-epoxidada y la relación F_V/F_M alcanzó valores en torno a 0,3-0,4 en *Q. coccifera* y *Q. ilex* ssp. *ballota* (Figura 4.5). Estos bajos valores de F_V/F_M son atribuibles fundamentalmente a descensos en F_M en el caso de *Q. coccifera* y a aumentos en F_0 en *Q. ilex* ssp. *ballota* (Figura 4.5), como respuesta a la sequía en ambas situaciones. Al mediodía solar se detectaron fuertes descensos en F_V/F_M para valores de potencial hídrico en torno a los -4 MPa, con el conjunto de pigmentos del ciclo de las xantofilas casi completamente de-epoxidado (valores de $(A+Z)/(V+A+Z)$ de 0,8-0,9) (Figura 4.5). F_0 y F_M mostraban un comportamiento similar al descrito para *Q. coccifera* y *Q. ilex* ssp. *ballota* antes del amanecer, mientras que *Q. suber* mostraba un *quenching* de F_M , en relación con la situación descrita para esta especie antes del amanecer (Figura 4.5).

Se encontró una fuerte correlación entre los valores de F_V/F_M y los valores de $(A+Z)/(V+A+Z)$ medidos antes del amanecer ($R^2=0,77$, $F=16,56$, $P=0,007$; Figura 4.6). La existencia de esta fuerte correlación se debe a los valores obtenidos para *Q. coccifera* y *Q. ilex* ssp. *ballota*, ya que estas variables permanecieron prácticamente constantes para *Q. suber* (Figura 4.5). Esta correlación no fue tan buena al mediodía (Figura 4.6), porque se produjeron unos fuertes descensos en F_V/F_M mediados por estrés hídrico, mientras que los pigmentos del ciclo de las xantofilas se encontraban

en sus formas de-epoxidadas durante todo el experimento ($(A+Z)/(V+A+Z)=0,8-0,9$) (Figura 4.5).

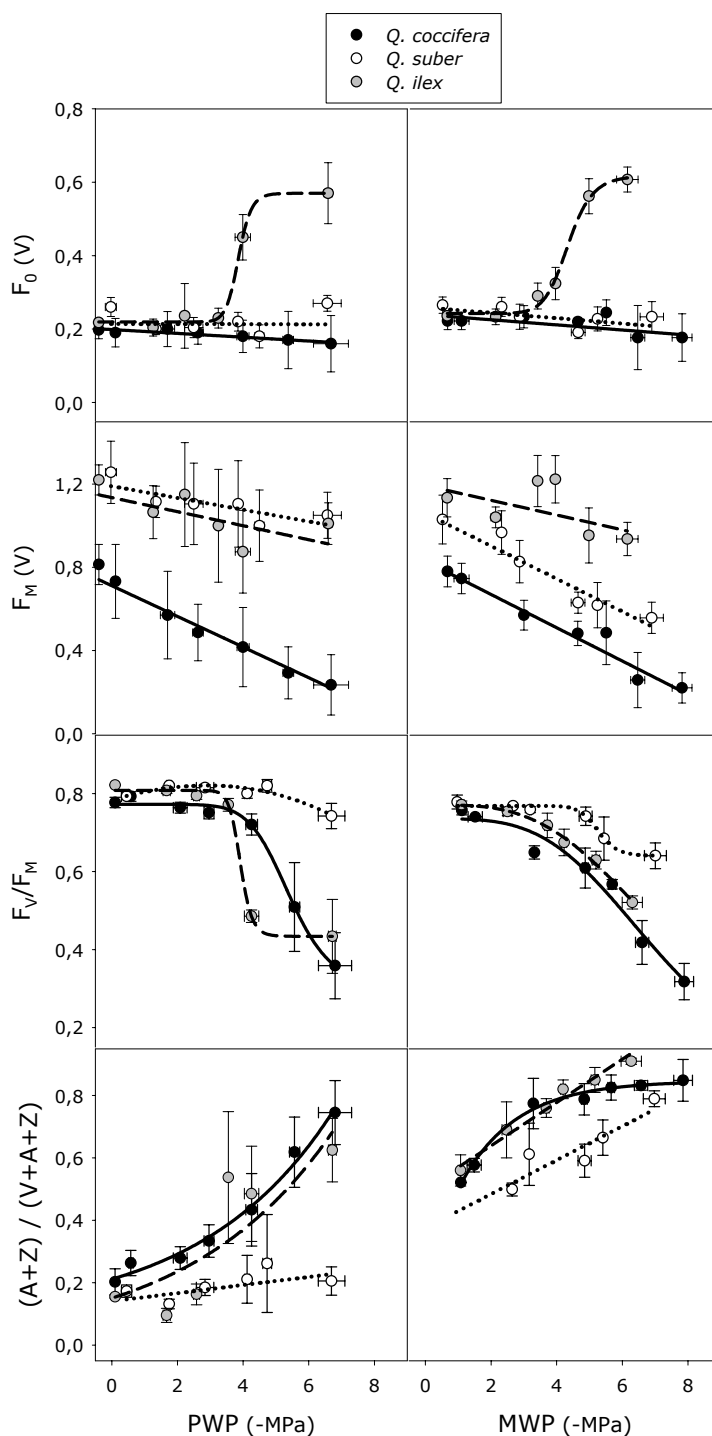


Figura 4.5. Evolución temporal de la F_0 (V), la F_M (V), la eficiencia potencial máxima del PSII (F_v/F_M), y del estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas [$(A+Z)/(V+A+Z)$] con el potencial hídrico del amanecer (PWP) y al mediodía (MWP) para *Q. coccifera* (en negro), *Q. ilex* ssp. *ballota* (en gris) y *Q. suber* (en blanco) antes del amanecer (izquierda) y al mediodía (derecha) (hora solar). Las barras de error indican el error estándar del valor medio.

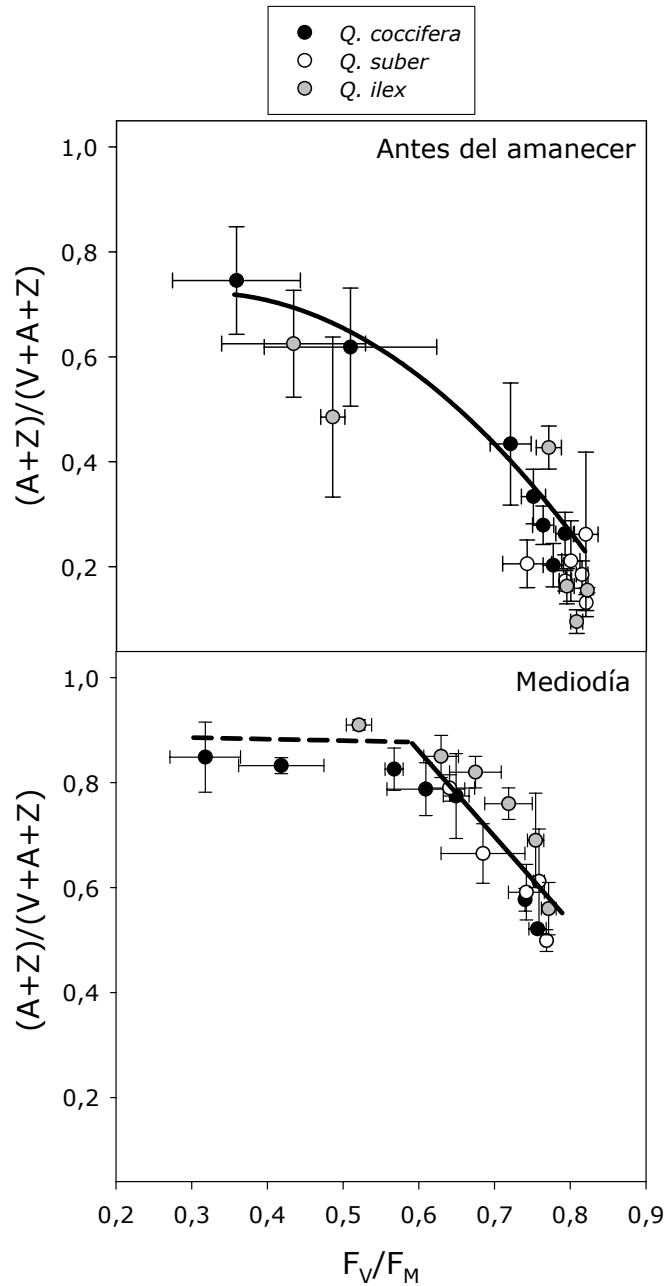


Figura 4.6. Relación entre la eficiencia potencial máxima del PSII (F_v/F_m), y el estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas $[(A+Z)/(V+A+Z)]$ antes del amanecer y al mediodía (hora solar) para *Q. coccifera* (en negro), *Q. ilex* ssp. *ballota* (en gris) y *Q. suber* (en blanco). Las barras de error indican el error estándar del valor medio.

La relación ETR/A se vio incrementada para todas las especies a medida que la sequía se hacía más intensa (Figura 4.7). Este incremento fue mayor en *Q. coccifera* y *Q. ilex* ssp. *ballota*, resaltando las diferencias de comportamiento entre

estas dos especies y *Q. suber*, sobre todo cuando el potencial hídrico al mediodía sobrepasaba los -6 MPa. La eficiencia real del PSII (Φ_{PSII}) disminuyó a medida que el estrés hídrico se hacía más intenso, para las tres especies investigadas (Figura 4.8). Este hecho es atribuible al cierre de los centros de reacción del PSII (disminución en el *quenching* fotoquímico, qP) y a una disminución de la eficiencia de aquellos centros de reacción del PSII que permanecían abiertos (disminución de la eficiencia intrínseca del PSII, $\Phi_{exc.}$) (Figura 4.8). Al principio del experimento, los valores de Φ_{PSII} , qP y $\Phi_{exc.}$ eran más altos en *Q. suber* que en las otras dos especies. Al final del periodo de sequía, la fracción de luz absorbida que es disipada por la antena del PSII ($1-\Phi_{exc.}$) era más alta en *Q. coccifera* y *Q. ilex ssp. ballota* que en *Q. suber* (Figura 4.8).

El estrés hídrico intenso no modificó significativamente la composición de los pigmentos fotosintéticos en ninguna de las tres especies estudiadas (Tabla 4.1), excepto en las interconversiones dentro del ciclo de las xantofilas, ya mencionadas anteriormente (ver Figura 4.5). La clorofila a (Chl a) solamente disminuyó en *Q. suber* cuando el estrés hídrico fue máximo (momento indicado como S2 en la Tabla 4.1), y V+A+Z solamente se incrementó en *Q. coccifera* y *Q. ilex ssp. ballota* en S2 (Tabla 4.1), aunque estos cambios no fueron estadísticamente significativos.

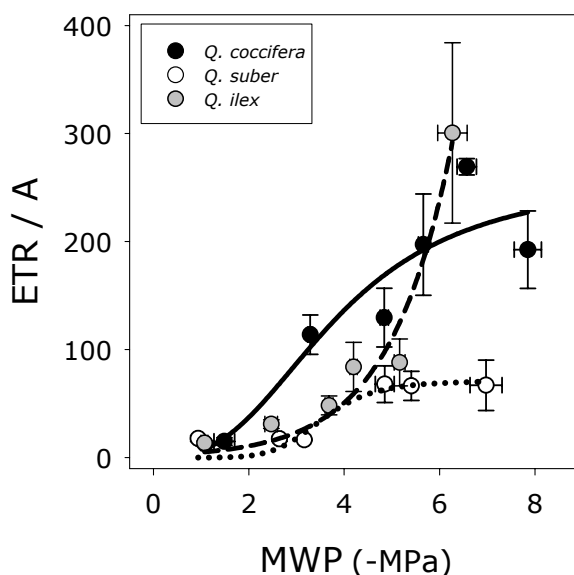


Figura 4.7. Evolución temporal de la relación entre la tasa de transporte electrónico y la fotosíntesis neta (ETR/A) medido al mediodía (hora solar) con el potencial hídrico al mediodía (MWP) para *Q. coccifera* (en negro), *Q. ilex ssp. ballota* (en gris) y *Q. suber* (en blanco). Las barras de error indican el error estándar del valor medio.

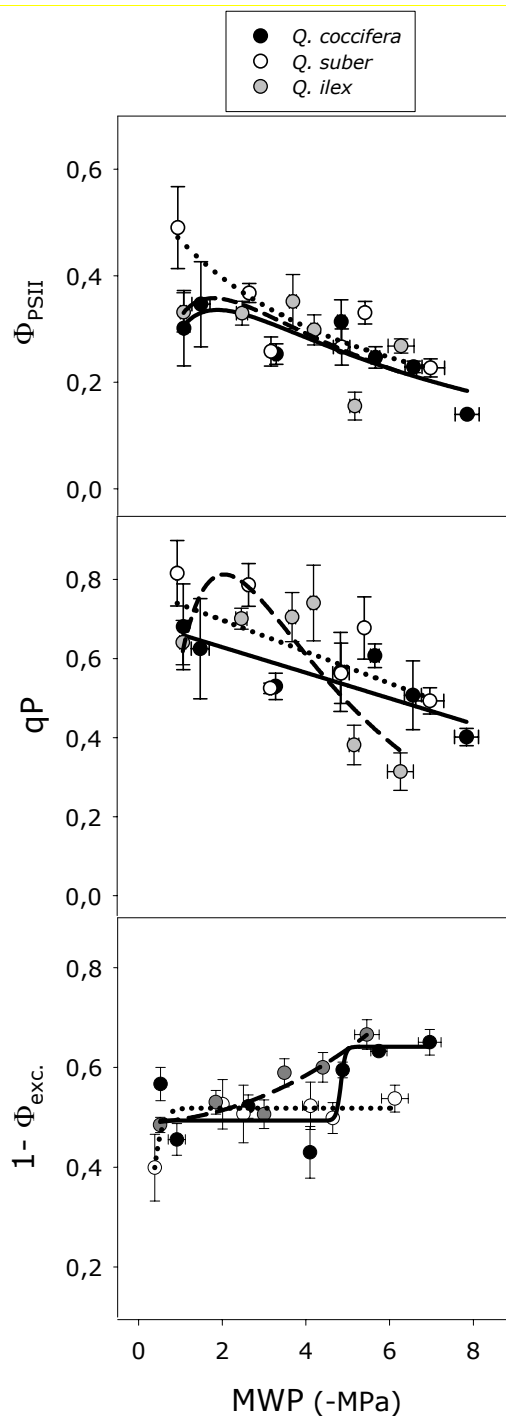


Figura 4.8. Evolución temporal de la eficiencia real del PSII (Φ_{PSII}), del *quenching* fotoquímico (qP) y de la fracción de energía disipada por la antena del PSII ($1-\Phi_{exc.}$) medido al mediodía (hora solar) con el potencial hídrico al mediodía (MWP) para *Q. coccifera* (en negro), *Q. ilex* ssp. *ballota* (en gris) y *Q. suber* (en blanco). Las barras de error indican el error estándar del valor medio.

Tabla 4.1. Evolución temporal de la composición de pigmentos fotosintéticos en *Q. coccifera*, *Q. ilex* ssp. *ballota* y *Q. suber* en tres momentos concretos durante el experimento: control (CO), alrededor del punto de pérdida de turgencia (S1) y cuando el estrés hídrico fue máximo (S2). Chl a y b se expresan en $\mu\text{mol m}^{-2}$, mientras que la neoxantina (Nx), luteína (Lx), β -caroteno (β -car) y V+A+Z se expresan en $\text{mmol pigmento mol}^{-1}$ Chl. Los números entre paréntesis indican el error estándar del valor medio. Las diferencias no fueron significativas a $P < 0,05$.

		Clorofilas			Carotenoides			
		Chl a	Chl b	Chl a /Chl b	Nx	Lx	β -car	V+A+Z
<i>Quercus coccifera</i>	CO	320,7 (22,1)	96,9 (10,4)	3,4 (0,1)	31 (4)	125 (17)	96 (9)	45 (7)
	S1	270,9 (10,3)	82,1 (3,8)	3,4 (0,0)	27 (1)	124 (4)	99 (6)	48 (3)
	S2	290,7 (18,1)	83,8 (9,1)	3,5 (0,1)	25 (3)	121 (12)	92 (8)	64 (4)
<i>Quercus suber</i>	CO	370,3 (38,4)	105,5 (14,8)	3,5 (0,0)	29 (4)	122 (17)	102 (14)	53 (10)
	S1	380,2 (22,4)	103,4 (7,7)	3,7 (0,1)	28 (1)	118 (11)	107 (8)	55 (3)
	S2	280,3 (23,8)	91,4 (7,8)	3,1 (0,1)	34 (4)	140 (11)	85 (18)	66 (2)
<i>Quercus ilex</i> ssp. <i>ballota</i>	CO	332,3 (23,8)	88,5 (6,9)	3,8 (0,1)	26 (4)	111 (8)	109 (11)	56 (6)
	S1	391,4 (52,7)	111,3 (19,3)	3,5 (0,0)	26 (5)	122 (18)	104 (18)	55 (7)
	S2	346,1 (65,7)	97,3 (24,2)	3,6 (0,0)	26 (6)	123 (28)	109 (24)	67 (13)

4.4. Discusión

En este trabajo se documenta el diferente comportamiento que presentan, en respuesta a un intenso estrés hídrico, tres especies de *Quercus* mediterráneos genuinos, concretamente *Quercus coccifera*, *Quercus ilex* ssp. *ballota* y *Quercus suber*. Bajo condiciones de alta hidratación, no se detectan diferencias de comportamiento reseñables en lo relativo a la eficiencia fotoquímica. Bajo estas condiciones de alta hidratación tan sólo puede señalarse una importante diferencia en la eficiencia intrínseca en el uso del agua (WUE) de *Q. coccifera*, muy superior bajo estas condiciones a la presentada por sus otros dos congéneres (*Q. ilex* ssp. *ballota* y *Q. suber*). Hay que resaltar que, aunque *Q. suber* alcanza valores de WUE muy altos a potenciales hídricos medios, es *Q. coccifera* la especie que alcanza valores más altos

de WUE con las mayores tasas de fotosíntesis neta. Las diferencias aparecen una vez que las tasas de fotosíntesis alcanzan valores insignificantes, lo que ocurre en las tres especies a partir del momento en que el potencial hídrico antes de amanecer alcanza los -4 MPa, haciéndose estas diferencias más patentes a medida que la sequía progresa y el potencial hídrico de base alcanza valores por debajo de -7 o -8 MPa.

La sequía es capaz de reducir la tasa neta de asimilación de CO₂ de tres maneras: limitando la entrada de CO₂ en la hoja (limitación estomática), disminuyendo la difusión de CO₂ dentro del mesófilo (limitación no estomática) o por la inhibición de los procesos fotoquímicos y metabólicos asociados a la fotosíntesis (limitaciones enzimáticas y fotoquímicas) (Flexas *et al.* 1998, 2002a, Flexas & Medrano 2002a). Bajo tales circunstancias, y desde el momento en que tanto el PSI como el PSII continúan captando luz, puede producirse un exceso de energía de excitación que puede o no ser dirigida a través de la cadena de transporte de electrones. Estos electrones no consumidos en la fijación final de CO₂ pueden reaccionar con moléculas generadoras de formas muy reactivas de oxígeno, aumentando así la probabilidad de que se produzcan daños oxidativos.

Las tres especies, *Q. coccifera*, *Q. ilex* ssp. *ballota* y *Q. suber*, respondieron al intenso estrés hídrico mediante mecanismos de fotoprotección específicos y diferentes, que les permitieron evitar daños importantes en su aparato fotosintético. La disipación térmica del exceso de energía al mediodía fue común a las tres especies, aunque con algunas diferencias específicas. La cantidad de energía absorbida que se disipó en la antena del PSII ($1-\Phi_{exc.}$) alcanzó un 55% en *Q. suber* al final del periodo de sequía, mientras que en las otras dos especies se alcanzó un porcentaje del 65%. También se observaron diferencias en el funcionamiento del ciclo de las xantofilas. En *Q. suber*, la mayor parte de la anteraxantina y zeaxantina formadas al mediodía revertió a violaxantina a lo largo de la noche, con independencia del grado de estrés hídrico soportado. Sin embargo, las plantas de *Q. coccifera* y *Q. ilex* ssp. *ballota* sometidas a un severo déficit hídrico retuvieron a lo largo de la noche las formas de epoxidadas (A+Z) producidas durante el día. Este comportamiento fue mucho más evidente en las fases finales del ciclo de sequía, coincidiendo con el descenso de los valores de la relación F_v/F_m antes de amanecer (ver la correlación entre los valores antes de amanecer de F_v/F_m y la relación $(A+Z)/(V+A+Z)$ presentada en la Figura 4.6).

La persistencia antes de amanecer de formas de-epoxidadas (A+Z) nos permite sugerir que la estrategia de fotoprotección desarrollada por *Q. coccifera* y *Q. ilex* ssp. *ballota* podría estar vinculada a la existencia de un valor de pH luminal permanentemente bajo ($\text{pH} < 5,8$) al final del ciclo de sequía. En este sentido, es de sobra conocido que la enzima V de-epoxidasa permanece inactiva a un pH superior a 6,5, operando de manera óptima a un pH inferior a 5,8 (Pfündel & Dilley 1993, Rockholm & Yamamoto 1996). La persistencia de un bajo pH luminal podría inhibir la reacción inversa de epoxidación a violaxantina a lo largo del final de la tarde y de la noche. Otros autores (Demmig-Adams & Adams 2006, Demmig-Adams *et al.* 2006, Zarter *et al.* 2006a, 2006b) han apuntado la posibilidad de que la disipación del exceso de energía podría estar vinculada a proteínas relacionadas con las proteínas PsbS en especies de vida larga, perennifolias y de lento crecimiento, con una limitación intrínseca de la fotosíntesis y una notable capacidad para sobrevivir durante largos periodos bajo condiciones ambientales típicamente estresantes para el vegetal.

Los datos indican que los mecanismos de fotoprotección desarrollados para superar la intensa sequía estival podrían ser diferentes en las tres especies estudiadas. Las tres mostraron una regulación “a la baja” del transporte electrónico en respuesta a un déficit hídrico muy severo, con valores de ETR que descendieron desde 273 (*Q. suber*) o 164 (*Q. coccifera* y *Q. ilex* ssp. *ballota*) hasta 109 μmol electrones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ al mediodía, pero de forma muy diferente. Después de una sequía intensa, *Q. suber* reguló “a la baja” los valores de ETR mediante el cierre de los centros de reacción del PSII (tal como refleja el descenso de qP) y a través de una disminución de la eficiencia intrínseca del PSII mediada por la presencia de A+Z (lo que se refleja en un descenso de $\Phi_{\text{exc.}}$). Aunque esto también se observó en las otras dos especies, los cambios fueron mucho menos marcados. *Q. coccifera* y *Q. ilex* ssp. *ballota*, además de regular “a la baja” la tasa de transporte electrónico a través de cambios en qP y en $\Phi_{\text{exc.}}$, fotoinactivaron los centros del PSII, promoviendo un descenso mayor de ETR. Esto se puso en evidencia por los bajos valores que antes de amanecer alcanza la relación F_V/F_M bajo condiciones de déficit hídrico severo. Los mecanismos últimos que explicarían esta inactivación del PSII no se conocen todavía de manera precisa, ya que incluso parecen ser diferentes en *Q. coccifera* respecto de *Q. ilex* ssp. *ballota*. En la primera, el descenso en F_V/F_M se debió a descensos en F_M , mientras que en la última se asoció a un fuerte aumento de F_0 . El conocimiento definitivo de las bases bioquímicas o fisiológicas de esta inactivación de centros

requiere de posteriores estudios. Aunque las tres especies estudiadas regularon “a la baja” el transporte electrónico en respuesta a una sequía extrema, la relación ETR/A, en la que valores altos indicarían una cantidad excesiva de electrones que no se destinan a la fijación fotosintética de CO₂, fue mucho mayor en *Q. coccifera* y *Q. ilex* ssp. *ballota* que en *Q. suber* al final del periodo de sequía. Esto podría sugerir la existencia de un riesgo potencial de daño oxidativo en las dos primeras especies, frente a la tercera, si tales electrones reaccionaran con O₂ generando especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, este no parece ser el caso, ya que se puede constatar claramente que el conjunto de pigmentos fotosintéticos, una de las principales “dianas” de estos daños oxidativos, permanecía inalterado durante todo el ciclo, con independencia de las conversiones propias del ciclo de las xantofilas.

En el caso de *Q. coccifera* y *Q. ilex* ssp. *ballota*, los descensos en los valores antes de amanecer de F_v/F_M no se interpretan como señal de un daño permanente al aparato fotosintético, ya que: (i) no hubo evidencias de daño oxidativo en el aparato fotosintético a lo largo de todo el ciclo y, además, (ii) las plantas recuperaron los valores fisiológicos propios de plantas bien hidratadas al cabo de tan sólo unas pocas horas de ser de regadas de nuevo, lo que no sucedió en el caso de *Q. suber*, cuyos ejemplares murieron tras alcanzar los valores más altos de déficit hídrico (datos no mostrados). Además, el mantenimiento de una maquinaria de captación de energía en *Q. coccifera* y *Q. ilex*, mediante unos pigmentos fotosintéticos bien conservados, podría contribuir a esa capacidad de recuperación rápida de la fotosíntesis en estas especies tras un largo periodo estival de estrés. Esta condición no debería atribuirse a la duración del experimento realizado, ya que este mismo comportamiento ha sido observado en estudios donde la duración del periodo seco fue mucho más largo (Vilagrosa 2002, Peguero-Pina *et al.* 2008).

La consideración de estos descensos en F_v/F_M como un mecanismo adicional de fotoprotección podría sugerir que *Q. coccifera* y *Q. ilex* ssp. *ballota* son capaces de aclimatarse a condiciones más severas, en términos de déficit hídrico, que *Q. suber*. Por otro lado, otras evidencias sugieren que, efectivamente, *Q. coccifera* es ligeramente más resistente a la embolia producida por un exceso de tensión hídrica en el xilema (PLC₅₀ = -7 MPa, Vilagrosa *et al.* 2003a) que *Q. ilex* ssp. *ballota* (PLC₅₀ = -5.5 MPa, Corcuera *et al.* 2004b) y *Q. suber* (PLC₅₀ = -5 MPa, Tyree & Cochard 1996). Por lo tanto, nuestros resultados, unidos a los procedentes de otras investigaciones, cuestionan la consideración de que las especies de *Quercus* genuinamente

mediterráneos constituyan un grupo fisiológico compacto y homogéneo (Kummerov 1973, Poole & Miller 1975, Tenhunen *et al.* 1981, Acherar & Rambal 1992, Turner 1994). De hecho, otros autores demostraron la existencia de diferentes estrategias en respuesta al déficit hídrico a pesar de la existencia de una convergencia morfológica foliar en estas especies (Lo Gullo & Salleo 1988, Salleo & Lo Gullo 1990, Martínez-Vilalta *et al.* 2003, Baquedano & Castillo 2006), que probablemente se originó en el Terciario, mucho antes del origen del clima y la vegetación mediterránea en el Cuaternario (Verdú *et al.* 2003, Ackerly 2004b). Por lo tanto, hay que tener mucho cuidado antes de establecer cualquier aproximación general al presente y futuro funcionamiento de los robles perennifolios mediterráneos en el contexto de un cambio climático global (IPCC 2001).

4.5. Conclusiones

Aunque *Q. coccifera*, *Q. ilex* ssp. *ballota* y *Q. suber* poseen un amplio margen de seguridad, con similares potenciales hídricos de pérdida de turgencia y cavitación (Corcuera *et al.* 2002), el comportamiento de su maquinaria fotosintética en respuesta a un periodo de intenso estrés hídrico estival varió marcadamente entre las tres especies estudiadas. Las diferencias se acentuaron cuando las tasas de fijación fotosintética de CO₂ se hicieron prácticamente nulas. Estos hechos indican una adaptación del PSII que va más allá de la cercanía desde un punto de vista genético y morfológico existente entre estas especies, demostrando que la convergencia morfológica no se expresa necesariamente en el comportamiento fisiológico de estas especies bajo condiciones de estrés hídrico.

CAPÍTULO 5

Fotoquímica, medida a distancia del índice de reflectancia fisiológico y estado de de-epoxidación del ciclo de las xantofilas en *Quercus coccifera* bajo condiciones de sequía intensa

5.1. Introducción.....	94
5.2. Material y métodos.....	97
5.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales.....	97
5.2.2. Contenido hídrico relativo y porcentaje de embolia.....	100
5.2.3. Principios e instrumentación para la medida de los cambios en la parte del verde del espectro de reflectancia.....	100
5.2.4. Medidas de intercambio de gases, fluorescencia de clorofila y PRI en el campo.....	101
5.2.5. Análisis de pigmentos fotosintéticos.....	105
5.3. Resultados.....	105
5.3.1. Medida a distancia de las variaciones del PRI durante un periodo de sequía intensa.....	105
5.3.2. Intercambio de gases, fluorescencia de clorofila y composición de los pigmentos fotosintéticos durante un periodo de sequía intensa.....	110
5.3.3. Relaciones entre PRI, NPQ, F_s , y el estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas.....	113
5.3.4. Contenido hídrico relativo y porcentaje de embolia.....	115
5.4. Discusión.....	115
5.5. Conclusiones.....	120

5.1. Introducción

La sequía estival se ha considerado la principal restricción ambiental al crecimiento y expansión de la vegetación mediterránea (Larcher 2000, Corcuera *et al.* 2002). La escasa precipitación estival que caracteriza al clima mediterráneo reduce la disponibilidad de agua en el suelo durante la mayor parte del potencial periodo de crecimiento de estas especies. Esta falta de agua tiene como resultado un déficit hídrico foliar que altera multitud de procesos fisiológicos, pudiendo tener en último término consecuencias fatales para el crecimiento y desarrollo de la planta.

La fotosíntesis es uno de los procesos fisiológicos más importantes afectados por la sequía (ver Flexas & Medrano 2002a, 2002b, Morales *et al.* 2006). Bajo condiciones naturales de campo, hay multitud de variables ambientales que interactúan con la fotosíntesis, tales como cambios en la intensidad de la luz recibida, temperatura ambiental, humedad relativa, e intensidad y dirección del viento (Schulze & Caldwell 1994). El estrés hídrico puede reducir la asimilación neta de CO₂ de tres maneras: limitando la entrada del CO₂ dentro de la hoja (limitación estomática), disminuyendo la difusión del CO₂ dentro del mesófilo (limitación no estomática) o inhibiendo los procesos metabólicos y fotoquímicos asociados con la fotosíntesis (limitaciones fotoquímicas y enzimáticas) (Flexas & Medrano 2002a, Flexas *et al.* 2002a). El cierre estomático es una respuesta común al estrés hídrico en especies mediterráneas (Tenhunen *et al.* 1987, LoGullo & Salleo 1988, Faria *et al.* 1996, 1998). Bajo estas condiciones, donde existe una cantidad excesiva de energía lumínica que no puede ser usada en procesos fotosintéticos, se produce un incremento del Δ pH intratilacoidal y del estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas, protegiendo el aparato fotosintético a través de un mecanismo que disipa el exceso de energía lumínica en forma de calor (Demmig-Adams & Adams 1992, Niyogi 1999, Li *et al.* 2000, Gullías *et al.* 2002). Este mecanismo de fotoprotección frente al exceso de luz varía en función del momento del día, así como en función del estrés térmico, hídrico y nutricional existente en cada momento (Morales *et al.* 2006).

Quercus coccifera L. es una especie arbustiva esclerófila que forma vegetación leñosa en las áreas más xéricas del fitoclima mediterráneo (Braun-Blanquet & Bolós 1957). La capacidad de los robles perennifolios mediterráneos, tales como *Q. coccifera* (Vilagrosa *et al.* 2003a), para soportar periodos de sequía intensa jugará un papel de vital importancia en la formación de paisaje en la Península Ibérica, en el contexto del

cambio climático experimentado por esta zona durante los últimos 50 años (Piñol *et al.* 1998). El cierre estomático en *Q. coccifera* se produce a potenciales hídricos mucho menos negativos que el límite de cavitación (Corcuera *et al.* 2002, Vilagrosa *et al.* 2003a). Así, esta especie ofrece un gran rango de potenciales hídricos en los que investigar sobre los cambios de los parámetros relacionados con los procesos fotosintéticos asociados a periodos extremadamente largos de estrés hídrico estival.

El desarrollo de las medidas hiperespectrales a distancia a finales de la década de los 80 y principios de los 90 ha permitido la cuantificación de parámetros químicos foliares en doseles vegetales (Rock *et al.* 1988, Carter 1994, Gitelson & Merzlyak 1996, Huang *et al.* 2004, Asner *et al.* 2005), el mapeado de la composición de especies (Foody & Cutler 2006), y el estudio del impacto de especies invasoras (Asner & Vitousek 2005). Un número importante de las técnicas de medida a distancia del estado de la vegetación se han desarrollado para cuantificar el grado de verdor de la misma y trazar el mapa de su distribución espacial, con la intención de estimar la fotosíntesis del dosel y/o la productividad neta primaria (Sellers 1987, Peñuelas & Filella 1998, Grace *et al.* 2007).

De esta manera, muchos estudios de medida a distancia de la vegetación se han centrado en la detección del grado de verdor del dosel (por ejemplo, el índice de vegetación diferencial normalizado, NDVI), lo que no es necesariamente un buen indicador del estado fisiológico del mismo (Stylinski *et al.* 2002). Uno de los principales problemas que presentan los índices basados en el verdor de la vegetación es su sensibilidad a otros factores ambientales o de la vegetación, tales como el índice de área foliar (LAI), la reflectancia del suelo sobre el que asienta la cubierta vegetal (Daughtry *et al.* 2000, Zarco-Tejada *et al.* 2004), o el ángulo de observación del dosel (Kempeneers *et al.* en prensa). Además, estos índices fallan en la detección de cambios dinámicos en la fotosíntesis, como los producidos durante un ciclo diario o bajo unas condiciones de estrés dadas (Running & Nemani 1988). De esta manera, dichas técnicas fallan en la detección de cambios inducidos por la sequía en especies perennifolias (Running & Nemani 1988). Por otra parte, las respuestas a corto plazo de los procesos fotosintéticos pueden ser detectadas a distancia mediante medidas pasivas de fluorescencia de clorofila (Moya *et al.* 2004). De manera alternativa, una modificación de este último instrumento se puede utilizar para detectar los cambios a distancia de la reflectancia de la vegetación en la ventana del verde del espectro (Evain *et al.* 2004).

El índice de reflectancia fisiológico se define como:

$$PRI = (R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570})$$

donde R_{531} y R_{570} representan, respectivamente, las señales de reflectancia a 531 y 570 nm, siendo ésta última la longitud de onda usada como referencia (Gamon *et al.* 1992). Este índice puede utilizarse para monitorizar los cambios dinámicos en fotosíntesis, con sensores de reflectancia diseñados para medir a una cierta distancia (Evain *et al.* 2004). Así, el PRI proporciona un método rápido y no destructivo para la valoración del estado fisiológico de la hoja y del dosel vegetal (Peñuelas *et al.* 1994, Evain *et al.* 2004, Weng *et al.* 2006) para un amplio número de especies (Gamon *et al.* 1997, Guo & Trotter 2004).

Las bases fisiológicas de los cambios en el PRI comenzaron a investigarse a principios de la década de los 90. Los cambios en la absorbancia centrados en la ventana de 531-535 nm se han relacionado con cambios conformacionales de los cloroplastos debidos a cambios en el Δ pH intratilacoidal y con cambios en el estado de agregación de los complejos pigmento-proteína de la antena debidos a una acumulación de formas de-epoxidadas de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (Bilger *et al.* 1989, Morales *et al.* 1990, Ruban *et al.* 1993).

Los cambios rápidos en la reflectancia de la vegetación en el entorno de los 531 nm (cambios en el PRI) debidos a cambios repentinos en la radiación solar incidente, pueden ser detectados de modo pasivo y a distancia utilizando un radiómetro portátil. Parece ser que estos cambios pueden ser debidos a cambios conformacionales en los cloroplastos, asociados con la generación de un Δ pH trans-tilacoidal y con cambios en el estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (Gamon *et al.* 1990). De esta manera, los cambios en la reflectancia y en la absorbancia en el entorno de los 531 nm pueden tener un origen común.

El principal objetivo de este capítulo ha sido la medida en continuo de los cambios de reflectancia a 531 nm (PRI) en un dosel vegetal muy denso de brinzales de *Q. coccifera*, utilizando para ello un sensor pasivo (Evain *et al.* 2004) en condiciones de campo durante un ciclo de sequía estival intensa (a potenciales hídricos donde casi no existe información acerca de los cambios fisiológicos experimentados por las plantas). Los cambios en el PRI se compararon con los

cambios en parámetros fotosintéticos, con el *quenching* no fotoquímico (NPQ), con la fluorescencia estacionaria (F_s) y con el grado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas $[(A+Z)/(V+A+Z)]$, con el objetivo de obtener una mayor información acerca del significado fisiológico de estos cambios en el PRI. *Q. coccifera* fue elegida como especie modelo porque muestra una extraordinaria resistencia a pérdidas en la conductividad hidráulica, llegando a alcanzar potenciales hídricos de hasta -10 MPa (Vilagrosa *et al.* 2003a). El empleo del PRI medido a distancia es una alternativa a la medida pasiva a distancia de la fluorescencia de clorofila (ambas técnicas utilizadas para seguir los cambios dinámicos en la fotosíntesis), en contraste con otros parámetros monitorizados con sensores a distancia, que no son necesariamente buenos indicadores del estado fisiológico del dosel vegetal (por ejemplo, aquellos índices basados en el NDVI).

5.2. Material y métodos

5.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

Para la realización de este estudio se eligió *Q. coccifera* como especie modelo en la investigación sobre las variaciones del PRI con el estrés hídrico, debido a sus características fisiológicas y al importante papel que desempeña dentro de la vegetación mediterránea. Alrededor de 200 brinzales de un año de edad se plantaron en el exterior en un contenedor de $0,70$ m³ para las medidas diarias y en continuo del PRI (Figura 5.1). Otro contenedor de las mismas características se plantó al lado del primero, bajo las mismas condiciones, para la realización de las medidas de intercambio de gases, fluorescencia de clorofila y para la toma de muestras para el análisis de pigmentos fotosintéticos mediante HPLC. Los doseles vegetales formados eran cerrados y las hojas se distribuían a diferentes alturas dentro del dosel. Sin embargo, la señal de reflectancia medida estaba dominada principalmente por las hojas situadas en la parte más alta del dosel vegetal.



Figura 5.1. La fotografía de la izquierda muestra uno de los doseles de brinzales de *Q. coccifera* utilizados en la realización de este estudio. La fotografía de la derecha muestra uno de los brinzales de *Q. coccifera* constituyentes del dosel.

Al principio del experimento, los brinzales presentaban tasas fotosintéticas correspondientes a hojas sanas y plenamente desarrolladas (entre 11 y 14 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$). Estas plantas bien regadas, sobre las que se hicieron estas medidas, se utilizaron como plantas control. El estrés hídrico se impuso de manera gradual impidiendo el aporte de agua al contenedor. De esta manera, los brinzales no se regaron desde el 14 de Julio hasta el 7 de Agosto, momento en el que los contenedores con los brinzales se regaron de nuevo para realizar las medidas de recuperación del estrés hídrico sufrido por las plantas. No se observaron daños visibles ni pérdida de hojas durante el ciclo de sequía, hecho que sugiere que el potencial hídrico del xilema no sobrepasó los -5 MPa y que la pérdida de conductividad hidráulica fue inferior al 20 % (Vilagrosa *et al.* 2003a).

Los experimentos se desarrollaron en la Estación Experimental de Aula Dei (EEAD-CSIC, Zaragoza, España) bajo las condiciones típicas de un verano mediterráneo. Los datos meteorológicos fueron proporcionados por la estación meteorológica de la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC). El periodo de estudio fue muy seco, siendo la radiación solar, temperatura y humedad relativa características de un verano mediterráneo (Figura 5.2). Durante el periodo de estudio la mayor parte de los días fueron secos y soleados, aunque con presencia de nubes

en días concretos y dos episodios de precipitación (los días 20 y 23 de Julio) de 0,1 mm cada uno. El viento no fue muy fuerte y su dirección fue predominantemente del sur durante el día y predominantemente del norte durante la noche durante la realización del experimento (datos no mostrados).

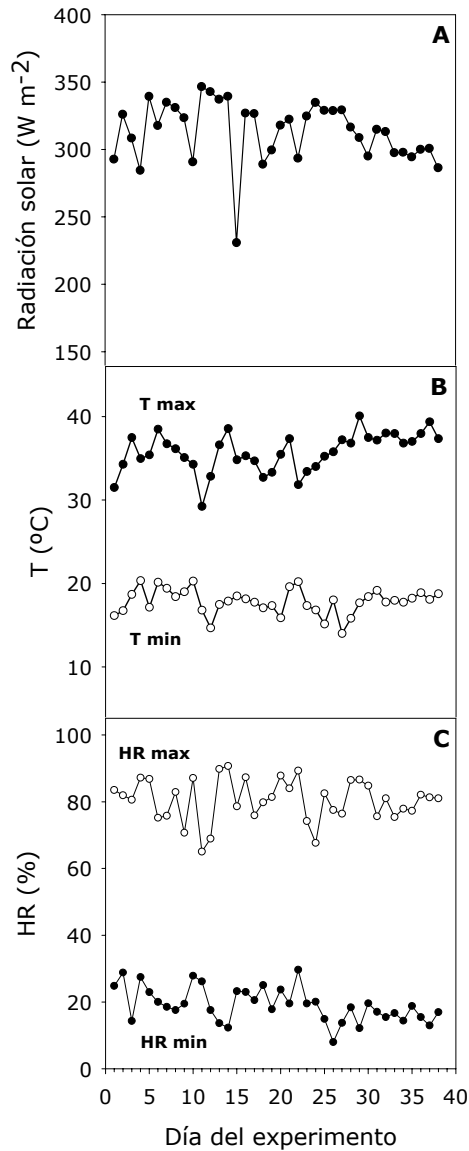


Figura 5.2. A. Radiación solar incidente media diaria ($W m^{-2}$) durante la realización del experimento. B. Temperaturas máximas y mínimas diarias ($^{\circ}C$) durante la realización del experimento. C. Humedad relativa máxima y mínima diarias (%) durante la realización del experimento.

5.2.2. Contenido hídrico relativo y porcentaje de embolia

Al final del ciclo de sequía se midió el contenido hídrico relativo (RWC) y el porcentaje de embolia para verificar el grado de estrés hídrico alcanzado.

Para medir el RWC se arrancaron 20 hojas de los brinzales de *Q. coccifera* y se pesaron, obteniendo así el peso fresco (FW). Posteriormente las hojas fueron hidratadas hasta saturación (peso constante) durante 48 horas a 5 °C en oscuridad, obteniendo así el peso en turgencia (TW). Entonces las hojas se secaron en una estufa durante 76 horas a 50 °C hasta que alcanzaron un peso constante, obteniendo así el peso seco (DW). El RWC se calculó de acuerdo con la fórmula:

$$\text{RWC} = (\text{FW} - \text{DW}) / (\text{TW} - \text{DW})$$

Para medir el porcentaje de embolia se cortaron 10 brotes de brinzales de *Q. coccifera* en segmentos de 30 a 50 mm de longitud, rasurando ambos extremos con una cuchilla de afeitar. El proceso se realizó debajo del agua para evitar cualquier proceso de embolia adicional. La metodología fue la misma que la empleada en Vilagrosa *et al.* (2003a), siguiendo el procedimiento metodológico descrito por Tyree & Sperry (1989).

5.2.3. Principios e instrumentación para la medida de los cambios en la parte del verde del espectro de reflectancia

El PRI, introducido por Gamon *et al.* (1992), está basado en cambios de reflectancia en la parte verde del espectro, que se correlacionan con el estado de depoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas y con cambios en el ΔpH trans-tilacoidal. Desde el momento en que el PRI se correlaciona mejor con el *quenching* no fotoquímico que con el *quenching* fotoquímico o la eficiencia fotoquímica (Evain *et al.* 2004), se ha preferido mantener el nombre original (“índice de reflectancia fisiológico”) en lugar del nombre revisado (“índice de reflectancia fotoquímico”) (Peñuelas *et al.* 1995).

Desde hace unos cuantos años se han llevado a cabo intentos previos de medir el PRI con espectrorradiómetros de campo (Gamon *et al.* 1990, 1992, 1997,

Peñuelas *et al.* 1994, 1995), o con radiómetros hiperspectrales especialmente desarrollados para este cometido (Méthy *et al.* 1999, Méthy 2000). En este estudio se ha utilizado un espectrómetro no comercial bicanal (Evain *et al.* 2004), con canales de medida definidos por filtros de interferencia. El campo de visión del instrumento es de 4° aproximadamente. Un divisor de haz (fabricado a partir de un cubreobjetos de microscopio recubierto con aluminio), con casi las mismas tasas de transmisión y reflexión, se colocó a 45° con respecto al eje del haz luminoso. En cada uno de los haces resultantes el ancho de banda espectral se definió colocando un filtro de interferencia centrado a 531 nm o 570 nm. (Omega, FWHM = 7 nm, 70% de transmisión, 25 mm de diámetro). Para que hubiera suficiente señal en la detección se utilizaron fotodiodos amplificados (HUV 2000, EGG). Un espejo pequeño, colocado en la entrada del dispositivo y realizando un movimiento de flip-flop, cambiaba automáticamente cada segundo el campo de visión entre la vegetación y el panel de referencia (Evain *et al.* 2004). La señal de referencia se obtenía, en principio, de un panel blanco de Spectralon cercano y paralelo al dosel vegetal. Este panel blanco fue sustituido por un panel gris debido a la saturación de la señal. La reflectancia del panel gris de referencia fue previamente calibrada mediante la comparación con un estándar blanco de reflectancia (Spectralon, Labsphere, North Dutton, NH). La señal de la reflectancia se calcula dividiendo la radiancia espectral del dosel por la radiancia del panel de referencia.

La adquisición de datos se realizó utilizando multímetros (HP34401A) conectados a un PC mediante conexión GPIB bus. Un programa realizado en el laboratorio mediante el software HP BASIC (HP E2060, Hewlett Packard, Les Ulis, Francia) permitió el control on-line y la visualización de las señales medidas.

5.2.4. Medidas de intercambio de gases, fluorescencia de clorofila y PRI en el campo

Para realizar las medidas de PRI en el campo, el panel de referencia gris se colocó junto al dosel de brinzales de *Q. coccifera* sin ninguna inclinación respecto a la vertical, con el propósito de que estuviera casi paralelo a la inclinación media de la superficie del dosel. El PRI se midió sobre un dosel de 30 cm de diámetro y a 4 m de distancia en dirección Sur-Norte, bajo condiciones naturales de luz. En la Figuras 5.3 y

5.4 se pueden observar, respectivamente, un esquema y una fotografía del dispositivo experimental utilizado. Los datos se recogieron cada segundo. Los cambios en la reflectancia espectral a lo largo del día, debidos a los cambios en la posición del sol, se tuvieron en cuenta midiendo el panel de referencia cada segundo. Sin embargo, las medidas de PRI podrían estar afectadas por cambios en la función de distribución de la reflectancia bidireccional (BRDF) durante el ciclo diario (Gastellu-Etchegorry *et al.* 1999). Sin embargo, Evain *et al.* (2004) sugirieron que estos efectos eran menores y no afectaban a la precisión de las medidas realizadas, con lo que no se tuvieron en cuenta.

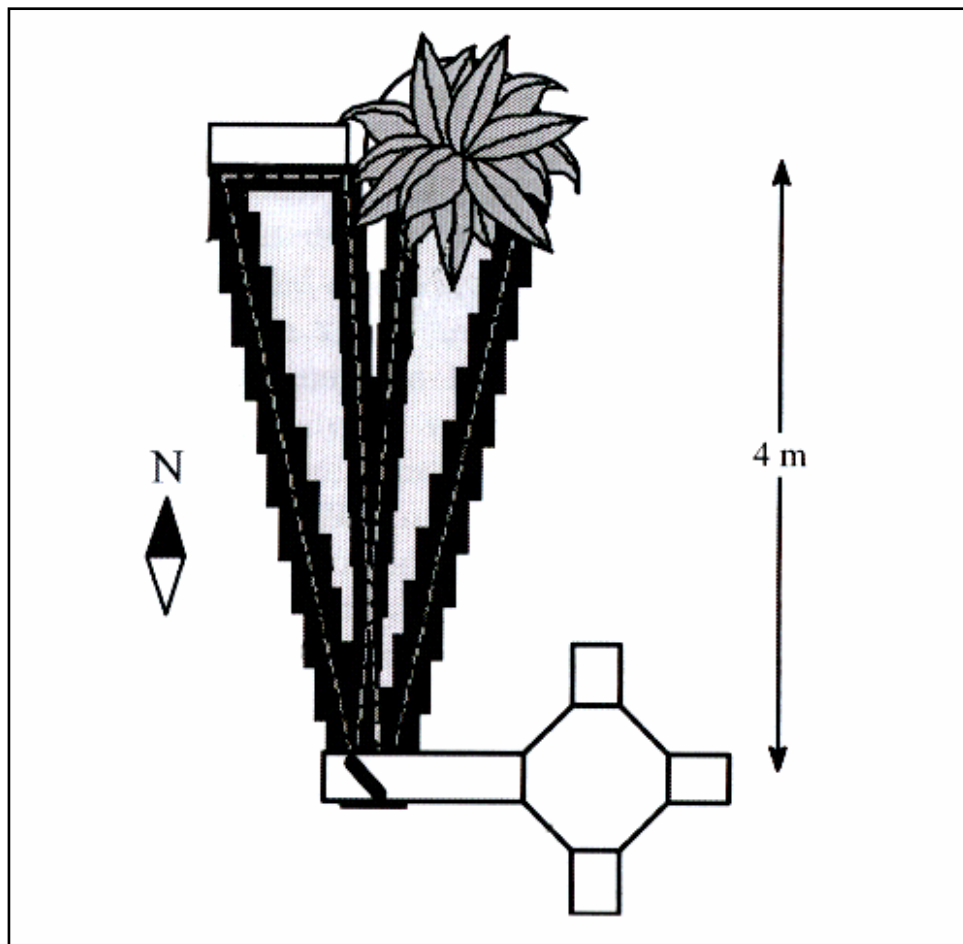


Figura 5.3. Esquema del dispositivo experimental utilizado para la medida a distancia y en continuo del PRI (tomado de Evain *et al.* 2004).



Figura 5.4. Fotografía del dispositivo experimental utilizado para la medida a distancia y en continuo del PRI. Se puede observar la colocación del sensor de PRI, el dosel de brinzales de *Q. coccifera* y el panel de referencia.

Las medidas de intercambio de gases se hicieron con un sistema portátil de medida de intercambio de gases LI-6400 (LI-COR, Lincoln, Nebraska, Estados Unidos). Para ello se midieron 10 hojas no escindidas, sanas y plenamente desarrolladas situadas en la parte superior del dosel por la mañana (entre las 8 y las 9 h (hora solar)), al mediodía (entre las 11 y las 12 h (hora solar)) y por la tarde (entre las 14 y las 15 h (hora solar)), varios días durante la realización del experimento. En el momento de realización de las medidas se recogieron datos de asimilación neta de CO_2 (A) y conductancia estomática (g_s). Las medidas se hicieron con una concentración de CO_2 controlada ($C_a = 350$ ppm), y con la densidad de flujo de fotones

fotosintéticos (PPFD) incidente en la superficie de las hojas, temperatura y humedad relativa que había en ese momento en el ambiente.

Los parámetros de fluorescencia de clorofila se midieron en 5 hojas no escindidas, sanas y plenamente desarrolladas, de la parte superior del dosel por la mañana (entre las 8 y las 9 h (hora solar)), al mediodía (entre las 11 y las 12 h (hora solar)) y por la tarde (entre las 14 y las 15 h (hora solar)) varios días durante la realización del experimento. Para ello se utilizó un fluorímetro portátil de pulso modulado (PAM-2000, Walz, Effeltrich, Alemania). La fluorescencia de clorofila mínima en la oscuridad (F_0) se midió antes del amanecer mediante el encendido de una luz modulada a 6 kHz, con una PPFD por debajo de $0,1 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en la superficie de la hoja. La fluorescencia de clorofila máxima en la oscuridad (F_M) se midió, antes del amanecer, a 20 kHz con un pulso saturante de luz blanca de $6000 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ durante 1 s. El valor de fluorescencia en el estado estacionario (F_S) se midió bajo las condiciones de PPFD existentes en cada momento. Posteriormente se aplicó un segundo pulso saturante de luz blanca para determinar la fluorescencia máxima en el estado adaptado a la luz (F'_M). Por último, las hojas se taparon con una tela completamente negra con el objetivo de determinar la fluorescencia mínima después de la inducción (F'_0). El protocolo experimental utilizado para el análisis del *quenching* de la fluorescencia de clorofila fue, esencialmente, el descrito por Genty *et al.* (1989) con algunas modificaciones. Estos cambios estaban relacionados con las medidas de F_0 y F'_0 , las cuáles se midieron en presencia de una luz rojo-lejano ($7 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) utilizada para oxidar completamente el lado aceptor del fotosistema II (PSII) (Belkhouja *et al.* 1998a, Morales *et al.* 1998). La eficiencia potencial máxima del PSII en oscuridad se calculó como F_V/F_M (Morales *et al.* 1991, Abadía *et al.* 1999). Las eficiencias real (Φ_{PSII}) e intrínseca ($\Phi_{\text{exc.}}$) del PSII se calcularon como $(F'_M - F_S) / F'_M$ y $(F'_M - F'_0) / F'_M$, respectivamente (Genty *et al.* 1989, Harbinson *et al.* 1989). El *quenching* fotoquímico (qP) se calculó como $(F'_M - F_S) / (F'_M - F'_0)$, de acuerdo con van Kooten & Snel (1990). El *quenching* no fotoquímico (NPQ) se calculó como $(F_M / F'_M) - 1$, de acuerdo con Bilger & Björkman (1990). La fracción de luz absorbida que es disipada por la antena del PSII ($1 - \Phi_{\text{exc.}}$) también fue estimada de acuerdo con Morales *et al.* (1998). Hay que resaltar que recientemente se han descrito otras aproximaciones alternativas para la desactivación térmica, produciendo tasas de disipación ligeramente más altas, que sólo pueden ser aplicadas en un limitado número de casos que cumplan una serie de criterios (Kornyeyev &

Hendrickson 2007). Las tasas de transporte electrónico (ETR) se estimaron de acuerdo con Krall & Edwards (1992), multiplicando Φ_{PSII} por PFD por 0,5 (porque se asume una distribución equitativa de la energía de excitación entre los fotosistemas I y II) y por 0,84, que se considera el coeficiente de absorbancia foliar más común para las plantas C_3 (Björkmann & Demmig 1987), incluyendo *Q. coccifera* (Morales *et al.* 2002).

5.2.5. Análisis de pigmentos fotosintéticos

Inmediatamente después de haber realizado las medidas de fluorescencia de clorofila (por la mañana, al mediodía y por la tarde), se cortaron discos de hojas con un sacabocados calibrado. Posteriormente se envolvieron los discos en papel de aluminio, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron (todavía envueltos en papel de aluminio) a -20 °C. Las muestras se recogieron de las mismas hojas donde se habían realizado previamente las medidas de fluorescencia de clorofila. Los pigmentos foliares se extrajeron posteriormente con acetona en presencia de ascorbato sódico como antioxidante, tal y como describen Abadía & Abadía (1993). Los extractos se filtraron a través de un filtro hidrófobo de $0,45$ μm de diámetro y se analizaron mediante un método isocrático de HPLC (Larbi *et al.* 2004). Todos los reactivos químicos utilizados fueron de calidad HPLC.

5.3. Resultados

5.3.1. Medida a distancia de las variaciones del PRI durante un periodo de sequía intensa

La utilidad de las medidas a distancia de PRI en condiciones de campo se comprobó sobre un dosel de brinzales en crecimiento de *Q. coccifera*. Un ejemplo de las medidas realizadas en estos experimentos, para plantas bien regadas, se muestra en la Figura 5.5. El PRI cambiaba a lo largo del día, siguiendo una imagen especular respecto a los cambios a lo largo del día en PFD (Figura 5.5a). Los cambios en el PRI seguían muy bien los cambios detectados en PFD a lo largo del día, mostrando un fuerte descenso al mediodía correspondiente al máximo desarrollo del NPQ. Este

descenso revertía completamente por la tarde (Figura 5.5a). Las nubes produjeron fluctuaciones muy rápidas en PPFD, que eran seguidas por cambios rápidos de tipo especular en el PRI (Figura 5.5b).

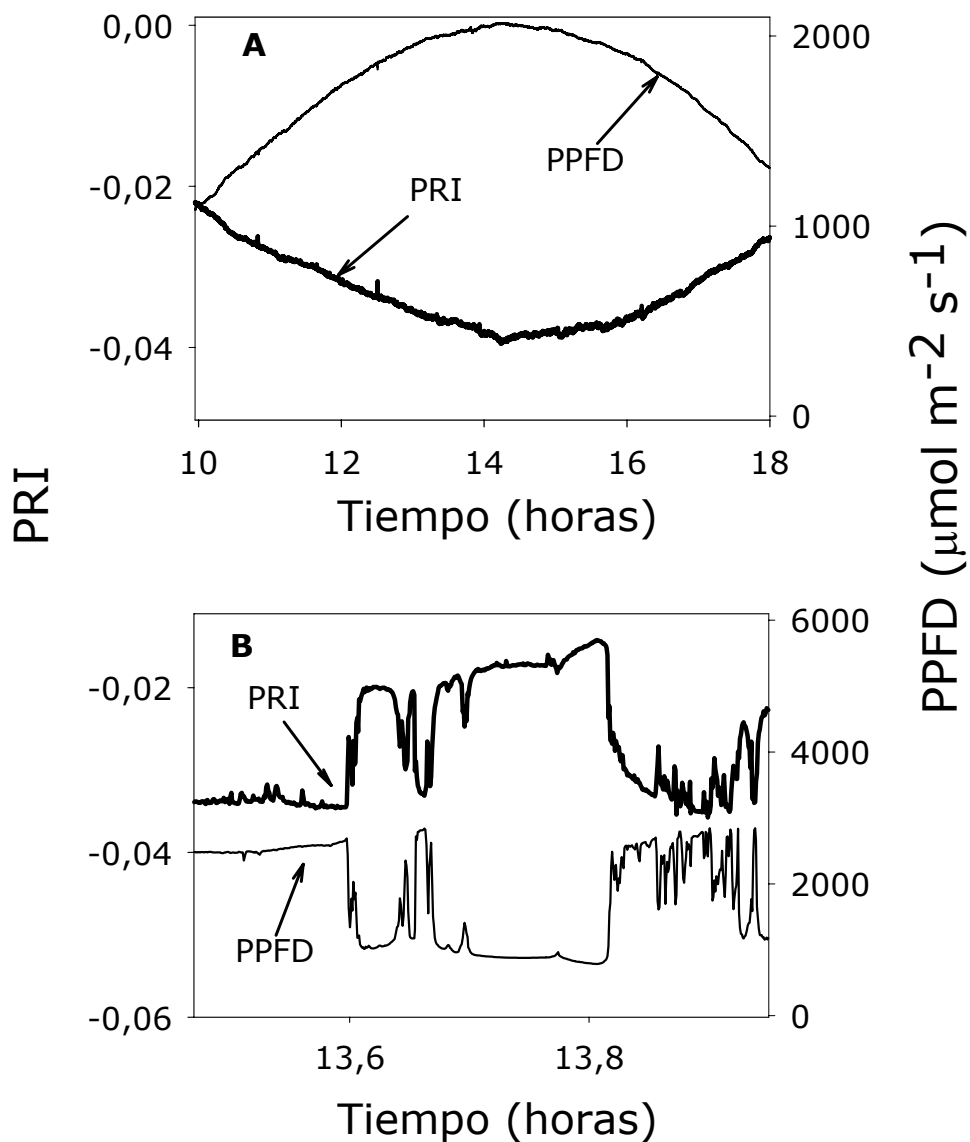


Figura 5.5. Evolución temporal de la densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) y del índice de reflectancia fisiológico (PRI) en un dosel de brinzales de *Q. coccifera* en condiciones control (plantas bien regadas, sin estrés hídrico) bajo unas condiciones propias del verano mediterráneo durante: **(A)** un día completamente soleado y **(B)** parte de un día nublado.

El PRI también se midió sobre un dosel de brinzales en crecimiento de *Q. coccifera* sometidos a un estrés hídrico paulatino. El PRI disminuyó progresivamente con el estrés hídrico a lo largo del ciclo de sequía (Figura 5.6), alcanzando sus valores más bajos al final del ciclo de sequía, y recuperando aproximadamente el 85% de los valores característicos de una planta control después de que los brinzales fueran regados de nuevo. El PRI disminuyó de un modo más marcado al mediodía y por la tarde, probablemente porque las condiciones ambientales - principalmente temperatura y humedad relativa - fueron más estresantes que por la mañana, y por la exposición acumulada a la radiación fotosintéticamente activa a lo largo del día. Hay que hacer mención a la ligera y transitoria recuperación del PRI después de los dos leves y esporádicos episodios de precipitación (indicados en la Figura 5.6 con flechas grises, precipitación de 0,1 mm cada día). También es destacable la recuperación marcada y transitoria del PRI en días nublados (indicados en la Figura 5.6 con círculos de color blanco).

En un dosel de brinzales de *Q. coccifera* bien regados se podían distinguir dos fases (una rápida y otra lenta) en el descenso del PRI inducido por un incremento repentino en PPF, debido a movimientos de las nubes (Figura 5.7a). Al final del ciclo de sequía y para un cambio similar en PPF, la fase rápida casi había desaparecido por completo, mientras que la fase lenta era todavía apreciable (Figura 5.7b).

La Figura 5.8 muestra las correlaciones entre el PRI y PPF para doseles bien regados y con un alto grado de estrés hídrico durante un incremento repentino en PPF, debido a movimientos en las nubes. Por un lado, las plantas bien regadas mostraban una relación exponencial entre PRI y PPF, indicando la existencia de una respuesta rápida (la fase rápida) seguida de una respuesta gradual (la fase lenta). Por el contrario, la relación lineal existente entre PRI y PPF para plantas con un alto grado de estrés hídrico indicaba la existencia de una sola respuesta gradual del PRI a cambios repentinos en PPF (la fase lenta).

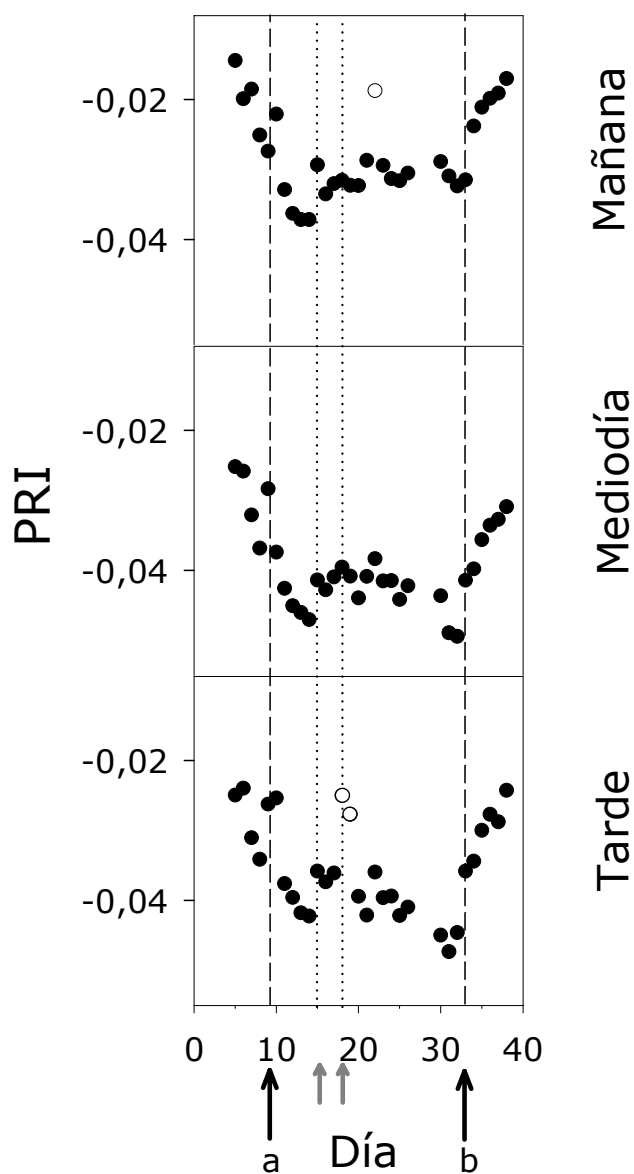


Figura 5.6. Evolución temporal del índice de reflectancia fisiológico (PRI) por la mañana (entre las 8 y las 9 h (hora solar)), al mediodía (entre las 11 y las 12 h (hora solar)) y por la tarde (entre las 14 y las 15 h (hora solar)) en un dosel de brinzales de *Q. coccifera* durante la realización del experimento. Las flechas negras indican los días de riego (a indica el comienzo del ciclo de sequía, el 14 de Julio; b indica el final del ciclo de sequía, el 8 de Agosto). Las flechas grises indican los dos eventos de precipitación (0,1 mm cada día). Los círculos blancos representan los valores de PRI durante periodos nublados.

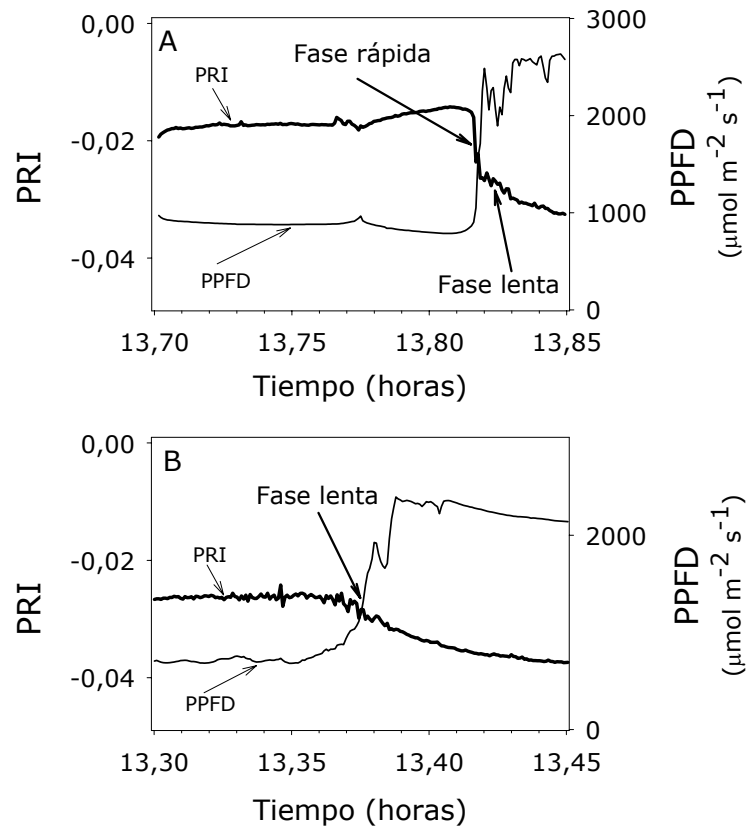


Figura 5.7. Respuesta del índice de reflectancia fisiológico (PRI) a un incremento repentino en la densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) inducido por un movimiento de las nubes sobre el dosel de brinzales de *Q. coccifera*: **(A)** al principio (control, plantas bien regadas), **(B)** y al final del ciclo de sequía (estrés hídrico intenso).

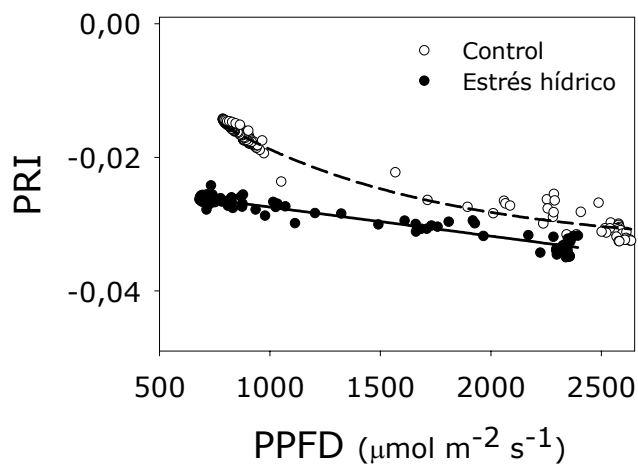


Figura 5.8. Correlaciones entre el índice de reflectancia fisiológico (PRI) y la densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) en condiciones control ($y = -0,0335 + 0,0412e^{-0,001x}$; $R^2=0,97$; $P<0,01$), y en condiciones de estrés hídrico intenso ($y = -0,0231 - (4,34 \cdot 10^{-6}) x$; $R^2=0,94$; $P<0,01$), durante un incremento repentino en PPFD inducido por un movimiento de nubes.

5.3.2. Intercambio de gases, fluorescencia de clorofila y composición de los pigmentos fotosintéticos durante un periodo de sequía intensa

La tasa de fotosíntesis neta (A) y la conductancia estomática (g_s) disminuyeron progresivamente a medida que el estrés hídrico se hacía más intenso, alcanzando valores muy bajos al final del ciclo de sequía, y recuperando los valores iniciales de una planta control cinco días después de que los brinzales fueran regados de nuevo (Figura 5.9). Los descensos inducidos por la sequía fueron más marcados por la tarde que por la mañana o al mediodía. La eficiencia instantánea en el uso del agua (WUE, calculada como el cociente A/g_s) fue máxima en los días centrales del ciclo de sequía, porque el descenso en la conductancia estomática fue más marcado que el descenso en la fotosíntesis neta durante este periodo (datos no mostrados).

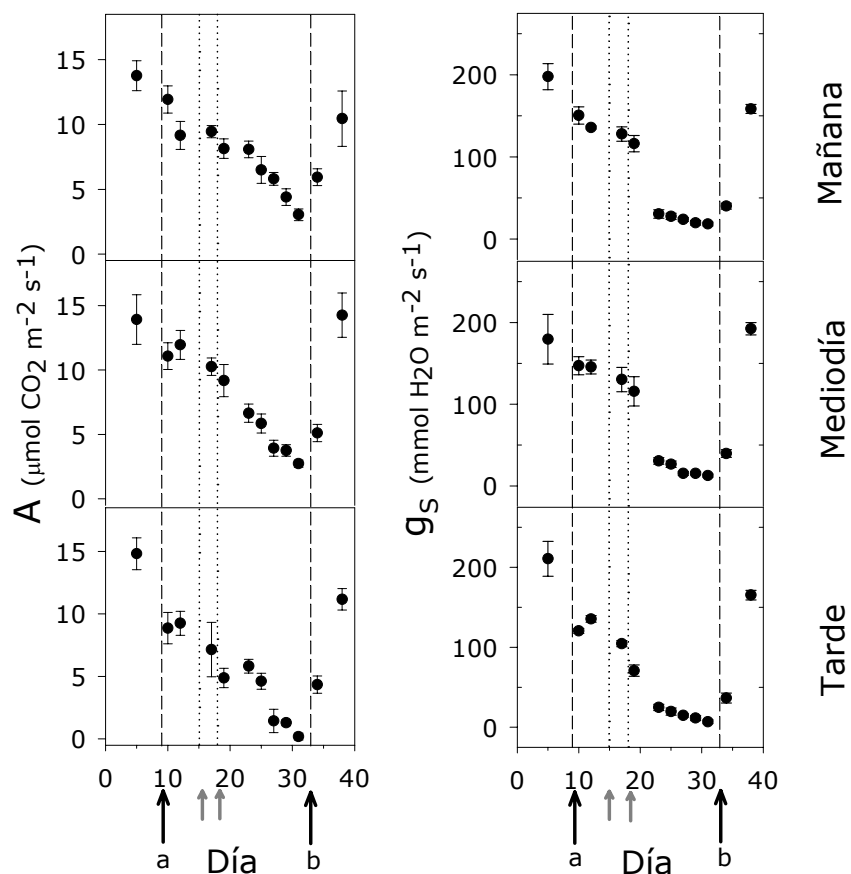


Figura 5.9. Evolución temporal de la asimilación neta de CO_2 (A) y la conductancia estomática (g_s) por la mañana (entre las 8 y las 9 h (hora solar)), al mediodía (entre las 11 y las 12 h (hora solar)) y por la tarde (entre las 14 y las 15 h (hora solar)) en un dosel de brinzales de *Q. coccifera* durante la realización del experimento. Las flechas negras indican los días de riego (a indica el comienzo del ciclo de sequía, el 14 de Julio; b indica el final del ciclo de sequía, el 8 de Agosto). Las flechas grises indican los dos eventos de precipitación (0,1 mm cada día).

La eficiencia real del PSII (Φ_{PSII}) permaneció prácticamente constante durante el ciclo de sequía por la mañana, mientras que al mediodía y por la tarde se observaron descensos con respecto a los valores de las plantas control de 0,30-0,35 a 0,10-0,15 (Figura 5.10). Hay que resaltar que estos descensos en Φ_{PSII} (Figura 5.10) eran mucho menos pronunciados que los observados en las tasas de fotosíntesis neta (Figura 5.9). Por este motivo, el cociente entre el transporte electrónico y la fotosíntesis (ETR/A) se incrementó de 10-16 en condiciones control a 44-46 al final del ciclo de sequía (datos no mostrados), correspondiendo los valores más bajos dentro de cada rango a aquéllos medidos por la mañana. Estos datos indican que la cantidad de electrones que no están destinados a procesos fotosintéticos es muy alta en plantas sometidas a un alto grado de estrés hídrico, porque los valores de ETR se mantuvieron relativamente altos durante el ciclo de sequía mientras que los valores de fotosíntesis neta disminuyeron de un modo muy pronunciado.

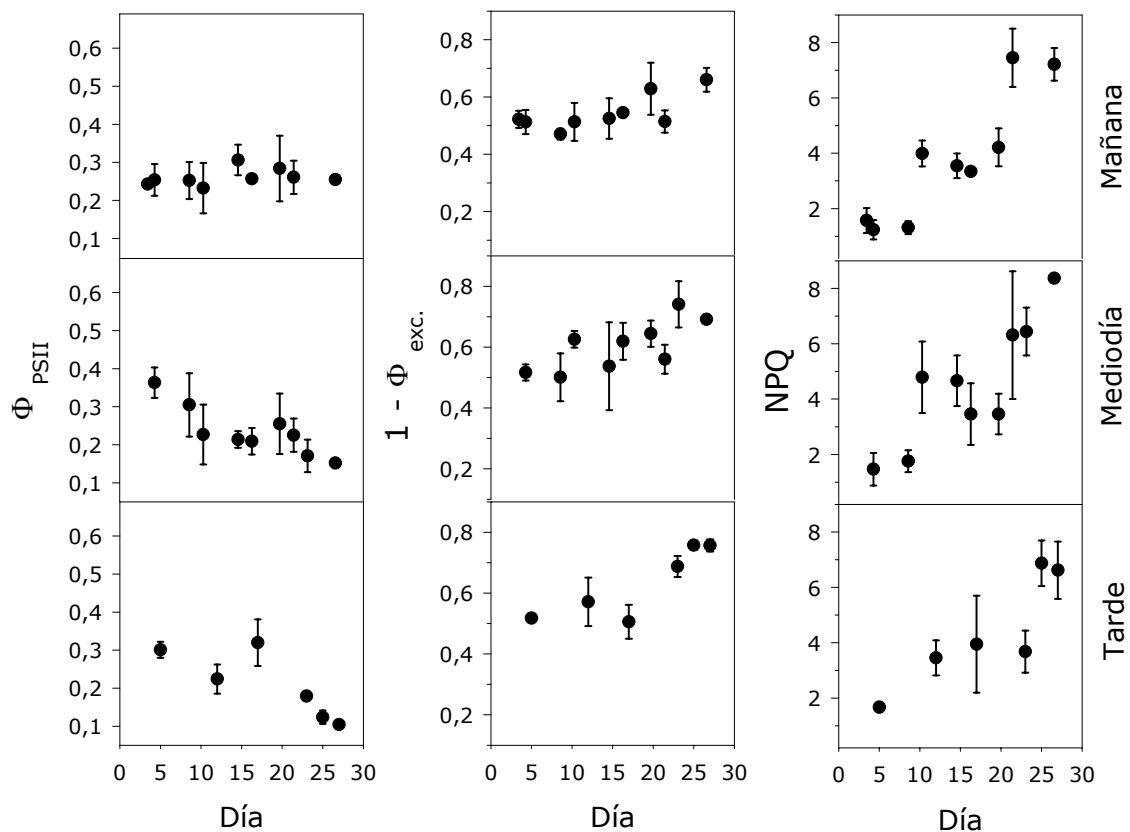


Figura 5.10. Evolución temporal de la eficiencia real del PSII (Φ_{PSII}), de la fracción de luz absorbida que es disipada en la antena del PSII ($1 - \Phi_{exc.}$) y del *quenching* no fotoquímico (NPQ) por la mañana (entre las 8 y las 9 h (hora solar)), al mediodía (entre las 11 y las 12 h (hora solar)) y por la tarde (entre las 14 y las 15 h (hora solar)) en un dosel de brinzales de *Q. coccifera* durante la realización del experimento. Los datos se representan como media \pm error estándar.

La fracción de luz absorbida que es disipada en la antena del PSII ($1 - \Phi_{exc.}$) se incrementó del 50 % para plantas en condiciones control al 65-75 % al final del ciclo de sequía (Figura 5.10). Por otra parte, el NPQ fue aumentando de manera acusada a medida que el estrés hídrico se hacía más intenso, partiendo de unos valores de 1,5 para plantas control y llegando a unos valores de 7-8 al final del ciclo de sequía (Figura 5.10).

El estrés hídrico no modificó la composición de los pigmentos fotosintéticos de las hojas de *Q. coccifera* (Tabla 5.1), exceptuando el estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas ((A+Z)/(V+A+Z)) (Figura 5.11). Por la mañana, la relación (A+Z)/(V+A+Z) se incrementó desde un 50% en condiciones control hasta un 80% al final del ciclo de sequía. Al mediodía y por la tarde, las relaciones (A+Z)/(V+A+Z) fueron muy altas (80-92%) durante todo el experimento.

Tabla 5.1. Evolución temporal en la composición de pigmentos fotosintéticos en *Q. coccifera* durante la realización del experimento. Chl a y b se expresan en $\mu\text{mol m}^{-2}$, y neoxantina (Nx), luteína (Lx), β -caroteno (β -car) y violaxantina + anteraxantina + zeaxantina (V+A+Z) en $\text{mmol pigmento mol}^{-1}$ Chl. Las diferencias no fueron significativas a $P < 0,05$.

Día	Clorofilas			Carotenoides			
	Chl a	Chl b	Chl a/Chl b	Nx	Lx	β -car	V+A+Z
10	193.4±8.6	56.4±2.7	3.45±0.06	27±1	139±3	109±2	116±6
12	192.7±9.2	55.0±2.7	3.51±0.04	28±1	139±3	102±2	105±6
17	195.1±9.7	55.5±2.9	3.54±0.07	27±1	135±3	108±3	103±7
19	211.6±15.8	59.8±5.0	3.58±0.06	27±1	132±3	106±2	93±5
23	221.6±10.9	63.5±3.6	3.52±0.06	27±1	137±3	110±2	107±8
25	187.5±21.5	56.1±8.3	3.41±0.13	28±1	149±7	111±4	120±18
27	223.9±10.8	69.5±3.6	3.24±0.07	32±1	173±5	129±2	128±12
31	176.9±10.1	55.1±3.2	3.22±0.05	28±1	153±3	118±2	139±7

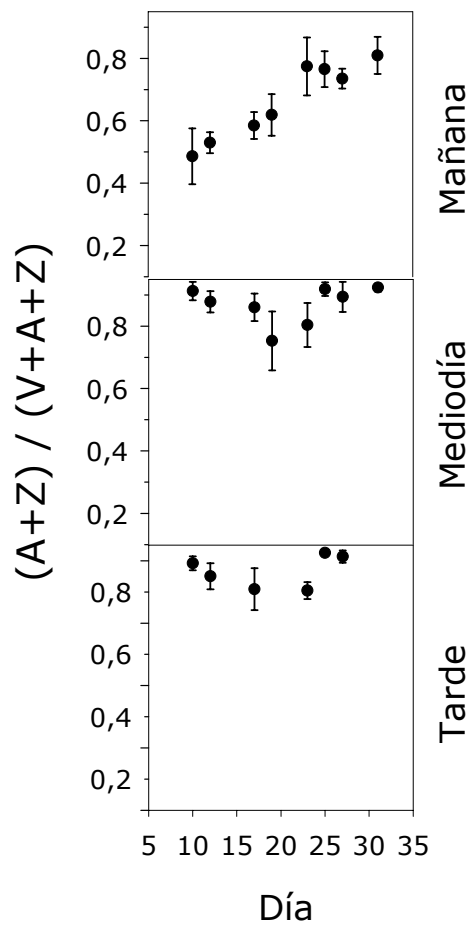


Figura 5.11. Evolución temporal del estado de de-epoxidación del ciclo de las xantofilas $[(A+Z)/(V+A+Z)]$, donde A es la anteraxantina, Z es la zeaxantina y V es la violaxantina] por la mañana (entre las 8 y las 9 h (hora solar)), al mediodía (entre las 11 y las 12 h (hora solar)) y por la tarde (entre las 14 y las 15 h (hora solar)) en un dosel de brinzales de *Q. coccifera* durante la realización del experimento. Los datos se representan como media \pm error estándar.

5.3.3. Relaciones entre PRI, NPQ, FS, y el estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas

Las relaciones PRI – NPQ y PRI - F_s son sobradamente conocidas (Fig. 5.12a y 5.12b, Gamon *et al.* 1992, Flexas *et al.* 2002b, Evain *et al.* 2004, Moya *et al.* 2004). Los datos obtenidos en este trabajo se ajustan de manera bastante satisfactoria con estas relaciones, aunque algunos puntos al final del ciclo de sequía (rodeados con un círculo en la Figura 5.12a y 5.12b) se desvían de esta relación (ver sección 5.4. Discusión). Además, se observó la existencia de una correlación entre el PRI y

(A+Z)/(V+A+Z) en brinzales de *Q. coccifera* sometidos a un intenso estrés hídrico (Figura 5.12c). La relación PRI vs. (A+Z)/(V+A+Z) (Figura 5.12c) es más fuerte que la relación NPQ vs. (A+Z)/(V+A+Z) ($R^2=0,16$; $P=0,068$), sugiriendo que bajo ciertas circunstancias el PRI es un mejor indicador del estrés hídrico que el NPQ.

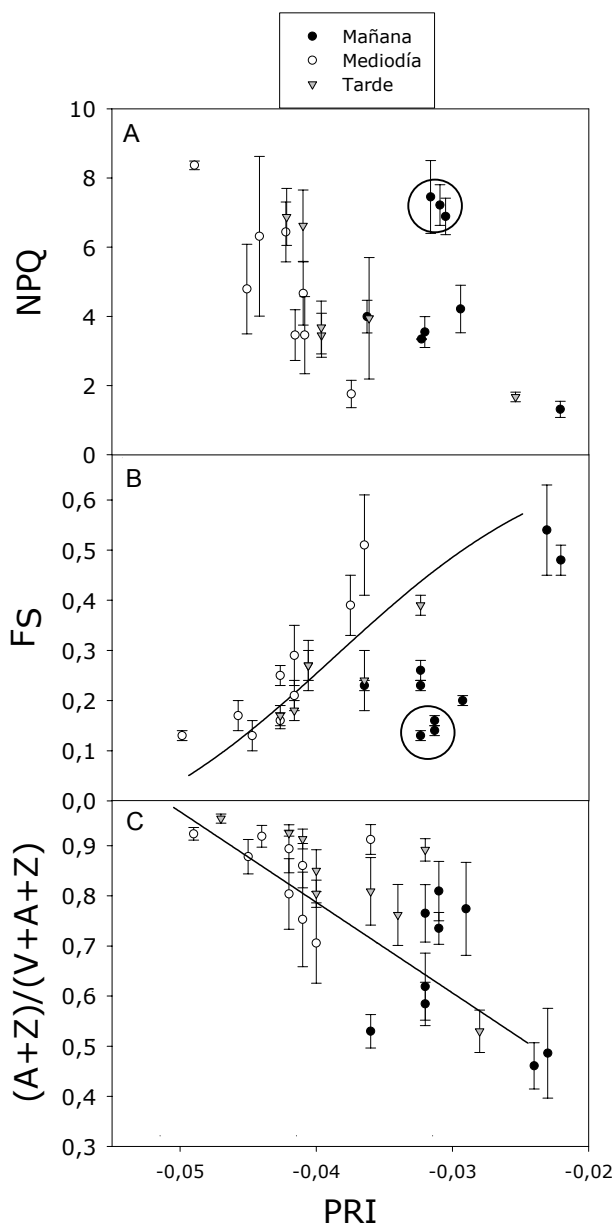


Figura 5.12. Relación entre el PRI y el NPQ (A; $y = -5876 + 0,0001 e^{-215x} + 5875 e^{-0,02x}$; $R^2=0,63$; $P<0,01$), la fluorescencia estacionaria (F_s) (B; $y = 0,62/(1+e^{-((x+0,03)/0,01)})$; $R^2=0,57$; $P<0,01$), y el grado de de-epoxidación del ciclo de las xantofilas [(A+Z)/(V+A+Z)] (C; $y = 0,074 - 18,34x$; $R^2=0,63$; $P<0,01$) en *Q. coccifera* durante el periodo experimental. Los datos se representan como media \pm error estándar. Los puntos rodeados por un círculo no están incluidos en las regresiones.

5.3.4. Contenido hídrico relativo y porcentaje de embolia

Aunque el nivel de contenido hídrico relativo (RWC) alcanzado al final del ciclo de sequía fue muy bajo (65%) en comparación con las plantas control (100%), el porcentaje de embolia fue bajo (16%) (Tabla 5.2). En las plantas en condiciones control el porcentaje de embolia fue inapreciable (0%) (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Contenido hídrico relativo (%) y grado de embolia (%) al principio (control, plantas bien regadas) y al final del ciclo de sequía (estrés hídrico intenso).

	RWC (%)	Embolia (%)
Plantas control	100	0
Plantas al final del ciclo de sequía	65	16

5.4. Discusión

Contrariamente a lo que algunos estudios previos habían establecido, la medida a distancia del PRI debe ser considerada como una herramienta muy prometedora para la monitorización de los cambios dinámicos (a lo largo del día) en la fotoprotección del dosel vegetal bajo condiciones de estrés hídrico intenso. Nuestros datos indican que tanto el NPQ (a escala foliar) como el PRI (a escala de dosel vegetal) respondían frente a cambios en la intensidad lumínica a lo largo del día y frente a periodos de estrés hídrico intenso.

Sin embargo, existen dificultades asociadas al empleo del NPQ en especies mediterráneas que pueden sufrir periodos de intensa sequía, tales como *Q. coccifera*. Esto hecho se basa en los descensos inducidos por sequía de los valores de F_M medidos antes del amanecer, que tienen como consecuencia una estimación a la baja del NPQ real. En este estudio, al final del ciclo de sequía, las hojas presentaban valores de F_V/F_M alrededor de 0,5, debidas fundamentalmente a descensos en F_M (datos no mostrados). Este problema se ha resuelto mediante la utilización de un valor

de F_M medido antes del amanecer en plantas bien regadas, representativo y estadísticamente bien definido, para seguir los cambios en NPQ durante el desarrollo del ciclo de sequía. Si esta consideración no se toma en cuenta, el NPQ no puede ser usado como un indicador preciso del grado de estrés sufrido por la planta, debiendo ser llamado “NPQ aparente” (Corcuera *et al.* 2005a).

El NPQ puede ser dividido en, al menos, tres componentes: (i) qE , relacionado con el pH del lumen y sensible a zeaxantina, (ii) qT , que es el *quenching* del las transiciones de estado, y (iii) qI , relacionado con procesos de fotoinhibición, de acuerdo con sus cinéticas de relajación en la oscuridad (Müller *et al.* 2001). Por lo tanto, en el caso de la existencia de fotoinhibición, un alto nivel de NPQ no siempre refleja fotoprotección. En este estudio se sugiere que el NPQ, además de reflejar algunos mecanismos fotoprotectores relacionados con qE , está revelando fenómenos de fotoinactivación de los centros de reacción del PSII, hecho evidenciado por los descensos en F_M sin cambios en los valores de F_0 (datos no mostrados). En relación con estos hechos, los incrementos en las tasas de disipación de la energía en la antena del PSII ($1 - \Phi_{exc.}$) por estrés hídrico eran mucho más pequeños que los observados en NPQ, reflejando la existencia de algún tipo de mecanismo fotoprotector relacionado con qE (a través de incrementos en $(1 - \Phi_{exc.})$, y evidenciando fotoinactivación de los centros de reacción del PSII (por los descensos en F_M antes del amanecer, que incrementaban considerablemente el NPQ). La relación entre los procesos de fotoprotección y fotoinactivación bajo condiciones de estrés hídrico intenso en la vegetación mediterránea es un objetivo de futuros estudios.

Las correlaciones encontradas en este estudio entre el PRI y el NPQ o la F_S eran estadísticamente significativas a $P < 0,001$ ($R^2 = 0,63$ y $R^2 = 0,57$, respectivamente). De hecho, ya han sido descritas anteriormente buenas correlaciones entre el PRI y el NPQ (Evain *et al.* 2004), y entre el PRI y la F_S (en este caso dependiendo de las variaciones en la PPFD incidente) (Flexas *et al.* 2002b, Moya *et al.* 2004). Este no es un hecho sorprendente porque ambos parámetros reflejan, en muchos casos, procesos de fotoprotección relacionados con la generación de un ΔpH intratilacoidal y/o la de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas.

La relación $(A+Z)/(V+A+Z)$ fue siempre muy alta, incluso antes de que comenzara el periodo de sequía, y no varió mucho durante todo el periodo experimental al mediodía y por la tarde. Sin embargo, el PRI fluctuó de manera

considerable durante la realización del experimento. Este hecho se refleja en la correlación relativamente baja encontrada entre el PRI y $(A+Z)/(V+A+Z)$ ($R^2=0,63$), en comparación con trabajos previos ($R^2=0,98$; Gamon & Surfus 1999). La principal diferencia es la diferente escala de medida, desde el nivel foliar en Gamon & Surfus (1999) hasta el nivel de dosel vegetal en este estudio, lo que hizo disminuir los valores de R^2 (aunque a nivel de dosel la relación todavía es significativa a $P<0,001$). Los valores tan altos de $(A+Z)/(V+A+Z)$ al mediodía y por la tarde, incluso antes de que comenzara el periodo de sequía, deben ser atribuidos a la cantidad acumulada de radiación solar incidente recibida por las plantas. Esta afirmación se basa en el hecho de que en plantas bien regadas la relación $(A+Z)/(V+A+Z)$ por la mañana era de 0,5, incrementándose hasta casi 1,0 al mediodía y por la tarde.

Cambios cualitativos y/o cuantitativos en la cobertura del dosel pueden limitar la utilidad del PRI como indicador de estrés hídrico. Sin embargo, la composición de los pigmentos fotosintéticos no cambió durante la realización del experimento (ver Tabla 5.1). En consecuencia, los cambios observados en el PRI no estaban causados por cambios en el verdor del dosel. Además, la estructura del dosel no sufrió cambios durante el periodo de estrés hídrico. Por una parte, las hojas estaban ya completamente desarrolladas al principio del experimento y no se observó de manera apreciable crecimiento (es decir, no hubo cambios en la altura de las plantas). Por otra parte, el estrés hídrico impuesto fue menos severo que el descrito en trabajos previos (Vilagrosa *et al.* 2003a), sin que se produjera caída de hoja durante el periodo de sequía. Además, aunque el nivel de estrés hídrico impuesto llevó a las hojas por debajo del punto de turgencia, no hubo marchitamiento. Por último, el ángulo medio entre las hojas y el tallo no cambió de manera significativa a lo largo del periodo experimental (datos no mostrados). Todos estos datos indican, por lo tanto, que el índice de área foliar permaneció prácticamente constante durante el periodo de estrés hídrico en *Q. coccifera*, sugiriendo que los cambios en NDVI debidos a estrés hídrico no son probables en esta especie. En este sentido, hay que resaltar que, en un experimento independiente donde *Q. coccifera* también fue expuesta a un fuerte estrés hídrico, los valores de NDVI del dosel iban desde $0,80 \pm 0,01$ (plantas bien regadas) hasta $0,76 \pm 0,01$ (plantas con un fuerte grado de estrés hídrico). Así, se puede concluir que el PRI es un indicador válido para medidas a distancia en doseles cerrados de especies perennifolias que no sufren cambios en la arquitectura del dosel con el estrés hídrico. Trabajos previos señalaron que el uso de las medidas pasivas a distancia del PRI, como una herramienta para la detección del estrés hídrico, no

siempre es posible, especialmente en doseles en los que el estrés hídrico conlleva marchitamiento o cambios en el ángulo foliar (Gamon *et al.* 1992, 1997, Peñuelas *et al.* 1994). Este no es el caso de *Q. coccifera*, aunque sea expuesta a estrés hídrico severo.

Tanto el PRI como el estudio del funcionamiento fisiológico de ciertas especies mediterráneas en respuesta a la sequía intensa, sufriendo potenciales hídricos tan negativos, son cuestiones muy novedosas que se presentan en este capítulo. Por un lado, existe un interés creciente en el uso del PRI, y otros índices de reflectancia basados en medidas hiperspectrales, para medidas a distancia en vuelo (Rahman *et al.* 2001) y en misiones de exploración desde el espacio terrestre (Harris 2002, Stylinski *et al.* 2002, Winkel *et al.* 2002). En relación a este tema, Grace *et al.* (2007) han relacionado una señal de PRI procedente de un satélite con la eficiencia en el uso de la luz. Por otro lado, *Q. coccifera* es una excelente planta modelo para este tipo de estudios por su capacidad de supervivencia a tan extremas condiciones de estrés hídrico, recuperando casi completamente su estado original unas pocas horas después del riego de recuperación. Otro aspecto novedoso del presente estudio es la desaparición de la fase rápida del PRI bajo condiciones de intensa sequía, en respuesta a un repentino incremento en la intensidad lumínica.

Gamon *et al.* (1990) y Ruban *et al.* (1993) describieron la existencia de dos fases cinéticamente distintas en las medidas de los cambios a 531-535 nm en reflectancia (PRI) y absorbancia respectivamente. En este sentido, se distinguieron dos fases del PRI en respuesta a cambios en la intensidad de la luz:

- un componente rápido del PRI (del orden de segundos), atribuido a (i) cambios conformacionales en los cloroplastos producidos por la generación de un ΔpH intratilacoidal y (ii) parcialmente a la de-epoxidación de ciclo de las xantofilas.
- un componente principal de PRI (lento, del orden de minutos) relacionado con la de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (Evain *et al.* 2004).

En este estudio se describe la desaparición de la fase rápida del PRI bajo condiciones de sequía intensa en respuesta a un incremento repentino en la

intensidad lumínica. Este hecho debe estar relacionado con la imposibilidad de incrementar el ΔpH a tal nivel de estrés, posiblemente porque los valores de ΔpH ya estuvieran muy altos (y, por lo tanto, el pH del lumen intratilacoidal muy bajo). De hecho, el ciclo de las xantofilas está casi completamente de-epoxidado al final del ciclo de sequía, independientemente de la hora del día. Además, se sabe que la enzima violaxantina de-epoxidasa se inactiva a un pH superior a 6,5 y opera de manera óptima a un pH inferior a 5,8 (Pfündel & Dilley 1993, Rockholm & Yamamoto 1996).

La existencia de un bajo pH luminal de manera permanente en *Q. coccifera*, en respuesta a periodos de estrés hídrico intenso, podría estar relacionada con mecanismos de fotoprotección que aún quedan por explicar. En este sentido, Demmig-Adams y sus colaboradores (Demmig-Adams & Adams III 2006, Demmig-Adams *et al.* 2006) han señalado que la disipación del exceso de energía podría estar relacionada con proteínas relacionadas con las proteínas PsbS en especies perennifolias con baja capacidad de crecimiento y alta capacidad de supervivencia, con una capacidad fotosintética limitada intrínsecamente y una gran capacidad para sobrevivir a periodos prolongados con condiciones ambientales que impiden el crecimiento, como es el caso de *Q. coccifera*.

Con independencia del mecanismo fisiológico, los cambios en *Q. coccifera* asociados a la sequía intensa permiten a esta especie evitar el daño oxidativo. Esto se ve claramente en la composición de los pigmentos fotosintéticos, que permanece prácticamente constante durante todo el ciclo de sequía, excepto en lo que se refiere a las inter-conversiones dentro del ciclo de las xantofilas. Además, las variables relacionadas con la eficiencia del PSII (por ejemplo, F_v/F_m , Φ_{PSII} y $\Phi_{\text{exc.}}$) presentaban un alto grado de resistencia, mostrando solamente ligeros o moderados descensos cuando los valores de fotosíntesis se aproximaron a cero. Estudios previos han señalado que las especies mediterráneas han desarrollado estrategias para prevenir los procesos fotoinhibitorios, incluyendo mecanismos para prevenir o disipar el exceso de absorción de luz, o mecanismos diseñados para consumir el exceso de poder reductor generado por el PSII (Flexas *et al.* 1999, Martínez-Ferri *et al.* 2000, Flexas & Medrano 2002b, Gulías *et al.* 2002).

La conservación intacta de la maquinaria fotosintética y el bajo porcentaje de embolia al final del ciclo de sequía (16%) podrían contribuir a la rápida recuperación de *Q. coccifera* tras un largo periodo de estrés hídrico estival, explicando la rápida

recuperación en los valores de asimilación neta de CO₂ y conductancia estomática después de regar de nuevo los brinzales de *Q. coccifera* que habían sido sometidos a estrés hídrico.

5.5. Conclusiones

El PRI se ha revelado como un indicador de estrés hídrico excelente, sensible, dinámico y no destructivo, incluso en especies vegetales bajo condiciones de intensa sequía en condiciones naturales y, como es el caso de *Q. coccifera*, especialmente resistentes al estrés hídrico estival.

El siguiente objetivo debe ser la consideración del empleo del PRI para evaluar el estado hídrico de la planta a través de las medidas a distancia de reflectancia del dosel vegetal.

El empleo de estas especies perennifolias como plantas modelo para la monitorización de la disponibilidad de agua en el suelo durante las cuatro estaciones del año puede ayudar a comprender la evolución del paisaje mediterráneo en relación con el cambio climático.

CAPÍTULO 6

Análisis temporal de la cinética de los cambios en la reflectancia en el verde, la fluorescencia de clorofila y el ciclo de las xantofilas durante cambios bruscos en la intensidad lumínica

6.1. Introducción.....	122
6.2. Material y métodos.....	124
6.2.1. <i>Material vegetal y condiciones experimentales</i>	124
6.2.2. <i>Medidas de reflectancia espectral</i>	128
6.2.3. <i>Medidas de fluorescencia de clorofila</i>	128
6.2.4. <i>Análisis de pigmentos fotosintéticos</i>	129
6.3. Resultados.....	129
6.3.1. <i>Predawn</i>	129
6.3.2. <i>Mediodía</i>	132
6.4. Discusión.....	135
6.5. Conclusiones.....	138

6.1. Introducción

La vegetación mediterránea está frecuentemente expuesta a una cantidad excesiva de radiación lumínica, que no puede ser usada en la asimilación de carbono (Peguero-Pina *et al.* 2008). Por este motivo, las plantas poseen mecanismos de disipación de este exceso de energía que ayudan a prevenir daños asociados al mismo (Björkman & Demmig-Adams 1994).

Uno de estos mecanismos está asociado al llamado ciclo de las xantofilas, donde el pigmento carotenoide zeaxantina (sin epoxidar) se genera a partir de la de-epoxidación de la violaxantina (dos epóxidos) con la anteraxantina como paso intermedio (un epóxido). Ambas reacciones de de-epoxidación están catalizadas por la misma enzima, la violaxantina-deepoxidasa. Parece ser que esta enzima se localiza en el lumen tilacoidal, con una actividad óptima a un pH cercano a 5,2 (Pfündel & Dilley 1993). El exceso de energía lumínica produce un aumento del gradiente de pH a través de la membrana tilacoidal, lo que causa una acidificación del lumen y, como consecuencia, una activación de la enzima (Bilger *et al.* 1989). La reacción inversa (epoxidación de zeaxantina a violaxantina) está catalizada por una epoxidasa localizada en el otro lado de la membrana tilacoidal, cuya actividad está promovida por unas condiciones de pH y potencial redox que se dan bajo condiciones limitantes de luz (Yamamoto 1979). Se ha demostrado que la zeaxantina juega un papel determinante en los mecanismos responsables de parte de la disipación de energía no radiativa cuando hay exceso de energía lumínica (Demmig *et al.* 1987, Niyogi 1999, Li *et al.* 2000).

A nivel foliar, el ciclo de las xantofilas puede ser estudiado con técnicas ópticas. Estudios previos han encontrado cambios en la absorbancia centrados en la ventana de 531-535 nm, que se han relacionado con cambios conformacionales de los cloroplastos debidos a cambios en el Δ pH intratilacoidal y con cambios en el estado de agregación de los complejos pigmento-proteína de la antena debidos a una acumulación de formas de-epoxidadas de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (Bilger *et al.* 1989, Morales *et al.* 1990, Ruban *et al.* 1993). Por otro lado, los cambios en el estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas se pueden medir siguiendo los cambios en la absorbancia a 505 nm en suspensiones de cloroplastos (Yamamoto *et al.* 1972) o en discos de hoja (Bilger *et al.* 1989, Morales *et al.* 1990). De esta manera, cambios en la absorbancia en estas longitudes de onda

son indicadores de la regulación lumínica del fotosistema II (PSII) (Peñuelas *et al.* 1995). Sin embargo, la aplicación de la medida de estos cambios de absorbancia fuera del laboratorio presenta multitud de problemas prácticos. Concretamente, su aplicación en hojas verdes intactas y fotosintéticamente activas es muy complicada debido a la gran densidad óptica de las hojas en estas longitudes de onda y a la existencia de cambios en la absorbancia inducidos por la luz, con considerables solapamientos espectrales (Inoue & Shibata 1973, Krause 1973, Witt 1979).

Por otro lado, se han encontrado cambios rápidos en la reflectancia de la vegetación en el entorno de los 531 nm (PRI, acrónimo de “Physiological Reflectance Index”) debidos a cambios repentinos en la radiación solar incidente (Peguero-Pina *et al.* 2008). Parece ser que estos cambios pueden ser debidos a cambios conformacionales en los cloroplastos, asociados con la generación de un ΔpH trans-tilacoidal y con cambios en el estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (Gamon *et al.* 1990). Por estos motivos, los cambios encontrados en la absorbancia y en la reflectancia en el entorno de los 531 nm parecen tener un origen común (Peñuelas *et al.* 1995, Peguero-Pina *et al.* 2008).

Sin embargo, la existencia de una posible relación entre la reflectancia a 505 nm y la de-epoxidación de los pigmentos de las xantofilas no ha sido investigada todavía, siendo uno de los principales objetivos de este capítulo. El posible uso de índices reflectométricos basados en esta longitud de onda permitiría estudiar de manera pasiva y a distancia el nivel de disipación térmica del exceso de energía lumínica, con independencia de otros factores que sí influyen en la reflectancia a 531 nm, tales como la generación del ΔpH trans-tilacoidal y fenómenos de reordenamiento cloroplástico en respuesta a cambios en la intensidad lumínica (Gamon *et al.* 1990).

Por otra parte, el conocimiento de los cambios rápidos en la señal de reflectancia en la parte verde del espectro y la formación de formas de-epoxidadas en respuesta a un brusco incremento en la radiación lumínica es una cuestión que necesita ser estudiada más en profundidad, constituyéndose como uno de los objetivos de este capítulo. Aunque estudios previos han establecido relaciones de este tipo (Gamon & Surfus 1999), no se han realizado todavía experimentos donde se realice la medida simultánea de la reflectancia espectral y la inmediata congelación de la muestra para el posterior análisis de pigmentos fotosintéticos. El desarrollo de un prototipo experimental (ver sección 6.2. Material y métodos) que permite cortar un

disco de una hoja no escindida mientras se realizan las medidas de reflectancia espectral ha hecho posible la realización de este trabajo. Para ello se ha elegido *Quercus coccifera* L. como especie modelo, debido a su particular comportamiento fisiológico y a su importante papel como especie formadora de paisaje dentro de la vegetación mediterránea.

6.2. Material y métodos

6.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

Quercus coccifera L. fue elegida como especie modelo para el estudio de la cinética de las variaciones en la reflectancia espectral a 505 y 531 nm en respuesta a un cambio drástico en las condiciones lumínicas: de luz tenue (unos 65 μmoles de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a luz saturante (unos 1850 μmoles de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Para este estudio se utilizaron plantas de *Q. coccifera* de 5 años de edad procedentes de semillas de masas de esta especie localizadas en la Sierra de Luna (Zaragoza). Las plantas crecieron en macetas de plástico de 6,3 litros de capacidad (0,197 m de diámetro y 0,207 m de altura), usando un sustrato ácido compuesto por turba negra, arena y tierra a partes iguales.

Las medidas se realizaron en hojas procedentes de plantas bien regadas (en ausencia de estrés hídrico) antes del amanecer y al mediodía. Cada hoja fue expuesta a luz tenue durante 4 min. Los tiempos de exposición a luz saturante iban desde los 6 hasta los 180 s. La última fase del estudio consistió en la exposición de hojas a luz tenue desde los 6 hasta los 180 s tras exposición de 4 min a luz tenue y 3 min a luz saturante. La luz tenue era proporcionada por un foco halógeno colocado 90 cm por encima del dispositivo. La luz saturante fue proporcionada por una fuente halógena de luz blanca (KL 2500 LCD, Schott AG, Mainz, Alemania).

Para la realización de la medida simultánea del PRI y la toma de muestras para análisis de pigmentos fotosintéticos se desarrolló un dispositivo experimental no comercial que es capaz de cortar e inmediatamente congelar en nitrógeno líquido un disco de hoja procedente de una hoja no escindida en la cuál se había medido previamente el PRI (Figura 6.1). El dispositivo permite ser programado para que, a un tiempo determinado, un electroimán libere una barra de acero que cae y perfora la

hoja sobre la que se han estado realizando las medidas de reflectancia (Figuras 6.2 y 6.3). Esta barra de acero perfora la hoja y produce el corte de un disco de hoja que cae hasta un pequeño depósito situado debajo que contiene nitrógeno líquido, quedando dicho disco de hoja congelado inmediatamente.



Figura 6.1. Fotografía en la que se muestra el dispositivo experimental empleado para la realización de este estudio.

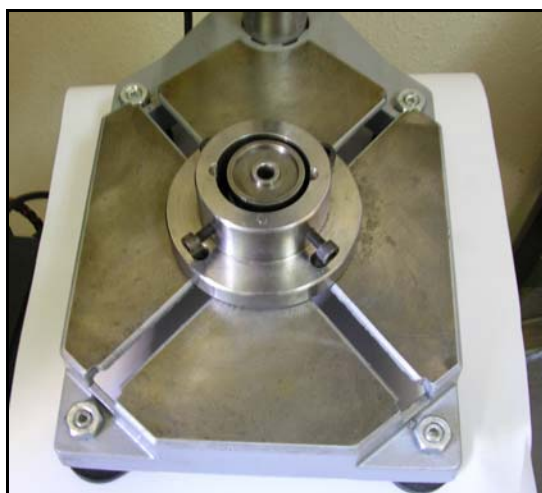


Figura 6.2. Fotografías en las que se muestran en detalle el electroimán (parte superior), el orificio sobre el que se colocan las hojas (parte media) y el controlador (parte inferior) del dispositivo experimental utilizado.



Figura 6.3. Secuencia de eventos que se suceden tras la liberación del electroimán y que tienen como resultado la obtención de un disco de hoja que se congela inmediatamente en nitrógeno líquido.

6.2.2. Medidas de reflectancia espectral

Para la realización de las medidas de reflectancia espectral se utilizó un espectrorradiómetro portátil USB-2000 (Ocean Optics, Dunedin, Estados Unidos) con un rango de detección en longitudes de onda que van de 200 a 1100 nm. El tiempo de integración elegido fue de 100 ms.

El índice de reflectancia fisiológico (PRI) a 531 nm se calculó como:

$$PRI_{531} = (R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570})$$

donde R_{531} y R_{570} representan, respectivamente, la reflectancia de la hoja a 531 y 570 nm, siendo ésta última la longitud de onda usada como referencia (Gamon *et al.* 1997, Evain *et al.* 2004). El estudio de la reflectancia a 505 nm se hizo empleando un índice alternativo (llamado PRI_{505}) calculado de manera análoga al PRI pero utilizando la reflectancia a 505 nm en vez de a 531 nm.

6.2.3. Medidas de fluorescencia de clorofila

Las medidas de la fluorescencia de clorofila se realizaron utilizando un fluorímetro portátil con modulación en la amplitud del pulso FMS II (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, Reino Unido). F_0 se midió antes del amanecer encendiendo la luz modulada de medida con una PPF de $0,4 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la superficie de la hoja. F_M se midió antes del amanecer con un pulso de 0,8 s de $9000 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca sobre la superficie de la hoja. Posteriormente se aplicó un segundo pulso saturante de luz blanca para determinar la fluorescencia máxima en el estado adaptado a la luz (F'_M) en los tiempos donde se tomaban muestras para el análisis de pigmentos fotosintéticos. El protocolo experimental utilizado para el análisis de F_0 fue esencialmente el descrito por Genty *et al.* (1989) con algunas modificaciones. Éstas consistían fundamentalmente en la presencia de una luz rojo-lejano ($7 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en las medidas de F_0 para oxidar completamente el lado aceptor del PSII (Belkhdja *et al.* 1998a, Morales *et al.* 1998). La eficiencia potencial máxima del PSII en condiciones de oscuridad se calculó como F_V/F_M (Morales *et al.* 1991, Abadía *et al.* 1999), siendo $F_V = F_M - F_0$. El *quenching* no fotoquímico (NPQ) se calculó como $(F_M / F'_M) - 1$, de acuerdo con Bilger & Björkman (1990).

6.2.4. Análisis de pigmentos fotosintéticos

Los discos de las hojas donde se habían realizado las medidas de reflectancia espectral y fluorescencia de clorofila se extrajeron del nitrógeno líquido donde habían sido depositados y se envolvieron en papel de aluminio, almacenándose (todavía envueltos en papel de aluminio) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los pigmentos foliares se extrajeron posteriormente con acetona en presencia de ascorbato sódico como antioxidante, tal y como describen Abadía & Abadía (1993). Los extractos se filtraron a través de un filtro hidrófobo de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro y se analizaron mediante un método isocrático de HPLC (Larbi *et al.* 2004). Todos los reactivos químicos utilizados fueron de calidad HPLC.

6.3. Resultados

6.3.1. Predawn

En la Figura 6.4 se observa la evolución del PRI medido a 505 y a 531 nm en hojas de *Q. coccifera* cogidas antes del amanecer y expuestas a 3 min de luz saturante (parte izquierda de la figura) y, posteriormente, a 3 min de luz de relajación (parte derecha de la figura). La señal a 531 nm presentaba una respuesta bimodal, tanto en la saturación como en la relajación, con una primera fase de 0 a 90 s y una segunda fase de 90 a 180 s, aproximadamente. Esta respuesta bimodal también se observa en la señal a 505 nm, aunque de forma más atenuada que a 531 nm. Hay que resaltar el brusco descenso que se produce en la señal a 505 nm instantes después de comenzar la exposición a la luz saturante, no llegando a recuperarse los valores iniciales incluso después de 3 min de relajación. Sin embargo, el descenso a 531 nm durante los primeros instantes es más atenuado, aunque tampoco se llegan a recuperar los valores iniciales tras 3 min de relajación.

En la Figura 6.5 se observa la evolución del *quenching* no fotoquímico (NPQ) en hojas de *Q. coccifera* expuestas a 3 min de luz saturante (parte izquierda de la figura) y, posteriormente, a 3 min de luz de relajación (parte derecha de la figura). Como era de esperar, durante la saturación se apreció una respuesta de tipo sigmoideal, con un incremento constante del NPQ hasta aproximadamente los 120 s, momento en el que se produce la saturación del NPQ en relación con el estrés

lumínico. Sin embargo, durante los 3 min de relajación se observó una respuesta en dos fases, con un descenso rápido del NPQ al principio seguido por un descenso muy atenuado después. Hay que señalar que al cabo de los 3 min de relajación el NPQ se situó aproximadamente en 0,80, no llegando a recuperarse, por lo tanto, los valores de NPQ anteriores al comienzo del experimento.

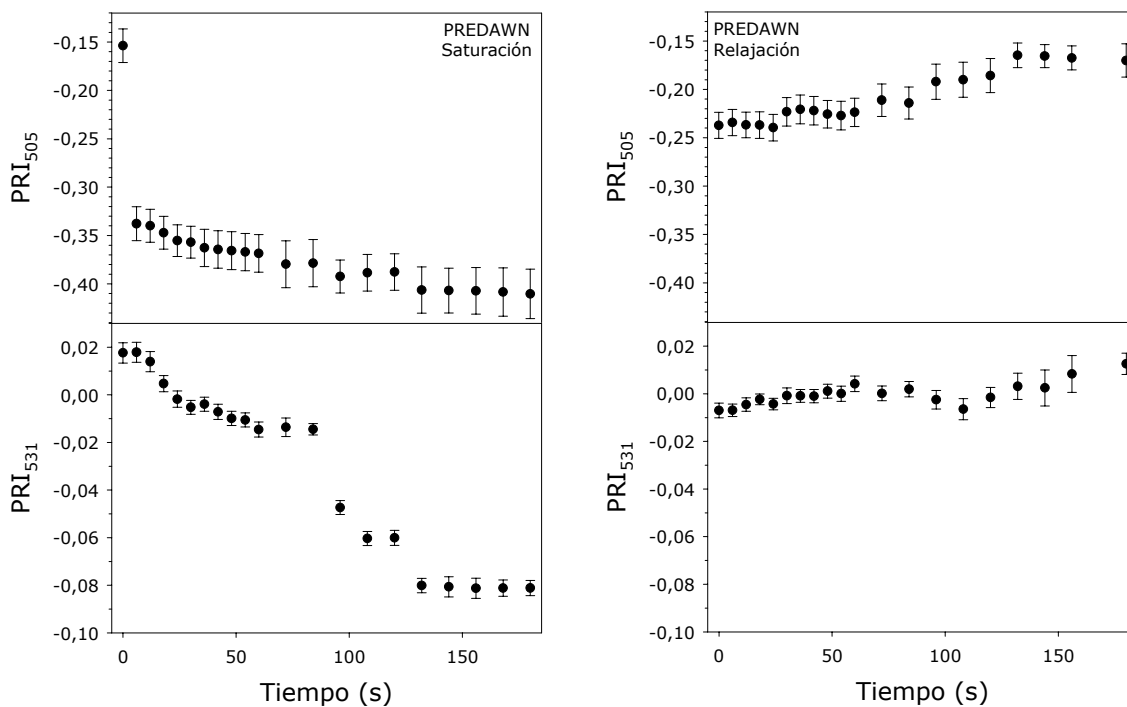


Figura 6.4. Evolución del PRI a 505 y a 531 nm en hojas de *Q. coccifera* cogidas antes del amanecer expuestas a condiciones de luz saturante durante 3 min (saturación) y posteriormente a 3 min de luz tenue (relajación). Las barras de error indican el error estándar del valor medio.

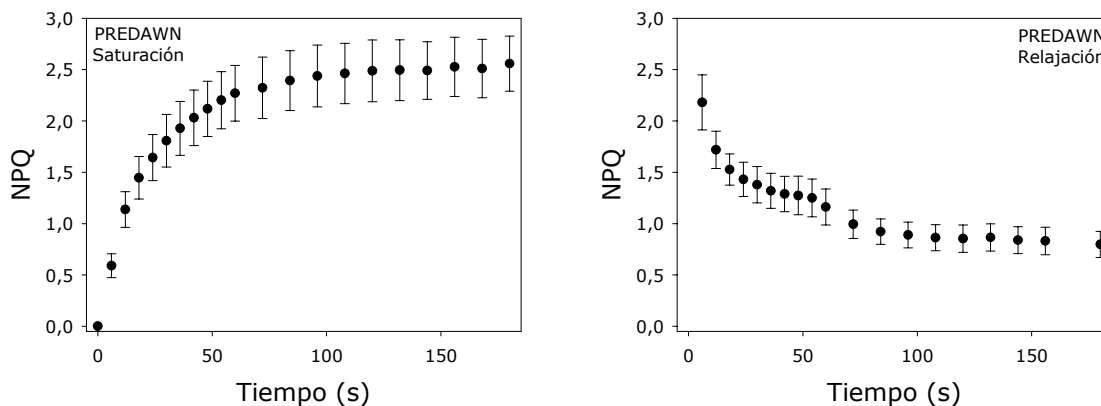


Figura 6.5. Evolución del *quenching* no fotoquímico (NPQ) en hojas de *Q. coccifera* cogidas antes del amanecer expuestas a condiciones de luz saturante durante 3 min (saturación) y posteriormente a 3 min de luz tenue (relajación). Las barras de error indican el error estándar del valor medio.

En la Figura 6.6 se observa la evolución del estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas $[(A+Z)/(V+A+Z)]$ en hojas de *Q. coccifera* expuestas a 3 min de luz saturante (parte izquierda de la figura) y, posteriormente, a 3 min de luz de relajación (parte derecha de la figura). En la saturación se produjo un aumento de $(A+Z)/(V+A+Z)$ desde 0,1 hasta casi 0,8 al final de los 3 min. En este caso parece que hubo un suave incremento hasta los 90 s seguido por un brusco incremento desde los 90 a los 180 s, momento en el que casi todo el conjunto de pigmentos del ciclo de las xantofilas estaba en su forma de-epoxidada. En el momento que desaparece la luz saturante, la luz de relajación promovió un inmediato descenso de $(A+Z)/(V+A+Z)$ hasta valores próximos 0,6, llegando de manera gradual a valores próximos a 0,4 al final de los 3 min de relajación. Al igual que ocurría con el NPQ, estos valores de $(A+Z)/(V+A+Z)$ al final del experimento eran superiores a los propios de hojas de *Q. coccifera* en condiciones control y en ausencia de cualquier estímulo lumínico.

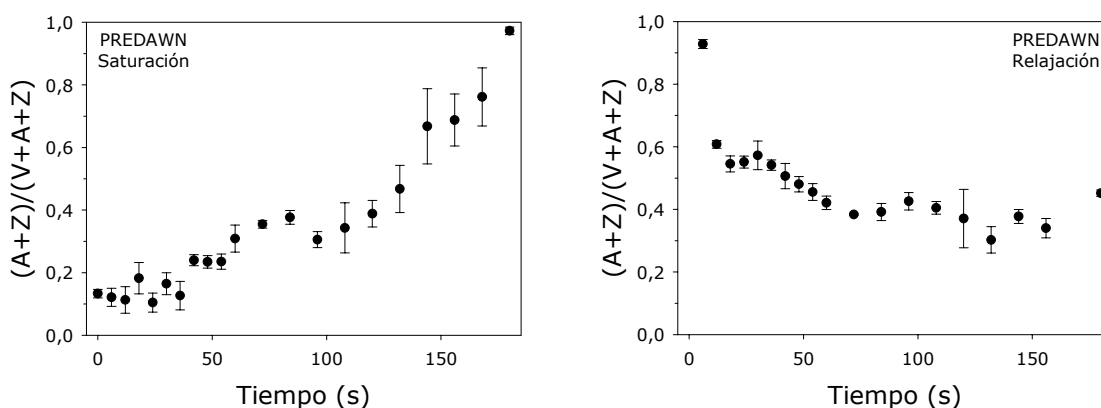


Figura 6.6. Evolución del grado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas $[(A+Z)/(V+A+Z)]$ en hojas de *Q. coccifera* cogidas antes del amanecer expuestas a condiciones de luz saturante durante 3 min (saturación) y posteriormente a 3 min de luz tenue (relajación). Las barras de error indican el error estándar del valor medio.

En la Figura 6.7 se observa la evolución de las relaciones entre la anteraxantina (A) y la zeaxantina (Z) respecto a la cantidad total de pigmentos del ciclo VAZ (A/VAZ y Z/VAZ) en hojas de *Q. coccifera* expuestas a 3 min de luz saturante (parte izquierda de la figura) y, posteriormente, a 3 min de luz de relajación (parte derecha de la figura). La relación A/VAZ se incrementaba conforme aumentaba el

tiempo de exposición a la luz saturante desde 0,05 hasta 0,15 a los 90-100 s aproximadamente, para descender posteriormente hasta aproximadamente 0,08 al cabo de los 3 min. Durante los 3 min de relajación este parámetro iba aumentando progresivamente hasta el final del experimento. Por otro lado, la relación Z/VAZ iba aumentando con la exposición a la luz de saturación, con una respuesta bimodal similar a la encontrada en la señal de reflectancia. Durante la relajación se produce un descenso gradual, también bimodal, de este parámetro aunque sin llegar a recuperar los valores control del principio del experimento.

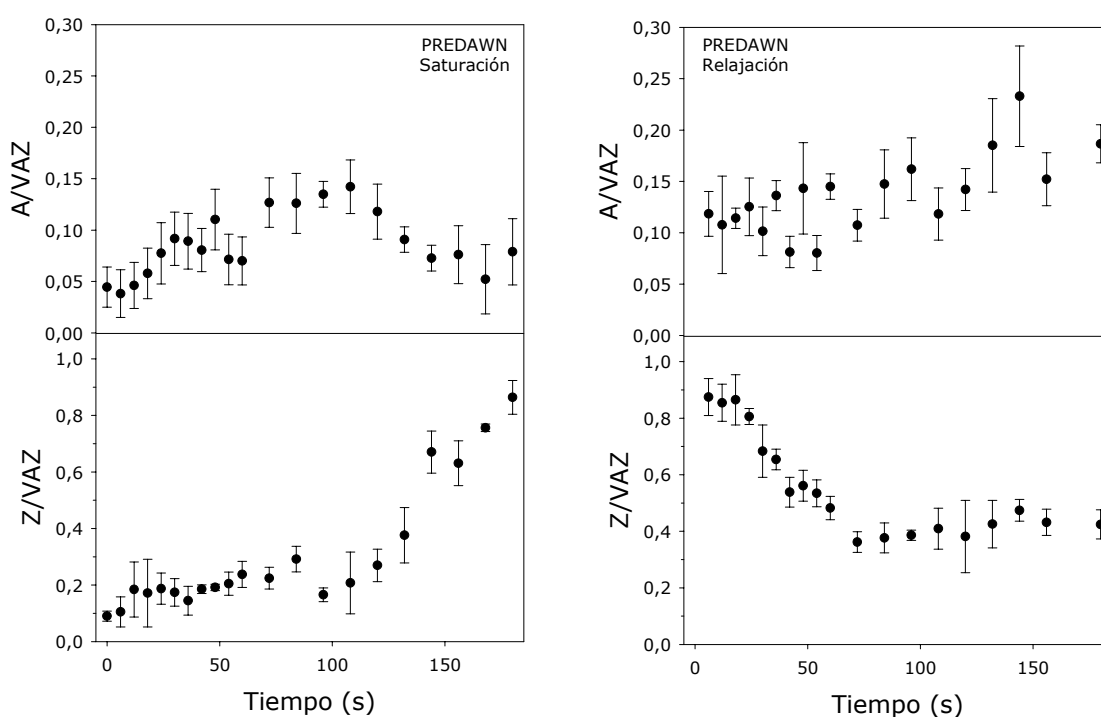


Figura 6.7. Evolución de la concentración de anteraxantina (A) y zeaxantina (Z) respecto a la cantidad total de pigmentos del ciclo VAZ (A/VAZ y Z/VAZ) en hojas de *Q. coccifera* cogidas antes del amanecer expuestas a condiciones de luz saturante durante 3 min (saturación) y posteriormente a 3 min de luz tenue (relajación). Las barras de error indican el error estándar del valor medio.

6.3.2. Mediodía

En la Figura 6.8 se observa la evolución del PRI medido a 505 y a 531 nm en hojas de *Q. coccifera* cogidas al mediodía y expuestas a 3 min de luz saturante (parte izquierda de la figura) y, posteriormente, a 3 min de luz de relajación (parte derecha de

la figura). En este caso desaparece la respuesta bimodal tanto a 505 como a 531 nm, siendo el descenso observado menos acentuado (excepto en la señal a 505 nm durante los primeros instantes) que en hojas cogidas antes del amanecer (Figura 6.4). Además, la recuperación de la señal durante los 3 min de relajación es prácticamente despreciable (excepto el brusco incremento a 505 nm en los primeros instantes de la relajación).

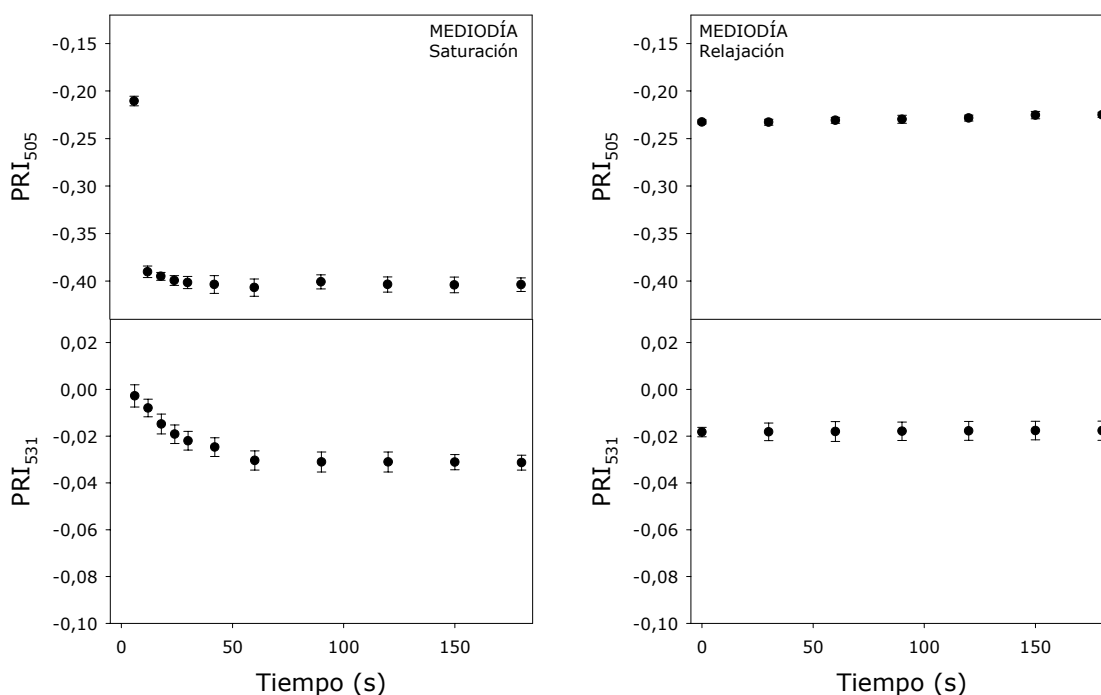


Figura 6.8. Evolución del PRI a 505 y a 531 nm en hojas de *Q. coccifera* cogidas al mediodía (hora solar) expuestas a condiciones de luz saturante durante 3 min (saturación) y posteriormente a 3 min de luz tenue (relajación). Las barras de error indican el error estándar del valor medio.

En la Figura 6.9 se observa la evolución del *quenching* no fotoquímico (NPQ) en hojas de *Quercus coccifera* expuestas a 3 min de luz saturante (parte izquierda de la figura) y, posteriormente, a 3 min de luz de relajación (parte derecha de la figura). El hecho de que las hojas cogidas al mediodía partiesen de unos valores de NPQ bastante altos fue debido a la exposición previa de estas hojas a la radiación lumínica. De esta manera, los valores obtenidos al final de los 3 min de saturación eran prácticamente los mismos que al principio. Además, los valores de NPQ tras 3 min de relajación eran también prácticamente iguales que al principio de la misma.

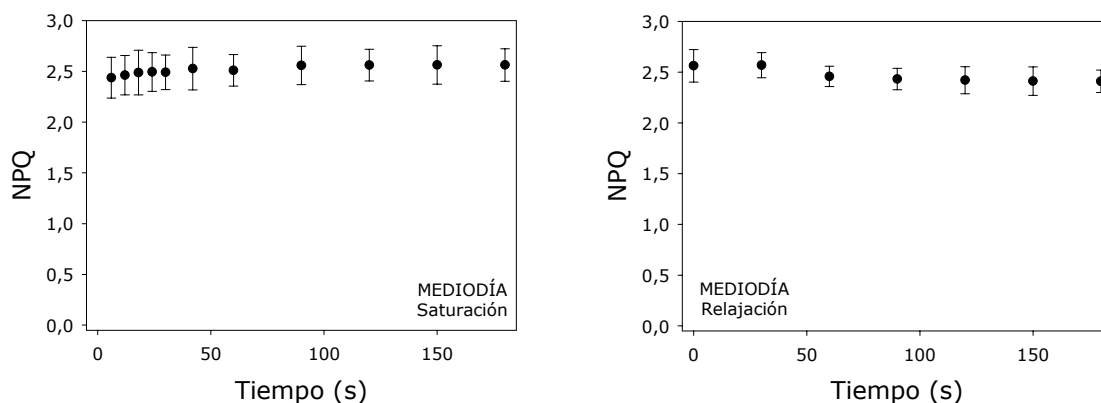


Figura 6.9. Evolución del *quenching* no fotoquímico (NPQ) en hojas de *Q. coccifera* cogidas al mediodía (hora solar) expuestas a condiciones de luz saturante durante 3 min (saturación) y posteriormente a 3 min de luz tenue (relajación). Las barras de error indican el error estándar del valor medio.

En la Figura 6.10 se observa la evolución del estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas $[(A+Z)/(V+A+Z)]$ en hojas de *Q. coccifera* cogidas al mediodía y expuestas a 3 min de luz saturante (parte izquierda de la figura) y, posteriormente, a 3 min de luz de relajación (parte derecha de la figura). Al igual que pasa con el NPQ, los valores de partida de $(A+Z)/(V+A+Z)$ eran altos (alrededor de 0,5) lo que hace que el incremento a lo largo de la saturación fuese pequeño. Además, durante la relajación los valores de este parámetro apenas cambiaron, permaneciendo cercanos a 0,6 al final del experimento.

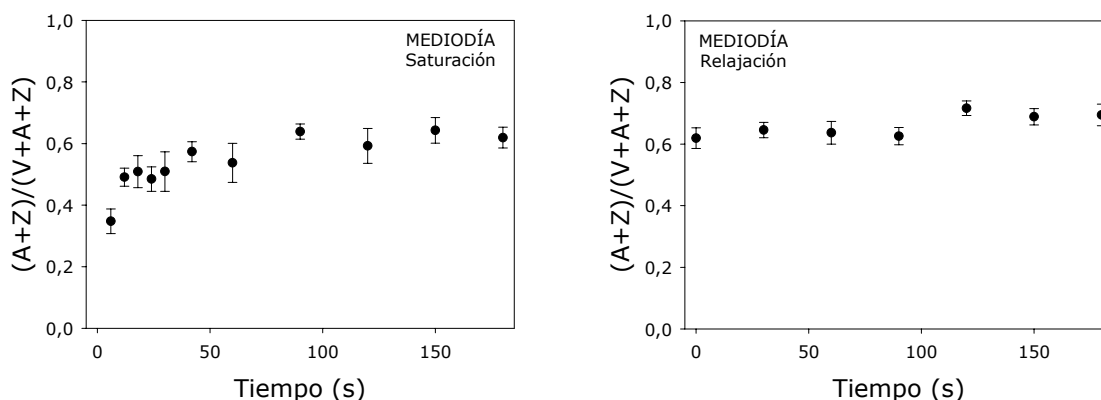


Figura 6.10. Evolución del grado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas $[(A+Z)/(V+A+Z)]$ en hojas de *Q. coccifera* cogidas al mediodía (hora solar) expuestas a condiciones de luz saturante durante 3 min (saturación) y posteriormente a 3 min de luz tenue (relajación). Las barras de error indican el error estándar del valor medio.

En la Figura 6.11 se observa la evolución de las relaciones entre la anteraxantina (A) y la zeaxantina (Z) respecto a la cantidad total de pigmentos del ciclo VAZ (A/VAZ y Z/VAZ) en hojas de *Q. coccifera* cogidas al mediodía y expuestas a 3 min de luz saturante (parte izquierda de la figura) y, posteriormente, a 3 min de luz de relajación (parte derecha de la figura). En cuanto a la saturación, tanto A/VAZ como Z/VAZ seguían un comportamiento similar al descrito para hojas cogidas antes del amanecer, pero de una manera mucho más atenuada. En cuanto a la relajación, no se apreciaron cambios significativos en ninguno de los dos parámetros respecto de los valores obtenidos al final de los 3 min de saturación.

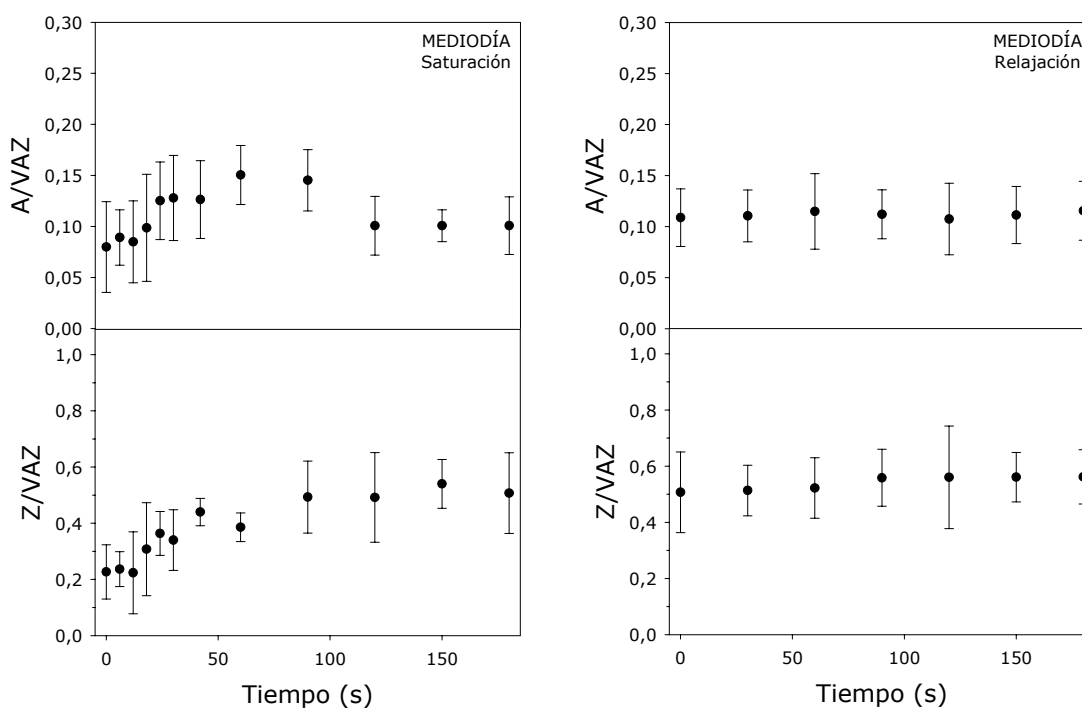


Figura 6.11. Evolución de la concentración de anteraxantina (A) y zeaxantina (Z) respecto a la cantidad total de pigmentos del ciclo VAZ (A/VAZ y Z/VAZ) en hojas de *Q. coccifera* cogidas al mediodía (hora solar) expuestas a condiciones de luz saturante durante 3 min (saturación) y posteriormente a 3 min. de luz tenue (relajación). Las barras de error indican el error estándar del valor medio.

6.4. Discusión

En este trabajo se ha realizado un análisis detallado en el tiempo de la cinética de diversas variables fisiológicas durante cambios intensos y repentinos en la

intensidad lumínica (luz tenue seguida de luz saturante, y seguida de nuevo de luz tenue). Concretamente, se ha profundizado en el estudio de los cambios en la reflectancia en la parte verde del espectro, la fluorescencia de clorofila y la composición de los pigmentos del ciclo de las xantofilas. Este estudio se realizó en hojas de *Quercus coccifera* en dos situaciones concretas: en ausencia de cualquier estímulo lumínico previo (plantas cogidas antes del amanecer y mantenidas en la oscuridad hasta que se realizaron las medidas) y bajo una estimulación lumínica propia del verano mediterráneo (plantas cogidas al mediodía y mantenidas a la luz hasta que se realizaron las medidas). Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que los cambios en la reflectancia en la parte verde del espectro (a 505 y a 531 nm) debidos a un incremento repentino en la radiación fotosintéticamente activa están relacionados con la generación de un ΔpH trans-tilacoidal (deducido a partir de los cambios a 531 nm y en NPQ) y con un aumento del grado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas $[(A+Z)/(V+A+Z)]$ (medido por HPLC y deducido a partir de los cambios a 505 nm), tal y como ya se había descrito en anteriores trabajos (Gamon *et al.* 1997, Gamon & Surfus 1999, Peguero-Pina *et al.* 2008 y las referencias incluidas en el mismo).

Sin embargo, hay que resaltar la existencia de una respuesta diferencial de estas variables en relación con un incremento repentino en la intensidad lumínica. Estas diferencias se observan con más claridad en la situación donde las hojas parten en ausencia de cualquier estímulo lumínico previo ("predawn"). Mientras que el aumento del NPQ sigue una cinética de saturación con un máximo a los 90-100 s de exposición a la luz saturante (Figura 6.5), el resto de los parámetros medidos sigue cambiando pasado ese tiempo de exposición (Figuras 6.4, 6.6). De este hecho se puede deducir que existe un primer aumento significativo, pero menor, del $(A+Z)/(V+A+Z)$ asociado al máximo aumento del NPQ y a la generación parcial de un ΔpH trans-tilacoidal, seguido de un aumento mucho mayor del $(A+Z)/(V+A+Z)$ paralelo a la generación completa de este gradiente y que no lleva asociados incrementos del NPQ. Por lo tanto, la primera consecuencia que se deriva de este hecho es que el NPQ es una variable experimental que no absorbe todos los cambios fisiológicos experimentados por el PSII debidos a un cambio brusco en las condiciones lumínicas.

Esta respuesta bimodal podría estar relacionada con las interconversiones dentro del ciclo de las xantofilas, como se observa en las Figuras 6.6 y 6.7. De hecho, la separación entre las dos fases de cambio en la reflectancia y en $(A+Z)/(V+A+Z)$ y la

saturación del NPQ se producen al mismo tiempo que se produce un máximo en la concentración de A/VAZ (Figura 6.7, unos 90-100 s. de exposición a luz saturante). Además, a partir de este momento se empieza a producir un fuerte incremento de Z/VAZ hasta alcanzar valores de 0,8-0,9, variable que hasta entonces había permanecido prácticamente inalterada (aumenta desde 0,1 hasta 0,2; Figura 6.7). Por lo tanto, en *Q. coccifera* parece que existen dos fases en la de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas en respuesta a aumentos repentinos de la intensidad lumínica: una primera fase donde se produce mayoritariamente la de-epoxidación de violaxantina (V) a anteraxantina (A) (con poca producción de zeaxantina (Z)) y una segunda fase donde se produce la de-epoxidación de la V restante y la A a Z (con escasa producción de A). Es precisamente al final de la primera fase cuando se alcanzan los niveles más altos de NPQ (Figura 6.5). Diferentes estudios (p.ej. Morales *et al.* 2000) han relacionado diversos cambios en la absorbancia en la parte verde del espectro con cambios en la concentración de V, A y Z. Es esperable que estos cambios en absorbancia también produzcan cambios en la reflectancia a estas longitudes de onda, tal y como se observa en la Figura 6.4.

La formación de Z está relacionada con la disipación térmica del exceso de energía lumínica (Demmig-Adams *et al.* 1989). La generación de un ΔpH trans-tilacoidal inducido por un aumento brusco de la PPFD promueve un cambio conformacional en los complejos menores de la antena del PSII. Algunos autores proponen que este cambio conformacional posibilita la unión de la Z a estos complejos menores, produciéndose un aumento en la disipación de la energía (Morosinotto *et al.* 2002). Sin embargo, Ruban *et al.* (2007) afirman que la formación inicial del NPQ en *Arabidopsis thaliana* responde a un cambio conformacional en los principales complejos captadores de luz del PSII (LHCII), inducido por la formación de un ΔpH dependiente de luz. Este cambio conformacional tendría, como consecuencia, un aumento de la transferencia de energía sobrante al carotenoide luteína en su estado excitado (denominado luteína 1) y, por lo tanto, una disipación de energía a través de esta molécula. En este estudio no se observan cambios significativos en la concentración de luteína (datos no mostrados), lo que no excluye que la disipación térmica ocurra mediada por la luteína de los LHCII. Sin embargo, hay que hacer notar aquí que los máximos niveles de NPQ se obtienen a valores relativamente bajos de $(A+Z)/(V+A+Z)$ en *Q. coccifera* en respuesta a un exceso de luz, lo que podría sugerir

que la disipación térmica se localice en los complejos menores de la antena del PSII los cuales albergarían unas pocas moléculas de-epoxidadas del ciclo de las xantofilas.

Hasta ahora nos hemos referido a la situación en la que las hojas partían en ausencia de cualquier estímulo lumínico previo. Cuando el experimento se realizó con hojas cogidas al mediodía (hora solar), la respuesta de las distintas variables estudiadas indicaba la existencia de un ΔpH trans-tilacoidal previo debido a la exposición de las hojas a la luz a lo largo de toda la mañana, ya que las variaciones encontradas a lo largo de la saturación y de la relajación eran muchísimo menores que en la situación de “predawn”. Esta ausencia de respuesta frente al estímulo lumínico alcanza su máxima expresión en situaciones de estrés hídrico severo (a potenciales hídricos de -6 MPa, aproximadamente), donde los cambios de reflectancia en el verde, de fluorescencia de clorofila y de los pigmentos del ciclo de las xantofilas son despreciables (datos no mostrados).

6.5. Conclusiones

En este capítulo se ha profundizado en el conocimiento del significado fisiológico de los cambios en la reflectancia en la parte verde del espectro, y su relación con el NPQ y los pigmentos del ciclo de las xantofilas. El uso de índices reflectométricos como indicadores de estrés hace que la comprensión del significado de la señal obtenida sea fundamental para una óptima interpretación posterior de los resultados obtenidos.

La respuesta diferencial obtenida, debida al diferente estado de partida de la hoja en cuanto al grado de estrés acumulado (lumínico y/o hídrico), hace de la reflectancia una potente herramienta en el estudio del estado fisiológico de la vegetación. Además, la reflectancia es una variable que puede ser monitorizada de un modo pasivo y a distancia, lo puede facilitar su empleo como herramienta de diagnóstico del estado de vigor de masas forestales mediante teledetección.

CAPÍTULO 7

Análisis detallado de la eficiencia potencial máxima del PSII a través de las hojas de *Quercus coccifera*: existencia de un gradiente vertical con bajas eficiencias en la parte más interna del mesófilo

7.1. Introducción.....	140
7.2. Material y métodos.....	143
7.2.1. <i>Material vegetal y condiciones experimentales</i>	143
7.2.2. <i>Medidas de fluorescencia de clorofila con el PAM-2000 y con el FMSII</i>	144
7.2.3. <i>Medidas de fluorescencia de clorofila con el Xe-PAM</i>	145
7.2.4. <i>Medidas de fluorescencia de clorofila con un fluorímetro no comercial a partir del efecto Kautsky</i>	145
7.2.5. <i>Medidas de asimilación neta de CO₂</i>	146
7.2.6. <i>Medidas de eficiencia real (Φ_{PSII}) e intrínseca (Φ_{exc}) del PSII, quenching fotoquímico (qP) y no fotoquímico (NPQ)</i>	146
7.2.7. <i>Análisis estadístico</i>	147
7.3. Resultados.....	148
7.4. Discusión.....	153
7.5. Conclusiones.....	156

7.1. Introducción

La fluorescencia de clorofila está considerada como un indicador intrínseco, preciso y no destructivo de la eficiencia fotosintética. Los factores que controlan la emisión de la fluorescencia de clorofila y los orígenes moleculares de la fluorescencia de clorofila variable han sido revisados extensa y periódicamente (Papageorgiou 1975, Briantais *et al.* 1986, Renger & Schreiber 1986, Bolhar-Nordenkamp *et al.* 1989, Krause & Weis 1991, Schreiber & Bilger 1993, Dau 1994, Schreiber *et al.* 1994, Govindjee 1995, Joshi & Mohanty 1995). Uno de los usos más clásicos de las medidas de fluorescencia de clorofila ha sido la investigación de la influencia directa e indirecta de las variables ambientales en la fotosíntesis de las plantas.

Un hecho que frecuentemente se pasa por alto en los estudios que se ocupan de los efectos de diversos estreses en los parámetros fotosintéticos es la existencia de importantes gradientes dentro de la hoja. Cuando la luz entra y se desplaza por el interior de la hoja, tanto la absorción como la dispersión de la misma crean un gradiente lumínico. Tanto las propiedades ópticas foliares como las características del microambiente lumínico interno han sido previamente discutidas por diversos autores (Fukshansky 1981, Osborne & Raven 1986, Vogelmann 1986, 1989, Sun *et al.* 1996, Nishio 2000). Dependiendo de las propiedades ópticas foliares y de la calidad de la luz (es decir, de las longitudes de onda específicas que entran en la hoja), los gradientes lumínicos pueden ser relativamente intensos o graduales, exponenciales o lineales.

Las hojas gruesas y aquéllas compuestas en su mayor parte por mesófilo esponjoso tienen numerosos espacios intercelulares que favorecen la dispersión lumínica, promoviendo el atrapamiento de la luz. La escasa absorción lumínica a 730 nm (luz rojo-lejano) crea un gradiente lumínico aproximadamente lineal, mientras que la luz azul (450 nm) decrece exponencialmente a medida que nos internamos en la hoja (Seyfried & Fukshansky 1983, Vogelmann *et al.* 1989). Por ejemplo, Vogelmann *et al.* (1989) y Cui *et al.* (1991) expusieron que la luz azul se atenúa en los primeros 50-100 μm del mesófilo de la hoja (a saber, una capa de células epidérmicas y media capa (como máximo una) de células en empalizada). La luz verde se absorbe débilmente, en consonancia con el espectro de absorción de los cloroplastos, penetrando en profundidad dentro del mesófilo (Evans 1999). La luz roja también crea gradientes intensos, aunque los datos obtenidos indican que los gradientes de la luz

roja están entre los creados por la luz azul y verde (Evans 1999, Vogelmann & Han 2000, Evans & Vogelmann 2006).

Por lo tanto, en hojas irradiadas con luz blanca (solar o artificial), la luz absorbida se reduce a luz roja y azul, y la luz dispersada hacia delante y detrás está formada principalmente por luz verde y rojo lejano. Así, la luz verde y rojo lejano, es decir, las longitudes de onda de baja absorción, dominan el ambiente lumínico dentro de la hoja, tanto en las capas del mesófilo esponjoso como en el mesófilo en empalizada. Estos resultados indican que la luz azul y la luz roja proporcionan energía para la fotosíntesis en las capas celulares cercanas a la parte superior de la hoja (superficie adaxial), mientras que la luz verde es una fuente de energía particularmente importante a medida que profundizamos dentro de la hoja (Sun *et al.* 1998, Nishio 2000). A este respecto, hay que recordar que aunque el coeficiente de absorptividad molar de la clorofila es pequeño en la parte verde del espectro, la absorción de la hoja en estas longitudes de onda no es despreciable (Morales *et al.* 1991). Esto se debe a la alta concentración foliar de clorofila y al importante efecto de la múltiple dispersión en las regiones espectrales de débil absorción (ver Louis *et al.* 2006 y las referencias incluidas).

La composición de las células a lo largo del gradiente también es diferente. En espinaca, Terashima & Inoue (1985a, 1985b) y Terashima *et al.* (1986) informaron sobre la existencia de una transición gradual de los cloroplastos de luz a los de sombra, tanto en la morfología del cloroplasto como en los componentes de la cadena de transporte electrónico, desde la parte superior a la parte inferior de la hoja. En las secciones de hoja, la clorofila alcanzaba su concentración máxima a $75-105 \pm 15 \mu\text{m}$ dentro de la hoja (Vogelmann & Martin 1993). Nishio *et al.* (1993) describieron un descenso gradual de la relación clorofila a / clorofila b a medida que se profundizaba en la hoja, debido a que la parte inferior está más sombreada que la superior (Outlaw 1987, Terashima 1989, Cui *et al.* 1991). Además, Louis *et al.* (2006) describieron diferencias en el espectro de excitación de la clorofila, cuando comparaban los lados abaxial y adaxial de hojas de judía, que eran adscritas a unas mayores concentraciones de carotenoides o a una mayor conversión de violaxantina a zeaxantina en el lado adaxial. Estas podrían ser razones por las que la superficie adaxial de la hoja se considera generalmente más tolerante que la abaxial en relación a la alta luz (Evans *et al.* 1993, Sun *et al.* 1996).

Otro aspecto a tener en cuenta es que el CO_2 entra en la hoja a través de los estomas, localizados en la mayor parte de los casos en el lado abaxial (inferior) de la hoja, lo que crea un gradiente de CO_2 . Se ha sugerido que las células del mesófilo empalizada permiten una colocación vertical de los cloroplastos más óptima que podría responder a la concentración interna de CO_2 dentro de la hoja (Parkhurst 1986). Sin embargo, los espacios aéreos intercelulares y el ordenamiento cloroplástico minimizan potenciales gradientes internos de CO_2 (Evans & von Caemmerer 1996, Evans 1999). En cualquier caso, las tasas máximas de fijación de CO_2 se encuentran en la parte media de la hoja y la parte más importante de la fijación de CO_2 se da en la mitad inferior y no en el lado adaxial (donde la luz es máxima), siguiendo la distribución de la enzima Rubisco dentro de la hoja (Nishio *et al.* 1993). Estos datos indican que el gradiente lumínico está, de alguna manera, desconectado de la fijación de CO_2 (Nishio *et al.* 1993).

Esta heterogeneidad dentro de la hoja puede causar, al menos, dos problemas importantes que deben ser considerados. En primer lugar, algunas técnicas muy utilizadas en la investigación de la fotosíntesis, tales como el intercambio de gases o la composición de pigmentos fotosintéticos, ofrecen resultados integrados de todas las capas celulares dentro de la hoja. Los estudios de fluorescencia de clorofila, sin embargo, le dan una mayor importancia a los efectos del estrés en las capas de células superficiales, dado que los fluorímetros más comerciales usan luz roja o azul como luz de medida (fuente de excitación). Un segundo problema que surge de la heterogeneidad foliar podría estar relacionado con el estudio de tilacoides aislados. Por ejemplo, algunas de las evidencias de daño en el PSII inducido por estrés (ver Morales *et al.* 2006) provienen de estudios llevados a cabo con tilacoides aislados. Los tilacoides aislados, sin embargo, pueden ser o no ser representativos de las células originarias usadas para realizar el aislamiento de los tilacoides (Quílez *et al.* 1992). Por estas razones, los procedimientos metodológicos deben ser establecidos para evaluar el comportamiento fotosintético a lo largo del gradiente foliar, en vez de utilizar técnicas que consideran la hoja como una única y gran capa de células o de experimentos con tilacoides aislados. Estos procedimientos metodológicos fueron iniciados con el trabajo pionero de Schreiber *et al.* (1996), en el que se combinaba la técnica de la microsonda de fibra óptica con la de la modulación de la amplitud del pulso.

El principal objetivo de este trabajo ha sido, por lo tanto, investigar la eficiencia fotosintética de las diferentes capas de células de hojas de *Quercus coccifera* L., utilizando la eficiencia potencial máxima del PSII (F_V/F_M) como el parámetro medido de fluorescencia de clorofila. Se han empleado diversos fluorímetros comerciales y no comerciales con el ánimo de utilizar longitudes de onda que penetren más o menos profundamente dentro de la hoja, con medidas en los lados adaxial y abaxial de la hoja. Se eligió *Q. coccifera* como especie de estudio porque posee hojas heterobáricas, que se caracterizan por tener regiones transparentes en su lámina debido a la presencia de grupos de células que conectan los haces vasculares con la superficie epidérmica (BSE). En las hojas de *Q. coccifera*, el área ocupada por estas BSE representa aproximadamente el 42-45 % del total del área foliar (Karabourniotis *et al.* 2000). Karabourniotis *et al.* (2000) indicaron que las BSE incrementaban el microambiente lumínico en las capas internas del mesófilo con altos niveles de radiación fotosintéticamente activa. Estos mismos autores sugieren que este hecho podría afectar al comportamiento fotosintético de tales hojas, proporcionando ventajas adaptativas. En este trabajo se presentan evidencias de la existencia de un gradiente en la eficiencia potencial máxima del PSII (medida a través de la relación F_V/F_M) desde el lado adaxial (eficiencias máximas) hasta el lado abaxial (eficiencias mínimas) en hojas de brinzales de 1 año de edad de *Q. coccifera*, en condiciones control sin ningún tipo de estrés.

7.2. Material y métodos

7.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

Para la realización de este trabajo se utilizaron brinzales de 1 año de edad de *Q. coccifera*, todos ellos de la misma procedencia (Zaragoza, España). Las plantas se sembraron y crecieron en un invernadero de policarbonato alveolar de muy alta transparencia (superior al 90 % en el rango de radiación fotosintéticamente activa), lo que garantizó un flujo de 1300 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ al mediodía. Un sistema de enfriamiento termostatzado por evaporación forzada de agua garantizó un régimen térmico dentro de los límites normales en un verano medio en el clima mediterráneo del noreste peninsular. Las medidas se realizaron durante el verano, cuando las hojas estaban completamente desarrolladas.

7.2.2. Medidas de fluorescencia de clorofila con el PAM-2000 y con el FMS II

Los parámetros de fluorescencia de clorofila se midieron en un cuarto oscuro en 10 hojas no escindidas de *Q. coccifera* con un fluorímetro portátil con modulación en la amplitud del pulso modelo PAM-2000 (Heinz Walz, Effeltrich, Alemania). Las plantas se taparon con una tela negra durante 60 min para calcular la fluorescencia de clorofila mínima (F_0) y máxima (F_M). F_0 se midió encendiendo la luz modulada de medida a 0,6 kHz, con una PPFD por debajo de $0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la superficie de la hoja. F_M se midió a 20 kHz con un pulso de 1 s de $6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca sobre la superficie de la hoja.

Después de realizar estas medidas, las plantas fueron tapadas de nuevo con la tela negra durante 60 min para calcular F_0 y F_M con un fluorímetro portátil con modulación en la amplitud del pulso modelo FMS II (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, Reino Unido). F_0 se midió encendiendo la luz modulada de medida con una PPFD de $0,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la superficie de la hoja. F_M se midió con un pulso de 0,8 s de $6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca sobre la superficie de la hoja.

El protocolo experimental utilizado para el análisis de F_0 fue esencialmente el descrito por Genty *et al.* (1989) con algunas modificaciones. Éstas consistían fundamentalmente en la presencia de una luz rojo-lejano ($7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en las medidas de F_0 para oxidar completamente el lado aceptor del PSII (Belkhdja *et al.* 1998a, Morales *et al.* 1998). La eficiencia potencial máxima del PSII en condiciones de oscuridad se calculó como F_v/F_M (Morales *et al.* 1991, Abadía *et al.* 1999), siendo $F_v = F_M - F_0$.

La elección de estos dos modelos de fluorímetros comerciales para la comparación de los valores de F_v/F_M se basó en (i) las diferentes longitudes de onda de excitación que utilizan, (ii) en su disponibilidad y (iii) en el hecho de que son dos de los modelos comerciales más ampliamente utilizados en el mundo de la ecofisiología de plantas. Por este motivo, se consideró importante conocer las posibles fuentes de variación en las medidas obtenidas debido al empleo de aparatos con diferentes características técnicas.

7.2.3. Medidas de fluorescencia de clorofila con el Xe-PAM

El fluorímetro Xe-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, Alemania) posee la versatilidad de poder seleccionar diferentes rangos de longitudes de onda para la excitación de la fluorescencia de clorofila con modulación del pulso, a partir de una lámpara de descarga de xenón con la ayuda de filtros de paso de banda. Para realizar las medidas de fluorescencia de clorofila, el Xe-PAM aplica flashes de $1\mu\text{s}$ a una frecuencia lo suficientemente baja para medir F_0 (Schreiber *et al.* 1993, Kolb *et al.* 2004). Las medidas de fluorescencia de clorofila se hicieron en un cuarto oscuro después de que las plantas se taparan con una tela negra y se mantuvieran en oscuridad durante 60 min. Los datos se obtuvieron de 10 discos recién cortados de hoja (1 cm^2) que se fijaron con cinta de doble cara en un portamuestras de aluminio negro mate. Las muestras se orientaron con un ángulo de 45° respecto a la luz de excitación y al sensor de fluorescencia. La luz actínica empleada para la medida de F_M era proporcionada por una lámpara halógena. La eficiencia potencial máxima del PSII en condiciones de oscuridad se calculó como F_V/F_M (Morales *et al.* 1991, Abadía *et al.* 1999), siendo $F_V = F_M - F_0$.

En este trabajo, la luz de excitación fue filtrada con filtros de interferencia de paso de banda (Lambda Research Optics, Inc., California, Estados Unidos, anchura de banda de 10 nm) a 650 o 600 nm con el objetivo de emular, respectivamente, el PAM-2000 o el FMS II. La señal de fluorescencia resultante se detectó por encima de 690 nm (Bilger *et al.* 1997, Markstädter *et al.* 2001) utilizando tres filtros RG9 (Schott AG, Mainz, Alemania), o por encima de 665 nm (Barnes *et al.* 2000) utilizando tres filtros RG665 (Schott AG, Mainz, Alemania).

7.2.4. Medidas de fluorescencia de clorofila con un fluorímetro no comercial a partir del efecto Kautsky

Para medir la fluorescencia de clorofila utilizando la misma fuente de luz como luz de excitación y luz actínica, se realizaron medidas con un fluorímetro no comercial (Morales *et al.* 1990, 2002) en hojas escindidas, a temperatura ambiente y en un cuarto oscuro. Las plantas se taparon con una tela negra y se mantuvieron en oscuridad durante 60 min. Las curvas de inducción de fluorescencia se midieron

utilizando el dispositivo experimental descrito previamente por Morales *et al.* (1991). La luz de excitación se filtró con filtros de interferencia de paso de banda (Lambda Research Optics, Inc., California, Estados Unidos, ancho de banda de 10 nm) a varias longitudes de onda: 650, 600, 550 y 500 nm. La PPFD medida fue de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sobre la superficie de la hoja. La fluorescencia de clorofila fue monitorizada y registrada durante 2 s. La señal de fluorescencia fue detectada a 680 o 740 nm para maximizar, respectivamente, la contribución del PSII o del PSI (Agati *et al.* 2000) a la señal de la fluorescencia de clorofila. Para ello, se utilizó un filtro RG665 (Schott AG, Mainz, Alemania) acoplado con filtros interferenciales de paso de banda a 680 o 740 nm. (Schott AG, Mainz, Alemania). Las medidas se realizaron en las superficies adaxial y abaxial de hojas adaptadas a la oscuridad. Posteriormente fue calculada la ratio F_V/F_P , que proporciona una estimación de la eficiencia del PSII (Morales *et al.* 1991).

7.2.5. Medidas de asimilación neta de CO_2

Las medidas de asimilación neta de CO_2 (A) se realizaron al mediodía (hora solar) en hojas del año completamente desarrolladas de *Q. coccifera*, utilizando un sistema portátil de análisis de intercambio de gases (CIRAS-1, PP Systems, Reino Unido) con una concentración externa de CO_2 controlada ($C_a = 350$ ppm). Las medidas se hicieron en las superficies adaxial y abaxial de la hoja con luz solar (PPFD = $1875 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y con una fuente de luz blanca (KL 2500 LCD, Schott AG, Mainz, Alemania) filtrada con un filtro de corte a 665 nm (RG665, Schott AG, Mainz, Alemania; PPF = $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

7.2.6. Medidas de eficiencia real (Φ_{PSII}) e intrínseca (Φ_{exc}) del PSII, quenching fotoquímico (qP) y no fotoquímico (NPQ)

Todos estos parámetros, relativos a la fluorescencia de clorofila, se midieron al mediodía (hora solar) en hojas del año no escindidas completamente desarrolladas de *Q. coccifera*, utilizando un fluorímetro portátil con modulación en la amplitud del pulso modelo FMS II (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, Reino Unido). Las medidas se hicieron en las superficies adaxial y abaxial de la hoja con luz solar (PPFD = 1875

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y con una fuente de luz blanca (KL 2500 LCD, Schott AG, Mainz, Alemania) filtrada con un filtro de corte a 665 nm (RG665, Schott AG, Mainz, Alemania; PPFD = $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Las plantas se taparon con una tela negra, manteniéndose en la oscuridad durante 30 min, para estimar la fluorescencia de clorofila mínima (F_0) y máxima (F_M). F_0 se midió encendiendo la luz modulada de medida con una PPFD de $0,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la superficie de la hoja. F_M se midió con un pulso de 0,8 s de $6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca sobre la superficie de la hoja. Las plantas fueron destapadas y el valor de fluorescencia en el estado estacionario (F_S) se midió al mediodía con luz solar y con luz roja como luces actínicas. Posteriormente se aplicó un segundo pulso saturante de luz blanca para determinar la fluorescencia máxima en el estado adaptado a la luz (F'_M). Por último, las hojas se taparon de nuevo con una tela completamente negra con el objetivo de determinar la fluorescencia mínima después de la inducción (F'_0). El protocolo experimental utilizado para el análisis del *quenching* de la fluorescencia de clorofila fue, esencialmente, el descrito por Genty *et al.* (1989) con algunas modificaciones. Estos cambios estaban relacionados con las medidas de F_0 y F'_0 , las cuáles se midieron en presencia de una luz rojo-lejano ($7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) utilizada para oxidar completamente el lado aceptor del fotosistema II (PSII) (Belkhdja *et al.* 1998a, Morales *et al.* 1998). Las eficiencias real (Φ_{PSII}) e intrínseca ($\Phi_{\text{exc.}}$) del PSII se calcularon como $(F'_M - F_S) / F'_M$ y $(F'_M - F'_0) / F'_M$, respectivamente (Genty *et al.* 1989, Harbinson *et al.* 1989). El *quenching* fotoquímico (qP) se calculó como $(F'_M - F_S) / (F'_M - F'_0)$, de acuerdo con van Kooten & Snel (1990). El *quenching* no fotoquímico (NPQ) se calculó como $(F_M / F'_M) - 1$, de acuerdo con Bilger & Björkman (1990).

7.2.7. Análisis estadístico

Todos los valores que aparecen en las gráficas de este capítulo están expresados como valor medio \pm error estándar. Las comparaciones entre los valores medios se realizaron utilizando el test *t* de Student, excepto para los distintos valores obtenidos con las medidas del efecto Kautsky, para los que se utilizó el test de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls (SNK).

7.3. Resultados

Los valores de eficiencia potencial máxima del PSII (F_V/F_M) medidos en el lado adaxial de hojas de *Q. coccifera* obtenidos con el FMS II fueron mayores que los obtenidos con el PAM-2000 (Figura 7.1), siendo las diferencias estadísticamente significativas ($P=0,000$).

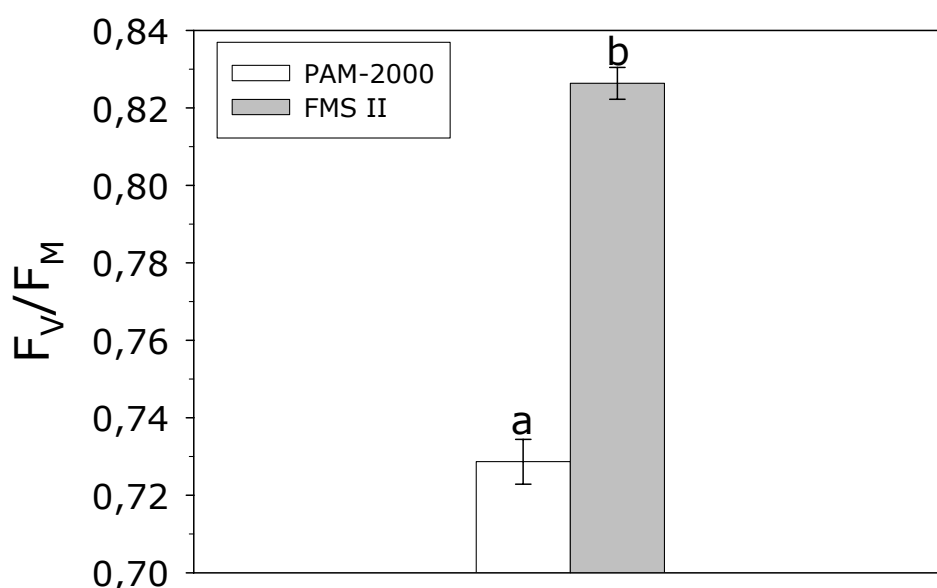


Figura 7.1. Eficiencia potencial máxima del PSII (F_V/F_M) medida con el PAM-2000 y con el FMS II en el lado adaxial de hojas de *Q. coccifera*. Las barras de error indican el error estándar del valor medio. Las diferencias significativas ($P \leq 0,05$) se indican mediante letras diferentes.

Estas diferencias, aunque se atenúan, seguían siendo estadísticamente significativas en las medidas realizadas con el Xe-PAM, cuando se emulan las condiciones de medida del PAM-2000 y del FMS-II (Figura 7.2), tanto para la detección por encima de 700 nm (Figura 7.2a, $P=0,003$) como por encima de 665 nm (Figura 7.2b, $P=0,000$). El mantenimiento de estas diferencias indica que no pueden ser adscritas a un artefacto causado solamente por el uso de dos fluorímetros comerciales distintos.

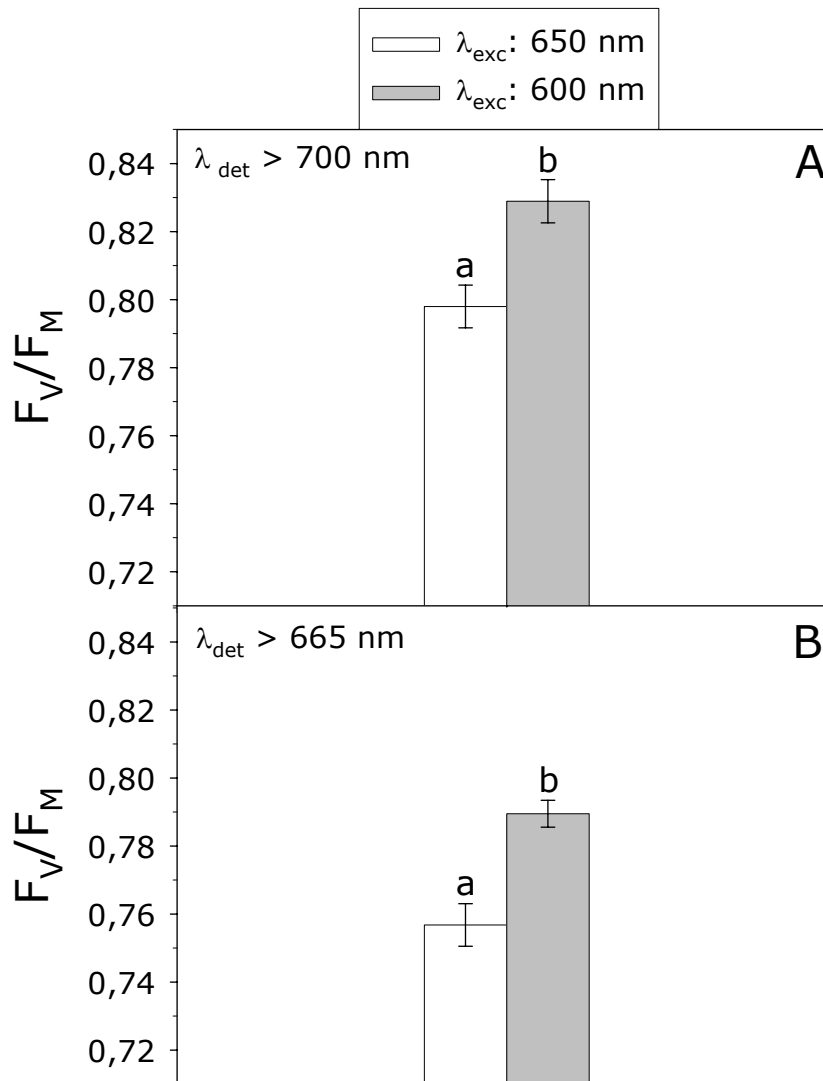


Figura 7.2. Eficiencia potencial máxima del PSII (F_V/F_M) en el lado adaxial de hojas de *Q. coccifera* medida con el Xe-PAM, emulando al PAM-2000 (excitación a 650 nm, barras blancas) y al FMS II (excitación a 600 nm, barras grises), con la detección **(A)** por encima de 700 nm y **(B)** por encima de 665 nm. Símbolos como en Figura 7.1.

La Figura 7.3 representa los valores de F_V/F_P en los lados adaxial y abaxial de hojas de *Q. coccifera*. Estas medidas se realizaron combinando diferentes longitudes de onda de excitación (650, 600, 550 y 500 nm) con la detección filtrada en 680 y 740 nm. Cuando se midió por el lado adaxial (haz) se observó un gradiente en cuanto a eficiencia fotoquímica (F_V/F_P), magnitud que disminuía a medida que la luz de excitación incidía sobre capas celulares que están situadas a mayor profundidad dentro del mesófilo (excitación a 550 y 500 nm). Estas diferencias eran

estadísticamente significativas ($P < 0,05$) tanto si la detección es a 680 como a 740 nm. Cuando se realizaron las medidas por el lado abaxial (envés) se observó una imagen muy distinta, obteniendo las mayores eficiencias con la longitud de onda que más penetra dentro del mesófilo (500 nm), sobre todo cuando la detección era a 680 nm. Esto indica que el estado de las capas de células más próximas al lado adaxial era mejor desde un punto de vista fotoquímico que las más próximas al lado abaxial. La poca claridad de los resultados obtenidos en el lado abaxial con la detección a 740 nm pudiera ser debida a la escasa señal de fluorescencia en estas longitudes de onda, hecho que puede ser una fuente importante de error.

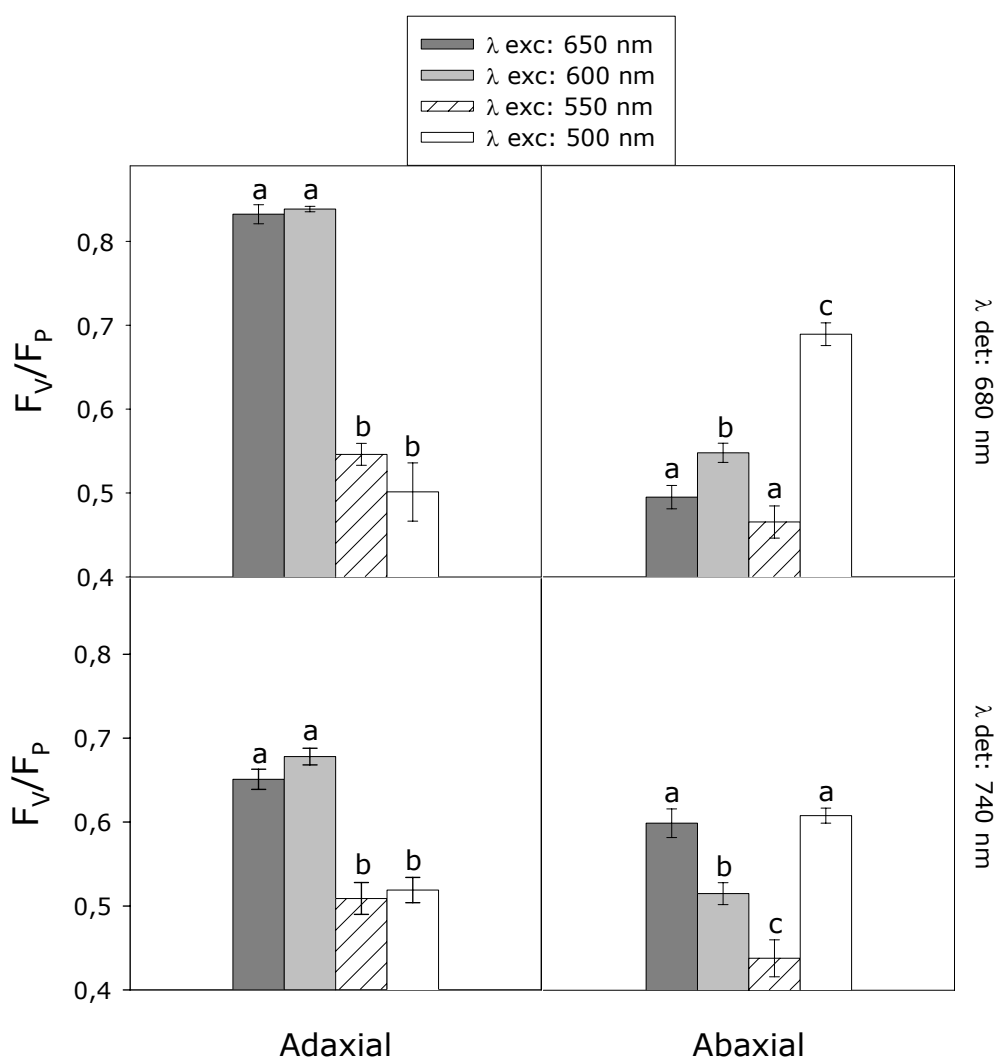


Figura 7.3. Eficiencia del PSII (F_V/F_P) en los lados adaxial y abaxial de hojas de *Q. coccifera* con la luz de excitación filtrada a diversas longitudes de onda (650, 600, 550 y 500 nm) y con la detección a 680 y 740 nm. Símbolos como en Figura 7.1.

En la Figura 7.4 se observan las tasas de asimilación neta de CO_2 (A) obtenidas con luz solar y con luz roja de baja penetración en los lados adaxial y abaxial de hojas de *Q. coccifera*. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los valores de A obtenidos con luz blanca y con luz roja, ni por el lado adaxial ($P=0,705$) ni por el lado abaxial ($P=0,136$), aunque los valores de asimilación neta de CO_2 , tomados en su conjunto, siempre eran mayores en el lado adaxial que en el abaxial ($P=0,002$).

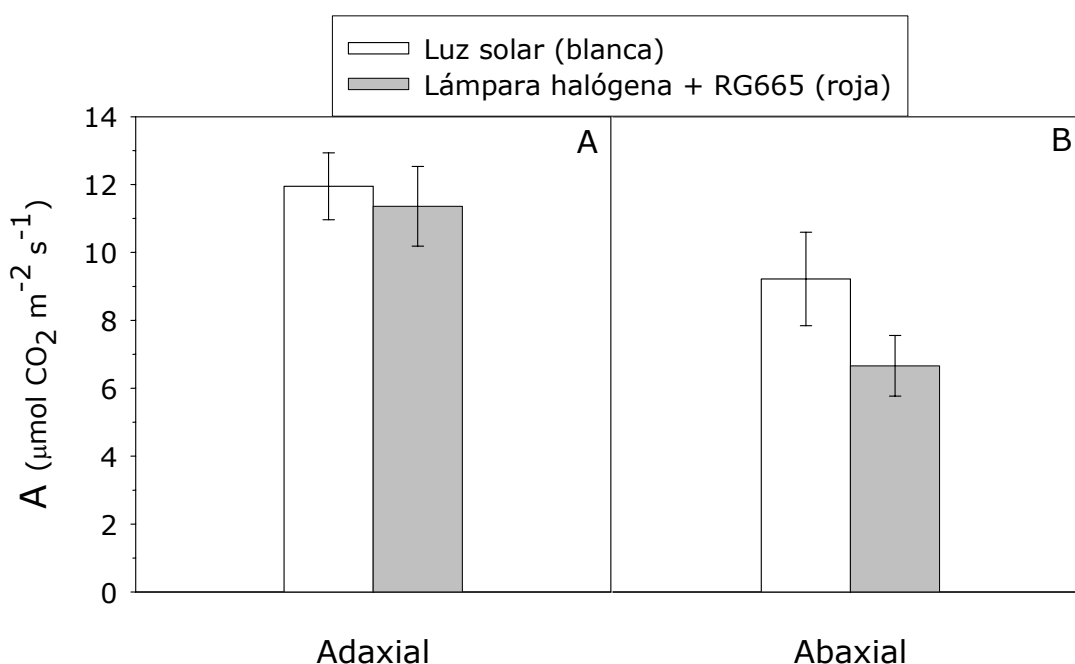


Figura 7.4. Asimilación neta de CO_2 (A) en los lados (A) adaxial y (B) abaxial de hojas de *Q. coccifera*, medida con luz solar y luz roja (lámpara halógena + RG665). Símbolos como en Figura 7.1.

En la Figura 7.5 se observan las eficiencias real (Φ_{PSII}) e intrínseca ($\Phi_{\text{exc.}}$), el *quenching* fotoquímico (qP) y el no fotoquímico (NPQ) en los lados adaxial y abaxial de hojas de *Q. coccifera*, medidos con luz blanca y luz roja. Las únicas diferencias estadísticamente significativas se encontraron en Φ_{PSII} y en qP, parámetros que eran siempre mayores con luz blanca que con luz roja, tanto por el lado adaxial ($P=0,004$ y $P=0,012$) como por el lado abaxial ($P=0,049$ y $P=0,037$). Además, los valores de Φ_{PSII} y de qP siempre eran más altos en el lado adaxial que en abaxial ($P=0,003$).

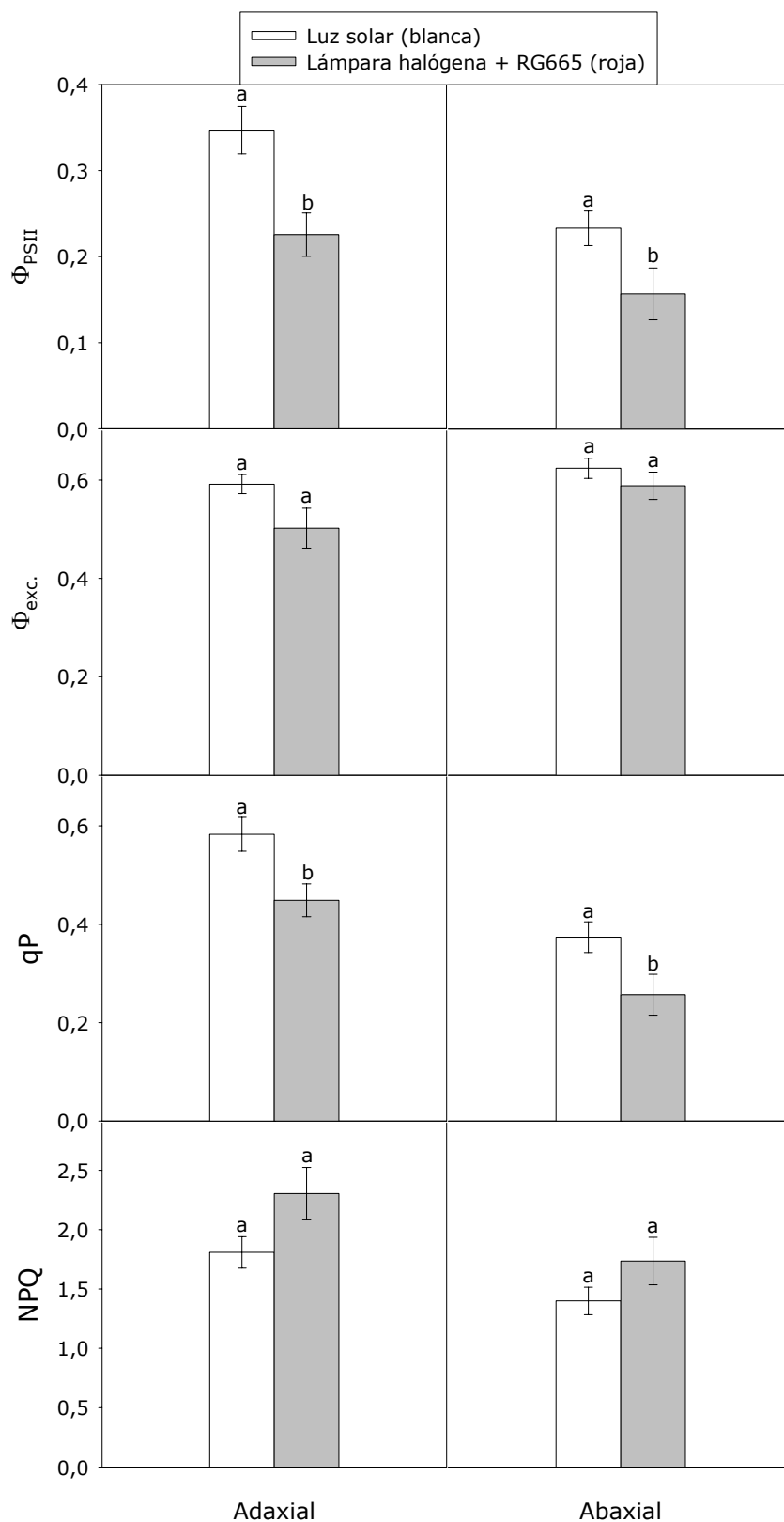


Figura 7.5. Eficiencias real (Φ_{PSII}) e intrínseca ($\Phi_{exc.}$), *quenching* fotoquímico (qP) y no fotoquímico (NPQ) en los lados adaxial y abaxial de hojas de *Q. coccifera*, medidos con luz solar y luz roja (lámpara halógena + RG665). Símbolos como en Figura 7.1.

7.4. Discusión

En las últimas décadas, la fluorescencia de clorofila ha sido una herramienta muy utilizada por ecofisiólogos e investigadores de la fotosíntesis para el estudio del funcionamiento fotosintético de las plantas (Papageorgiou 1975, Briantais *et al.* 1986, Renger & Schreiber 1986, Bolhar-Nordenkampf *et al.* 1989, Schreiber & Bilger 1993, Schreiber *et al.* 1994, Govindjee 1995). La introducción de un gran número de fluorímetros portátiles y fácilmente manejables ha popularizado el uso de esta técnica. Dos de los más extendidos modelos disponibles comercialmente son el PAM-2000 (Heinz Walz, Efeltrich, Alemania) y el FMS II (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, Reino Unido). Estos instrumentos utilizan, respectivamente, 650 y 600 nm como longitud de onda de excitación. En este trabajo se han encontrado diferencias en la eficiencia potencial máxima del PSII (F_V/F_M) medida con ambos fluorímetros en plantas sanas de *Q. coccifera* sin ningún tipo de estrés. Concretamente, los valores de F_V/F_M medidos con el PAM-2000 fueron siempre inferiores a aquellos medidos con el FMS II en las mismas hojas y bajo las mismas condiciones experimentales (midiendo siempre en el lado adaxial). Este fenómeno también se encontró en otras especies del género *Quercus*, como *Q. suber* y *Q. petraea* (datos no mostrados).

En primer lugar se exploró la posibilidad de que las diferencias encontradas fueran debidas a un artefacto instrumental. Así, se midió la relación F_V/F_M en las mismas hojas (siempre desde el lado adaxial) con un fluorímetro Xe-PAM (Heinz Walz, Efeltrich, Alemania; Schreiber *et al.* 1993), que tiene la versatilidad de poder seleccionar diferentes rangos de longitudes de onda con la ayuda de filtros de interferencia para la excitación de la fluorescencia de clorofila con modulación de la amplitud del pulso derivada de una lámpara de descarga de xenón. En este estudio, se filtró la luz de medida a 650 o 600 nm, emulando respectivamente al PAM-2000 o al FMS II. Las diferencias entre las dos longitudes de onda de excitación fueron todavía observables, no pudiendo ser adscritas a un artefacto causado por el uso de dos fluorímetros comerciales distintos.

Todavía, con el fluorímetro Xe-PAM, la luz de medida (excitación) y el pulso saturante de luz actínica (luz blanca, utilizada para la medida de F_M) eran distintas. Este hecho podría representar una nueva fuente de variación en las medidas de F_V/F_M , por el hecho de que la luz de medida y la de saturación pudieran ser absorbidas de un modo diferencial por las distintas capas de células en profundidad. Por lo tanto, se

consideró necesario el empleo de un fluorímetro no comercial (Morales *et al.* 1990, 1991), que emplea una iluminación actínica en continuo para la medida de la fase rápida del efecto Kautsky, a partir del cual la eficiencia potencial máxima del PSII puede ser registrada (Abadía *et al.* 1999). De nuevo, se midió en el lado adaxial de las mismas hojas y las diferencias entre 650 y 600 nm desaparecieron. Por lo tanto, estas diferencias fueron adscritas al uso de luces diferentes para la excitación y para la saturación del PSII de hojas adaptadas a la oscuridad.

Posteriormente se utilizó este fluorímetro no comercial para investigar la eficiencia potencial máxima del PSII cuando la luz penetra más en profundidad dentro del mesófilo, utilizando luces a 650, 600, 550 y 500 nm, realizando medidas en los lados adaxial y abaxial de la hoja. Los resultados indicaron que las longitudes de onda débilmente absorbidas por los pigmentos fotosintéticos, y por lo tanto que penetraban más profundamente dentro del mesófilo, proporcionaban valores de F_V/F_M más bajos cuando las medidas eran llevadas a cabo desde el lado adaxial. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, cuando las medidas se realizaban desde el lado abaxial, las longitudes de onda que penetraban más profundamente proporcionaban valores de F_V/F_M mejores que aquéllas que se absorbían más superficialmente. Las tasas de fotosíntesis eran también mayores (unas dos veces) cuando las medidas se hacían por el lado adaxial, lo que era debido a una mejor Φ_{PSII} principalmente originada por un qP más alto. Todos estos datos indican que el lado abaxial, o al menos las capas celulares más profundas del mesófilo, de las hojas de *Q. coccifera* de 1 año de edad sin ningún tipo de estrés se caracterizaba por tener un funcionamiento fotosintético dañado.

El origen del bajo rendimiento del lado abaxial en las hojas de *Q. coccifera* podría estar relacionado con la cantidad de luz que llega a estas capas de células y de su composición en pigmentos fotosintéticos. En el caso de *Q. coccifera* ya se ha mencionado anteriormente que sus hojas se caracterizan por la presencia de BSE, que facilitan la penetración de la luz hasta la parte más profunda del mesófilo (Karabourniotis *et al.* 2000). De hecho, a determinadas orientaciones específicas de la muestra, la cantidad de luz dentro de las BSE en la parte profunda del mesófilo se aproximaba a la detectada por la sonda en el lado adaxial de la superficie de las hojas iluminadas de *Q. coccifera* (Karabourniotis *et al.* 2000). Estas grandes cantidades de luz en capas celulares con cloroplastos de tipo sombra (ver sección 7.1 Introducción) pueden generar este bajo rendimiento fotosintético. El bajo rendimiento fotosintético

del lado abaxial de las hojas ya ha sido descrito previamente, generalmente relacionado con su composición proteínica y pigmentaria (ver Li *et al.* 2007 y referencias incluidas). Hasta donde se sabe, este es el primer trabajo donde un bajo rendimiento fotosintético en el lado abaxial de las hojas se acompaña con una eficiencia potencial máxima del PSII disminuida.

El hecho de que diferentes técnicas de medida reflejen la actividad de diferentes poblaciones celulares puede tener importantes consecuencias en la fotosíntesis de las plantas bajo condiciones de estrés. Por ejemplo, el uso combinado de la fluorescencia de clorofila y las medidas de intercambio de gases (Valentini *et al.* 1995, Medrano *et al.* 2002) ha sido utilizado con éxito en la separación de la tasa de transporte electrónico en varias fracciones, incluyendo aquéllas destinadas a fotosíntesis, respiración oscura y fotorrespiración, en plantas con estrés hídrico (Flexas & Medrano 2002b). Sin embargo, no ha sido posible la utilización de esta aproximación con plantas deficientes en hierro o nitrógeno (Morales *et al.* 2006). Este hecho se debe a que la relación entre el transporte electrónico y la suma de la fotosíntesis neta, respiración oscura y fotorrespiración disminuye en plantas con deficiencia de hierro o nitrógeno (Morales *et al.* 2006) por debajo del valor teórico de 4,5-5 (von Caemmerer & Farquhar 1981). Una posible explicación para esto es que la tasa de transporte electrónico (estimada con la fluorescencia de clorofila) y la tasa de fotosíntesis (medido con técnicas de intercambio de gases) podrían estar originadas a partir de distintas poblaciones celulares. Las capas celulares más superficiales, que contribuyen más a la estimación de la tasa de transporte electrónico, pueden estar más afectadas que las capas celulares más profundas, que contribuyen más a la estimación de las tasas de intercambio de gases. En el caso del estrés hídrico, la relación entre el transporte electrónico y la fotosíntesis neta nunca disminuye por debajo de 5 (Flexas *et al.* 1999b). En cualquier caso, hay que tener cuidado cuando se emplean diferentes técnicas que pueden reflejar la actividad fotosintética de diferentes poblaciones celulares o de diferentes capas celulares en plantas bajo diversas condiciones de estrés.

7.5. Conclusiones

En este capítulo se han encontrado diferencias cuando se han utilizado diferentes fluorímetros comerciales y no comerciales para estimar la eficiencia potencial máxima del PSII (a través de la relación F_V/F_M en hojas adaptadas a la oscuridad) en el lado adaxial de hojas de 1 año de brinzales de *Q. coccifera* en condiciones control, sin ningún tipo de estrés.

La eficiencia fotosintética del lado abaxial, o al menos de las capas profundas del mesófilo, fue más baja que la del lado adaxial, lo que puede ser adscrito a la fuerte disminución de la eficiencia potencial máxima del PSII. Esta baja eficiencia fotosintética del lado abaxial podría relacionarse con la existencia de BSE en las hojas de *Q. coccifera*, que facilitan la penetración de altas tasas de radiación fotosintéticamente activa hasta la parte más profunda del mesófilo.

Finalmente, la existencia de poblaciones o capas celulares dentro de las hojas con diferentes actividades fotosintéticas o eficiencias hace necesaria la evaluación de cómo la luz penetra dentro del mesófilo cuando se usa la fluorescencia de clorofila o técnicas de intercambio de gases que usan diferentes longitudes de onda de excitación.

CAPÍTULO 8

Conclusiones generales y futuras líneas de investigación

8.1. El decaimiento de <i>Abies alba</i> y <i>Pinus sylvestris</i> en Aragón.....	158
8.2. La vegetación esclerófila mediterránea: respuestas al estrés hídrico y al estrés lumínico.....	160
8.3. El PRI medido a distancia como un indicador no destructivo del estado hídrico de la vegetación.....	161
8.4. Consideraciones sobre la comparación de medidas obtenidas con diversos sistemas de intercambio de gases y fluorescencia de clorofila.....	163
8.5. Conclusiones.....	164

8.1. El decaimiento de *Abies alba* y *Pinus sylvestris* en Aragón

Los capítulos 2 y 3 se han ocupado del estudio, desde distintos puntos de vista, de dos de los más importantes fenómenos de decaimiento observados en el paisaje forestal aragonés durante los últimos años. Estos episodios han tenido como protagonistas a *A. alba* y *P. sylvestris*, dos especies que ocupan en Aragón áreas próximas a sus límites de distribución. Este matiz es de vital importancia para comprender el estado actual y la futura evolución de estas poblaciones, ya que el establecimiento de una especie en sus límites ecológicos y/o geográficos hace que ésta sea más sensible a cualquier tipo de alteración climática, lo que actuará como un importante factor de predisposición al decaimiento, en el sentido dado por Manion (1991) a este término. Sin embargo, aunque ambos procesos tienen algunas características comunes, no es menos cierto que cada uno muestra bastantes particularidades interesantes.

Por una parte, el decaimiento de *A. alba* en la población de Paco Ezpela constituye un ejemplo de conjunción entre factores regionales (alteraciones en el clima a largo plazo relacionados con el cambio global) con otros factores locales (desordenes nutricionales, episodios agudos de sequía estival, etc.). Esta afirmación se fundamenta en el óptimo estado fisiológico encontrado, a partir de indicadores fotoquímicos y reflectométricos de daño, en los ejemplares de la otra población estudiada, Gamueta, muy cercana en el espacio pero muy distinta desde un punto de vista biogeográfico. Este hecho es una constante en el decaimiento de *A. alba* en el Pirineo, ya que la ausencia de un patrón geográfico claro es una de las principales características del decaimiento de *A. alba* en el Pirineo. Por lo tanto, el entendimiento de las causas que hacen que se vean afectadas, en mayor o menor grado, poblaciones muy alejadas entre sí y muy diferentes en cuanto a su estructura y localización geográfica podría ser un objetivo a alcanzar en futuras investigaciones. En este sentido, una línea de trabajo interesante sería la búsqueda, a nivel poblacional, de factores de tipo ecogenético que pudieran agrupar a las poblaciones de *A. alba* del Pirineo en función de su sensibilidad al aumento de la temperatura y la disminución de las precipitaciones.

Por otro lado, el decaimiento de *P. sylvestris* en la provincia de Teruel ha servido como marco teórico para testar una nueva técnica fotoquímica en el estudio de la resistencia de los tejidos vivos del *cambium* a temperaturas de congelación, ya que

el daño por helada se presentó como un posible factor desencadenante de este proceso. Además de poner a punto una nueva técnica fotoquímica, se ha demostrado que el frío no fue el causante del último episodio de decaimiento detectado en estas masas de *P. sylvestris*, una especie cuya área central de distribución se sitúa en el centro-norte de continente eurosiberiano. Aunque el factor desencadenante último del proceso no está del todo claro, se podían apreciar una serie de factores comunes en los ejemplares afectados que hacían pensar en la existencia de un cierto grado de estrés crónico en estas poblaciones. Concretamente, los ejemplares de *P. sylvestris* en decaimiento se asentaban sobre suelos someros y con escasa fracturación de la roca madre, que impedía el desarrollo de raíces profundas para la búsqueda del recurso hídrico. Además, las condiciones climáticas existentes en la zona indican que la actividad vegetativa de *P. sylvestris* en esta zona está limitada por las bajas temperaturas invernales y por la escasez de precipitación estival, lo que hace que el potencial periodo de crecimiento del árbol se vea reducido en gran medida. Por último, hay que tener en cuenta un último factor de vital importancia para comprender este proceso: la historia del territorio donde se asientan estas poblaciones de *P. sylvestris*. En este sentido, parece demostrado que la ganadería fue la principal actividad económica de la zona, promoviendo el uso de la tierra para pasto y limitando en gran medida la presencia del pino albar en la zona. Sin embargo, el abandono de la actividad ganadera en la zona ha favorecido la expansión a gran escala de *P. sylvestris* en este territorio. La gran densidad de ejemplares en la zona corrobora esta afirmación. Todos estos hechos -la escasez de suelo, la existencia de condiciones climáticas poco favorables y los antecedentes históricos- actuaron como factores de predisposición al decaimiento de estas masas. En este sentido, la historia del paisaje se constituye como una disciplina fundamental que tiene que formar parte del estudio de éste y otros fenómenos de decaimiento forestal que puedan suceder en el futuro.

En resumen, estas poblaciones de *A. alba* y *P. sylvestris* fronterizas entre el mundo mediterráneo y el mundo eurosiberiano se revelan como unos valiosos indicadores de la dinámica de la vegetación en el contexto del cambio global. Por lo tanto, el conocimiento en profundidad de la estructura y el funcionamiento de estas y otras poblaciones de similares características es uno de los objetivos a conseguir en el futuro.

8.2. La vegetación esclerófila mediterránea: respuestas frente al estrés hídrico y al estrés lumínico

El decaimiento forestal en la Península Ibérica también ha incidido sobre especies características de la vegetación mediterránea. Es más, tal y como se menciona en el capítulo 1, el decaimiento de especies del género *Quercus* se presenta como un interesante fenómeno de estudio, ya que ha afectado en mayor medida a las especies que, en principio, se identifican como más adaptadas a las condiciones climáticas existentes en el área bajo la influencia del clima mediterráneo de la Península Ibérica, como es el caso del fenómeno conocido como “la seca” de la encina y otras especies del género *Quercus*. Aunque se ha demostrado la influencia de otros factores de predisposición relacionados con la baja calidad de los suelos, parece claro que los desórdenes climáticos son el principal factor desencadenante de estos procesos. Esta indiscutible afirmación empírica choca frontalmente con el tradicional concepto de la vegetación esclerófila mediterránea como un grupo fisiológico homogéneo, propuesto por muchos autores (ver sección 1.6 para más detalles). Por lo tanto, el estudio del funcionamiento de la vegetación esclerófila mediterránea frente al estrés hídrico y lumínico fue considerado como uno de los principales objetivos a cubrir en este trabajo. Concretamente, se ha intentado profundizar en el conocimiento de los diferentes mecanismos fotoquímicos que muestran estas especies frente a periodos largos de falta de agua y altos niveles de radiación lumínica, condiciones típicas del verano mediterráneo.

De esta manera, en el capítulo 4 se ha demostrado que tres especies congénicas (*Q. coccifera*, *Q. ilex* ssp. *ballota* y *Q. suber*), consideradas como representantes genuinas de la vegetación esclerófila mediterránea y con una alta resistencia a la sequía desde el punto de vista de su arquitectura hidráulica, presentan un comportamiento diferencial en el funcionamiento del fotosistema II frente a un periodo de estrés hídrico intenso. Concretamente, las mayores diferencias se encuentran en la evolución de la eficiencia instantánea en el uso del agua, en la eficiencia potencial máxima del fotosistema II y en las interconversiones de los pigmentos del ciclo de las xantofilas. En relación con esto, es interesante resaltar la excelente correlación encontrada entre el potencial hídrico y la eficiencia potencial máxima del fotosistema II (F_v/F_M) medidos antes del amanecer para *Q. coccifera* y *Q. ilex* ssp. *ballota*. La capacidad de adaptación de la cadena de transporte electrónico en

estas dos especies – especialmente en *Q. coccifera* - hace de la medida de F_V/F_M un posible indicador no destructivo del contenido de agua en el suelo cuando el potencial hídrico se hace muy negativo. Una línea de investigación que queda abierta para el futuro es la búsqueda de otras especies constituyentes de la vegetación mediterránea cuyo fotosistema II responda al estrés hídrico de una manera análoga al de *Q. coccifera* y *Q. ilex* ssp. *ballota*.

Una de las principales conclusiones del capítulo 4 es que si especies congénicas con evidentes vínculos genéticos, con solapamientos en sus respectivas áreas de distribución, muestran semejantes diferencias de comportamiento, la supuesta unidad funcional de la vegetación mediterránea se ve puesta en entredicho. Este argumento concuerda con trabajos realizados por otros autores (Ogaya & Peñuelas 2006), que cuestionan el papel de la esclerofilia y su relación con la resistencia al estrés hídrico, llegando a considerar a este carácter morfológico como un epifenómeno debido a la gran cantidad de radiación solar incidente en la región mediterránea. Por lo tanto, a la hora de afrontar el estudio de procesos de decaimiento de la vegetación esclerófila mediterránea, hay que tener especial cuidado en la consideración de una especie como altamente resistente al déficit hídrico, ya que esta asunción puede llevar a conclusiones erróneas, cuando se buscan los factores causales relacionados con episodios de decaimiento en estas especies. El incremento en la aridez pronosticado para los próximos años en la cuenca mediterránea hace que estas consideraciones adquieran una especial importancia. En este sentido, la búsqueda del parámetro fisiológico definitivo que identifique inequívocamente el grado de tolerancia a la sequía es un objetivo a alcanzar en futuros trabajos.

8.3. El PRI medido a distancia como un indicador no destructivo del estado hídrico de la vegetación

Es indudable que la búsqueda y puesta a punto de nuevos indicadores fotoquímicos o reflectométricos de resistencia al estrés hídrico se infiere de estudios realizados en plantas modelo. En este caso, la especie en cuestión tendría que ser (i) altamente tolerante al estrés hídrico, (ii) ofrecer un amplio margen de seguridad entre el potencial hídrico donde se produce el cierre estomático y el potencial hídrico donde el grado de cavitación impide la recuperación de la planta y (iii) tener parámetros

fisiológicos fácilmente medibles con alta sensibilidad al estrés hídrico. Además, la especie en cuestión tenía que ser importante desde un punto de vista ecológico, es decir, que su presencia en la vegetación natural no fuese testimonial, sino que jugase un papel importante como especie formadora de paisaje. Por todas estas razones, la especie elegida para los siguientes trabajos a realizar fue *Q. coccifera*, ya que posee todas estas características. Así, en el capítulo 5 se realizó el seguimiento de manera pasiva, en continuo y a distancia del PRI (Índice de Reflectancia Fisiológico) sobre un dosel de brinzales de *Q. coccifera* sometidos a un estrés hídrico prolongado. Por otro lado, también se realizó el seguimiento de otros parámetros fisiológicos (contenido hídrico relativo, cavitación, intercambio de gases, fluorescencia de clorofila y pigmentos fotosintéticos) como medidas complementarias a la reflectancia espectral, lo que tenía como objetivo (i) adquirir un conocimiento profundo del funcionamiento fisiológico de esta especie en respuesta al estrés hídrico, y (ii) intentar establecer relaciones entre los cambios en el PRI medido a distancia y los cambios en los parámetros fisiológicos medidos en contacto.

Los resultados obtenidos en este capítulo revelan al PRI como un excelente indicador indirecto y no destructivo del estrés hídrico. Las buenas correlaciones encontradas con parámetros fisiológicos tradicionalmente relacionados con el estrés hídrico, como el NPQ y $(A+Z)/(V+A+Z)$, confirman esta afirmación. La medida del PRI en continuo y a larga distancia, mediante la incorporación de sensores reflectométricos en avionetas y satélites, es uno de los objetivos de la Agencia Espacial Europea, tal y como ha sido puesto de manifiesto en recientes publicaciones y congresos internacionales (Rahman *et al.* 2001, Styliniski *et al.* 2002, Grace *et al.* 2007).

Aunque las correlaciones encontradas en el capítulo 5 eran bastante buenas, el hecho de que el PRI se midiera a nivel de dosel vegetal y el resto de medidas se hiciera a nivel foliar planteaba una serie de incógnitas respecto a su empleo como indicador de la actividad fotosintética y fotoquímica. En el capítulo 6 se profundiza en el conocimiento del significado fisiológico de los cambios en la reflectancia en la parte verde del espectro, mediante la medida simultánea de la reflectancia espectral, el NPQ y los pigmentos del ciclo de las xantofilas. El desarrollo de un prototipo experimental no comercial, que permitía la obtención e inmediata congelación de un disco de hoja donde se habían realizado las medidas de reflectancia espectral y fluorescencia de clorofila, posibilitó la realización de este trabajo. De esta manera se pudo comprobar que los cambios en los parámetros relacionados con la actividad del fotosistema II,

causados por repentinas transiciones de oscuridad a altos niveles de radiación fotosintéticamente activa, se correlacionaban muy bien con cambios en la reflectancia en la parte verde del espectro.

8.4. Consideraciones sobre la comparación de medidas obtenidas con diversos sistemas de intercambio de gases y fluorescencia de clorofila

El empleo de técnicas basadas en la medida de intercambio de gases y la fluorescencia de clorofila está cada vez más extendido en los estudios relacionados con la ecofisiología de plantas, sobre todo en la respuesta de la vegetación frente a diversos estreses y en el estudio de procesos de decaimiento forestal. Sin embargo, muy pocos trabajos tienen en cuenta la influencia de la calidad de la luz de medida en la respuesta obtenida, ya que la capacidad de penetración de la luz dentro de la hoja cambia en función de la longitud de onda empleada. Así, la hoja presenta un máximo de absorción en las longitudes de onda correspondientes al azul y al rojo, mientras que el nivel de absorción de la radiación verde es relativamente pequeño. Por lo tanto, la luz de excitación utilizada estará incidiendo sobre distintas capas celulares en función de la longitud de onda empleada.

En el capítulo 7 se analiza la eficiencia del fotosistema II a través de distintas capas celulares del mesófilo de *Q. coccifera*, demostrando que existe un gradiente vertical de eficiencia dentro del mismo. Por lo tanto, debido a que el comportamiento fisiológico de estas capas celulares no es homogéneo, existe la posibilidad de que haya interpretaciones erróneas cuando se comparan medidas obtenidas a partir de diferentes aparatos, por ejemplo cuando se comparan medidas de intercambio de gases y fluorescencia de clorofila, o cuando se comparan medidas de fluorescencia realizadas con fluorímetros con distintas características técnicas.

8.5. Conclusiones

1. Las poblaciones de abeto blanco localizadas en el límite ecológico de la especie, bajo condiciones más xéricas pueden ser mucho más sensibles a un cambio climático que aquellas situadas en el núcleo de su área de distribución, bajo condiciones más méxicas. Un futurible aumento de la temperatura y un aumento de la frecuencia de sequías intensas en los Pirineos podrían causar una acusada pérdida de productividad en aquellas poblaciones de abeto blanco localizadas cerca del límite ecológico de la especie.

2. La fluorescencia de clorofila en el clorénquima cortical de la corteza es una técnica fácil, rápida, no destructiva y precisa, para la caracterización de la vitalidad del *cambium* bajo temperaturas de congelación en el tallo de *P. sylvestris* y otras especies leñosas que posean este tejido fotosintético. Esta técnica permite establecer el valor de temperatura umbral a la que se producen daños irreversibles por helada en diferentes tejidos vegetales, incluyendo la parte interna de la corteza.

3. El comportamiento de la maquinaria fotosintética de *Q. coccifera*, *Q. ilex* ssp. *ballota* y *Q. suber* en respuesta a un periodo de intenso estrés hídrico estival varió marcadamente entre las tres especies estudiadas. Estos hechos indican una adaptación del PSII que va más allá de la cercanía desde un punto de vista genético y morfológico existente entre estas especies, demostrando que la convergencia morfológica no se expresa necesariamente en el comportamiento fisiológico de estas especies bajo condiciones de estrés hídrico.

4. El PRI se ha revelado como un indicador de estrés hídrico excelente, sensible, dinámico y no destructivo, incluso en especies vegetales bajo condiciones de intensa sequía en condiciones naturales y, como es el caso de *Q. coccifera*, especialmente resistentes al estrés hídrico estival. El empleo de estas especies perennifolias como plantas modelo para la monitorización de la disponibilidad de agua en el suelo durante las cuatro estaciones del año puede ayudar a comprender la evolución del paisaje mediterráneo en relación con el cambio climático.

5. El uso de índices reflectométricos como indicadores de estrés hace que la comprensión del significado de la señal obtenida sea fundamental para una óptima interpretación posterior de los resultados obtenidos. La respuesta diferencial obtenida,

debida al diferente estado de partida de la hoja en cuanto al grado de estrés acumulado (lumínico y/o hídrico), hace de la reflectancia una potente herramienta en el estudio del estado fisiológico de la vegetación. Además, la reflectancia es una variable que puede ser monitorizada de un modo pasivo y a distancia, lo puede facilitar su empleo como herramienta de diagnóstico del estado de vigor de masas forestales mediante teledetección.

6. En *Q. coccifera*, la eficiencia fotosintética del lado abaxial, o al menos de las capas profundas del mesófilo, fue más baja que la del lado adaxial, lo que puede ser adscrito a la fuerte disminución de la eficiencia potencial máxima del PSII. Esta baja eficiencia fotosintética del lado abaxial podría relacionarse con la existencia de BSE en las hojas de *Q. coccifera*, que facilitan la penetración de altas tasas de radiación fotosintéticamente activa hasta la parte más profunda del mesófilo.

7. Finalmente, la existencia de poblaciones o capas celulares dentro de las hojas con diferentes actividades fotosintéticas o eficiencias hace necesaria la evaluación de cómo la luz penetra dentro del mesófilo cuando se usa la fluorescencia de clorofila o técnicas de intercambio de gases que usan diferentes longitudes de onda de excitación.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Abadía, J. & Abadía, A. 1993. Iron and plant pigments. En *Iron Chelations in Plant and Soil Microorganisms*. Eds. L. Barton & B. Hemming. Academic Press, San Diego, pp. 327-344.
- Abadía, J., Morales, F. & Abadía, A. 1999. Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-deficient leaves. *Plant Soil* 215, 183-192.
- Abadía, J., Nishio, J.N. & Ferry, N. 1986. Chlorophyll protein and polypeptide composition of Mn-deficient sugar beet thylakoids. *Photosynthesis Research* 7, 237-245.
- Acherar, M. & Rambal, S. 1992. Comparative water relations of four Mediterranean oak species. *Vegetatio* 99-100, 177-184.
- Ackerly, D.D. 2004a. Functional strategies of chaparral shrubs in relation to seasonal water deficit and disturbance. *Ecological Monographs* 74(1), 25-44.
- Ackerly, D.D. 2004b. Adaptation, niche conservatism, and convergence: comparative studies of leaf evolution in the California chaparral. *The American Naturalist* 163(5), 654-671.
- Agati, G., Cerovic, Z.G. & Moya, I. 2000. The effect of decreasing temperature up to chilling values on the in vivo F685/F735 chlorophyll fluorescence ratio in *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*: The role of photosystem I contribution to the 735 nm fluorescence band. *Photochemistry and Photobiology* 72(1), 75-84.
- Aït-Bachir, S., Gil-Pelegrín, E. & Lacaze, B. 2000. Application of remote sensing to the study of oak decline in Aragón, Spain. En *Remote sensing in the 21 st Century: Economic and Environmental Applications*. Ed. J.L. Casanova. Balkema, Róterdam, pp. 99-102.
- Alfa, R., Moro-Serrano, J. & Notivol, E. 2001. Genetic variability of Scots pine (*Pinus sylvestris*) provenances in Spain: growth traits and survival. *Silva Fennica* 35 (1), 27-38.

- Allué-Andrade, J.L. 1990. *Atlas fitoclimático de España: Taxonomías*. MAPA-INIA, Madrid.
- Ameaglio, T., Cochard, H. & Ewers, F.W. 2001. Stem diameter variations and cold hardiness in walnut trees. *Journal of Experimental Botany* 52 (364), 2135-2142.
- Appel, D.N. 1995. The oak wilt enigma: Perspectives from the Texas epidemic. *Annual Review of Phytopathology* 33, 103-118.
- Aschan, G. & Pfanz, H. 2003. Non-foliar photosynthesis - a strategy of additional carbon acquisition. *Flora* 198 (2), 81-97.
- Asner, G.P., Carlson, K.M. & Martin, R.E. 2005. Substrate age and precipitation effects on Hawaiian forest canopies from space borne imaging spectroscopy. *Remote Sensing of Environment* 98, 457-467.
- Asner, G.P. & Vitousek P.M. 2005. Remote analysis of biological invasion and biogeochemical change. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (12), 4383-4386.
- Auclair, A.N.D, Worrest, R.C., Lachance, D. & Martin, H.C. 1992. Climatic perturbation as a general mechanism of forest dieback. En *Forest decline concepts*. Eds. P.D: Manion & D. Lachance. APS Press, St. Paul, pp. 38-58.
- Aussenac, G. 2002. Ecology and ecophysiology of circum-Mediterranean firs in the context of climate change. *Annals of Forest Science* 59, 823-832.

B

- Balaguer, L., Pugnaire, F.I., Martínez-Ferri, E., Armas, C., Valladares, F. & Manrique, E. 2002. Ecophysiological significance of chlorophyll loss and reduced photochemical efficiency under extreme aridity in *Stipa tenacissima* L. *Plant Soil* 24, 343-352.
- Baquadano, F.J. & Castillo, F.J. 2006. Comparative ecophysiological effects of drought on seedlings of the Mediterranean water-saver *Pinus halepensis* and water-spenders *Quercus coccifera* and *Quercus ilex*. *Trees Structure and Function* 20, 689-700.
- Barnes, P.W., Searles, P.S., Ballaré, C.L., Ryel, R.J. & Caldwell, M.M. 2000. Non-invasive measurements of leaf epidermal transmittance of UV radiation using chlorophyll fluorescence: field and laboratory studies. *Physiologia Plantarum* 109, 274-283.

-
- Baroli, I., Do, A.D., Yamane, T. & Niyogi, K.K. 2003. Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress. *The Plant Cell* 15, 992-1008.
- Beck, E.H., Heim, R. & Hansen, J. 2004. Plant resistance to cold stress: mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. *Journal of Biosciences* 29 (4), 449-459.
- Belkhodja, R., Morales, F., Quílez, R., López-Millán, A.F., Abadía, A. & Abadía, J. 1998a. Iron deficiency causes changes in chlorophyll fluorescence due to reduction in the dark of the Photosystem II acceptor side. *Photosynthesis Research* 56, 265-276.
- Belkhodja, R., Morales, F., Sanz, M., Abadía, A. & Abadía, J. 1998b. Iron deficiency in peach trees: effects on leaf chlorophyll fluorescence and nutrient concentrations in flowers and leaves. *Plant Soil* 203, 257-268.
- Bergmann, W. 1993. *Ernährungsstörungen bei Kulturpflanzen: Entstehung und Diagnose*. Gustav Fischer, Verlag, Stuttgart.
- Bert, G.D. 1993. Impact of ecological factors, climatic stresses, and pollution on growth and health of silver fir (*Abies alba* Mill.) in the Jura mountains: an ecological and dendrochronological study. *Acta Oecologica* 14, 229-246.
- Beyschlag, W., Ryel, R.J. & Dietsch, C. 1994. Shedding of older needle age classes does not necessarily reduce photosynthetic primary production of Norway spruce. Analysis with a three-dimensional canopy photosynthesis model. *Trees Structure and Function* 9, 51-59.
- Bigras, F.J. & Bertrand, A. 2006. Responses of *Picea mariana* to elevated CO₂ concentration during growth, cold hardening and dehardening: phenology, cold tolerance, photosynthesis and growth. *Tree Physiology* 26, 875-888.
- Bilger, W. & Björkman, O. 1990. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25, 173-185.
- Bilger, W., Björkman, O. & Thayer, S.S. 1989. Light-induced spectral absorbance changes in relation to photosynthesis and the epoxidation state of xanthophyll cycle components in cotton leaves. *Plant Physiology* 91, 542-551.
- Bilger, W., Veit, M., Schreiber, L. & Schreiber, U. 1997. Measurement of leaf epidermal transmittance of UV radiation by chlorophyll fluorescence. *Physiologia Plantarum* 101, 754-763.
-

- Binder, W.D. & Fielder, P. 1996. Chlorophyll fluorescence as an indicator of frost hardiness in white spruce seedlings from different latitudes. *New Forests* 11, 233-253.
- Biocca, M., Tainter, F.H., Starke, D.A., Oak, S.W. & Williams, J.G. 1993. The persistence of oak decline in the western North Carolina Nantahala Mountains. *Castanea* 58, 178-184.
- Björkman, O. & Demmig, B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170, 489-504.
- Björkman, O. & Demmig-Adams, B. 1994. Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion and dissipation in leaves of higher plants. En *Ecophysiology of photosynthesis*. Eds. E.D. Schulze & M.M. Caldwell. Ecological studies 100. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 17-47.
- Blanco, E., Casado, M.A., Costa, M., Escribano, R., García, M., Génova, M., Gómez, A., Gómez, F., Moreno, J.C., Morla, C., Regato, P. & Sainz, H. 1997. *Los bosques ibéricos*. Ed. Planeta, Barcelona, p. 572.
- Blondel, J. & Aronson, J. 1999. Biology and wildlife of the Mediterranean region. Oxford University Press, New York.
- Bolhar-Nordenkamp, H.R., Long, P.S., Baker, N.R., Oquist, G., Schreiber, U. & Lechner, E.G. 1989. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology* 3, 497-514.
- Brasier, C.M. 1992. Oak tree mortality in Iberia. *Nature* 360, 539.
- Brasier, C.M. 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Annals of Forest Science* 53, 347-358.
- Brasier, C.M., Robredo, F. & Ferraz, J.F.P. 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathology* 42, 140-145.
- Braun-Blanquet, J. & de Bolós, O. 1957. Les groupements végétaux du bassin moyen de l'Ebre et leur dynamisme. *Anales de Aula Dei* 5 (1-4), 1-266.
- Breckle, S.W. 2002. *Walter's vegetation of the earth*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Breda, N. 2000. Water shortage as a key factor in the case of the oak dieback in the Harth Forest (Alsation plain, France) as demonstrated by dendroecological and

-
- ecophysiological study. En *Recent Advances on Oak Health in Europe*. Eds. T. Oszako & C. Delatour. Forest Research Institute, Poland, pp. 157-159.
- Briantais, J.M., Verotte, C., Krause, G.H. & Weis, E. 1986. Chlorophyll a fluorescence of higher plants: chloroplasts and leaves. En *Light Emission by Plants and Bacteria*. Eds. Govindjee, J. Ames & D.C. Fork. Academic Press, Orlando, pp. 539-583.
- Brodribb, T.J. & Holbrook, N.M. 2004. Stomatal protection against hydraulic failure: a comparison of coexisting ferns and angiosperm. *New Phytologist* 162, 663-670.
- Brubaker, L.B. 1986. Responses of tree populations to climatic change. *Vegetatio* 67, 119-130.
- Bücher, A. & Dessens, J. 1991. Secular trend of surface temperature at an elevated observatory in the Pyrenees. *Journal of Climate* 4, 859-868.
- Burghardt, M. & Riederer, M. 2006. Cuticular transpiration. En *Biology of the plant cuticle*. Eds. M. Riederer & C. Müller. *Annual Plant Reviews*, vol. 23. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 292-311.
- Burrows, G.E., Offord, C.A., Meagher, P.F. & Ashton, K. 2003. Axillary meristems and the development of epicormic buds in Wollemi pine (*Wollemia nobilis*). *Annals of Botany* 92, 835-844.

C

- Camarero, J.J. & Gutiérrez, E. 2004. Pace and pattern of recent treeline dynamics: response of ecotones to climatic variability in the Spanish Pyrenees. *Climatic Change* 63, 181-200.
- Camarero, J.J., Martín, E. & Gil-Pelegrín, E. 2003. The impact of a needleminer (*Epinotia subsequana*) outbreak on radial growth of silver fir (*Abies alba*) in the Aragón Pyrenees: A dendrochronological assessment. *Dendrochronologia* 21, 3-12.
- Campbell, B.M. & Berger, M.J.A. 1988. Plant form in the mountains of the Cape South Africa. *Journal of Ecology* 76, 637-653.
- Carcaillet, C. & Muller, S.D. 2005. Holocene tree-limit and distribution of *Abies alba* in the inner French Alps: anthropogenic or climatic changes? *Boreas* 34 (4), 468-476.

- Carrión, J.S., Munuera, M., Dupré, M. & Andrade, A. 2001. Abrupt vegetation changes in the Segura Mountains of southern Spain throughout the Holocene. *Journal of Ecology* 89, 783-797.
- Carter, G.A. 1994. Ratios of leaf reflectances in narrow wavebands as indicators of plant stress. *International Journal of Remote Sensing* 15, 697-704.
- Carter, G.A. & Knapp, A.K. 2001. Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. *American Journal of Botany* 88, 677-684.
- Catalán-Bachiller, G., Gil-Muñoz, P., Galera-Peral, R.M., Martín-Albertos, S., Agundez-Leal, D. & Alía-Miranda, R. 1991. *Regiones de procedencia de Pinus sylvestris L. y Pinus nigra Arn. subsp. salzmannii (Dunal) Franco*. ICONA, Madrid.
- Cavender-Bares, J. & Holbrook, N.M. 2001. Hydraulic properties and freezing-induced cavitation in sympatric evergreen and deciduous oaks with contrasting habitats. *Plant, Cell and Environment* 24 (12), 1243-1256.
- Cavender-Bares, J., Sack, L. & Savage, J. 2007. Atmospheric and soil drought reduce nocturnal conductance in live oaks. *Tree Physiology* 27 (4), 611-620.
- Ceballos, L. & Ruiz de la Torre, J. 1979. *Árboles y arbustos de la España Peninsular*. E.T.S.I.M., Madrid.
- Ceulemans, R. & Mousseau, M. 1994. Effects of elevated atmospheric CO₂ on woody plants. *New Phytologist* 127, 425-446.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P. & Pereira, J.S. 2003. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30(3), 239-264.
- Comstock, J. & Ehleringer, J. 1986. Canopy dynamics and carbon gain in response to soil water availability in *Encelia frutescens* Gray, a drought-deciduous shrub. *Oecologia* 6, 271-278.
- Conard, S.C., Sparks, S.R. & Regelbrugge, J.C. 1997. Comparative plant water relations and soil water depletion patterns of three seral shrub species on forest sites in southwestern Oregon. *Forest Science* 43(3), 336-347.
- Conesa i Mor, J.A. 1997. *Tipologia de la vegetació: anàlisi i caracterització*. Universitat de Lleida, pp. 202-206.
- Corcuera, L., Camarero, J.J. & Gil-Pelegrín, E. 2002. Functional groups in *Quercus* species derived from the analysis of pressure-volume curves. *Trees Structure and Function* 16, 465-472.

-
- Corcuera, L., Camarero, J.J. & Gil-Peigrín, E. 2004a. Effects of a severe drought on growth and wood-anatomical properties of *Quercus faginea*. *IAWA Journal* 25(2), 185-204.
- Corcuera, L., Camarero, J.J. & Gil-Peigrín, E. 2004b. Effects of a severe drought on *Quercus ilex* radial growth and xylem anatomy. *Trees Structure and Function* 18, 83-92.
- Corcuera, L., Camarero, J.J., Sisó S., & Gil-Peigrín, E. 2006. Radial-growth and wood-anatomical changes in overaged *Quercus pyrenaica* coppice stands: functional responses in a new Mediterranean landscape. *Trees Structure and Function* 20 (1), 91-98.
- Corcuera, L., Morales, F., Abadía, A. & Gil-Peigrín, E. 2005a. Seasonal changes in photosynthesis and photoprotection in a *Quercus ilex* subsp. *ballota* woodland located in its upper altitudinal extreme in the Iberian Peninsula. *Tree Physiology* 25, 599-608.
- Corcuera, L., Morales, F., Abadía, A. & Gil-Peigrín, E. 2005b. The effect of low temperatures on the photosynthetic apparatus of *Quercus ilex* subsp. *ballota* at its lower and upper altitudinal limits in the Iberian peninsula and during a single freezing-thawing cycle. *Trees Structure and Function* 19, 99-108.
- Cornic, G. and J.-M. Briantais. 1991. Partitioning of photosynthetic electron flow between CO₂ and O₂ reduction in a C₃ leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO₂ concentrations and during drought stress. *Planta* 183, 178-184.
- Costa Tenorio, M., Morla, C. & Sainz Ollero, H. 1997. *Los bosques ibéricos. Una interpretación geobotánica*. Editorial Planeta, Madrid.
- Court-Picon, M., Gadbin-Henry, C., Guival, F. & Roux, M. 2004. Dendrometry and morphometry of *Pinus pinea* L. in Lower Provence (France): adaptability and variability of provenances. *Forest Ecology and Management* 94(1-3), 319-333.
- Cramer, H.H. 1984. On the predisposition to disorders of Middle European forests. *Planzenschutz-Nachrichten Bayer* 2, 97-207.
- Cui, M., Vogelmann, T.C. & Smith, W.K. 1991. Chlorophyll and light gradients in sun and shade leaves of *Spinacia oleracea*. *Plant, Cell and Environment* 14, 493-500.

D

- Dau, H. 1994. Molecular mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence. *Photochemistry and Photobiology* 60, 1-23.
- Daughtry, C.S.T., Walthall, C.L., Kim, M.S., de Colstoun, E.B. & McMurtrey, J.E. 2000. Estimating corn leaf chlorophyll status from leaf and canopy reflectance. *Remote Sensing of Environment* 74, 229-239.
- Davis, S.D., Ewers, F.W., Sperry, J.S., Portwood, K.A., Crocker, M.C. & Adams, G.C. 2002. Shoot dieback during prolonged drought in *Ceanothus* (*Rhamnaceae*) chaparral of California: a possible case of hydraulic failure. *American Journal of Botany* 89, 820-828.
- Davis, S.D., Kolb, K.J. & Barton, K.P. 1998. Ecophysiological processes and demographic patterns in the structuring of California chaparral. En *Landscape degradation and biodiversity in Mediterranean-type ecosystems*. Eds. P.W. Rundel, G. Montenegro & F. Jaksic. Berlin, Springer-Verlag, pp. 297-310.
- Davis, S.D., Sperry, J.S. & Hacke, U.G. 1999. The relationship between xylem conduit diameter and cavitation caused by freezing. *American Journal of Botany* 86, 1367-1372.
- De las Rivas, J., Abadía, A. & Abadía, J. 1989. A new reversed phase HPLC method resolving all major higher plant photosynthetic pigments. *Plant Physiology* 91, 190-192.
- Del Tredici, P. 2001. Sprouting in temperate trees: a morphological and ecological review. *Botanical Review* 67, 121-140.
- Demmig, B., Winter, K., Krüger, A. & Czygan, F.C. 1987. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant Physiology* 84, 218-224.
- Demmig-Adams, B. & Adams III, W.W. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 575-588.
- Demmig-Adams, B. & Adams III, W.W. 1996. Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plants. *Planta* 198, 460-470.
- Demmig-Adams, B. & Adams III, W.W. 2006. Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytologist* 172, 11-21.

-
- Demmig-Adams, B., Adams III, W.W., Barker, D.H., Logan, B.A., Bowling, D.R. & Verhoeven, A.S. 1996. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum* 98, 253-264.
- Demmig-Adams, B., Ebbert, V., Mellman, D.L., Mueh, K.E., Schaffer, L., Funk, C., Zarter, R., Adamska, I., Jansson, S. & Adams III, W.W. 2006. Modulation of PsbS and flexible vs sustained energy dissipation by light environment in different species. *Physiologia Plantarum* 127, 670-680.
- Demmig-Adams, B., Winter, K., Krüger, A. & Czygan, F.C. 1989. Light stress and photoprotection related to the carotenoid zeaxanthin in higher plants. En *Photosynthesis*. Ed. W.R. Briggs. Alan R. Liss, Inc. New York, pp. 375-391.
- Díaz, H.F. & Bradley, R.S. 1997. Temperature variations during the last century at high elevation. *Climatic Change* 36, 254–279.
- Di Castri, F. 1981. Mediterranean-type shrublands of the world. En *Mediterranean-type shrublands*. Eds. F. Di Castri, D.W. Goodall & R.L. Specht. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-52.
- Donabauer, E. & Ciesla, W.M. (1992). Dieback and decline forest: a global overview. FAO, United Nations, Roma.
- Dwyer, J.P., Cutter, B.E. & Wetteroff, J.J. 1995. A dendrochronological study of black and scarlet oak decline in the Missouri Ozarks. *Forest Ecology and Management* 75, 69-75.

E

- Eisenhauer, D.R. 1991. Development of the ecological stability of oak stands in the central and northeastern diluvium region of Germany. *Ekologia* 10, 353-371.
- Epron, D. & Dreyer, E. 1992. Effect of a severe dehydration on leaf photosynthesis in *Quercus petraea* (Mtt.) Liebl.: photosystem II and electrolyte leakage. *Tree Physiology* 10, 273-284.
- Epron, D. & Dreyer, E. 1993. Photosynthesis of oak leaves under water stress: maintenance of high photochemical efficiency of photosystem II and occurrence of non-uniform CO₂ assimilation. *Tree Physiology* 13, 107-117.
- Esteso-Martínez, J., Camarero, J.J. & Gil-Pelegrín, E. 2006a. Competitive effects of herbs on *Quercus faginea* seedlings inferred from vulnerability curves and

- spatial-pattern analyses in a Mediterranean stand (Iberian System, northeast Spain). *Ecoscience* 13(3), 378-387.
- Esteso-Martínez, J. & Gil-Pelegrín, E. 2004. Frost resistance of seeds in Mediterranean oaks and the role of litter in the thermal protection of acorns. *Annals of Forest Science* 61, 481-486.
- Esteso-Martínez, J., Valladares, F., Camarero, J.J. & Gil-Pelegrín, E. 2006b. Crown architecture and leaf habit are associated with intrinsically different light-harvesting efficiencies in *Quercus* seedlings from contrasting environments. *Annals of Forest Science* 63, 511-518.
- Evain, S., Flexas, J. & Moya, I. 2004. A new instrument for passive remote sensing: 2. Measurement of leaf and canopy reflectance changes at 531 nm and their relationship with photosynthesis and chlorophyll fluorescence. *Remote Sensing of Environment* 91, 175-185.
- Evans, J.R. 1999. Leaf anatomy enables more equal access to light and CO₂ between chloroplasts. *New Phytologist* 143, 93-104.
- Evans, J.R., Jakobsen, I. & Ögren, E. 1993. Photosynthetic light response curves. 2. Gradients of light absorption and photosynthetic capacity. *Planta* 189, 191-200.
- Evans, J.R. & Vogelmann, T.C. 2006. Photosynthesis within isobilateral *Eucalyptus pauciflora* leaves. *New Phytologist* 171(4), 771-782.
- Evans, J.R. & von Caemmerer, S. 1996. Carbon dioxide diffusion inside leaves. *Plant Physiology* 110, 339-346.

F

- Faria, T., García-Plazaola, J.I., Abadía, A., Cerasoli, S., Pereira, J.S. & Chaves, M.M. 1996. Diurnal changes in photoprotective mechanisms in leaves of cork oak (*Quercus suber*) during summer. *Tree Physiology* 16, 115-123.
- Faria, T., Silverio, D., Breia, E., Cabral, R., Abadía, A., Abadía, J., Pereira, J.S. & Chaves, M.M. 1998. Differences in the response of carbon assimilation to summer stress (water deficits, high light and temperature) in four Mediterranean tree species. *Physiologia Plantarum* 102, 419-428.
- Fernández-Cancio, A. & Manrique-Menéndez, E. 2001. Programas GENPT para la reconstrucción de una estación meteorológica con resolución mensual en

- cualquier punto del territorio español, conocidas sus coordenadas y su altitud. Software Registration 106.649, Spain.
- Fernández-Cancio, A., Manrique-Menéndez, E., Navarro-Cerrillo, R. & Fernández-Fernández, R. 2004. El síndrome de la Seca en el ecosistema de los *Quercus*: Enfoque climático. En *La Seca: El decaimiento de encinas, alcornoques y otros Quercus en España*. Ministerio de Medio Ambiente, Organismo Autónomo Parques Nacionales, Madrid, pp. 153-169.
- Flexas, J., Badger, M., Chow, W.S., Medrano, H. & Osmond, C.B. 1999a. Analysis of the relative increase in photosynthetic CO₂ uptake when photosynthesis in grapevine leaves is inhibited following low night temperatures and/or water stress. *Plant Physiology* 121, 675-684.
- Flexas, J., Bota, J., Escalona, J.M., Sampol, B. & Medrano, H. 2002a. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Functional Plant Biology* 29, 461-471.
- Flexas, J., Escalona, J.M., Evain, S., Gulías, J., Moya, I., Osmond, C.B. & Medrano, H. 2002b. Steady-state chlorophyll fluorescence (Fs) as an indicator of leaf photosynthesis and stomatal conductance under drought conditions. *Physiologia Plantarum* 114, 231-240.
- Flexas, J., Escalona J.M. & Medrano, H. 1998. Down-regulation of photosynthesis by drought under field conditions in grapevine leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 25, 893-900.
- Flexas, J., Escalona, J.M. & Medrano, H. 1999b. Water stress induces different levels of photosynthesis and electron transport rate regulation in grapevines. *Plant, Cell and Environment* 22, 39-48.
- Flexas, J. & Medrano, H. 2002a Drought-inhibition of photosynthesis in C₃ plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany* 89, 183-189.
- Flexas, J. & Medrano, H. 2002b. Energy dissipation in C₃ plants under drought. *Functional Plant Biology* 29, 1209-1215.
- Foody, G.M. & Cutler, M.E.J. 2006. Mapping the species richness and composition of tropical forests from remotely sensed data with neural networks. *Ecological Modelling* 195 (1-2), 37-42.
- Führer, E. 1998. Oak decline in Central Europe: a synopsis of hypotheses. En *Proceedings: Population dynamics, impacts, and integrated management of forest defoliating insects*. Eds. M.L. McManus & A.M: Liebhold. USDA Forest Service, General Technical Report, pp. 7-24.

Fukshansky, L. 1981. Optical properties of plants. En *Plants and the daylight spectrum*. Ed. H. Smith. Academic Press, London, pp. 21-40.

G

- Galmés, J., Abadía, A., Cifre, J., Medrano, H. & Flexas, J. 2007. Photoprotection processes under water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits. *Physiologia Plantarum* 130 (4), 495-510.
- Gamon, J.A., Field, C.B., Bilger, W., Björkman, O., Freedman, A.L. & Peñuelas, J. 1990. Remote sensing of the xanthophyll cycle and chlorophyll fluorescence in sunflower leaves and canopies. *Oecologia* 85, 1-7.
- Gamon, J.A., Field, C.B., Goulden, M.L., Griffin, K.L., Hartley, A.E., Joel, G., Peñuelas, J. & Valentini, R. 1995. Relationships between NDVI, canopy structure, and photosynthesis in three Californian vegetation types. *Ecological Applications* 5, 28-41.
- Gamon, J.A., Peñuelas, J. & Field, C.B. 1992. A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency. *Remote Sensing of Environment* 41, 35-44.
- Gamon, J.A., Serrano, L. & Surfus, J.S. 1997. The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels. *Oecologia* 112, 492-501.
- Gamon, J.A. & Surfus, J.S. 1999 Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer. *New Phytologist* 143, 105-117.
- Gandullo, J.M. & Sánchez Palomares, O. 1994. *Estaciones ecológicas de los pinares españoles*. ICONA, Col. Técnica, Madrid.
- García-López, J.M., Gonzalo-Jiménez, J. & Allué-Camacho, C. 2002. Caracterización fitoclimática de procedencias de encinar (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf) Samp y *Quercus ilex* L. subsp. *ilex*) en el centro-norte peninsular. *Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales* 11, 77-96.
- Gastellu-Etcheberry, J.P., Guillevic, P., Zagolski, F., Demarez, V., Trichon, V., Demarez, D. & Leroy, M. 1999. Modelling BRF and radiation regime of tropical and boreal forests: Part I. BRF. *Remote Sensing of Environment* 68, 281-316.
- Gaston, K.J. 2003. *The structure and Dynamics of Geographic Ranges*. Oxford Univ. Press, New York.

- Genty, B., Briantais, J.M. & Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990, 87-92.
- Gil, E., Corcuera, L., Camarero, J.J. & Martín-Bernal, E. 2004. La Seca no parasitaria: Aproximación funcional al decaimiento de los *Quercus*. En *La Seca: El decaimiento de encinas, alcornoques y otros Quercus en España*. Ministerio de Medio Ambiente, Organismo Autónomo Parques Nacionales, Madrid, pp. 299-315.
- Gil-Pelegrín, E., Aranda, I., Peguero-Pina, J.J. & Vilagrosa, A. 2005. El continuo suelo-planta-atmósfera como un modelo integrador de la ecofisiología forestal. *Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales* 14(3), 358-370.
- Giovannini, G., Perulli, D., Piussi, P. & Salbitano, F. 1992. Ecology of vegetative regeneration after coppicing in macchia stands in Central Italy. *Plant Ecology* 99-100(1), 331-343.
- Gitelson, A.A. & Merzlyak, M.N. 1996. Signature analysis of leaf reflectance spectra: Algorithm development for remote sensing of chlorophyll. *Journal of Plant Physiology* 148, 494-500.
- Gitelson, A., Merzlyak, M. & Lichtenthaler, H. 1996. Detection of red edge position and chlorophyll content by reflectance measurements near 700 nm. *Journal of Plant Physiology* 148, 501-205.
- Glynn, C. & Lindelöw, A. 2002. Defoliation by the needle-shortening pine gall midge *Thecodiplosis brachyntera*, on pines in central Sweden. *Scandinavian Journal of Forest Research* 17 (2), 150-157.
- Gonçalves-Alvim, S.J., Korndorf, G. & Fernandes, G.W. 2006. Sclerophylly in *Qualea parviflora* (Vochysiaceae): influence of herbivory, mineral nutrients and water status. *Plant Ecology* 187(2): 153-162.
- González-Cascón, M.R., Alcubilla, M. & Rehfuess, K.E. 1985. Wirkungen von Magnesium- und Calcium –Sulfat und –Carbonat auf Spross- und Wurzelentwicklung junger Weisstannen (*Abies alba* Mill.) im Topfversuch mit sauren Böden. *Forst und Jagdzeitung* 161, 21-28.
- Govindjee. 1995. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology* 22, 131-160.
- Grace, J., Nichol, C., Disney, M., Lewis, P., Quaife, T. & Bowyer, P. 2007. Can we measure terrestrial photosynthesis from space directly, using spectral reflectance and fluorescence? *Global Change Biology* 13, 1484-1497.

- Grieu, P., Guehl, J.M. & Aussenac, G. 1988. The effects of soil and atmospheric drought on photosynthesis and stomatal control of gas exchange in three coniferous species. *Physiologia Plantarum* 73, 97-104.
- Groom, Q.J., Baker, N.R. & Long, S.P. 1991. Photoinhibition of holly (*Ilex aquifolium*) in the field during the winter. *Physiologia Plantarum* 83, 585-590.
- Guehl, J.M. & Aussenac, G. 1987. Photosynthesis decrease and stomatal control of gas exchange in *Abies alba* Mill. in response to vapor pressure difference. *Plant Physiology* 83, 316-322.
- Guehl, J.M., Aussenac, G., Bouachrine, J., Zimmermann, R., Pennes, J.M., Ferhi, A. & Grieu, P. 1991. Sensitivity of leaf gas exchange to atmospheric drought, soil drought, and water use efficiency in some Mediterranean *Abies* species. *Canadian Journal of Forest Research* 21, 1507-1515.
- Gulías, J., Flexas, J., Abadía, A. & Medrano, H. 2002. Photosynthetic responses to water deficit in six Mediterranean sclerophyll species: possible factors explaining the declining distribution of an endemic Balearic species (*Rhamnus ludovici-salvatoris*). *Tree Physiology* 22, 687-698.
- Guo, J. & Trotter, C.M. 2004. Estimating photosynthetic light-use efficiency using the photochemical reflectance index: variations among species. *Functional Plant Biology* 31, 255-265.

H

- Hacke, U.G., Sperry, J.S. & Pitterman, J. 2000. Drought experience and cavitation resistance in six shrubs from the Great Basin, Utah. *Basic and Applied Ecology* 1, 31-41.
- Hacke, U.G., Sperry, J.S., Wheeler, J.K. & Castro, L. 2006. Scaling of angiosperm xylem structure with safety and efficiency. *Tree Physiology* 26(6), 689-701.
- Hacker, J. & Neuner, G. 2007. Ice propagation in plants visualized at the tissue level by infrared differential thermal analysis (IDTA). *Tree Physiology* 27(12), 1661-1670.
- Harbinson, J., Genty, B. & Baker N.R. 1989. Relationship between the quantum efficiencies of Photosystems I and II in pea leaves. *Plant Physiology* 90, 1029-1034.

- Harris, R.A. 2002. *Proceedings of the FLEX workshop*. 19/20 Junio 2002. Noordwijk-The Netherlands. ESA Publications Division, ISBN 92-9092-837-9.
- Havaux, M. 1992. Photoacoustic measurements of cyclic electron flow around photosystem I in leaves adapted to light-states 1 and 2. *Plant and Cell Physiology* 33, 799-803.
- Hertel, G. 1988. Proceedings of the US/FRG research symposium: effects of atmospheric pollutants on the spruce-fir forests of the Eastern United States and the Federal Republic of Germany. 1987 October 19-23, Burlington, VT. USDA For. Serv., Gen. Tech. Rep. NE-120.
- Huang, Z., Turner, B.J., Dury, S.J., Wallis, I.R. & Foley, W.J. 2004. Estimating foliage nitrogen concentration from HYMAP data using continuum removal analysis. *Remote Sensing of Environment* 93, 18-29.
- Hurme, P., Sillanpää, M.J., Arjas, E., Repo, T. & Savolainen, O. 2000. Genetic basis of climatic adaptation in Scots pine by Bayesian quantitative trait locus analysis. *Genetics* 156, 1309-1322.

I

- Inoue, Y. & Shibata, K. 1973. Light-induced chloroplast rearrangements and their action spectra as measured by absorption spectrophotometry. *Planta* 114, 341-358.
- IPCC. 2001. *Climate change 2001: the scientific basis*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ivanov, A.G., Krol, M., Sveshnikov, D., Malmberg, G., Gardeström, P, Hurry, V., Öquist, G. & Huner, N.P.A. 2006. Characterization of the photosynthetic apparatus in cortical bark chlorenchyma of Scots pine. *Planta* 223, 1165-1177.

J

- Jalas, J., Suominen, J. & Lampinen, R. 1999. *Atlas Florae Europaeae*. En: <http://www.fmnh.helsinki.fi/english/botany/afe/index.htm>.
- Jarvis, A.J. & Davies, W.J. 1997. Whole plant water flux and the regulation of water loss by plants. *Plant, Cell and Environment* 20, 521-527.

- Jones, H.G. 1992. *Plants and Microclimate. A quantitative approach to environmental plant physiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Joosen, R., Lammers, M., Balk, P., Bronnum, P., Konings, M., Perks, M., Stattin, E., Van Wordragen, M. & Van Der Geest, A. 2006. Correlating gene expression to physiological parameters and environmental conditions during cold acclimation of *Pinus sylvestris*, identification of molecular markers using cDNA microarrays. *Tree Physiology* 26, 1297-1313.
- Joshi, M.K. & Mohanty, P. 1995. Probing photosynthetic performance by chlorophyll a fluorescence: analysis and interpretation of fluorescence parameters. *Journal of Scientific & Industrial Research (India)* 54, 155-174.
- Juknys, R., Vencloviene, J., Stravinskiene, V., Augustaitis, A. & Bartkevicius, E. 2003. Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) growth and condition in a polluted environment: from decline to recovery. *Environmental Pollution* 125(2), 205-212.

K

- Karabourniotis, G., Bornman, J.F. & Nikolopoulos, D. 2000. A possible optical role of the bundle sheath extensions of the heterobaric leaves of *Vitis vinifera* and *Quercus coccifera*. *Plant, Cell and Environment* 23, 423-430.
- Kempeneers, P., Zarco-Tejada, P.J., North, P.R.J., De Backer, S., Delalieux, S., Sepulcre-Cantó, G., Morales, F., Van Aardt, J.A.N., Sagardoy, R., Coppin, P. & Scheunders, P. 2008. Model inversion robustness under changing viewing conditions for chlorophyll estimation from hyperspectral imagery. *International Journal of Remote Sensing*, en prensa.
- Kerstiens, G. 1996. Cuticular water permeability and its physiological significance. *Journal of Experimental Botany* 47, 1813-1832.
- Kolb, C.A., Schreiber, U., Gademann, R. & Pfündel, E.E. 2005. UV-A screening in plants determined using a new portable fluorometer. *Photosynthetica* 43(3), 371-377.
- Körner, Ch. 1995. Leaf diffusive conductances in the major vegetation types of the globe. En *Ecophysiology of Photosynthesis*. Eds. E.D. Schulze & M.M. Caldwell. Springer-Verlag, Berlin, pp. 463-490.

-
- Kornyeyev, D. & Hendrickson, L. 2007. Energy partitioning in photosystem II complexes subjected to photoinhibitory treatment. *Functional Plant Biology* 34 (3), 214-220.
- Kozłowski, T.T., Kramer, P.J. & Pallardy, S.G. 1991. The physiological ecology of woody plants. Academic Press, Toronto.
- Krall, J.P. & Edwards, G.E. 1992. Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves. *Physiologia Plantarum* 86, 180-197.
- Krause, G.H. 1973. The high-energy state of the thylakoid system as indicated by chlorophyll fluorescence and chloroplast shrinkage. *Biochimica et Biophysica Acta* 292, 715-728.
- Krause, G.H. & Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 313-349.
- Kummerov, J. 1973. Comparative anatomy of sclerophylls of Mediterranean climate areas. En *Mediterranean-type ecosystems: origin and structure*. Eds. F. Di Castri & H.A. Mooney. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 213-224.

L

- Langenfeld-Heyser, R., Schella, B., Buschmann, K. & Speck, F. 1996. Microautoradiographic detection of CO₂ fixation in lenticel chlorenchyma of young *Fraxinus excelsior* L. stems in early spring. *Trees Structure and Function* 10, 255-260.
- Larbi, A., Abadía, A., Morales, F. & Abadía, J. 2004. Fe resupply to Fe-deficient sugar beet plants leads to rapid changes in the violaxanthin cycle and other photosynthetic characteristics without significant de novo chlorophyll synthesis. *Photosynthesis Research* 79, 59-69.
- Larcher, W. 2000. Temperature stress and survival of Mediterranean sclerophyllous plants. *Plant Biosystems* 134, 279-295.
- Larcher, W. 2003. *Physiological plant ecology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Levitt, J. 1980. *Responses of plants to environmental stresses. Water, radiation, salt and other stresses*. Academic Press, New York.

- Lev-Yadun, S. & Ne'eman, G. 2004. When may green plants be aposematic? *Biological Journal of the Linnean Society* 81(3), 413-416.
- Lewis, R. & Olivera, F.L. 1979. Live oak decline in Texas. *Journal of Arboriculture* 5, 241-244.
- Li, D., Junttila, O. & Palva, E.T. 2004. Environmental regulation and physiological basis of freezing tolerance in woody plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 26, 213-222.
- Li, P.M., Fang, P., Wang, W.B., Gao, H.Y. & Peng, T. 2007. The higher resistance to chilling stress in adaxial side of *Rumex* K-1 leaves is accompanied with higher photochemical and non-photochemical quenching. *Photosynthetica* 45(4), 496-502.
- Li, X.P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A.R., Rosenquist, M., Jansson, S. & Niyogi, K.K. 2000. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403, 391-395.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods In Enzymology* 148, 350-382.
- Lloret, F. & Siscart, D. 1995. Los efectos demográficos de la sequía en poblaciones de encina. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales* 2, 77-81.
- Lo Gullo, M.A. & Salleo, S. 1988. Different strategies of drought resistance in three Mediterranean sclerophyllous trees growing in the same environmental conditions. *New Phytologist* 108, 267-276.
- Louis, J., Cerovic, Z.G. & Moya, I. 2006. Quantitative study of fluorescence excitation and emission spectra of bean leaves. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 85, 65-71.
- Lu, P., Colombo, S.J. & Sinclair, R.W. 2007. Cold hardiness of interspecific hybrids between *Pinus strobus* and *P. wallichiana* measured by post-freezing needle electrolyte leakage. *Tree Physiology* 27, 243-250.
- Lu, P., Joyce, D.G. & Sinclair, R.W. 2003. Geographic variation in cold hardiness among eastern white pine (*Pinus strobus* L.) provenances in Ontario. *Forest Ecology and Management* 178 (3), 329-340.
- Luisi, N., Lerario, P. & Vannini, A. 1993. Recent advances in studies on oak decline. Proc. Int. Congress, Brindisi, Italy, September 13-18, 1992.
- Lumaret, R., Mir, C., Michaud, H. & Raynal, V. 2002. Phylogeographical variation of chloroplast DNA in holm oak (*Quercus ilex* L.). *Molecular Ecology* 11, 2327-2336.

Luoranen, J., Repo, T. & Lappi, J. 2004. Assessment of the frost hardiness of shoots of silver birch (*Betula pendula*) seedlings with and without controlled exposure to freezing. *Canadian Journal of Forest Research* 34, 1108-1118.

M

Macias, M., Andreu, L., Bosch, O., Camarero, J.J. & Gutiérrez, E. 2006. Increasing aridity is enhancing Silver fir (*Abies alba* Mill.) water stress in its south-western distribution limit. *Climatic Change* 79, 289-313.

Maherali, H., Pockman, W. & Jackson, R. 2004. Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation. *Ecology* 85 (8), 2184-2199.

Manion, P.D. 1991. *Tree Disease Concepts*. Prentice-Hall, Londres.

Manrique, E. & Fernández-Cancio, A. 2000. Extreme climatic events in dendroclimatic reconstructions from Spain. *Climatic Change* 44, 123-138.

Marañón, T., Ajbilou, R., Ojeda, F. & Arroyo, J. 1999. Biodiversity of woody species in oak woodlands of southern Spain and northern Morocco. *Forest Ecology and Management* 115, 147-156.

Markstädter, C., Queck, I., Baumeister, J., Riederer, M., Schreiber, U. & Bilger, W. 2001. Epidermal transmittance of leaves of *Vicia faba* for UV radiation as determined by two different methods. *Photosynthesis Research* 67, 17-25.

Martín-Albertos, S., Díaz Fernández, P.M. & De Miguel, J. 1998. *Regiones de procedencia de especies forestales españolas*. Organismo Autónomo Parques Nacionales, Madrid.

Martínez-Ferri, E., Balaguer, L., Valladares, F., Chico, J.M. & Manrique, E. 2000. Energy dissipation in drought-avoiding and drought-tolerant tree species at midday during the Mediterranean summer. *Tree Physiology* 20, 131-138.

Martínez-Vilalta, J., Mangirón, M., Ogaya, R., Sauret, M., Serrano, L., Peñuelas, J. & Piñol, J. 2003. Sap flow of three co-occurring Mediterranean woody species under varying atmospheric and soil water conditions. *Tree Physiology* 23, 747-758.

Martínez-Vilalta, J. & Piñol, J. 2002. Drought-induced mortality and hydraulic architecture in pine populations of the NE Iberian Peninsula. *Forest Ecology and Management* 161, 247-256.

- Matzner, S.L., Rice, K.J. & Richards, J.H. 2001. Intra-specific variation in xylem cavitation in interior live oak (*Quercus wislizenii* A. DC.). *Journal of Experimental Botany* 52(357), 783-789.
- Mayr, S., Wieser, G. & Bauer, H. 2006. Xylem temperatures during winter in conifers at the alpine timberline. *Agricultural and Forest Meteorology* 137, 81-88.
- Mediavilla, S. & Escudero, A. 2003. Stomatal responses to drought at a Mediterranean site: a comparative study of co-occurring woody species differing in leaf longevity. *Tree Physiology* 23, 987-996.
- Medina, E., García, V. & Cuevas, E. 1990. Sclerophylly and oligotrophic environments: relationships between leaf structure, mineral nutrient content and drought resistance in tropical rain forests of the upper Rio Negro region. *Biotropica* 22(1), 51-64.
- Medrano, H., Bota, J., Abadía, A., Sampól, B., Escalona, J.M. & Flexas, J. 2002. Effects of drought on light-energy dissipation mechanisms in high-light-acclimated, field-grown grapevines. *Functional Plant Biology* 29, 1197-1207.
- Méthy, M. 2000. A two-channel hyperspectral radiometer for the assessment of photosynthetic radiation use efficiency. *Journal of Agricultural Engineering Research* 75, 107-110.
- Méthy, M., Joffre, R. & Rambal, S. 1999. Remote sensing of canopy photosynthetic performances: Two complementary ways for assessing the photochemical reflectance index. *Photosynthetica* 37, 239-247.
- Mitrakos, K. 1980. A theory for Mediterranean plant life. *Acta Oecologica / Oecologia Plantarum* 1, 245-252.
- Montenegro, G., Ginocchio, E.R., Segura, A., Keely, J.E. & Gómez, M. 2004. Fire regimes and vegetation responses in two Mediterranean-climate regions. *Revista chilena de historia natural* 77, 455-464.
- Morales, F., Abadía, A. & Abadía, J. 1990. Characterization of the xanthophyll cycle and other photosynthetic pigment changes induced by iron deficiency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiology* 94, 607-613.
- Morales, F., Abadía, A. & Abadía, J. 1991. Chlorophyll fluorescence and photon yield of oxygen evolution in iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiology* 97, 886-893.
- Morales, F., Abadía, A. & Abadía, J. 1998. Photosynthesis quenching of chlorophyll fluorescence and thermal energy dissipation in iron-deficient sugar beet leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 25, 403-412.

- Morales, F., Abadía, A. & Abadía, J. 2006. Photoinhibition and photoprotection under nutrient deficiencies, drought and salinity. En *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment*. Eds. B. Demmig-Adams, W.W. Adams III & A.K. Mattoo. Springer, The Netherlands, pp. 65-85.
- Morales, F., Abadía, A., Abadía, J., Montserrat, G. & Gil-Pelegrín, E. 2002. Trichomes and photosynthetic pigment composition changes: responses of *Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp. and *Quercus coccifera* L. to Mediterranean stress conditions. *Trees Structure and Function* 16, 504-510.
- Morales, F., Belkhodja, R., Abadía, A. & Abadía, J. 2000. Photosystem II efficiency and mechanism of energy dissipation in iron-deficient, field grown pear trees (*Pyrus communis* L.). *Photosynthesis Research* 63: 9-21.
- Morales, F., Moise, N., Quílez, R., Abadía, A., Abadía, J. & Moya, I. 2001. Iron deficiency interrupts energy transfer from a disconnected part of the antenna to the rest of photosystem II. *Photosynthesis Research* 70, 207-220.
- Morosinotto, T., Baronio, R. & Bassi, R. 2002. Dynamics of chromophore binding to Lhc proteins in vivo and in vitro during operation of the xanthophyll cycle. *Journal of Biological Chemistry* 277, 36913-36920.
- Moya, I., Camenen, L., Evain, S., Goulas, Y., Cerovic, Z.G., Latouche, G., Flexas, J. & Ounis, A. 2004. A new instrument for passive remote sensing 1. Measurements of sunlight-induced chlorophyll fluorescence. *Remote Sensing of Environment* 91, 186-197.
- Müller, P., Li, X.P. & Niyogi, K.K. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology* 125, 1558-1566.

N

- Neuner, G. & Buchner, O. 1999. Assessment of foliar frost damage: a comparison of in vivo chlorophyll fluorescence with other viability tests. *Journal of Applied Botany* 73, 50-54.
- Nilsen, E.T. & Muller W.H. 1981. Phenology of the summer deciduous shrub *Lotus scoparius*. Climatic controls and adaptive significance. *Ecological Monographs* 51, 323-341.
- Nishio, J.N. 2000. Why are higher plants green? Evolution of the higher plant photosynthetic pigment complement. *Plant, Cell and Environment* 23, 539-548.

- Nishio, J.N., Sun, J. & Vogelmann, T.C. 1993. Carbon fixation gradients across spinach leaves do not follow internal light gradients. *The Plant Cell* 5, 953-961.
- Niyogi, K.K. 1999. Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 333-359.

O

- Oak, S., Tainter, F., Williams, J. & Starkey, D. 1996. Oak decline risk rating for the southeastern United States. Ecology and Physiology of Oaks in a Changing Environment Symposium (Sept. 1994, Nancy, France). *Annales des Sciences Forestieres* 53, 721-730.
- Ogaya, R. & Peñuelas, J. 2006. Contrasting foliar responses to drought in *Quercus ilex* and *Phillyrea latifolia*. *Biologia Plantarum* 50(3), 373-382.
- O'Neill, G.A., Adams, W.T. & Aitken, S.N. 2001. Quantitative genetics of spring and fall cold hardiness in seedlings from two Oregon populations of coastal Douglas-fir. *Forest Ecology and Management* 149 (1-3), 305-318.
- Öquist, G. & Huner, N.P.A. 2003. Photosynthesis of overwintering evergreen plants. *Annual Review of Plant Biology* 54, 329-355.
- Ortigosa, L., García-Ruiz, J.M. & Gil, E. 1990. Land reclamation by reforestation in the Central Pyrenees. *Mountain Research and Development* 10, 281-288.
- Osborne, B.A. & Raven, J.A. 1986. Light absorption by plants and its implications for photosynthesis. *Biological Reviews* 61, 1-61.
- Outlaw, W.H. Jr. 1987. A minireview: Comparative biochemistry of photosynthesis in palisades cells, spongy cells, and guard cells of C₃ leaves. *Progress in Photosynthesis Research* 4, 265-272.

P

- Papageorgiou, G. 1975. Chlorophyll fluorescence: an intrinsic probe of photosynthesis. En *Bioenergetics of Photosynthesis*. Ed. Govindjee. Academic Press, New York, pp. 319-371.

-
- Parkhurst, D.F. 1986. Internal leaf structure: a three dimensional perspective. En *On the economy of plant form and function*. Ed. T.J. Givnish. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 215-249.
- Pataki, D.E., Oren, R. & Phillips, N. 1998. Responses of sap flux and stomatal conductance of *Pinus taeda* L. trees to stepwise reductions in leaf area. *Journal of Experimental Botany* 49, 871-878.
- Peguero-Pina, J.J., Morales, F., Flexas, J., Gil-Pelegri n, E. & Moya, I. 2008. Photochemistry, remotely sensed physiological reflectance index and deepoxidation state of the xanthophyll cycle in *Quercus coccifera* under intense drought. *Oecologia* 156(1), 1-11.
- Peinado, M., Alcaraz, F., Aguirre, J.L. & Mart nnez-Parras, J.M. 1997. Vegetation formations and associations of the zonobiomes along the North American Pacific coast: from northern California to Alaska. *Plant Ecology* 129, 29-47.
- Peñuelas, J. & Filella, I. 1998. Visible and near-infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological status. *Trends in Plant Science* 3, 151-156.
- Peñuelas, J., Filella, I. & Gamon, J.A. 1995. Assessment of photosynthetic radiation-use efficiency with spectral reflectance. *New Phytologist* 131, 291-296.
- Peñuelas, J., Filella, I., Lloret, F., Pi ol, J. & Siscart, D. 2000. Effects of a severe drought on water and nitrogen use by *Quercus ilex* and *Phyllirea latifolia*. *Biologia Plantarum* 43, 47-53.
- Peñuelas, J., Gamon, J.A., Freeden, A.L., Merino, J. & Field, C.B. 1994. Reflectance indices associated with physiological changes in nitrogen- and water-limited sunflower leaves. *Remote Sensing of Environment* 48, 135-146.
- Peñuelas, J., Lloret, F. & Montoya, R. 2001. Severe drought effects on Mediterranean woody flora. *Forest Science* 47, 214-218.
- Perks, M.P., Osborne B.A. & Mitchell, D.T. 2004. Rapid predictions of cold tolerance in Douglas-fir seedlings using chlorophyll fluorescence after freezing. *New Forests* 28, 49-62.
- Pfanz, H. 1999. Photosynthetic performance of twigs and stems of trees with and without stress. *Phyton-Annales Rei Botanicae* 39 (3), 29-33.
- Pfanz, H., Aschan, G., Langenfeld-Heyser, R., Wittmann, C. & Loose, M. 2002. Ecology and ecophysiology of tree stems: cortical and wood photosynthesis. *Journal Naturwissenschaften* 89 (4), 147-162.
- Pfündel, E.E. & Dilley, R.A. 1993. The pH dependence of violaxanthin deepoxidation in isolated pea chloroplasts. *Plant Physiology* 101, 65-71.

- Piñol, J., Terradas, J. & Lloret, F. 1998. Climate warming, wildfire hazard, and wildfire occurrence in coastal eastern Spain. *Climatic Change* 38, 345-357.
- Pockman, W.T. & Sperry, J.S. 1997. Freezing-induced xylem cavitation and the northern limit of *Larrea tridentata*. *Oecologia* 109, 19-27.
- Pockman, W.T. & Sperry, J.S. 2000. Vulnerability to xylem cavitation and the distribution of Sonoran desert vegetation. *American Journal of Botany* 87, 1287-1299.
- Poole, D.K. & Miller, P.C. 1975. Water relations of selected species of chaparral and coastal communities. *Ecology* 56, 1118-1128.
- Puértolas, J., Gil, L. & Pardos, J.A. 2005. Effects of nitrogen fertilization and temperature on frost hardiness of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seedlings assessed by chlorophyll fluorescence. *Forestry* 78(5), 501-511.

Q

- Querol, J.V. 1995. *Ecogeografía y explotación forestal en las serranías de Albarracín y Gúdar-Maestrazgo*. Consejo de Protección de la Naturaleza de Aragón, Zaragoza, España.
- Quílez, R., Abadía, A. & Abadía, J. 1992. Characteristics of thylakoids and photosystem II membrane preparations from iron deficient and iron sufficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Plant Nutrition* 15, 1809-1819.

R

- Rahman, A.F., Gamon, J.A., Fuentes, D.A., Roberts, D. & Prentiss, D. 2001. Modelling spatially distributed ecosystem flux of boreal forest using hyperspectral indices from AVIRIS imagery. *Journal of Geophysical Research* 106, 33579-33591.
- Reille, M. & Pons, A. (1992). The ecological significance of sclerophyllous oak forests in the western part of the Mediterranean basin: a note on pollen analytical data. *Vegetatio* 99-100, 13-17.
- Renger, G. & Schreiber, U. 1986. Practical applications of fluorometric methods to algae and higher plant research. En *Light Emission by Plants and Bacteria*. Eds. Govindjee, J. Amesz & D.C. Fork. Academic Press, Orlando, pp. 587-619.

-
- Repo, T., Leinonen, I., Wang, K.Y. & Hänninen, H. 2006. Relation between photosynthetic capacity and cold hardiness in Scots pine. *Physiologia Plantarum* 126, 224-231.
- Repo, T., Zhang, G., Ryyppö, A. & Rikala, R. 2000a. The electrical impedance spectroscopy of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) shoots in relation to cold acclimation. *Journal of Experimental Botany* 51 (353), 2095-2107.
- Repo, T., Zhang, G., Ryyppö, A., Rikala, R. & Vuorinen, M. 2000b. The relation between growth cessation and frost hardening in Scots pine of different origins. *Trees Structure and Function* 14, 456-464.
- Richardson, A.D. & Berlyn, G.P. 2002. Spectral reflectance and photosynthetic properties of *Betula papyrifera* (*Betulaceae*) leaves along an elevational gradient on Mt. Mansfield, Vermont, USA. *American Journal of Botany* 89, 88-94.
- Richardson, A.D., Duigan, S.P. & Berlyn, G.P. 2002. An evaluation of non-invasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist* 153, 185-184.
- Rivas-Martínez, S. 1987. *Memoria del mapa de series de vegetación de España*. ICONA, Madrid.
- Rizzo, D.M. & Garbelotto, M. 2003. Sudden oak death: endangering California and Oregon forest ecosystems. *Frontiers in Ecology and Environment* 1, 197-204.
- Robinson, N., Harper, R.J. & Smettem, K.R.J. 2006. Soil water depletion by *Eucalyptus* spp. Integrated into dryland agricultural systems. *Plant and Soil* 286(1-2), 141-151.
- Rock, B.N., Hoshizaki, T. & Miller, J.R. 1988. Comparison of in situ and airborne spectral measurements of the blue shift associated with forest decline. *Remote Sensing of Environment* 24, 109-127.
- Rockholm, D.C. & Yamamoto, H.Y. 1996. Violaxanthin de-epoxidase (purification of a 43-kilodalton lumenal protein from lettuce by lipid-affinity precipitation with monogalactosyldiacylglyceride). *Plant Physiology* 110, 697-703.
- Rose, R. & Haase, D. 2002. Chlorophyll fluorescence and variations in tissue cold hardiness in response to freezing stress in Douglas-fir seedlings. *New Forests* 23, 81-96.
- Ruban, A.V., Berera, R., Iliaia, C., van Stokkum, I.H.M., Kennis, J.T.M., Pascal, A.A., van Amerongen, H., Robert, B., Horton, P. & van Grondelle, R. 2007. Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature* 450, 575-578.

- Ruban, A.V., Young, A.J. & Horton, P. 1993. Induction of nonphotochemical energy dissipation and absorbance changes in leaves. *Plant Physiology* 102, 741-750.
- Running, S.R. & Nemani, R. 1988. Relating seasonal patterns of the AVHRR vegetation index to simulated photosynthesis and transpiration of forests in different climates. *Remote Sensing of Environment* 24, 347-367.

S

- Sage, R.F., Sharkey, T.D. & Seeman, J.R. 1989. Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ in five C₃ species. *Plant Physiology* 89, 590-596.
- Salleo, S. & Lo Gullo, M.A. 1990. Sclerophylly and plant water relations in three Mediterranean *Quercus* species. *Annals of Botany* 65, 259-270.
- Salleo, S. & Nardini, A. 2000. Sclerophylly: Evolutionary advantage or mere epiphenomenon? *Plant Byosistems* 134(3), 247-259.
- Sánchez, M.E., Caetano, P., Ferraz, J. & Trapero, A. 2002. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in southwestern Spain. *Forest Pathology* 32, 5-18.
- Sánchez, M.E., Navarro, R.M., Trapero, A. & Fernández, P. 2000. La "seca" de encinas y alcornoques: una visión histórica. *Montes* 62, 29-39.
- Sandford, A.P. & Jarvis, P.G. 1986. Stomatal responses to humidity in selected conifers. *Tree Physiology* 2, 89-103.
- Schmieden, U. & Wild, A. 1995. The contribution of ozone to forest decline. *Physiologia Plantarum* 94, 371-378.
- Scholander, P.F., Hammel, H.T., Bradstreet, E.D. & Hemmingsen, E.A. 1965. Sap pressures in vascular plants. *Science* 148, 339-346.
- Schreiber, U. & Bilger, W. 1993. Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past years in retrospect. En *Progress in Botany*. Springer Verlag, Berlin, Heildelberg, pp. 151-173.
- Schreiber, U., Bilger, W. & Neubauer, C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. En *Ecophysiology of Photosynthesis*. Eds. E.D. Schulze & M.M. Caldwell. Springer-Verlag, Berlin, pp. 49-70.
- Schreiber, U., Köhl, M., Klimant, I. & Reising, H. 1996. Measurement of chlorophyll fluorescence within leaves using a modified PAM fluorometer with a fiber-optic microprobe. *Photosynthesis Research* 47, 103-109.

- Schreiber, U., Neubauer, C. & Schliwa, U. 1993. PAM fluorometer based on medium-frequency pulsed Xe-flash measuring light: A highly sensitive new tool in basic and applied photosynthesis research. *Photosynthesis Research* 36, 65-72.
- Schulze, E.D. & Caldwell, M.M. 1994. *Ecophysiology of photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin.
- Schütt, P. & Cowling, E.B. 1985. Waldsterben, a general decline of forests in Central Europe: Symptoms, development, and possible causes. *Plant Disease* 69, 548-558.
- Scortichini, M., Stead, D.E. & Rossi, M.P. 1993. Oak decline: aerobic bacteria associated with declining *Quercus cerris* in central Italy. *European Journal of Forest Pathology* 23, 120-127.
- Sellers, P.J. 1987. Canopy reflectance, photosynthesis and transpiration: II. The role of biophysics in the linearity of their interdependence. *Remote Sensing of Environment* 21, 143-183.
- Seyfried, M. & Fukshansky, L. 1983. Light gradients in plant tissue. *Applied Optics* 22, 1402-1408.
- Shigo, A.L. 1993. 100 tree myths. Shigo and Trees Associates, Durham.
- Shigo, A.L. 1994. A new tree biology: facts, photos and philosophies on trees and their problems and proper care. Shigo and Trees Associates, Durham.
- Sicoli, G., de Gioia, T., Luisi, N. & Lerario, P. 1998. Multiple factors associated with oak decline in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 37, 1-8.
- Sisó, S., Camarero, J.J. & Gil-Pelegri, E. 2001. Relationship between hydraulic resistance and leaf morphology in broadleaf leaf *Quercus* species: a new interpretation of leaf lobation. *Trees Structure and Function* 15, 341-345.
- Skelly, J.M. & Innes, J.L. 1994. Waldsterben in the forests of Central Europe and Eastern North America: Fantasy or reality? *Plant Disease* 78, 1021-1032.
- Sparks, J.P., Campbell, G.S. & Black, R.A. 2001. Water content, hydraulic conductivity and ice formation in winter stems of *Pinus contorta*: a TDR case study. *Oecologia* 127, 468-475.
- Specht, R.L. 1979. Heathlands and related shrublands of the world. En *Ecosystems of the world*. Ed. R.L. Specht. Elsevier Scientific, Amsterdam, Vol 9A, pp. 1-18.
- Sperry, J.S. 2000. Hydraulic constraints on plant gas exchange. *Agricultural and Forest Meteorology* 104 (1), 13-23.
- Sperry, J.S., Donnelly, J.R. & Tyree, M.T. 1988. A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant, Cell and Environment* 11, 35-40.

- Sperry, J.S., Hacke, U.G., Oren, R. & Comstock, J.P. 2002. Water deficits and hydraulic limits to leaf water supply. *Plant, Cell and Environment* 25, 251-263.
- Stylinski, C.D., Gamon, J.A. & Oechel, W.C. 2002. Seasonal patterns of reflectance indices, carotenoid pigments and photosynthesis of evergreen chaparral species. *Oecologia* 131, 366-374.
- Sun, J., Nishio, J.N. & Vogelmann, T.C. 1996. High-light effects on CO₂ fixation gradients across leaves. *Plant, Cell and Environment* 19, 1261-1271.
- Sun, J., Nishio, J.N. & Vogelmann, T.C. 1998. Green light drives CO₂ fixation deep within leaves. *Plant and Cell Physiology* 39, 1020-1026.
- Sundblad, L.G., Andersson, M., Geladi, P., Salomonson, A. & Sjöström, M. 2001. Fast, nondestructive of frost hardiness in conifer seedlings by VIS+NIR spectroscopy. *Tree Physiology* 21, 751-757.

T

- Tainter, F.H., Fraedrich, S.W. & Benson, D.M. 1984. The effect of climate on growth, decline, and death of northern red oaks in the western North Carolina Nantahala Mountains. *Castanea* 49(3), 127-137.
- Tardif, J., Camarero, J.J., Ribas, M. & Gutiérrez, E. 2003. Spatiotemporal variability in radial growth of trees in the Central Pyrenees: climatic and site influences. *Ecological Monographs* 73, 241-257.
- Taulavuori, K., Niinimaa, A., Laine, K., Taulavuori, E. & Lähdesmäki, P. 1997. Modelling frost resistance of Scots pine seedlings using temperature, daylength and pH of cell effusate. *Plant Ecology* 133, 181-189.
- Tenhunen, J.D., Beyschlag, W., Lange, O.L. & Harley, P.C. 1987. Changes during summer drought in leaf CO₂ uptake rates of macchia shrubs growing in Portugal: limitations due to photosynthetic capacity, carboxylation efficiency, and stomatal conductance. En *Plant Response to Stress. Functional Analysis in Mediterranean Ecosystems*. Eds. J.D. Tenhunen, F.M. Catarino, O.L. Lange & W. Oechel. NATO ASI Series, Vol. G15, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 305-327.
- Tenhunen, J.D., Lange O.L. & Braun, M. 1981. Midday stomatal closure in Mediterranean type sclerophylls under simulated habitat conditions in an environmental chamber. *Oecologia* 50, 5-11.

-
- Terashima, I. 1989. Productive structure of a leaf. En *Photosynthesis: Proceedings of the C.S. French Symposium*. Ed. W.R. Briggs. New Cork: Alan R. Liss, Inc., pp. 207-226.
- Terashima, I. & Inoue, Y. 1985a. Palisade tissue chloroplasts and spongy tissue chloroplasts in spinach: Biochemical and ultrastructural differences. *Plant and Cell Physiology* 26, 63-75.
- Terashima, I. & Inoue, Y. 1985b. Vertical gradient in photosynthetic properties of spinach chloroplasts dependent on intra-leaf light environment. *Plant and Cell Physiology* 26, 781-785.
- Terashima, I., Sakaguchi, S. & Hara, N. 1986. Intra-leaf and intracellular gradients in chloroplast ultrastructure of dorsiventral leaves illuminated from the adaxial or abaxial side during their development. *Plant and Cell Physiology* 27, 1023-1031.
- Thomas, F.M., Blank, R. & Hartmann, G. 2002. Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. *Forest Pathology* 32(4/5), 277-307.
- Thomas, F.M. & Hartmann, G. 1996. Soil and tree water relations in mature oak stands of northern Germany differing in the degree of decline. *Annals of Forest Science* 53, 697-720.
- Tourneux, C. & Peltier, G. 1995. Effect of water deficit on photosynthetic oxygen measured using $^{18}\text{O}_2$ and mass spectrometry in *Solanum tuberosum* L. leaf discs. *Planta* 195, 570-577.
- Traisier, C., Klotz, S., Uhl, D. & Mosbrugger, V. 2004. Environmental signals from leaves – a physiognomic analysis of European vegetation. *New Phytologist* 166, 465-484.
- Turner, I.M. 1994. Sclerophylly: primarily protective? *Functional Ecology* 8, 669-675.
- Turner, N.C. 1986. Adaptation to water deficits: a changing perspective. *Australian Journal of Plant Physiology* 13, 175-190.
- Turner, N.C. 1988. Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrigation Science* 9, 289-308.
- Tuset, J.J. 2004. La investigación ante el problema de la seca parasitaria. En *La Seca: el decaimiento de encinas, alcornoques y otros Quercus en España*. Eds. J.J. Tuset & G. Sánchez Peña. Ministerio del Medio Ambiente Organismo Autónomo Parques Nacionales. Madrid, pp. 407-413.

- Tyree, M.T. & Cochard, H. 1996. Summer and winter embolism in oak: impact on water relations. *Annals of Forest Science* 53, 173-180.
- Tyree, M.T. & Ewers, F.W. 1991. The hydraulic architecture of trees and other woody species. *New Phytologist* 119, 345-360.
- Tyree, M.T. & Sperry, J.S. 1989. Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40, 19-38.

V

- Val, J., Sanz, L., Montañes, L. & Monge, E. 1995. Application of chlorophyll fluorescence to study iron and manganese deficiencies in peach tree. *Acta Horticulturae* 383, 201-209.
- Valentini, R., Epron, D., De Angelis, P., Matteucci, G. & Dreyer, E. 1995. In situ estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Quercus cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant, Cell and Environment* 18, 631-640.
- Valladares, F., Vilagrosa, A., Peñuelas, J., Ogaya, R., Camarero, J.J., Corcuera, L., Sisó, S. & Gil-Pelegrín, E. 2004. Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. En *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*. Ed. F. Valladares. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, pp. 163-190.
- van Kooten, O. & Snel J.H.F. 1990. The use of chlorophyll fluorescence in plant stress physiology. *Photosynthesis Research* 25, 147-150.
- van Oosten, J.J., Afif, D. & Dizengremel, P. 1992. Long-term effects of a CO₂ enriched atmosphere on enzymes of primary carbon metabolism of spruce trees. *Plant Physiology and Biochemistry* 30, 541-547.
- Verdú, M., Dávila, P., García-Fayos, P., Flores-Hernández, N. & Valiente-Banuet, A. 2003. "Convergent" traits of Mediterranean woody plants belong to pre-Mediterranean lineages. *Biological Journal of the Linnean Society* 78 (3), 415-427.
- Vigo, J. & Ninot, J.M. 1987. Los Pirineos. En *La vegetación en España*. Eds. M. Peinado-Lorca & S. Rivas-Martínez. Serv. Publ. Univ. Alcalá de Henares, Alcalá de Henares, España, pp. 351-384.

- Vilagrosa, A. 2002. *Estrategias de resistencia al déficit hídrico en Pistacia lentiscus L. y Quercus coccifera L.* Tesis Doctoral, Departamento de Ecología, Universidad de Alicante, Alicante, España.
- Vilagrosa, A., Bellot, J., Vallejo, V.R. & Gil-Peigrín, E. 2003a. Cavitation, stomatal conductance, and leaf dieback in seedlings of two co-occurring Mediterranean shrubs during an intense drought. *Journal of Experimental Botany* 54, 2015-2024.
- Vilagrosa, A., Cortina, J., Gil-Peigrín, E. & Bellot, J. 2003b. Suitability of drought-preconditioning techniques in Mediterranean climate. *Restoration Ecology* 11, 208-216.
- Villar-Salvador, P., Castro-Díez, P., Pérez-Rontomé, C. & Montserrat-Martí, G. 1997. Stem xylem features in three *Quercus* (*Fagaceae*) species along a climatic gradient in NE Spain. *Trees, Structure and Function* 12 (2), 90-96.
- Vogelmann, T.C. 1986. Light within the plant. En *Photomorphogenesis in Plants*. Eds. R.E. Kendrick & G.H.M. Kronenberg. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp. 307-337.
- Vogelmann, T.C. 1989. Penetration of light into plants. *Photochemistry and Photobiology* 50(6), 895-902.
- Vogelmann, T.C., Bornman, J.F. & Josserand, S. 1989. Photosynthetic light gradients and spectral regime within leaves of *Medicago sativa*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 323, 411-421.
- Vogelmann, T.C. & Han, T. 2000. Measurement of gradients of absorbed light in spinach leaves from chlorophyll fluorescence profiles. *Plant, Cell and Environment* 23, 1303-1311.
- Vogelmann, T.C. & Martin, G. 1993. The functional significance of palisade tissue: penetration of directional versus diffuse light. *Plant, Cell and Environment* 16, 65-72.
- von Caemmerer, S & Farquhar, G.D. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153, 376-387.

W

- Walter, H. 1985. *Vegetation of the Earth and Ecological Systems of the Geobiosphere*. 3rd edition. Springer-Verlag, Berlin.

- Weng, J.H., Chen, Y.N. & Liao, T.S. 2006. Relationships between chlorophyll fluorescence parameters and photochemical reflectance index of three species adapted to different temperature regimes. *Functional Plant Biology* 33, 241-246.
- Westin, J., Sundblad, L.G. & Hällgren, J.E. 1995. Seasonal variation in photochemical activity and hardiness in clones of Norway spruce, *Picea abies* L. *Tree Physiology* 15, 685-689.
- Winkel, T., Méthy, M. & Thénot, F. 2002. Radiation use efficiency, chlorophyll fluorescence, and reflectance indices associated with ontogenic changes in water-limited *Chenopodium quinoa* leaves. *Photosynthetica* 40 (2), 227-232.
- Witt, H.T. 1979. Energy conversion in the functional membrane of photosynthesis. Analysis by light pulse and electric pulse methods. The central role of the electrical field. *Biochimica et Biophysica Acta* 505, 355-427.
- Wittmann, C. & Pfanz, H. 2007. Temperature dependency of bark photosynthesis in beech (*Fagus sylvatica* L.) and birch (*Betula pendula* Roth.) trees. *Journal of Experimental Botany* 58, 4293-4306.
- Wittmann, C., Pfanz, H., Loreto, F., Centritto, M., Pietrini, F. & Alessio, G. 2006. Stem CO₂ release under illumination: cortical photosynthesis, photorespiration or inhibition of mitochondrial respiration? *Plant, Cell and Environment* 29 (6), 1149-1158.

Y

- Yamamoto, H.Y. 1979. Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants. *Pure and Applied Chemistry* 51, 639-648.
- Yamamoto, H.Y., Kamite, L. & Wang, Y.Y. 1972. An ascorbate-induced absorbance change in chloroplasts from violaxanthin de-epoxidation. *Plant Physiology* 49, 224-228.
- Yates, C.J., Elliott, C., Byrne, M., Coates, D.J. & Fireman, R. 2007. Site production, germinability and seedling growth for a bird-pollinated shrub in fragments of kwongan in south-west Australia. *Biological Conservation* 136(2), 306-14.

Z

- Zarco-Tejada, P.J., Miller, J.R., Morales, A., Berjón, A. & Agüera, J. 2004. Hyperspectral indices and model simulation for chlorophyll estimation in open-canopy tree crops. *Remote Sensing of Environment* 90, 463-476.
- Zarter, C.R., Adams III, W.W., Ebbert, V., Adamska, I., Jansson, S. & Demmig-Adams, B. 2006a. Winter acclimation of PsbS and related proteins in the evergreen *Arctostaphylos uva-ursi* as influenced by altitude and light environment. *Plant, Cell and Environment* 29, 869-878.
- Zarter, C.R., Demmig-Adams, B., Ebbert, V., Adamska, I. & Adams III, W.W. 2006b. Photosynthetic capacity and light harvesting efficiency during the winter-to-spring transition in subalpine conifers. *New Phytologist* 172, 283-292.
- Zhang, G., Ryyppo, A., Vappavuori, E. & Repo, T. 2003. Quantification of additive response and stationary of frost hardiness by photoperiod and temperature in Scots pine. *Canadian Journal of Forest Research* 33(9), 1772-1784.