Universidad de La Laguna

Facultad de Biología

Respuestas de especies endémicas canarias al estrés múltiple de alta montaña

Canary endemic species response to alpine multiple stress

Alicia Victoria Perera Castro
Grado en Biología
Julio 2014

Universidad de La Laguna | Facultad de Biología

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2013/2014	ENTRADA Fecha: Núm:

Datos Personales

Nº DNI o pasaporte:	Nombre y Apellidos:
79071260 C	Alicia Victoria Perera Castro
Teléfono:	Dirección de correo electrónico:
676923162	alicia_1192@hotmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

Respuestas de especies endémicas canarias al estrés múltiple de alta montaña

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. Agueda Mª González Rodríguez	
Profesor/a del Departamento de Biología Vegetal	
y D./Dña.	
Profesor/a del Departamento de	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
Fdo.:	Fdo.:

La Laguna, a 8 de Julio de 2014

Firma del interesado/a

SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

Documentación a adjuntar:
- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación de los tutores en sobre cerrado y firmado.

Ejemplar para la Secretaría

Universidad de La Laguna
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL
(FISIOLOGÍA VEGETAL)
C/ Astrofísico Francisco Sánchez s/n (Edificio Fac. Farmacia)
38207 La Laguna. Tenerife. Tfno. 922318410/922318434
E-mail: aglerod@ull.es

Este trabajo titulado "Respuestas de especies endémicas canarias al estrés múltiple de alta montaña" ha sido realizado por la alumna ALICIA VICTORIA PERERA CASTRO bajo la dirección de la Prof. ÁGUEDA Mª GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, y la codirección de la investigadora y bióloga PATRICIA BRITO SÁNCHEZ, ambas integrantes del departamento de Biología Vegetal de la Universidad de La Laguna.

Y para que conste a los efectos oportunos se firma la presenta.

En San Cristóbal de La Laguna, a 8 de Julio de 2014.

La Autora:

Alicia Victoria Perera Castro

Los Directores y Codirectores:

Águeda Mª González Rodríguez

Patricia Brito Sánchez

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN……. 1
1.1. CONCEPTO DE ESTRÉS MÚLTIPLE Y SU IMPORTANCIA EN ECOSISTEMAS NATURALES…….....… 1
1.2. ALTA MONTAÑA EN EL CONTEXTO DEL CAMBIO CLIMÁTICO. ANTECEDENTES PARA CANARIAS…….… 2
1.3. DESCRIPCIÓN BIOCLIMÁTICA Y TIPOS DE ESTRESES ASOCIADOS…….…. 3

2. OBJETIVOS GENERALES…….…….. 5

3. METODOLOGÍA GENERAL……..... 6
3.1. LUGAR DE ESTUDIO Y MATERIAL VEGETAL…… 6
3.2. PRINCIPIOS GENERALES DE LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA A…. 6
3.3. PARÁMETROS UTILIZADOS Y MÉTODOS……..... 9
3.4. FLUORÍMETROS UTILIZADOS……...…… 12

4. ENSAYO I: MECANISMOS DE RESPUESTA AL ESTRÉS LUMÍNICO……... 14
4.1. INTRODUCCIÓN……..……..... 14
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS……...……. 15
4.3. ÁREA DE ESTUDIO Y DISEÑO EXPERIMENTAL……..…….. 15
4.3.1. ÁREA DE ESTUDIO…….…… 15
4.3.2. EXPERIMENTO 1: Determinación de la absortividad foliar…….. 16
4.3.3. EXPERIMENTO 2: Curvas de inducción y recuperación…….. ……. 16
4.3.4. EXPERIMENTO 3: Curvas rápidas de luz (RLC) …….. 17
4.3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO…….…….… 17
4.4. RESULTADOS ……...……. 17
4.4.1. EXPERIMENTO 1: Determinación de la absortividad foliar……....….. 17
4.4.2. EXPERIMENTO 2: Curvas de inducción y recuperación…… 18
4.4.3. EXPERIMENTO 3: Curvas rápidas de luz (RLC) …….....….. 19
4.5. DISCUSIÓN…….....…… 21

5. ENSAYO II: MECANISMOS DE RESPUESTA AL ESTRÉS TÉRMICO…… 24
5.1. INTRODUCCIÓN……..... 24
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS……...…….… 25
5.3. MATERIAL Y MÉTODOS…….…….… 25
5.3.1. PARCELA DE ESTUDIO……...…….. 25
5.3.2. EXPERIMENTO 4: TRATAMIENTO FOLIAR A TEMPERATURAS EXTREMAS Y DETERMINACIÓN DE LT_{50}…….……. 26
5.3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO……..…… 27
5.4. RESULTADOS……...….... 27
5.5. DISCUSIÓN…….……....….. 29

6. CONCLUSIONES GENERALES……...…….. 31

7. BIBLIOGRAFÍA…… 33

Resumen

En condiciones naturales los factores estresantes actúan de manera simultánea (estrés múltiple), siendo difícil reproducirlos en laboratorio, por lo que se hace necesario su estudio bajo condiciones naturales. En el caso de la alta montaña canaria, cabe destacar entre los factores estresantes la alta radiación y las temperaturas extremas. Este Trabajo de Fin de Grado contribuirá a la caracterización de los mecanismos de especies endémicas canarias para hacer frente a dichas condiciones. Se utilizó la fluorescencia de la clorofila como técnica principal para caracterizar el comportamiento fisiológico de estas especies. El efecto de la luz se evaluó bajo dos condiciones de exposición lumínicas contrastadas, observándose una plasticidad fenotípica en la mayoría de los parámetros medidos en todas las especies. *Echium wildpretii* y *Spartocytisus supranubius* presentaron las mejores adaptaciones a altas radiaciones, mientras que *Erysimum scoparium* y *Pterocephalus lasiospermus* fueron las más sensibles. En cuanto a la resistencia a las temperaturas extremas, *P. lasiospermus* mostró ser sensible tanto a la congelación como a las altas temperaturas. A pesar de llevar a cabo una aclimatación frente al frío, las bajas temperaturas mostraron ser un factor de riesgo potencial para el desarrollo actual de esta especie.

Palabras clave: absortividad, estrés lumínico, estrés térmico, fluorescencia, *quenching.*

Abstract:

In natural conditions, stressful factors work simultaneously (multiple stress), making its reproduction unlikely under lab conditions, thus increasing the field studies importance. Regarding canary's mountains environment, its most important stressful factors are high radiation and extreme temperatures. This bachelor's thesis has the aim of contributing to the description of the mechanisms developed by endemic species in order to deal with both factors. Chlorophyll fluorescence was the main technic used for studying physiological behaviors in this species. The light response was evaluated under two different conditions of light expositions, finding grate variation in nearly all species studied. *Echium wildpretii* and *Spartocytisus supranubius* showed the highest adaptation to high radiation, meanwhile *Erysimum scoparium* and *Pterocephalus lasiospermus* were the most sensitive studied species. In relation to extreme temperature resistance, *P. lasiospermus* was determined sensitive to both freezing and high temperatures. Despite developing cold acclimatization, low temperatures resulted in a potential risky factor for the development of this specie.

Key words: absorptivity, fluorescence, light stress, quenching, thermic stress.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONCEPTO DE ESTRÉS MÚLTIPLE Y SU IMPORTANCIA EN ECOSISTEMAS NATURALES

El concepto de estrés implica la presencia de cualquier factor externo a la planta, ya sea biótico o abiótico, que ejerce una influencia negativa sobre su desarrollo óptimo (Azcón-Bieto y Talón, 2000), el cual se determina en relación con la supervivencia de la planta, su producción o por procesos primarios de asimilación, como la fijación de CO_2 y la nutrición mineral (Taiz y Zeiger, 2002). Este concepto puede estar referido, además de al factor externo estresante descrito anteriormente, al estado fisiológico o de respuesta de la planta frente al mismo (Larcher, 2003).

En condiciones naturales rara vez un único factor estresante actúa de forma aislada e independiente de otros fenómenos, más bien al contrario, normalmente las plantas se ven forzadas a responder a eventos estresantes simultáneos o subsecuentes, fenómeno conocido como estrés múltiple. Esta respuesta dependerá de numerosas condiciones ambientales, como los ciclos circadianos, el cambio de estaciones e incluso de fenómenos de sinergia o antagonismo con otros factores estresantes (Larcher, 2003). En algunos casos, pueden tener lugar fenómenos de adquisición de resistencia, por el que la planta reduce el efecto perjudicial del factor estresante, e incluso de co-resistencia en donde la influencia de un determinado estrés puede aportar resistencia a otros agentes estresantes (Reigosa *et al*., 2003).

Por todo ello, la respuesta al estrés en ecosistemas naturales será mucho más real que aquellas estudiadas en plantas desarrolladas bajo condiciones de laboratorio, en donde es difícil simular un fenómeno de co-resistencia tal y como tiene lugar en la naturaleza. Es aquí en donde radica la importancia de realizar estudios de campo o de trabajar con muestras tomadas en campo para comprender de una forma más global e integradora la respuesta de las plantas a estos estreses.

En los últimos años, los estudios de la fisiología del estrés se han orientado a arrojar luz sobre la respuesta fisiológica de las plantas ante el cambio climático y el endurecimiento consecuente de las condiciones de estrés.

1.2. ALTA MONTAÑA EN EL CONTEXTO DEL CAMBIO CLIMÁTICO. ANTECEDENTES PARA CANARIAS.

Los ecosistemas de alta montaña son particularmente sensibles a los efectos del cambio climático, los cuales actúan más rápidamente que en otros hábitats terrestres (Köhler y Maselli, 2009). El impacto del cambio climático sobre la vegetación de alta montaña es variable, ya que no existe un único patrón altitudinal de radiación solar, precipitación o temperatura, sino que éstos varían entre los distintos sistemas montañosos terrestres dependiendo de la latitud, topografía y continentalidad (Körner, 1999; Martín *et al*., 2012). Por ello, los mecanismos de adaptación desarrollados por las plantas así como la respuesta futura ante el cambio climático predicho son igualmente variables. En ello radica la necesidad de realizar estudios regionales, tanto climáticos como fisiológicos, que aporten el conocimiento necesario para modelizar, predecir y realizar las actuaciones de conservación más adecuadas.

En Canarias se consideran ecosistemas de alta montaña a partir de los 2000-2200 m de altitud, es decir, englobando a los pisos bioclimáticos supramediterraneo pluviestacional seco y subhúmedo y oromediterráneo pluviestacional seco, este último a partir de 2900-3100 m (Rivas-Martínez, 1995), presentes únicamente en las islas de Tenerife y La Palma. Ambos pisos han sido confirmados como los más afectados por el cambio climático en toda Canarias, con un calentamiento registrado en el Parque Nacional del Teide de 0,14 ºC de media por década (Martín *et al*., 2012). Como consecuencia del cambio climático, se espera un ascenso altitudinal de los termotipos y una aridización de los ombrotipos (Del-Arco *et al*., 2008). Así, el retamar (*Spartocytisetum supranubii* Oberdorfer *ex* Esteve 1973) la comunidad climácica de la serie *Spartocytision supranubii* Oberdorfer *ex* Esteve 1973 (Del-Arco *et al*., 2006), podría verse abocado a la extinción por ver limitado su ascenso con la juventud geológica del territorio. Además, el aumento de las temperaturas podría inhibir fases del ciclo de las plantas alpinas inducidas por las bajas temperaturas, como por ejemplo, la propia floración, fenómeno conocido como vernalización (Del-Arco *et al*., 2008).

Los estudios biológicos que se han realizado en el piso bioclimático supramediterráneo seco de la isla de Tenerife se han orientados a la elaboración de catálogos fitosociológicos (eg. Del-Arco *et al*., 2010) y al estudio de cómo factores abióticos determinan la abundancia (Fernández-Palacios, 1992) y distribución altitudinal (Fernández-Palacios y de Nicolás, 1995) de las especies de alta montaña. Sin embargo, se han llevado a cabo pocos trabajos que aborden este ecosistema desde un punto de vista fisiológico (Lausi y Nimis, 1986; Köhler *et*

al. 2005), recalcando la necesidad de realizar estudios fisiológicos de las estrategias que pueden poseer las plantas de alta montaña en Canarias para enfrentarse a un clima tan hostil como lo es el de este piso bioclimático.

1.3. DESCRIPCIÓN BIOCLIMÁTICA Y TIPOS DE ESTRESES ASOCIADOS

El piso supramediterráneo se caracteriza por presentar un invierno típicamente frío, con temperaturas medias anuales de 6-10 ºC, temperaturas máximas del mes más frío de 4 a 8 ºC y mínimas de -5 a -2 ºC. A estas bajas temperaturas hay que añadir unas grandes oscilaciones térmicas diarias y estacionales. De hecho, las estaciones meteorológicas que presentan mayores índices de continentalidad (I_c) en Tenerife se encuentran dentro del Parque Nacional del Teide, alcanzando valores de I_c de 14,8 en la estación Realejos C.V/Portillo y en Santiago del Teide-Chinyero, es decir, 14,8 ºC de diferencia entre las temperaturas mínimas y las máximas medias (Del-Arco *et al*., 2006). En Izaña, las temperaturas mínimas absolutas más extremas registradas alcanzaron los -9,8 ºC en febrero de 1971, mientras que las máximas absolutas se corresponden con los 30,4 ºC en julio de 1995.

A bajas temperaturas, las membranas celulares adquieren rigidez y la energía requerida para activar procesos bioquímicos se incrementa, siendo la formación de hielo y la rotura de membranas el evento de mayor importancia en la supervivencia de una planta de alta montaña (Larcher, 2003). Sin embargo, la presencia de hielo en el ambiente también puede adquirir un papel protector como aislante térmico dependiendo del grosor y de la densidad de la capa de hielo, ejerciendo por otro lado un efecto negativo por el incremento de la presión parcial de CO_2 acompañado por una deficiencia en O_2 (Körner, 1999; Bannister *et al*., 2005). A excepción del riesgo de aplastamiento, los demás eventos no son importantes en este piso supramediterraneo, ya que los eventos de congelación no suelen prolongarse en gran medida gracias a la alta insolación y al deshielo.

A altas temperaturas se puede producir un daño directo tanto en las proteínas como en las membranas celulares. La desnaturalización de las proteínas y su consecuente pérdida de funcionalidad puede solventarse mediante la síntesis de proteínas del choque térmico (HSP), las cuales pueden restablecer la configuración espacial adecuada de la proteína dañada, o mediante el reemplazo de proteínas termolábiles por isoenzimas más estables. Por otro lado, el incremento de la fluidez de las membranas conlleva a una pérdida del gradiente de concentración a través de las mismas, al deterioro de la función ATPasa y a la inactivación del PSII, entre otros. Esta pérdida de la integridad de las membranas puede compensarse

mediante la inhibición de desaturasas, las cuales añaden dobles enlaces a los ácidos grasos, disminuyendo de ese modo la fluidez (Reigosa *et al*., 2003).

Respecto a las precipitaciones, este termotipo está combinado principalmente con un ombrotipo seco y subhúmedo, ya que soporta precipitaciones de 350-650 mm (del-Arco et al., 2006), en ocasiones en forma de nieve o granizo. Bajo estos eventos de congelación las plantas sufren un estrés hídrico adicional, ya que no pueden captar el agua contenida en el suelo, produciéndose la llamada desecación invernal o "*Winter desiccation*" (Walter, 2003). Incluso a valores de temperatura muy bajos pero positivos, la toma de agua se ve impedida debido a un incremento de su viscosidad y a un descenso de la conductividad hidráulica de las membranas de las células radiculares, cuya gravedad dependerá de la especie y de su nivel de adaptación.

Otro factor limitante en este ecosistema es la alta radiación, alcanzando valores de 500-1000 W/m^2, la mayor de España (www.aemet.es). En las plantas, altos niveles de radiación provocan fotoinhibición y destrucción fotooxidativa del aparato fotosintético caracterizado por una reducción en la eficiencia de la utilización de la luz, es decir, moles de CO_2 fijados por moles de fotones absorbidos (Foyer y Mullineaux, 1994). Sin embargo, algunas plantas han podido desarrollar sistemas eficaces de disipación de energía y/o sistemas antioxidantes (pigmentos o enzimas antioxidantes) que les permitan lidiar con esos altos niveles de radiación (Streb *et al.*, 1997).

Por otro lado, en este ecosistema hay que tener en cuenta las pobres condiciones edáficas, existiendo un predominio de los leptosoles, suelos jóvenes y poco desarrollados (Rodríguez *et al*., 2014). A esta escasez de acumulación de nutrientes en el suelo también contribuyen las numerosas rachas de viento. Aunque la velocidad media anual del viento sea de 6,82 m/s, el número de rachas de viento que superan los 55 m/s se encuentra en torno a 11 por mes, lo cual implica que en esos momentos puntuales se produzca la pérdida de materia orgánica y se perjudique de este modo el ciclo del carbono en este ecosistema.

Sin embargo, y a pesar de las condiciones extremas, las plantas vasculares han conseguido colonizar y desarrollarse en estos pisos bioclimáticos.

2. OBJETIVOS GENERALES

Este Trabajo de Fin de Grado (TFG) tiene como objetivo general realizar una contribución al conocimiento de los mecanismos llevados a cabo por diversas especies del supramediterráneo en Canarias para hacer frente a dos de los principales factores estresantes presentes en este ambiente: la alta radiación solar y las temperaturas extremas. De esta forma se mejorará el conocimiento de la fisiología del estrés, utilizando plantas endémicas de Canarias hasta ahora no estudiadas en este sentido.

Este objetivo general se llevará a cabo en dos ensayos independientes que se corresponden con los dos tipos de estreses estudiados, cada uno de ellos abordados en un capítulo. Es en estos en donde el objetivo general se desglosará en seis objetivos específicos.

3. METODOLOGÍA GENERAL

3.1. LUGAR DE ESTUDIO Y MATERIAL VEGETAL

Este TFG se desarrolló en el Parque Nacional del Teide, en las inmediaciones de El Portillo, a 2070 m de altitud. La vegetación más representativa se encuentra constituyendo comunidades propias de *Spartocytision supranubii sigmetum* Oberdorfer *ex* Esteve 1973, denominados de forma genérica como matorrales de cumbre. En Tenerife, estos matorrales son 1) el retamar (*Spartocytisetum supranubii*), el cual se combina con el tajinaste rojo (subas. *Echietosum wildpretii* P.Schönfelder in P.Schönfelder & Voggenreiter 1994) y con el codeso (facies de *Adenocarpus viscosus* subsp. *viscosus* Esteve 1973 *nom. mut. propos.*), 2) el matorral de alhelí y rosalito de cumbre (*Erysimo scoparii-Pterocephaletum lasiospermi* Rivas-Martínez *et al*. 1993) y 3) la comunidad de violetas (*Violetum cheiranthifoliae* Rivas-Martínez *et al*. 1993) (Del-Arco *et al*., 2006b). La vegetación potencial climatófila predominante es la del retamar, aunque mayoritariamente se ha visto reemplazada por el matorral de alhelí y rosalito de cumbre, el cual se ha expandido considerablemente en los últimos años (comunicación personal de técnicos del Parque Nacional del Teide).

Como representantes de las comunidades climatófilas anteriormente descritas, se seleccionaron seis especies para ser estudiadas en este TFG: el tajinaste (*Echium wildpretii* Pearson *ex* Hook. f.), el alhelí (*Erysimum scoparium* (Brouss. *ex* Willd.) Wettst.), el rosalito de cumbre (*Pterocephalus lasiospermus* Link *ex* Buch), el codeso (*Adenocarpus viscosus* (Willd.) Webb & Berthel.), la retama (*Spartocytisus supranubius* (L. f.) Christ *ex* G. Kunkel) y la fistulera (*Scrophularia glabrata* Aiton), todas ellas especies endémicas de Canarias.

3.2. PRINCIPIOS GENERALES DE LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA A

La fluorescencia de la clorofila “a” ha sido utilizada desde la década de los 80 como una medida indirecta y no destructiva del estado funcional de la planta. Se fundamenta en las distintas vías que puede seguir el flujo de energía fotónica al alcanzar una hoja (Fig. 1): 1) conversión cuántica fotosintética (fotoquímica), 2) disipación de energía en forma de calor y 3) reemisión de energía en forma de fluorescencia por parte de la clorofila a (Walker, 1987). La primera vía se corresponde con la canalización de la energía mediante la cadena de transporte electrónico para generar poder reductor y ATP que posteriormente será utilizado en la fijación de CO_2 en el ciclo de Calvin. La segunda vía hace referencia a procesos de disipación de energía como los que tienen lugar en los carotenoides, pigmentos fotosintéticos que permiten tolerar un excedente de energía, evitando de esta forma el daño oxidativo. Y

finalmente, el último proceso se basa en la reemisión de energía a una longitud de onda mayor (685 nm) que la correspondiente al pico de absorción del fotosistema II (PSII, 680 nm) (Walker, 1987; Azcón-Bieto y Talón, 2000; Larcher, 2003; Walter, 2003).

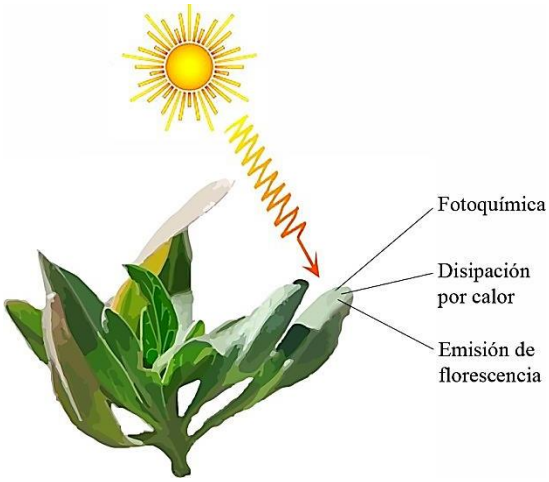

Figura 1. Ilustración esquemática de los tres procesos competitivos de disipación del exceso de radiación: fotoquímica, calor y fluorescencia.

La fracción de energía que es disipada por la vía de la fluorescencia *in vivo* es relativamente pequeña, del 3-5% de la energía total incidente (Azcón-Bieto y Talón, 2000). A pesar de ello, al ser estas vías procesos competitivos, el conocimiento de la contribución aportada por la fluorescencia permite indirectamente conocer la contribución de las otras dos a partir de mediciones rápidas y no destructivas de la fluorescencia.

En una hoja iluminada, los procesos de captación de luz, canalización hacia el PSII (P680) y reducción del pool de plastoquinonas (ciclo Q) (Fig. 2) son mucho más rápidos que los pasos posteriores en la cadena de transporte electrónico, por lo que se tiende a producir una cierta acumulación de quinonas reducidas (plastohidroquinonas) a la espera de ser oxidadas por el siguiente aceptor de electrones. Consecuentemente, aquellos centros de reacción del PSII cuyas quinonas estén reducidas no podrán, temporalmente, canalizar más energía procedente de las antenas, lo que conlleva a un aumento en la emisión de fluorescencia y disipación de esa energía. Estos centros de reacción reciben el nombre de centros “cerrados” (reducidos), en contraposición a los centros “abiertos” (oxidados), que sí son capaces de procesar energía y reducir de ese modo la emisión de fluorescencia (Azcon-Bieto y Talón, 2000).

En una hoja previamente adaptada a oscuridad la vía de disipación por calor estará inactivada y todos los centros de reacción estarán abiertos. Al iluminar el material con la luz de medida la proporción de centros de reacción cerrados sigue siendo prácticamente nula. La luz de medida es lo suficientemente débil (<200 µmol de fotones$\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) para no inducir el transporte electrónico y lo suficientemente alta para registrar el nivel mínimo de florescencia, denotado como F_0. Es entonces cuando se aplica un pulso saturante de alta intensidad (3000 µmol$\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) durante un periodo muy corto de tiempo (< 1 s), de modo que los centros de reacción se cierran y al no poder ceder los electrones al siguiente aceptor, permanecen

cerrados haciendo que la emisión de fluorescencia se incremente a su nivel máximo, denotado como F_m. La fluorescencia variable F_v no es más que la diferencia entre F_m y F_0. De esta forma se obtiene el parámetro F_v/F_m, cuyos valores óptimos varían entre 0,75 y 0,85 y que representa el rendimiento cuántico máximo del PSII, ya que al estar inactivada la vía de la disipación por calor, la F_v es equivalente a la energía máxima que puede ser canalizada por la vía fotoquímica (Schulze y Caldwell, 1995; Azcón-Bieto y Talón, 2000; Lichtenthaler *et al.*, 2005; Murchie y Lawson, 2013).

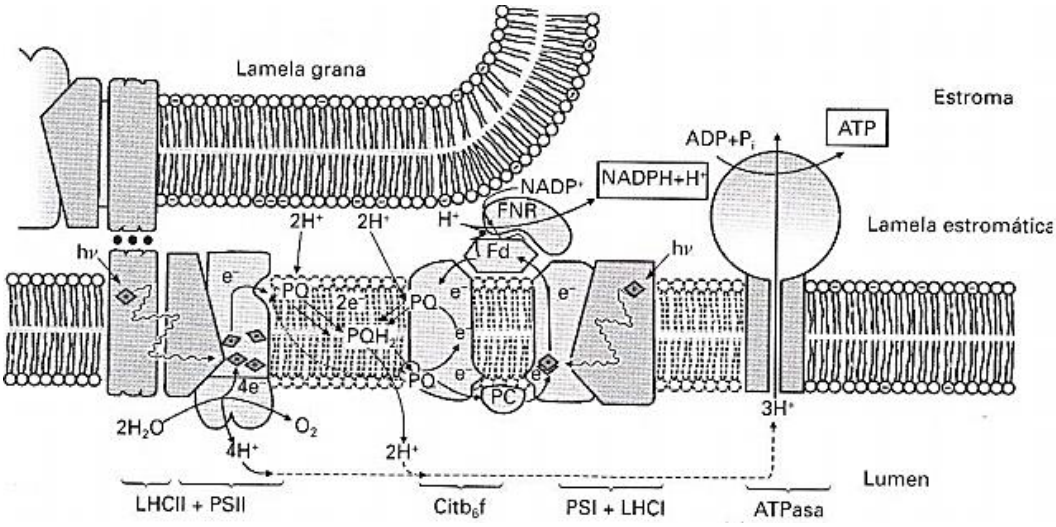

Figura 2. Ilustración esquemática de los cuatro complejos enzimáticos insertados en la membrana tilacoidal del cloroplasto indicando la transferencia y el flujo de electrones y protones. Las membranas dibujadas corresponden a una sección que incluye parte de la lamela grana y parte de la lamela estromática. El ciclo Q al que se hizo alusión anteriormente tiene lugar en el citocromo b_6f. La plastoquinona (PQ), una molécula anfipática y móvil a través de la membrana, requiere de dos electrones para reducirse a plastohidroquinona (PQH_2), ralentizando de ese modo su oxidación y liberación al pool de plastoquinonas, así como el flujo inicial de electrones por la cadena de transporte energético al aplicar un pulso de saturación (Azcon-Bieto y Talón, 2000).

Por el contrario, en una hoja no adaptada a oscuridad la vía de disipación por calor sí está activada, por lo que tras medir la fluorescencia (denotada en este caso como F') e inmediatamente después aplicar un pulso saturante de luz, la fluorescencia solo se incrementará hasta alcanzar la llamada fluorescencia máxima aparente (F_m'), cuyo valor siempre será menor a la F_m. La diferencia entre F_m' y F', relativizado a F_m' es lo que se conoce como rendimiento cuántico actual del PSII, denotado como Y(II), cuyos valores serán siempre menores a los de F_v/F_m dependiendo de la contribución de esa vía de disipación por calor (Schulze y Caldwell, 1995; Azcón-Bieto y Talón, 2000; Lichtenthaler *et al.*, 2005; Murchie y Lawson, 2013).

A partir de estos valores de fluorescencia fundamentales se pueden obtener numerosos parámetros que de una forma indirecta aportan información relevante acerca del estado fisiológico de la planta, así como de los distintos procesos que están teniendo lugar en ella.

3.3. PARÁMETROS UTILIZADOS Y MÉTODOS

A continuación se enumeran y explican los distintos parámetros calculados en este TFG (Tabla 1), así como el procedimiento metodológico necesario para obtenerlos.

Cinética de Kautsky (Fig. 3)

Si tras haber alcanzado la F_m y obtenido el valor F_v/F_m se mantiene constante una luz saturante, la fluorescencia decrece asintóticamente como consecuencia, en primer lugar, de una activación de la cadena transportadora de electrones (oxidación y apertura de los centros de reacción) y un incremento de la asimilación de CO_2 y del consumo de NADPH y, en segundo lugar, de la activación de los sistemas de disipación por calor. Tras 3-5 minutos de exposición a esta luz saturante la fluorescencia alcanza el llamado estado estable (F_s), en donde los centros de reacción cerrados y abiertos se encuentran en equilibrio (mismas tasas de oxidación y reducción). La diferencia entre F_m y F_s es el descenso de la fluorescencia (F_d) y su relativización a F_s es el ratio de descenso de la fluorescencia (R_{fd}), también conocido como *Vitality Index* (Lichenthaler *et al*., 2005). Éste parámetro, junto con F_v/F_m, aporta información relevante acerca del estado fisiológico de la planta.

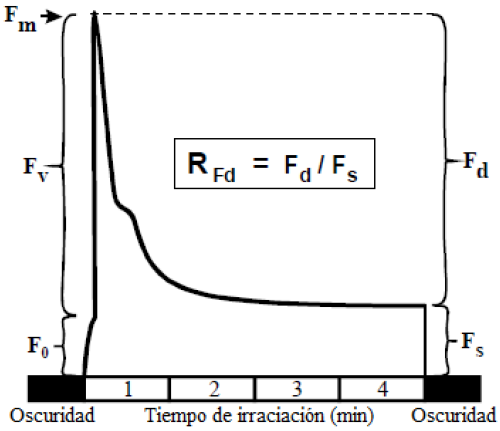

Figura 3. Cinética de Kautsky (adaptado de Lichenthaler *et al*., 2005).

Curvas de inducción y recuperación (Fig 4).

Si tras haber alcanzado la F_m y obtenido el valor F_v/F_m se mantiene constante una luz no saturante, nuevamente se producirá un descenso de la fluorescencia, en este caso conocido como *quenching*. A este descenso están contribuyendo competitivamente las dos primeras vías de uso de la energía luminosa, de modo que se pueden diferenciar el *quenching* fotoquímico (q_P) y el no fotoquímico (q_N) dependiendo de los procesos fisiológicos implicados (primera y segunda vía, respectivamente), ambos complementarios y cuyo sumatorio es igual a la unidad. $q_N = (F_m-F_m')/(F_m'-F_0')$

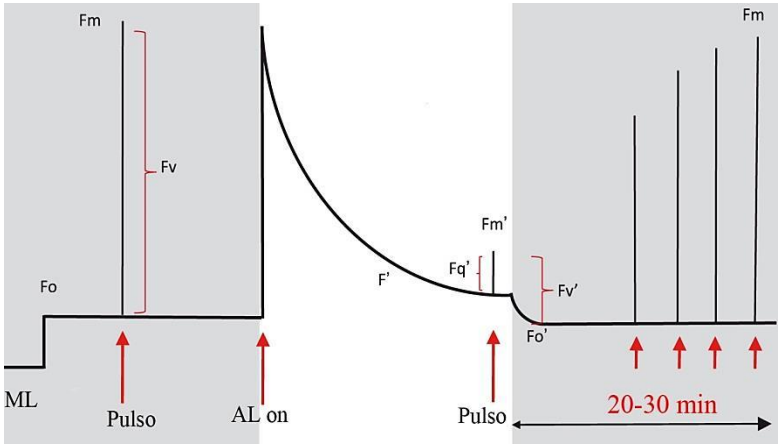

Figura 4. Esquema de una curva de inducción y recuperación. La F_0 es inducida mediante una luz muy débil, la luz de medida (ML). Al aplicar un pulso saturante la fluorescencia se incrementa y alcanza la F_m. Si tras aplicar este pulso se mantiene una luz no saturante continua (AL on), se realizará una curva de inducción típica, en donde la fluorescencia (F') va descendiendo asintóticamente debido a la canalización de la energía en la cadena de transporte electrónico. Si nuevamente se aplica un pulso durante esta fase, se obtendrá F_m'. Al final de la curva de inducción, (tras 5 min aproximadamente) la luz se apaga y se obtiene F_0', a partir del cual comienza el periodo de recuperación. Durante este periodo se aplican pulsos saturantes distantes para medir la recuperación de F_m y los componentes del *quenching* no fotoquímico (adaptado de Murchie y Laeson, 2013).

Un parámetro similar al qN y que también está altamente correlacionado con los procesos de disipación de energía es el NQP, denominado también quenching no fotoquímico pero determinado a partir de la fórmula: NPQ = $(F_m - F_m')/F_m'$. Para calcular el valor de NPQ es necesario aplicar pulsos de saturación durante la curva de inducción y registrar F_m'. La diferencia entre F_m y F_m' relativizado a F_m' es la forma de obtener NPQ (Lichtenthaler *et al.*, 2005). Es de interés calcular este parámetro, ya que a partir del mismo se puede inferir numerosos procesos fisiológicos implicados, los cuales se han dividido en tres componentes: (1) el componente energético (q_E) está relacionado con procesos de activación rápida como el establecimiento del gradiente de pH y la acidificación del lumen necesario para la activación del ciclo de las xantofilas o ciclo VAZ, (2) el componente de transición (q_T) incluye la fosforilación del complejo antena LHC y su movilización del PSII al PSI, y (3) el componente inhibitorio (q_I) está causado por un daño de los sistemas fotosintéticos, siendo el más frecuente de ellos la destrucción de la proteína D1, la cual es un constituyente importante en el PSII (Taiz y Zeiger, 2002).

Para discernir que componentes y qué procesos fisiológicos están contribuyendo en mayor proporción al NPQ se realizan mediciones de recuperación una vez finalizada la curva de inducción y desactivada la luz continua. Al aplicar pulsos de luz saturantes distanciados en el tiempo en esta fase de recuperación, la F_m cada vez va incrementándose hasta alcanzar la F_m inicial, la cual se corresponde con una adaptación a oscuridad completa e inactivación total de

los procesos de disipación por calor. Dependiendo de esta velocidad de "relajación" o inactivación una vez terminada la curva de inducción, se pueden diferenciar los tres componentes de q_N. Aproximadamente, q_E se relaja muy rápidamente entre 2-5 min de recuperación, q_T requiere entre 12-20 min y q_I puede tardar varias horas o incluso días, dependiendo del grado de fotoinhibición. Se asume que estos componentes son excluyentes, de modo que $q_N = q_E + q_T + q_I$ (Lichtenthaler *et al*, 2005; Lambrev, 2007; Roháček, 2010).

Iluminación con R y NIR

La absortividad de una hoja se define como el porcentaje de luz que alcanza los fotosistemas en relación con la luz total incidente (Carter y Knapp, 2001). Para calcularla es necesario iluminar la planta con luz roja (R, 660 nm) e infrarrojo cercano (NIR, 780 nm).

La luz a 780 nm no es absorbida por los pigmentos fotosintéticos, mientras que la luz roja sí, dependiendo de la presencia de estructuras o sustancias reflectantes, así como de la estructura interna del mesófilo o de la disposición de los cloroplastos (Woolley, 1971). De modo que si ambas luces se emiten con la misma intensidad, es posible calcular el porcentaje de luz fotosintéticamente activa emitida que es reflejada por la hoja (R/NIR), siendo por lo tanto la absortividad calculada como Abs = 1- R/NIR. Al medir este parámetro se evita la asunción de un valor convencional de 0,84 para las diferentes especies estudiadas.

Curvas rápidas de luz (RLC).

Las RLCs (Fig. 5) se llevan a cabo haciendo incidir de forma continua intensidades de luz crecientes y constantes en intervalos de 50 s. Esta intensidad se cuantifica como densidad de flujo fotónico (PPDF, en µmol de fotones·m^{-2}·s^{-1}). Al final de cada intervalo, un pulso de saturación permite obtener la F_m' y calcular el Y(II). Sin embargo, la información más relevante que pueden aportar las RLCs no proviene del Y(II) por sí mismo, sino del cálculo de la tasa de transporte electrónico (ETR) para cada intensidad lumínica según la fórmula ETR = PPDF x Abs x 0.5 x Y(II), es decir, la cantidad

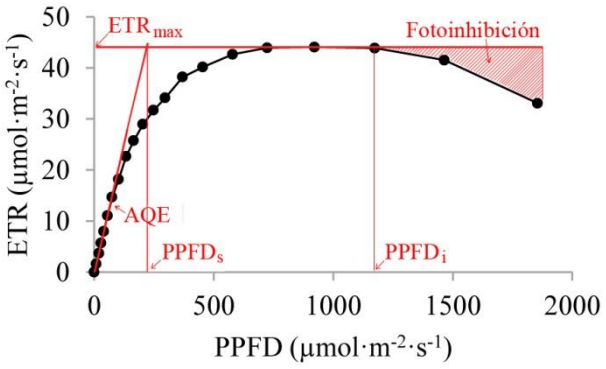

Figura 5. Ejemplo de RLC para *Pterocephalus lasiospermus*. AQE se corresponde con la pendiente de la curva, $PPFD_s$ con el punto de inflexión y $PPFD_s$ con el punto en el que comienza a descender ETR.

de luz alcanzada realmente por el PSII que es utilizada en procesos fotoquímicos (White y Critchley, 1999).

A partir de estos valores de ETR se pueden obtener otros parámetros de interés, como el ETR máximo alcanzado (ETR_{max}), la intensidad lumínica a la cual se satura el PSII ($PPFD_s$) o se fotoinhibe ($PPFD_i$), así como la eficiencia cuántica aparente (AQE, µmol de fotones·m^{-2}·s^{-1} canalizados hacia procesos fotoquímicos por cada µmol de fotones·m^{-2}·s^{-1} que alcanza el PSII).

Tabla 1. Resumen de los parámetros utilizados:

Método	Parámetros	Definición
Cinética de Kautsky	$F_v/F_m = (F_m-F_0)/F_m$ F_s $R_{fd} = (F_m - F_s)/F_s$	Rendimiento cuántico máximo del PSII. Fluorescencia en el estado estable. *Vitality index* o ratio de descenso de la fluorescencia.
Curvas de inducción y recuperación	F_v/F_m $q_P = (F_m'-F')/(F_m'-F_0')$ $q_N = (F_m-F_m')/(F_m'-F_0')$ $NPQ = ({}_NF/F_m')/F_m' = q_E + q_T + q_I$ ${}_NF_t = F_m – F_{mt}'$ $q_E = ({}_NF1- {}_NF5)/F_v$ $q_T = ({}_NF5-{}_NF20)/F_v$ $q_I = {}_NF20/F_v = q_N - q_E - q_T$	Rendimiento cuántico máximo del PSII. *Quenching* fotoquímico *Quenching* no fotoquímico. Fluorescencia máxima variable en un momento *t*. *Quenching* energético. *Quenching* de transcisión. *Quenching* fotoinhibitorio.
Iluminación con R y NIR	Abs = 1- R/NIR	Absortividad o porcentaje de luz incidente que es absorbida por los pigmentos fotosintéticos.
Curvas rápidas de luz	$Y(II) = (F_m'-F')/F_m'$ ETR = PPDF·Abs·0,5·Y(II) $PPDF_s$ $PPDF_i$ AQE	Rendimiento cuántico efectivo del PSII. Tasa de transporte electrónico. Densidad de flujo fotónico saturante. Densidad de flujo fotónico inhibitorio. Eficiencia cuántica aparente.

3.4. FLUORÍMETROS UTILIZADOS

En este TFG se han utilizado dos fluorímetros: MINI-PAM e IMAGING-PAM (Walz GmbH, Effeltrich, Alemania). Ambos son capaces de modular la intensidad lumínica aplicada y de detectar la fluorescencia reemitida por la clorofila *a*, discerniéndola de la luz ambiental, lo cual permite realizar medidas de campo, incluso bajo mediodía solar.

Sin embargo poseen distintos sistemas ópticos de emisión. El MINI-PAM utiliza un sistema de fibra óptica que emite una luz de medida roja (650 nm) y una luz modulada blanca (400-700 nm), mientras que el IMAGING-PAM está provisto de LEDs que emiten luz azul (470 nm), luz roja (660 nm) e infrarrojo cercano (NIR, 780 nm). Además, el IMAGING-PAM, posee la capacidad de realizar un escalado cromático a distintos parámetros calculados a partir de la fluorescencia de la clorofila y que se explicarán posteriormente, de modo que se obtiene una imagen de la hoja medida en donde cada píxel está asociado a un valor y coloreado según el mismo. Esto permite un estudio más detallado del efecto de factores estresantes, ya que en lugar de elegir ciegamente un punto al azar en la hoja, como ocurre con el MINI-PAM, se puede tener en cuenta la heterogeneidad de la misma en toda el área.

Figura 6. Fluorímetros utilizados en este estudio. Izquierda: IMAGING-PAM; centro: MINI-PAM; derecha: imagen escalada a los valores de F_m de *S. glabrata* con IMAGING-PAM.

4. ENSAYO I: MECANISMOS DE RESPUESTA AL ESTRÉS LUMÍNICO

4.1. INTRODUCCIÓN

Los tejidos fotosintéticos poseen distintos mecanismos de fotoprotección que les permiten soportar un exceso de luz y evitar un daño fotooxidativo, es decir, evitar la oxidación destructiva de la célula como consecuencia de la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Taiz y Zeiger, 2002).

El primer mecanismo desarrollado consiste en evitar la absorción de la luz mediante la acumulación de sustancias y/o estructuras reflectantes (ceras, sales, pelos, etc.), la reducción del ángulo de inclinación del limbo de las hojas respecto a los rayos luminosos, el ajuste del contenido de clorofilas y del tamaño de las antenas colectoras de luz, la síntesis de antocianinas y/o el movimiento y distribución de los cloroplastos.

Si este mecanismo no es suficiente, el exceso de radiación absorbida puede disiparse en los complejos antena mediante fluorescencia o mediante procesos no fotoquímicos, es decir, reacciones químicas dependientes de energía luminosa que no forman parte de la cadena de transporte electrónico de la fotosíntesis y que por lo tanto no conllevan a la formación de ATP y poder reductor, como el ciclo de las xantofilas (Streb *et al*., 1997).

La radiación que no es disipada mediante los mecanismos anteriormente descritos es canalizada hacia procesos fotoquímicos. Sin embargo, un exceso en la síntesis de ATP y NADPH puede conllevar a un bloqueo en la transferencia electrónica, así como un incremento en la formación de ROS. Para solventar este problema, las células vegetales pueden incrementar el metabolismo para consumir ambos productos a través del aumento de la actividad enzimática de la RuBisCo, de la fotorespiración y/o de reacciones dependientes de NADPH, como la reducción de nitratos o la reacción de Mehler.

Si, a pesar de ello, el incremento en la producción de ROS es inevitable, es necesaria la activación de sistemas antioxidantes, los cuales están constituidos tanto por enzimas como por pigmentos y otros compuestos antioxidantes.

Si los sistemas antioxidantes no son suficientes, el daño oxidativo puede retrasarse mediante una alta tasa de recambio de la proteína D1, siendo de hecho la proteína más sintetizada del planeta (Taiz y Zeiger, 2002)

Finalmente, el fracaso de todos los mecanismos descritos anteriormente puede dar lugar al estrés oxidativo, en el que las especies reactivas de oxígeno producen peroxidación de lípidos,

oxidación de proteínas, daños al material genético, blanqueamiento de pigmentos y otros procesos destructivos para la célula.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A la hora de entender cómo las plantas de alta montaña son capaces de adaptarse a la alta radiación solar es necesario estudiar qué mecanismos han desarrollado para enfrentarse al estrés lumínico, así como la versatilidad de los mismos, de modo que se han descrito los siguientes objetivos específicos:

1) Determinar la absortividad de las hojas o tallos fotosintéticos de las especies estudiadas.
2) Evaluar la capacidad de cada una de estas especies de disipar un excedente de energía en forma de calor a través del análisis del *quenching* no fotoquímico (q_N) y de sus componentes q_I, q_T y q_I.
3) Delimitar las tasas de transporte electrónico máximas (ETR_{max}), las densidades de flujo fotónico saturantes ($PPDF_s$) y fotoinhibitorias ($PPFD_i$), así como la eficiencia cuántica aparente (AQE) alcanzadas para cada especie.
4) Analizar la versatilidad de los parámetros anteriores ante diferentes exposiciones lumínicas.

4.3. ÁREA DE ESTUDIO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

4.3.1. ÁREA DE ESTUDIO

El área en donde se llevó a cabo esta parte del TFG (Fig. 7) se encuentra en el Centro de Visitantes del Parque Nacional del Teide, situado a 2.070 m de altitud, dentro de las instalaciones que el parque tiene asignadas para la recuperación y conservación de algunas de las especies del matorral de alta montaña.

Figura 7. Centro de Visitante del Parque Nacional del Teide.

En esta parcela los ejemplares de estudio, provenientes de los semilleros del centro, fueron plantados en macetas y depositados

en dos zonas con radiaciones contrastadas: el grupo experimental denotado como EXP_{50} se dispuso bajo un dosel artificial que implicó una reducción de la radiación global de un 50 %, mientras que el grupo EXP_{100} se localizó en una zona totalmente expuesta. Cada grupo experimental consta de 3 réplicas de las seis especies estudiadas, las cuales se diferenciaron únicamente en la exposición a la alta radiación a la que se vieron sometidos desde el 26 de septiembre del 2012. Las plantas fueron diariamente regadas para eliminar el efecto de un estrés hídrico adicional.

4.3.2. EXPERIMENTO 1: Determinación de la absortividad foliar

En este experimento se midieron los valores de Abs de las seis especies estudiadas utilizando el fluorímetro IMAGING-PAM. Cada especie estuvo representada por los dos grupos experimentales descritos anteriormente: EXP_{50} y EXP_{100}, cada uno de los cuales a su vez constituidos por 3 individuos, de las que se muestreó un "n" mínimo de 10 hojas. En todos los casos, se seleccionaron hojas adultas y en buen estado para homogeneizar el muestreo.

Las comparaciones entre los valores de Abs se realizaron tanto para los distintos grados de exposición, como para las distintas especies de cada grupo experimental. Además, se testó si los valores de absortividad medidos en cada caso se ajustan a un valor convencional de 0,84.

4.3.3. EXPERIMENTO 2: Curvas de inducción y recuperación.

Con el objetivo de comparar si existen diferencias en la capacidad de disipar el exceso de energía en forma de calor a diferentes condiciones de exposición lumínica y entre especies, se realizaron curvas de inducción y recuperación con el fluorímetro MINI-PAM, determinando los valores de q_N y de los componentes q_E, q_T y q_I. Cada curva consistió en un primer pulso saturante en hojas adaptadas previamente a 30 min de oscuridad para obtener los valores de F_0 y F_m. Cuarenta segundos después, se activó una luz no saturante (750 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, luz roja a 620 nm) durante 8 min, repitiendo los pulsos de saturación cada 40 s. Transcurrido ese tiempo, la luz se apagó y se realizaron 7 pulsos de luz a los 30, 90, 210, 510, 1110, 1200 y 1800 segundos de oscuridad para determinar la dinámica de recuperación.

En este caso, el número de réplicas fue 3 y se correspondió con el número de plantas presentes para cada especie en cada grupo experimental.

4.3.4. EXPERIMENTO 3: Curvas rápidas de luz (RLC)

Con el objetivo de obtener los parámetros ETR_{max}, $PPFD_s$, $PPFD_i$ y AQE, se llevaron a cabo RLCs utilizando el IMAGING-PAM. Con este fluorímetro se sometieron hojas no adaptadas totalmente a oscuridad a 20 intensidades distintas de luz (10, 21, 30, 41, 57, 76, 103, 134, 165, 205, 249, 298, 371, 456, 581, 725, 923, 1175, 1465 y 1856 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, luz azul 740 nm) durante 50 s cada una. Tras cada intervalo de tiempo se aplicó un pulso saturante de luz y se determinaron los valores de F' y F_m', con los que se calculó el ETR.

A partir de la curva ETR/PPFD (Fig. x) se aplicó el programa *Photosynthesis Assistant* Version 1.1 (Dundee Scientific, Dundee, Reino Unido), mediante el cual fue posible obtener los parámetros ETR_{max}, $PPFD_s$ y AQE. El parámetro $PPFD_i$ se obtuvo mediante la derivada de una ecuación polinómica ajustada a la curva de ETR (Microsoft Excel, 2010).

4.3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa IBM SPSS *Statistics* versión 21 (IBM, EE.UU.) con un nivel de confianza del 95 % ($\alpha = 0,05$). En todos los casos se testó y aceptó la hipótesis de normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

A la hora de comparar cualquiera de los parámetros medidos entre los dos grupos experimentales EXP_{50} y EXP_{100} para cada especie, se realizó un T-test para dos muestras independientes, el cual incluye una prueba de Levene para la igualdad de varianzas. En muchos casos, no se aceptó la hipótesis de homocedasticidad, aunque esto nunca cambió decisivamente el resultado del p-valor.

Para realizar comparaciones entre medias de un mismo parámetro entre especies distintas del mismo grupo experimental se aplicó un ANOVA de una vía con un *post hoc* de Duncan o un test no paramétrico, el T2 de Tamhane, según se cumpliera la hipótesis de homocedasticidad.

El análisis de la desviación de los valores de Abs para cada especie y grado de exposición del valor estándar 0,84 se llevó a cabo mediante T-test para una muestra.

4.4. RESULTADOS

4.4.1. EXPERIMENTO 1: Determinación de la absortividad foliar

En los valores de Abs obtenidos se observaron diferencias entre las seis especies estudiadas y entre los dos grados de exposición (Fig. 8). Todas las especies mostraron una reducción significativa de Abs en condiciones de EXP_{100}, a excepción de *A. viscosus*. La especie que

mostró un porcentaje de reducción mayor entre ambos grados de exposición fue *P. lasiospermus* con un 22,34 % de reducción. Además, esta especie alcanzó la Abs más baja en EXP_{100} con un valor de 0,64 seguida de *E. scoparium* y *E. wildpretii*, mientras que *S. supranubius*, *A. viscosus* y *S. glabrata* presentaron los valores más altos. Bajo EXP_{50}, fue *E. wildpretii* el que presentó valores menores de Abs, siendo *S. subranubius* y *S. glabrata* los que alcanzaron mayores valores de Abs.

Todos los valores de Abs resultaron ser distintos al valor convencional de 0,84, a excepción de *S. glabrata* bajo EXP_{50}. Asimismo, en el resto de las especies, las diferencias consistieron en una reducción de la Abs respecto a este valor convencional, a excepción de *S. supranubius* bajo EXP_{50}, cuya Abs resultó ser significativamente mayor que 0,84 tanto en hoja como en tallo.

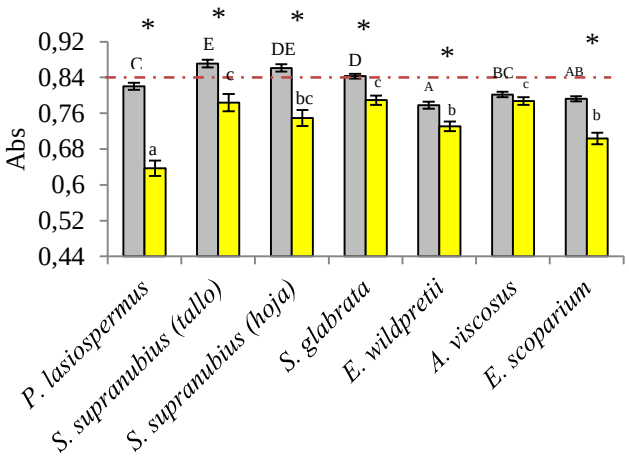

Figura 8. Valores de absortividad de las seis especies estudiadas para EXP_{50} (gris) y EXP_{100} (amarillo). El valor de absortividad convencional de 0,84 se resalta con una línea roja discontinua. *: diferencias significativas entre EXP_{100} y EXP_{50}. Letras mayúsculas: diferencias significativas entre especies del grupo EXP_{50}. Letras minúsculas: diferencias significativas entre especies del grupo EXP_{100}. p-valor < 0,05.

4.4.2. EXPERIMENTO 2: Curvas de inducción y recuperación

Se observaron comportamientos variables en q_N según el grado de exposición y de la especie (Fig. 9). Los valores de q_N fueron significativamente más altos bajo EXP_{50} en *P. lasiospermus* y *S. glabrata*, mientras que *S. supranubius* muestra un q_N mayor en EXP_{100}, no observándose diferencias significativas en el resto de las especies. Los valores más altos de q_N se encontraron en *P. lasiospermus* a EXP_{50} y *S. supranubius* a EXP_{100}, ambos por encima de

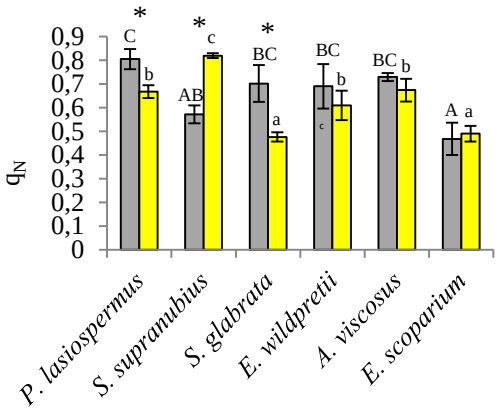

Figura 9. Valores de q_N (EXP_{100}: amarillo; EXP_{50}: gris). *: diferencias significativas entre EXP100 y EXP50. Letras mayúsculas: diferencias significativas entre especies del grupo EXP50. Letras minúsculas: diferencias significativas entre especies del grupo EXP100. p-valor < 0,05.

0,8, mientras que los valores más bajos se encontraron en *S. glabrata* de EXP_{100} y *E. scoparium*, con valores en torno a 0,47.

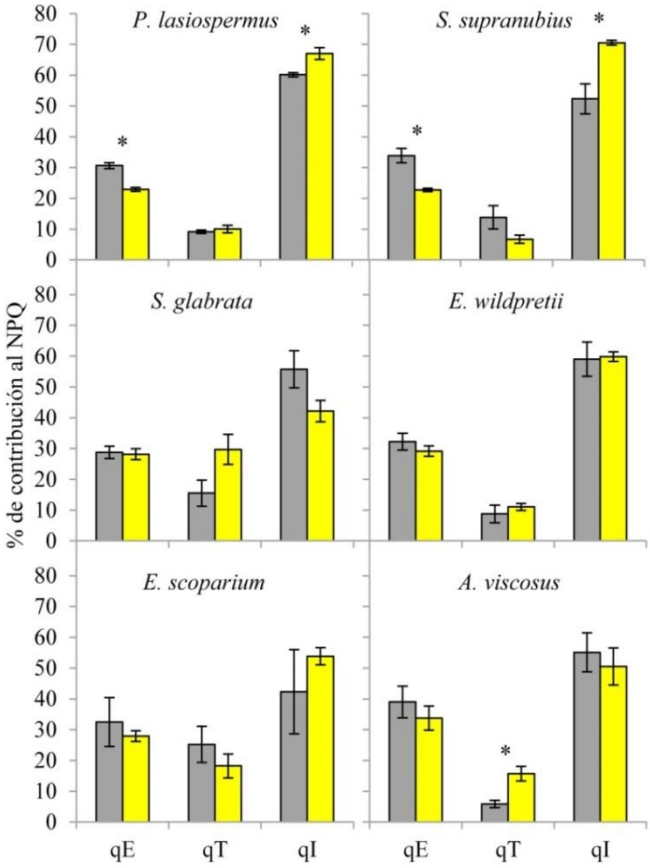

Figura 10. Porcentaje de contribución de los tres componentes al qN para las seis especies estudiadas (EXP_{100}: amarillo; EXP_{50}: gris). *: p-valor < 0,05

Con el análisis de los componentes de q_N (Fig. 10) se observó que *P. lasiospermus* y *S. supranubius* fueron las especies que presentaron un q_I superior a un 65%, mientras que en *S. glabrata* y *E. scoparium* la contribución de cada componente resultó ser más balanceada gracias al incremento de q_T, en contraposición al q_I.

Las especies estudiadas no mostraron diferencias según el grado de exposición, a excepción de *P. lasiospermus*, *S. supranubius* y *A. viscosus*. Las dos primeras especies sufrieron una disminución significativa de q_E acompañado de un aumento significativo de q_I bajo EXP_{100}. Por el contrario, *A. viscosus* presentó un aumento significativo únicamente en q_T en estas condiciones de exposición.

4.4.3. EXPERIMENTO 3: Curvas rápidas de luz (RLC)

El análisis de las RLCs (Fig. 11) indica que fue *S. supranubius* (tallo) la especie que mostró los valores máximos de ETR_{max} de 162 y 175 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ bajo EXP_{50} y EXP_{100}, respectivamente, mientras que *E. scoparium* mostró la ETR_{max} más baja con valores de 38 y 50 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ bajo EXP_{50} y EXP_{100}, respectivamente. Además, las especies *P. lasiospermus* y *S. supranubius* (hoja) mostraron valores de ETR_{max} más bajos en EXP_{100} respecto a EXP_{50}. Sin embargo, *S. glabrata* y *E. scoparium* tuvieron la tendencia contraria, mientras que el resto de las especies, así como el tallo de *S. supranubius*, no mostraron diferencias significativas según el grado de exposición lumínica.

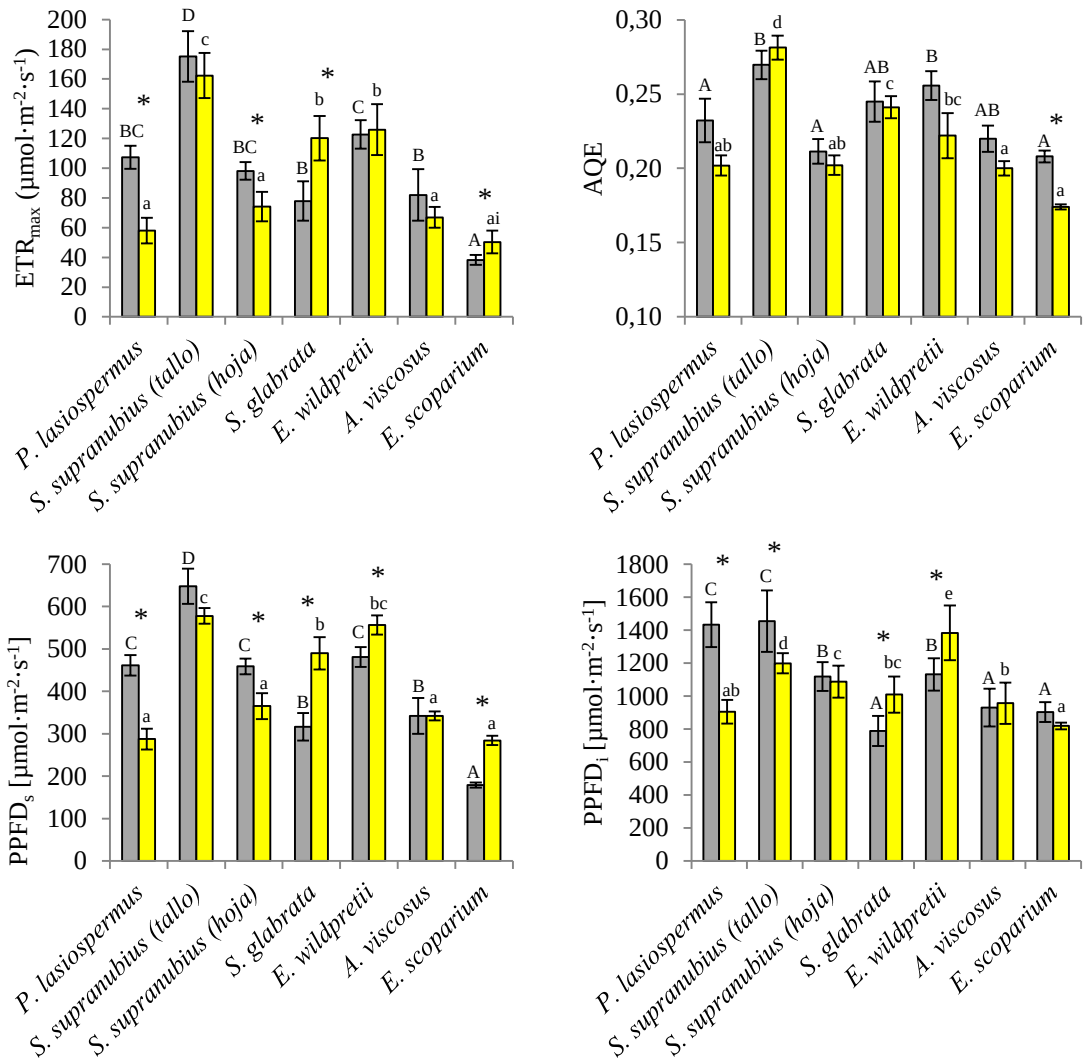

Figura 11. Valores de ETR_{max}, $PPFD_s$, $PPFD_i$ y AQE. EXP_{100}: amarillo; EXP_{50}: gris. *: *: diferencias significativas entre EXP100 y EXP50. Letras mayúsculas: diferencias significativas entre especies del grupo EXP50. Letras minúsculas: diferencias significativas entre especies del grupo EXP100. p-valor < 0,05.

Los valores de $PPFD_s$ mantienen el mismo comportamiento descrito anteriormente entre EXP_{50} y EXP_{100}, a excepción de *E wildpretii*, el cual si obtuvo diferencias significativas. El máximo $PPFD_s$ fue obtenido igualmente por *S. supranubius* (tallo) con valores de 647 y 577 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ en EXP_{50} y EXP_{100}, respectivamente, mientras que *E. scoparium* vuelve a presentar los valores mínimos de 179 y 284 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ en EXP_{50} y EXP_{100}, respectivamente.

Los valores de AQE no mostraron diferencias significativas entre distintos grados de exposición, excepto en *E. scoparium*, cuyos AQE fueron significativamente más altos bajo EXP_{50}. Los valores de AQE más altos fueron alcanzados por *S. supranubius* (tallo), con una eficiencia de 28 %, mientras que *E. scoparium* presentó el AQE mínimo de 17 %, ambos casos bajo EXP_{100}.

El análisis del $PPFD_i$ atendiendo al grado de exposición mostró conductas diferentes en las especies estudiadas. Así, *S. supranubius* (tallo) y *P. lasiospermus* mostraron valores de $PPFD_i$ en EXP_{50} significativamente más altos que en EXP_{100}, mientras que en *S. glabrata* y *E. wildpretii* mostraron la conducta contraria, no observándose diferencias significativas en el resto de las especies. En este caso, fueron *S. supranubius* (tallo) junto a *P. lasiospermus* de EXP_{50} y *E. wildpretii* de EXP_{100} las especies que presentaron valores de $PPFD_i$ mayores, con valores en torno a 1400 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

4.4.4. DISCUSIÓN

Todas las especies estudiadas fueron capaces de desarrollar mecanismos que permitieron reducir la absortividad de sus hojas o tallos cuando fueron expuestas a una alta radiación, a excepción de *A. viscosus*, el cual no mostró una reducción de la Abs frente a un cambio de exposición lumínica, lo cual refleja que esta especie no presenta una plasticidad fenotípica en esta barrera primaria. El resto de las especies sí mostraron una gran plasticidad. En el caso de *P. lasiospermus* y *S. supranubius* (tallo) ésta fue debida principalmente a la variación en la densidad de pelos, mientras que en el resto de las especies este factor no fue tan evidente (datos observados).

S. supranubius y *S. glabrata* presentaron los valores más altos de Abs en relación con el resto de las especies, lo cual indica que en estas especies este primer mecanismo de evitación de la absorción de luz está menos desarrollado. En el caso de *E. wildpretii*, es de destacar que bajo condiciones de menor exposición lumínica presentó los menores valores de Abs frente al resto de especies, indicando la gran importancia de esta barrera en esta especie. Esto concuerda con la alta densidad de pelos presente en la misma (Lausi y Nimis, 1986).

A la luz de los resultados observados, es evidente que la asunción de un valor convencional de 0,84 para este parámetro implica un error importante en el caso de las plantas de alta montaña estudiadas, recalcando la importancia de medir este parámetro para cada especie y situación experimental.

El análisis de q_N mostró valores mayores en *P. lasiospermus*, indicando que en esta especie la vía de disipación no fotoquímica está más desarrollada. Por el contrario, *E. scoparium* presentó los menores valores de q_N, lo cual se correlaciona con su bajo valor de Abs, indicando que esta barrera primaria es importante en este caso.

Cuando se analiza la versatilidad de q_N según el grado de exposición, se observa como *P. lasiospermus* y *S. glabrata* disminuyen su capacidad para disipar el exceso de energía en forma de calor al haberse desarrollado en un ambiente más expuesto a la radiación. En el caso de *P. lasiospermus*, esta disminución se explica por la baja Abs en estas condiciones, es decir, el desarrollo de esta barrera primaria compensa el déficit en la disipación, mientras que en *S. glabrata* no existe esa correlación. Por otro lado, *S. supranubius* presentó el comportamiento opuesto, es decir, adquiere mayor capacidad de disipación de energía en forma de calor cuando crece bajo altas radiaciones solares, siendo además la especie que tiene las barreras primarias menos desarrolladas.

La gran importancia observada del componente q_I en *P. lasiospermus* y *S. supranubius*, mayor que el 42 % típico de una planta no estresada (Lichtenthaler *et al*., 2005), indica la destrucción de la proteína D1, la cual es un constituyente importante en el PSII (Taiz y Zeiger, 2002). Este daño se debe a que en estas especies tiene lugar un descenso de q_E, indicando una inactivación de procesos dependientes del gradiente de pH, como el ciclo de las xantofilas cuando se desarrollan a altas radiaciones solares.

Aunque en principio el aumento de q_I pueda indicar la existencia de daño en los fotosistemas y una baja adaptación a la alta radiación, en ocasiones la fotoinhibición puede ser una estrategia de supervivencia, ya que el hecho de desactivar la fotosíntesis puede ser una forma de evitar la síntesis de ROS y el consecuente daño oxidativo. Sin embargo, esta estrategia solo es eficaz si se trata de una fotoinhibición dinámica y no crónica. Queda pendiente determinar si la mayor fotoinhibición que padecen las especies *P. lasiospermus* y *S. supranubius* con respecto a su potencial en condiciones sombreadas es crónica o dinámica.

Dada la variabilidad de los parámetros obtenidos a partir de las RLCs y su relación con la Abs y con q_N, se discutirán estos resultados de manera integradora para cada especie.

A. viscosus presentó una nula plasticidad fenotípica, ya que sus barreras primarias, tasas de transporte electrónico, así como sus puntos de saturación y fotoinhibición no se vieron modificados al exponerse a altas radiaciones. Además de carecer de estos sistemas de regulación, no se trató de una de las especies más resistentes a la alta radiación.

E. scoparium, a pesar de tener las barreras primarias bien desarrolladas, resultó ser la especie más sensible a la alta radiación, ya que presenta las menores tasas de transporte electrónico, así como puntos de saturación y fotoinhibición más bajos. Esta mayor sensibilidad a la alta insolación puede explicarse al presentar sistemas de disipación por calor más bajos. Además,

fue la única especie que presentó mayor eficiencia cuántica al desarrollarse bajo condiciones de menor radiación.

Al igual que la especie anterior, *S. glabrata* también se mostró sensible a la radiación. Sin embargo, a diferencia de *E. scoparium*, esta especie sí fue capaz de incrementar las ETR_{max}, lo cual no puede ser explicado con un aumento de la disipación térmica, siendo necesario la intervención de otros mecanismos como un incremento de la tasa metabólica y/o actividad antioxidante para explicar estas regulaciones a la alta radiación.

E. wildpretii presentó una gran adaptación a las altas radiaciones en contraposición a las especies hasta ahora nombradas, con altas tasas de ETR, lo cual puede ser explicado por su activación de las vías de disipación no fotoquímica, así como el desarrollo de sus barreras primarias.

El tallo de *S. supranubius* presentó la mejor adaptación a las altas radiaciones, ya que mostró las mayores ETR independientemente de su grado de exposición y se saturó y fotoinhibió más tardíamente, pese a tener una alta Abs. Sin embargo los mecanismos que retrasan esta fotoinhibición variaron dependiendo del grado de exposición en el cual se ha desarrollado la planta. Así, la mayor capacidad de disipación por calor explicó el retraso de la fotoinhibición en plantas desarrolladas en EXP_{100}. Sin embargo, este mecanismo no fue activado bajo EXP_{50}, lo cual indica que otros factores deben influir en la adquisición de esta alta resistencia, ya sea mediante incremento metabólico o actividad antioxidante. La hoja de *S. supranubius* presentó una menor resistencia a la fotoinhibición y menor eficiencia cuántica que el tallo, adquiriendo evidentemente un papel secundario en la actividad fotosintética.

P. lasiospermus es la especie de mayor plasticidad fenotípica, presentando una reducción de todos los parámetros estudiados bajo una alta exposición. Estos bajos valores de ETR_{max} y $PPFD_i$, así como un incremento en el daño de la proteína D1 y una reducción de la capacidad de disipación por calor mostrados en *P. lasiospermus* en alta radiación, indican que esta especie se encuentra inhibida bajo estas condiciones lumínicas. Esto contradice la gran abundancia de esta especie en el Parque Nacional del Teide, indicando la existencia de otros factores que le aporten ventaja a esta planta. El nicho ecológico es al fin y al cabo un promedio de los nichos fisiológicos que puede presentar una planta ante la multitud de factores, bióticos o abióticos, que determinan su supervivencia: condiciones edáficas, estrés hídrico o incluso el efecto que podría tener una herbivoría seleccionadora sobre la determinación del nicho de esta planta.

5. ENSAYO II: MECANISMOS DE RESPUESTA AL ESTRÉS TÉRMICO

5.1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos poiquilotermos, es decir, no son capaces de mantener su temperatura constante, por lo cual las temperaturas ambientales tienen una alta influencia en todos los procesos fisiológicos y son un factor determinante en su distribución y supervivencia. Ello es debido a que cada especie presenta unos rangos de temperatura específicos para llevar a cabo sus funciones vitales. Fuera de estos rangos un exceso de calor o frío, dependiendo de su intensidad y duración, dañará la actividad metabólica, el crecimiento y la viabilidad imponiendo los límites para su distribución.

Hemos de tener en cuenta que la temperatura tiene una multitud de efectos sobre la fisiología, puesto que cada proceso tiene de manera potencial una dependencia térmica única y la resistencia a las temperaturas extremas puede suponer una ventaja a la hora de competir con otras especies, ya que se trata de un factor ambiental con grandes oscilaciones que a menudo puede alcanzar umbrales desfavorables y dañinos. Los mecanismos que subyacen a estos daños ya se han reseñado anteriormente.

Si atendemos a su resistencia a las bajas temperaturas, podemos clasificar en (Larcher, 2003):

- Plantas sensibles a bajas temperaturas, las cuales sufren un daño letal a temperaturas superiores a pocos grados por encima del punto de congelación del agua.
- Plantas sensibles a la congelación, las cuales toleran bajas temperaturas mientras no exista formación de hielo intracelular, protegiéndose mediante un retraso del punto de congelación.
- Plantas tolerantes a la congelación, aquellas que soportan la congelación extracelular y la deshidratación del tejido asociada a dicha congelación.

En el caso de las altas temperaturas, las plantas pueden clasificarse en función de su resistencia en plantas (Larcher, 2003):

- Especies sensibles al calor, las cuales sufren un daño letal entre 30-45 ºC.
- Plantas relativamente resistentes al calor, las cuales son capaces de sobrevivir a 50-60 ºC durante al menos media hora.
- Procariotas tolerantes al calor, los cuales pueden soportar temperaturas por encima de 75 ºC.

A ello debemos añadir que estas resistencias, tanto a las bajas como a las altas temperaturas pueden sufrir variaciones estacionales dependiendo de la especie, siendo un fenómeno frecuente la aclimatación al someter a las plantas a recurrentes temperaturas extremas. Dichas aclimataciones juegan un papel decisivo al aumentar los límites de tolerancia de dichas especies en periodos de especial interés (Junttila y Robberecht, 1993).

En el caso de los ecosistemas de alta montaña, la limitación de crecimiento por las temperaturas extremas ejerce un papel destacado. Estudios de resistencias se han centrado principalmente en obtener valores para la época de crecimiento, mientras que es menos frecuente el análisis de la resistencia durante el período frío, y aún menor número de estudios que reflejen la variación anual de los cambios a dichas resistencias (Bannister et al., 2005; Larcher et al., 2010).

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El estudio de la respuesta frente al estrés térmico tiene los siguientes objetivos específicos:

1) Determinar la temperatura a la cual se produce el daño inicial y el daño letal de *Pterocephalus lasiospermus* y el tipo de resistencia de esta especie.
2) Determinar la versatilidad de la resistencia a las bajas temperaturas tras eventos de congelación como posible evidencia de aclimatación.

5.3. MATERIAL Y MÉTODOS

5.3.1. PARCELA DE ESTUDIO Y MATERIAL VEGETAL

El área de estudio se encuentra en el Morro del Sordo (Fig. 12) dentro del Parque Nacional del Teide a 2070 m de altitud. Está caracterizada por una comunidad de sustitución de *Erysimo scoparii-Pterocephaletum lasiospermi* Rivas-Martínez *et al*. 1993, formando un ecotono con el pinar y sustituyendo a la comunidad potencial y cabeza de serie de *Spartocytisetum-supranubii* Oberdorfer *ex* Esteve 1973 (Del-Arco *et al*., 2006).

Figura 12. Morro del Sordo (Parque Nacional del Teide).

Para este ensayo se requirió de una gran cantidad de material vegetal debido no solo al número de tratamientos y de réplicas, sino también a la necesidad de homogeneizar las hojas muestreadas –hojas adultas y con un estado fisiológico óptimo– por lo que se eligió *P. lasiospermus*, una de las especies dominantes del matorral de alta montaña, para llevar a cabo estos experimentos.

5.3.2. EXPERIMENTO 4: Tratamiento foliar a temperaturas extremas y determinación de LT_{50}.

Se realizaron tres ensayos de tratamiento térmico foliar (Fig. 13), los dos últimos separados por un fuerte evento de congelación: 17 diciembre (E1), 14 de febrero (E2) y 25 de febrero (E3).

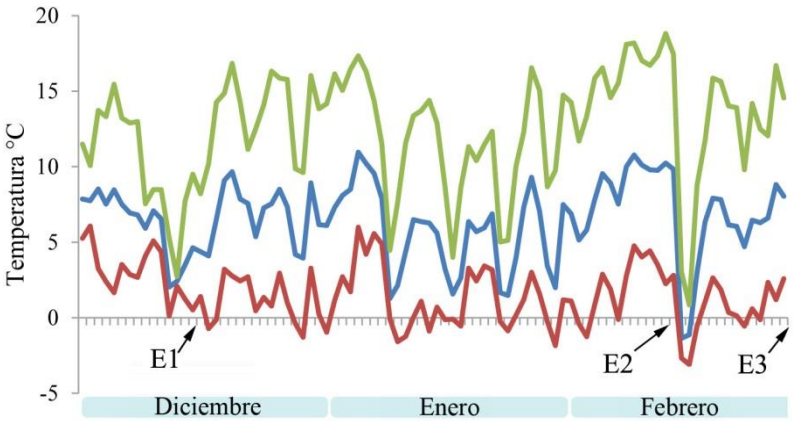

Figura 13. Temperaturas mínimas absolutas (rojo), medias (azul) y máximas absolutas (verde) del área de estudio.

En los tres ensayos se adoptó el mismo criterio para el muestreo: de los penachos recolectados en campo de *P. lasiospermus*, los cuales debían presentar el mismo grado de exposición, se seleccionaron hojas adultas a partir del tercer verticilo y que presentasen valores de F_v/F_m iniciales en torno a 0,75, equivalente a una hoja en óptimas condiciones.

Las hojas muestreadas se fijaron a láminas de acetato en grupos de 5 (E1 y E2) ó 9 réplicas (E3) y se introdujeron en bolsas herméticas con un papel humedecido para asegurar una atmósfera saturante que evite la deshidratación. Las bolsas cerradas, a su vez, se sometieron durante 30 minutos a un baño termostatado a diferentes temperaturas según el experimento (desde -16 a 50°C en E1 y E2 y desde -20 a 0°C en E3, con un intervalo de 2°C). Un termopar acoplado a una de las hojas indica el momento en el que alcanza la temperatura del baño, empezando a contabilizar el tiempo a partir de ese momento. Este es el procedimiento convencional para realizar este tipo de ensayos, lo cual permite realizar comparaciones entre especies ensayadas en cualquier parte del mundo (Larcher *et al*,, 2010).

Antes y después de cada tratamiento, se midió el estado fotosintético de cada hoja utilizando para ello los parámetros F_v/F_m y R_{fd} obtenidos mediante una cinética de Kautsky con luz saturante (E1 de 1.800 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, mientras que en E2 y E3 de 923 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, luz azul a

470 nm) con el IMAGING-PAM. Sin embargo, el cálculo de R_{fd} solo fue posible en E2 y E3, ya que la primera intensidad lumínica resultó ser dañina para la planta. Ambos parámetros se utilizarán como medida directa del estado fisiológico de la hoja, de modo que su porcentaje de desviación respecto a los valores de los controles equivale al porcentaje de daño en la misma.

En el caso de F_v/F_m, se consideran controles los valores de este parámetro obtenidos antes del tratamiento para cada réplica, mientras que para R_{fd} se seleccionaron 5 (E2) o 9 (E3) hojas control no sometidas a ningún tratamiento térmico pero sí a una cinética de Kautsky.

Tras cada ensayo, se calculó la temperatura a la cual se produce un 10% (LT_{10}) y un 50% de daño (LT_{50}). Normalmente el LT_{10} se considera la temperatura a la cual se produce un daño inicial y reversible, mientras que LT_{50} equivale a la temperatura crítica en donde se produce el daño irreversible y letal, ambos calculados a partir de los porcentajes de reducción de los parámetros indicadores de daño (Bannister *et al*., 2005; Larcher *et al*., 2010; Sierra-Almeida y Cavieres, 2012; Buchner *et al*., 2013).

5.3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Nuevamente se utilizó el programa IBM SPSS *Statistics* versión 21 (IBM, EE.UU.) con un nivel de confianza del 95 % ($\alpha = 0,05$). Para calcular los valores de LT_{10} y LT_{50} se aplicó una regresión lineal tanto para el porcentaje de reducción de F_v/F_m como de R_{fd} para las temperaturas umbrales, previamente testadas las hipótesis de normalidad y homocedasticidad. Una vez realizado el ajuste del modelo y haber testado su validez, se obtuvo la predicción del valor medio de temperatura equivalente a un 10 y 50 % de reducción tanto de F_v/F_m como de R_{fd}, así como los límites del intervalo superior e inferior para esa estimación media.

5.4. RESULTADOS

A continuación se muestran los valores de LT_{10} y LT_{50} estimados para cada ensayo y en los dos parámetros medidos: F_v/F_m y R_{fd} (Tabla 2), así como el comportamiento de estos parámetros a lo largo de cada ensayo (Fig. 14).

A bajas temperaturas, los valores de LT estimados a partir de F_v/F_m fueron significativamente mayores que con R_{fd}, aunque ambos mostraron la misma tendencia. En E1 y E2, se obtuvo un LT_{10} en torno a -10 ºC (con F_v/F_m como indicador de daño) y a -6 ºC (con R_{fd}) y un LT_{50} sobre -13 ºC (con F_v/F_m) y -8,5 ºC (con R_{fd}), mientras que a altas temperaturas se observó un LT_{10} de 40 ºC y un LT_{50} en torno a 43,5 ºC con ambos parámetros.

En E3, se observó para las bajas temperaturas que ambos valores de LT se incrementaron, obteniendo un LT_{10} de -12,5 ºC (con F_v/F_m) y -7,6 ºC (con R_{fd}) y un LT_{50} de -16 ºC (con F_v/F_m) y -9,9 ºC (con R_{fd}).

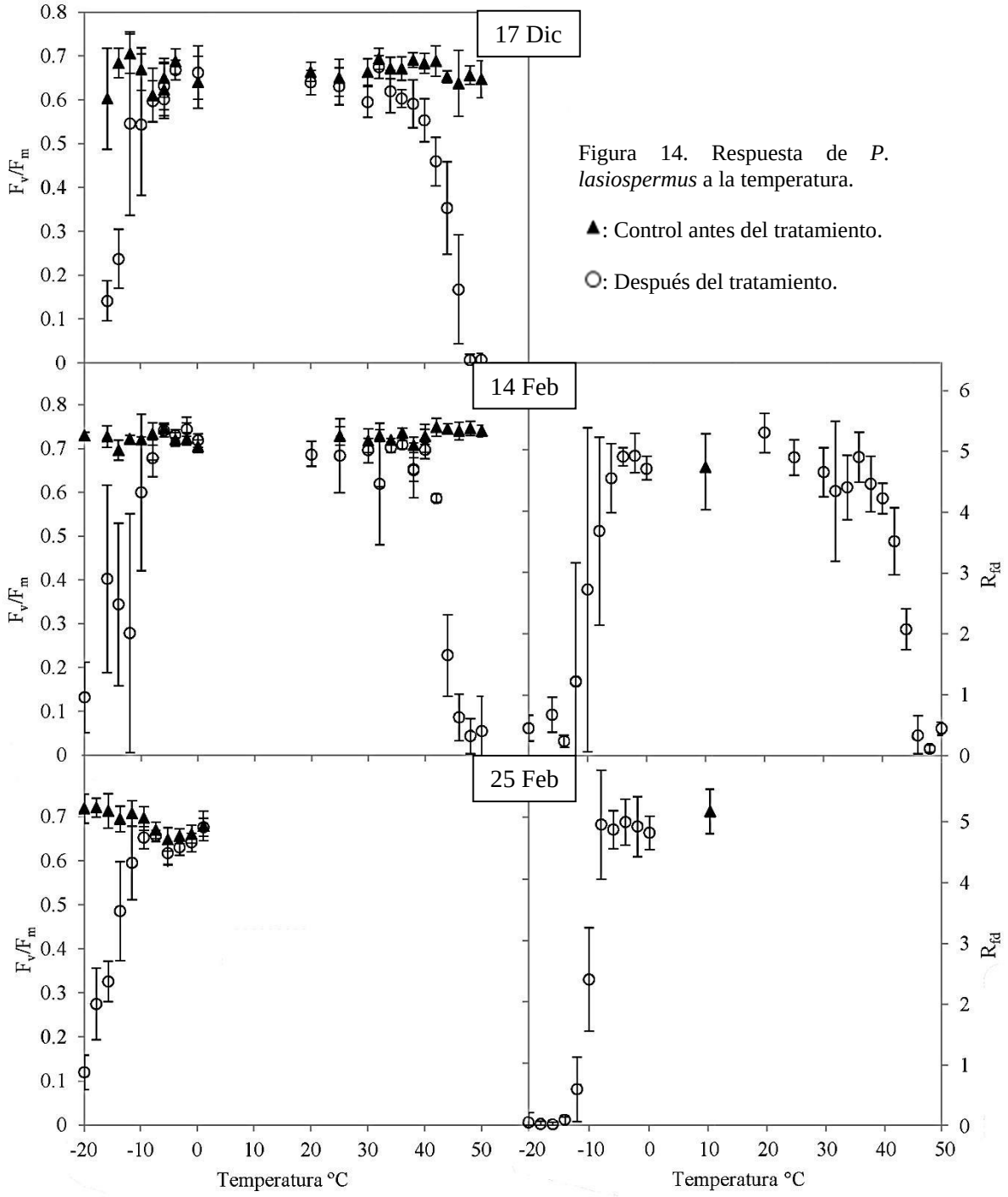

Figura 14. Respuesta de *P. lasiospermus* a la temperatura.

▲: Control antes del tratamiento.

○: Después del tratamiento.

Ensayo	LT (ºC) con F_v/F_m	p-valor	r	LT (ºC) con R_{fd}	p-valor	r
E1 (17 diciembre)	LT_{10} = -10,00 ± 0,84 LT_{50} = -12,94 ± 0,69	0,000	0,847	---------		
	LT_{10} = 38,71 ± 0,99 LT_{50} = 43,70 ± 1,11	0,000	0,824			
E2 (14 febrero)	LT_{10} = -9,47 ± 1,28 LT_{50} = -12,24 ± 1,21	0,000	0,633	LT_{10} = -6,34 ± 1,04 LT_{50} = -8,50 ± 0,88	0,000	0,729
	LT_{10} = 40,59 ± 0,95 LT_{50} = 43,99 ± 0,58	0,000	0,909	LT_{10} = 39,15 ± 1,12 LT_{50} = **43,26 ± 0,61**	0,000	0,916
E3 (25 febrero)	LT_{10} = -12,46 ± 0,78 LT_{50} = -16,04 ± 0,44	0,000	0,859	LT_{10} = -7,60 ± 0,55 LT_{50} = **-9,97 ± 0,32**	0,000	0,929

Tabla 2. Resumen de los LT_{10} y LT_{50} medidos para los tres ensayos, utilizando como parámetros indicadores del daño a F_v/F_m y R_{fd}. Para cada valor de LT se muestra el p-valor para la idoneidad del modelo obtenido de la regresión lineal, así como el coeficiente de correlación.

5.5. DISCUSIÓN

El parámetro R_{fd} resultó ser mucho más sensible al estrés por bajas temperaturas que el F_v/F_m. Esto se debe a que la activación de la cadena de transporte electrónico y la oxidación de los centros de reacción depende en gran medida de la fluidez de la membrana, mientras que la fluorescencia emitida al aplicar un pulso de saturación obedece únicamente al estado del PSII. Sin embargo, a altas temperaturas, la estimación de daño por parte de ambos parámetros se iguala, ya que el efecto del calor en la membrana (pérdida del gradiente de concentración y deterioro de la función ATPasa) provoca de forma directa un daño en el PSII.

A la hora de determinar la temperatura a la cual se produce el daño inicial y reversible, así como el daño letal e irreversible, se debe utilizar aquel parámetro cuyo significado fisiológico aluda a un proceso limitante para la planta. En este caso, la adquisición de rigidez en las membranas e incluso la rotura de las mismas se consideran eventos de trascendental importancia, a pesar de que el PSII todavía muestre clorofilas activas y capaces de emitir fluorescencia, por lo que se considera el parámetro de R_{fd} más adecuado para calcular los diferentes LT a temperaturas bajas.

La distancia entre ambos parámetros medidos es importante, ya que según la LT_{50} de F_v/F_m existe una aclimatación al frío a finales de febrero en E3. Los valores de LT_{50} entre E1 y E2 no mostraron diferencias significativas, pese a que ya se habían registrado varios eventos con

temperaturas mínimas por debajo de 0 ºC, mientras que se da una diferencia de entre 2 y 5,5 grados entre E2 y E3, la cual viene marcada por un fuerte evento de congelación que alcanzó temperaturas mínimas de -3 ºC. Este cambio no ocurre tan drásticamente en la LT_{50} de R_{fd}, con valores de entre 0,5 a 2,5 grados en E3 con respecto a E2. Un comportamiento similar se observa en el caso de la LT_{10}, tanto en F_v/F_m como en R_{fd}. En cualquier caso, es evidente la existencia de un fenómeno de aclimatación para *P. lasiospermus* provocado por eventos reiterados de congelación y bajas temperaturas.

Por otro lado, no se observó una diferencia significativa para las altas temperaturas entre E1 y E2. Sin embargo, una posible aclimatación al calor tras los meses cálidos se comprobará en ensayos posteriores, en la estación estival.

En definitiva, *P. lasiospermus* es una especie sensible a la congelación incluso teniendo en cuenta el fenómeno de aclimatación, sufriendo un daño inicial a -7,6 ºC y un daño irreversible a los -9,97 ºC. Estos valores son cercanos a las temperaturas mínimas absolutas registradas en el Parque Nacional del Teide (-9,8 ºC en febrero de 1971), lo cual indica que esta especie se encuentra en un riesgo de daño por bajas temperaturas. Sin embargo, los límites en altas temperaturas de daño inicial de 39,15 ºC y letal de 43,26 ºC se encuentran muy por encima de las máximas absolutas registradas en el parque (30,4 ºC en julio de 1995), mostrando un menor riesgo de daño por altas temperaturas.

6. CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones obtenidas en este trabajo se resumen a continuación:

1) Excepto *A. viscosus*, todas las demás especies estudiadas desarrollaron los mecanismos primarios de reducción de la Abs frente al exceso de radiación como consecuencia directa de una mayor exposición.
2) *S. supranubius* y *S. glabrata* fueron las especies que presentaron un menor desarrollo de estos mecanismos primarios frente al exceso de radiación, mientras que *P. lasiospermus* fue la especie que más desarrollada tenía esta estrategia.
3) La máxima capacidad de disipación de energía en forma de calor la presentó *S. supranubius*, mientras que *E. scoparium* mostró la menor.
4) En *P. lasiospermus* y *S. supranubius* el principal proceso implicado en la vía de disipación no fotoquímica fue la inactivación del PSII mediante la destrucción de la proteína D1.
5) *E. wildpretii* y el tallo de *S. supranubius* presentaron las mejores adaptaciones a las altas radiaciones.
6) *E. scoparium y P. lasiospermus* fueron las especies más sensibles a la alta radiación.
7) *P. lasiospermus* mostró ser una especie sensible a la congelación y a las altas temperaturas.
8) *P. lasiospermus* es capaz de llevar a cabo una aclimatación a las bajas temperaturas como resultado de exposiciones reiteradas a eventos de congelaciones.
9) Las bajas temperaturas mostraron ser un factor de riesgo para el desarrollo de *P. lasiospermus* en el Parque Nacional del Teide, mientras que las altas temperaturas actuales no lo fueron.

6. GENERAL CONCLUSIONS

The conclusions obtained in this bachelor thesis are summarized below:

1) Except *A. viscosus*, the rest of the studied species developed the primary mechanisms of Abs reduction since there is an excess of radiation as a consequence of higher exposition.
2) *S. supranubius* y *S. glabrata* showed a less development of this mechanism under high radiation, meanwhile *P. lasiospermus* was the specie which greatest developed this strategy.
3) The maximum capacity of energy dispersion by heat appeared in *S. supranubius*, meanwhile *E. scoparium* present the minimum.
4) In *P. lasiospermus* and *S. supranubius*, the main process involved in non photoquemical quenching was the inactivation of PSII by the destruction of D1 protein.
5) *E. wildpretii* and the stem of *S. supranubius* show the best adaptation to high radiation.
6) *E. scoparium* and *P. lasiospermus* were the most sensitive species to high radiation.
7) *P. lasiospermus* was sensitive to freezing and high temperatures.
8) *P. lasiospermus* was able to achieve an acclimatization to low temperatures as a result of a repeated exposition to freezing events.
9) Low temperatures were a risk factor for *P. lasiospermus* development in el Parque Nacional del Teide, meanwhile the current high temperature was not.

7. BIBLIOGRAFÍA

Azcón-Bieto, J. y Talón M. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Capítulo 13: Fotosíntesis en un ambiente cambiante. McGraw-Hill Interamericana. 203-216.

Bannister, P., Maegli, T., Dickinson, K., Halloy, S., Knight, A., Lord J., Mark, A. y Spencer, K. 2005. Will loss of snow cover during climatic warming expose New Zealand alpine plants to increased frost damage? *Oecologia.* 144:245-256.

Buchner, O., Karadar, M., Bauer, I. y Neuner, G. 2013. A novel system for *in situ* determination of heat tolerance of plants: first results on alpine dwarf shrubs. *Plant Methods.* 9:7

Carter, G. A. y 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.

Foyer, C. H. y Mullineaux, P. 1994. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC Press. 395 p.

Körner, C. 2010. Alpine plant life. Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems. Springer. 349 p.

Del-Arco, M. 2008. Consecuencias del cambio climático sobre la flora y vegetación canaria. In: Méndez, J.M. y M. Vázquez a. (Eds.). El Cambio Climático en Canarias. Academia Canaria de Ciencias. Serie Monografías Nº 1: 79-100. ISBN: 978-84-612-2434-0.

Del-Arco, M., Pérez-de-Paz, P. L., Acebes, J. R., González-Mancebo, J. M., Reyes-Betancort, J. A., Bermejo, J. A., de-Armas, S. y González-González, R. 2006. Bioclimatology and climatophilous vegetation of Tenerife (Canary Islands). *Annales Botanici Fennici*. 43:167-192.

Del-Arco, M., Wildpret, W., Pérez-de-Paz, P. L., Rodríguez, O., Acebes, J. R., García, A., Martín, V., Reyes-Betancort, J. A., Salas, M., Díaz, M. A., Bermejo, J. A., González-González, R., Cabrera, M. V., y García, S., 2006. *Mapa de Vegetación de Canarias*. GRAFCAN. Santa Cruz de Tenerife.

Del-Arco, M., González-González, R., Garzón-Machado, V. y Pizarro-Hernández, B. 2010. Actual and potential natural vegetation on the Canary Islands and its conservation status. *Biodiversity and Conservation.* 19:3089-3140.

Fernández-Palacios, J. M. y de los Santos, J. 1996. Ecología de las Islas Canarias. Muestreo y análisis de poblaciones y comunidades. Cap 9: La distribución de la flora y de la vegetación. Sociedad La Cosmológica, 219-240. Santa Cruz de La Palma, España.

Fernández-Palacios, J. M. 1992. Climatic responses of plant species on Tenerife, The Canary Islands. *Journal of Vegetation Science.* 3:595-602.

Fernández-Palacios, J. M. y de Nicolás, J. P. 1995. Altitudinal pattern of vegetation variation on Tenerife. *Journal of Vegetation Science*. 6:183-190.

Genty, B, Briantais, J. M. y 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.

Helaouët, P. y Beaugrand, G. 2009. Physiology, Ecological Niches and Species Distribution. *Ecosystems*. 12:1235-1245.

Junttila, O. y Robberecht, R. 1993. The influence of season and phenology on freezing tolerance in Silene acaulis L., a subarctic and arctic cushion plant of circumpolar distribution. *Annals of Botany.* 71:423-426.

Köhler, T. y Maselli, D. 2009. Mountains and Climate Change - From Understanding to Action. Cap 1: Climate Change in Mountains. Mountain Partnership Secretariat – FAO. pp. 65.

Köhler., L., Gieger T. y Leuschner C. 2005. Altitudinal change in soil and foliar nutrient concentrations and in microclimate across the tree line on the subtropical island mountain Mt. Teide (Canary Islands). Flora. 201:202-214.

Köhler, L., Gieger, T. y Leuschner, C. 2013. Altitudinal change in soil and foliar nutrient concentrations and in microclimate across the tree line on the subtropical island mountain Mt. Teide (Canary Islands). *Flora*. 201:202-214.

Lambrev, P., Tsonev, T., Velikova, V., Georgieva, K., Lambreva, M., Yordanov, I., Kovács, L. y Garab G. 2007. Trapping of the quenched conformation associated with non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence at low temperature. *Photosynthesis Research*. 94:321-332.

Larcher, W., Kainmüller, C. y Wagner, J. 2010. Survival types of high mountain plants under extreme temperatures. *Flora*. 205:3-18.

Larcher, W. 2003 Physiologycal Plant Ecology. Springer. 504 pp.

Lausi, D. y Nimis, P. L. 1986. Leaf and canopy adaptations in a high-elevation desert on Tenerife, Canary Islands. *Vegetatio.* 68:19-31.

Lichtenthaler H., Buschmann C. y Knapp M. 2005. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R_{Fd} of leaves with the PAM fluorometer

Martín, J. L., Bethencourt, J. y Cuevas-Agulló, E. 2012. Assessment of global warming on the island of Tenerife, Canary Islands (Spain). Trends in minimum, maximum and mean temperatures since 1944. *Climatic Change.* 114:343-355.

Murchie, E. y Lawson, T. 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*. V64:3983–3998.

Reigosa, M. J., Pedrol, N. y Sánchez, A. (Coordinadores) (2003). La ecofisiología vegetal, una ciencia de síntesis. Internacional Thomson Editores. España.

Rivas-Martínez, S. 1995. Clasificación bioclimática de la Tierra (Bioclimatic classification system of the World). *Folia Botanica Matritensis*. 16:1-29.

Rodríguez, N., Notario, J., Arbelo, C. D., Rodríguez-Rodríguez, A. y Guerra, J. A. 2014. Spatial variability of soil properties and soils classification in Teide National Park (Tenerife, Canary Islands). In: GlobalSoilMap. Basis of the global spatial soil information system. Arrouays, D., McKenzie, N., Hempel, J., Richer, A. y McBratney, A. (eds.) 191-196. Londres, Reino Unido.

Roháček, K. 2010. Method for resolution and quantification of components of the non-photochemical quenching (qN). *Photosynthesis Research.* 105:101-113.

Schulze, E. y Caldwell, M. 1995. Ecophysiology of Photosynthesis. Cap. 3: C Chlorophyll Fluorescence as a Nonintrusive Indicator for Rapid Assessment of In Vivo Photosynthesis. Schreiber, U., Bilger, W. y Neubauer, C. Springer. 450 p.

Sierra-Almeida, A. y Cavieres, L. A. 2012. Summer freezing resistance of high-elevation plant species changes with ontogeny. *Environmental and Experimental Botany.* 80:10-15.

Streb, P., Feierabend, J. y Blingny, R. 1997. Resistance to photoinhibition of photosystem II and catalase and antioxidative protection in high mountain plants. *Plant, Cell and Environment.* 20:1030-1040.

Taiz, L. y Zeiger, E. 2002. Plant Physiology. Cap. 9: Photosynthesis: Physiological and Ecological Considerations. Sinauer, 170-192.

Walker, D. 1987. The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. Oxygraphics, Sheffield.

White, A. J. y Critchley, C. 1999. Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynthesis Research*. 59:63-72.

Woolley, J. T. 1971. Reflectance and transmittance of light by leaves. *Plant Physiology*. 47:656-662.

Agencia Estatal de Meteorología. Disponible en internet: www.aemet.es