

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Ecofisiología del pino canario

Autor: Peters, Juliane

**Directores: María Soledad Jiménez Parrondo
y Domingo Morales Méndez**

Departamento de Biología Vegetal

JULIANE PETERS

ECOFISIOLOGÍA DEL PINO CANARIO



UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
2001

**TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR JULIANE PETERS
PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTORA EN BIOLOGÍA.**

LA LAGUNA A 12 DE MARZO DE 2001.

MARÍA SOLEDAD JIMÉNEZ PARRONDO Y DOMINGO MORALES MÉNDEZ,
PROFESORES TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL DE LA
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

CERTIFICAN:

Que la licenciada **Juliane Peters** ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Biología Vegetal (Unidad de Investigación de Fisiología Vegetal) de la Universidad de La Laguna, los trabajos de investigación que han conducido a la elaboración de su Tesis Doctoral titulada: ECOFISIOLOGÍA DEL PINO CANARIO.

La Laguna a 12 de marzo de 2001.

M^a SOLEDAD JIMÉNEZ

DOMINGO MORALES

Cuando el verano se extiende sobre el mundo, en un
mediodía de oro,

bajo la bóveda de las hojas dormidas se despliegan los
sueños de los árboles;

Cuando las salas del bosque son verdes y frescas, y el
viento sopla del oeste,

¡regresa a mí! ¡regresa a mí y di que mi tierra es la
mejor!.

“El señor de los anillos”. J.R.R. Tolkien.

A CARLOS JAVIER GALISTEO ORTEGA, DE FORMA MUY ESPECIAL

Y a ANNELIESE, MANFRED, DIRK y SABINE PETERS,
ARSENIO LEÓN OJEDA, LAURA LEÓN PETERS;
y al pequeño ¿RUBÉN? GALISTEO PETERS que viene,

CON TODO MI AMOR

AGRADECIMIENTOS

Es difícil explicar la ilusión que conlleva un trabajo como éste. Ha habido muchísimas aventuras durante este tiempo, y muchas cosas inolvidables. Pero todo esto carecería de sentido si no lo hubiera compartido con los seres que me han acompañado, ayudado y que se han preocupado por mí. Gracias a todos.

Gracias a *Marisol* y a *Domingo* porque han sido unos directores maravillosos, enseñándome mucho más de lo que hay en esta Tesis y, aparte, unos buenos amigos con los que he pasado innumerables aventuras que no olvidaré nunca.

Mil gracias a *Águeda* por ser una de las mejores personas que he conocido, por ayudarme tanto, no sólo en mi trabajo, por animarme, darme nuevas ideas y ver en mí la persona que siempre he querido ser.

Muchísimas gracias a *Vanessa* por ser tan abierta, espontánea y sencilla y haber traído al Departamento toda su fuerza.

A *Alberto*, por ser ejemplo de dedicación y de trabajo bien hecho desde que llegó, por alegrarnos con sus bromas y sus golosinas, por hacer que nos esforcemos para expresarnos mejor y por afianzar en mí la seguridad de que todo va a salir “superverde”.

Gracias a *Jesús* por su simpatía, su amabilidad con las personas que lo rodean, por su ayuda, su decisión, su iniciativa y su entrega al trabajo, que siempre serán un ejemplo a seguir.

Gracias también a *Domingo, Pedro, Isolde, Marta y Pilar*, por todos los momentos compartidos que ojalá hubiesen sido muchos más.

Un millón de gracias a *Carlos* por toda la felicidad, ilusión, decisión y amor que ha habido en mi vida desde que le conozco y por hacer que todo parezca mucho más fácil. Gracias por ser tan maravilloso conmigo.

Muchísimas gracias a *Arsenio* (SuperArse:), por ser como un hermano durante tantos años, muchas veces hemos compartido los mismos sueños.

Gracias a *Laura* (Superbaby), por toda la alegría que supone cada uno de sus gestos y de sus pasos y por la satisfacción que representa verla crecer junto a nosotros.

Gracias a *Diana* y a *Macu* por ser amigas tan especiales como sólo ellas pueden serlo, por todo lo que hemos compartido y todo lo que nos queda por compartir.

Gracias: A *Gilberto* por su cariño y por su genial ayuda en todo lo que está en su mano, por ser atento, cálido y cercano (todo el mundo debería poder ser testigo alguna vez de su capacidad de cálculo); A *Miguelito* por ser tan buen amigo, probablemente el menos “materialista” de todos; A *Tomí*, por esa risa tan alegre y contagiosa y por sus encantadores reportajes fotográficos.



Muchas gracias a los mejores amigos de siempre, a los que quiero y admiro más de lo que pueda quedar plasmado en este papel: *Mila, Carlos, Felipe, Carmi, Diego, Jorge, Gema, Mar, Gloria, Cecilio, Vicky, Charo, Sean, Virginia...* Sobre todo a *Carlitos* y a *Luis*, que son la alegría y la vida allí donde van.

Gracias a cada uno de los miembros de mi enorme familia que, aunque estén lejos, siempre están cerca. Especialmente a mis tíos, *Dorle, Guido, Eugen, Anita, Hilde, Hans, Hubertus, Bärbel, Ilse, Walter, Josef, Elisabeth, Maria, Martin, Robert, Inge, Brigitte, Rita* y a la memoria de *Berti, Franz, Anneliese, Jupp, Oma, Opa, Grobvater* y *Grobmutter*.

Mil gracias a *José Ramón*, por cómo es, por cómo anima su forma de trabajar y por ser siempre claro y sincero.

Muchas gracias a *José Mari*, por estar siempre dispuesto a ayudar y a escuchar y por animar a la gente como sólo él puede hacerlo.

Gracias a *Peter* y a *Jessica* que siempre serán parte de mi felicidad.

Gracias a mis buenos amigos del pasado, especialmente a *Neli*, a *Ligia*, y a *Conchi*.

A *Maica*, a *Javi* y a *Vere*, un millón de gracias por un millón de cosas.

Muchísimas gracias a *Agustín*, por estar ahí cada vez que había un problema informático y actuar de exorcista frente a los ordenadores poseídos.

Gracias a los profesores y a los investigadores de la Universidad de La Laguna que han hecho que el tiempo en ella haya pasado como un sueño benévolo y maravilloso. Y gracias a los grandes científicos colaboradores desde países lejanos, y a todos los miembros de sus equipos de trabajo, que siempre han sido motivo de ejemplo y admiración: Profesor *Dieter Grill*, *Doctor Gerhard Wieser*, Profesor *Rainer Lösch*, Profesor *Jan Cermák*, Profesora *Nadjezhda Nadjezhkina*...

Gracias a los profesores con los que todos los días he compartido espacio y tiempo: *Chana*, *Raymond*, *Blanca*, los más cercanos.

Muchísimas gracias a *Conchi*, porque conozco a pocas personas tan dispuestas a ayudar a los demás como ella y con una simpatía y un amor por los demás tan espontáneos, por ser la mejor aliada en los trámites burocráticos que tanto nos lían siempre.

A los diversos Departamentos que forman parte de la Universidad, siempre que he pedido ayuda me he encontrado con gente que me ha tratado con gran amabilidad y que han colaborado conmigo en la medida que estaba en su mano. Quisiera agradecer, particularmente, al Servicio de Nitrógeno Líquido (especialmente a *Antonio*) y al Departamento de Galénica de la Facultad de Farmacia (especialmente a *Ana*), que nos dejaron usar su liofilizador para liofilizar y desecar nuestras muestras.

Gracias, individualmente, a cada una de las personas que me acompañaron durante esos días de medida en la torre, no sólo por su ayuda (sin la cual los resultados obtenidos jamás hubieran podido ser tan ricos) sino, sobre todo, por su compañía: *Diana*, *José Miguel*, *Maica*, *Blanca Isabel*, *Águeda*, *Irga*, *Gilberto*, *Carlos Enrique*, *Tamar*.

A todos los científicos que contestaron a mis peticiones de bibliografía durante todos estos años, de forma totalmente desinteresada y muchos de ellos de esa forma tan atenta que me emocionó tantas veces. Una de las mayores alegrías cotidianas ha sido abrir el correo. ¡Gracias!

Desde aquí quiero mandar un abrazo muy fuerte a: *Michi*, *Maria*, *Günther*, *Astrid*, *Philipp*, *Wilfried*, *Andreas*, *Gunter*, *Edith*, *Toni*, *Birgit*, *Uli*, *Tina*, *Gisela*, *Theresa*, *Sophia*, *Tom*, *Guaci*, *Nacho*, *Marta*, *Sergi*, *Fermín*, *Leire*, *Eduardo*, *Luciana*, *Enrique*, *Martha*, *Samantha*, *Lorena*, *Ianara*, *Sert*, *Paola*, *Antonio*, *Pedrito*, *Aurelio*, *Mari*, *Manolo*,

Sergio, Carmen, José Manuel... sobre todo por ser buenos amigos que he conocido gracias a mi relación, directa o indirecta, con el Departamento y por todas las cosas que me han enseñado y que han compartido conmigo.

Gracias también a *Penny, Candela, Futzy y Boli*, por mantener alta mi moral.

Gracias a mis padres: *Anneliese y Manfred*, y a mis hermanos: *Sabine y Dirk*, por apoyarme siempre, por haberme enseñado tantas cosas importantes y por confiar y creer los unos en los otros y en los demás.

ASIMISMO, MUCHÍSIMAS GRACIAS:

A la **Consejería de Educación Cultura y Deportes del Gobierno de Canarias** por la concesión de una beca de postgrado desde julio de 1997 hasta diciembre del 2000, y al **Fondo Social Europeo** que cofinancia estas becas. Sin esta ayuda el presente trabajo no se hubiera podido llevar a cabo.

También a la **Consejería de Educación Cultura y Deportes** por la subvención del proyecto “influencia de la densidad de la cubierta de los pinares de Tenerife en la recarga del acuífero” (proyecto número PI1999/118, modalidad B).

Al **Vicerrectorado que Investigación de la Universidad de La Laguna** por la concesión de las Bolsas de Viaje, apoyando mi asistencia y participación en diversos congresos nacionales e internacionales (Córdoba, Tata (Hungría), Sevilla), que me han permitido viajar a lugares lejanos, conocer gente maravillosa y enriquecer mis conocimientos. También a este mismo organismo por la concesión de una ayuda para la realización de una estancia de un mes de duración en la Universidad de Graz entre los meses de mayo y junio de 2000.

Al **programa de Cooperación Bilateral de Ciencia y Tecnología entre España y Austria** (Acciones Integradas 32B-1995 y 34B-1996), que posibilitó mi estancia en Graz en 1996 durante el periodo de un mes bajo la dirección del Profesor Dieter Grill. Y a este mismo programa por la concesión de nuevas

Acciones Integradas durante 1998 y 1999 (Acción HU1997-0012), gracias a las cuales estuve también cuatro semanas en el Departamento de Fisiología Vegetal de la universidad de Graz, en los veranos de 1998 y 1999.

A la concesión de dos becas del programa europeo **COST** dentro del proyecto **Eurosilva E6** que me permitieron ir tres semanas a Graz en mayo de 1997 y dos semanas a esta misma ciudad en noviembre de 2000.

A los agentes del área de Medio Ambiente del **Cabildo Insular de Tenerife** por construir la torre del pinar. Y a este mismo organismo y, en especial, a Pascual Gil por toda la colaboración prestada.

Al personal de la **Comisión de doctorado**, de la **Consejería de Educación** en el Edificio Arcoiris de Santa Cruz, del **Rectorado** de la Universidad, de la portería y la biblioteca de las **Facultades de Biología y de Farmacia**..... por toda su ayuda y su amabilidad.



Gracias por todas las aventuras vividas a lo largo de este tiempo. Que siempre perduren en nuestro recuerdo los mejores momentos, que son los que me han hecho tan feliz en todo lo relacionado con este trabajo y con el día a día en el Departamento de Fisiología Vegetal.





ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

C_i :	Concentración de CO_2 en el mesófilo
DPV:	Déficit de presión de vapor
E:	Transpiración
F_0 :	Fluorescencia inicial
F_m :	Fluorescencia máxima
F_s :	Fluorescencia de estado estacionario
F_v :	Fluorescencia variable
Gs:	Conductancia estomática
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución
IRGA:	Analizador de gases por infrarrojo (I nfra- R ed G as A nalys e r)
It:	Índice de daño
LAI:	Índice de área foliar
LT_{10} :	Temperatura a la que se produce el 10% del daño
LT_{50} :	Temperatura a la que se produce el 50% del daño
PAR:	Radiación fotosintéticamente activa
PCL:	Punto de compensación luminoso
PEA:	Fluorímetro portátil (P lant E fficien c y A nalys e r)
Pn:	Fotosíntesis neta
$Pn_{máx}$:	Fotosíntesis neta máxima
PPFD:	Densidad de flujo fotónico fotosintético
PSL:	Punto de saturación luminoso
ϕ :	Rendimiento cuántico aparente
R_0 :	Conductividad relativa de una muestra expuesta a una determinada temperatura
Rd:	Respiración de oscuridad
Rfd:	$(F_m - F_s)/F_s$
Rt:	Conductividad relativa de una muestra expuesta a una determinada temperatura

INDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. EL PINO CANARIO⁴

1.1.1. <i>La aparición de los pinos</i>	4
1.1.2. <i>Origen de la flora canaria</i>	6
1.1.3. <i>La historia particular de Pinus canariensis</i>	7
1.1.4. <i>Aprovechamiento de los pinares canarios</i>	8
1.1.5. <i>Situación actual del pino canario</i>	9
1.1.6. <i>Entorno abiótico</i>	11
1.1.6.1. <i>Sustrato</i>	11
1.1.6.2. <i>Condiciones climáticas</i>	11
1.1.7. <i>Entorno biótico</i>	12
1.1.7.1. <i>Flora endémica asociada al pinar canario</i>	12
1.1.7.2. <i>Fauna asociada al bosque de pinos</i>	12
1.1.8. <i>Repoblaciones, plantaciones y conservación del pino canario</i>	13
1.2. OBJETIVOS GENERALES	15
1.3. OBJETIVOS CONCRETOS	17
1.4. BIBLIOGRAFÍA	18

2. MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES

2.1. MATERIAL VEGETAL	23
2.2. ÁREA DE ESTUDIO	24
2.3. TÉCNICAS Y APARATOS DE MEDIDA	25
2.3.1. <i>Estación meteorológica y datos climáticos</i>	25
2.3.2. <i>Analizador de gases por infrarrojo para medidas de intercambio gaseoso</i>	26
2.3.3. <i>Medidas de la fluorescencia de la clorofila</i>	28
2.3.3.1. <i>La fluorescencia de la clorofila</i>	28
2.3.3.2. <i>Inducción de la fluorescencia</i>	28
2.3.3.3. <i>Las medidas con el fluorímetro (PEA) y los accesorios necesarios</i>	30
2.3.4. <i>Medidas de liberación de electrolitos</i>	32
3.3.4.1. <i>La liberación de electrolitos</i>	32
3.3.4.2. <i>La preparación de las muestras y las medidas de conductividad</i>	32
2.3.5. <i>Análisis de las concentraciones de pigmentos y antioxidantes</i>	33

2.3.6. <i>Estudio de la ultraestructura mediante</i> <i>microscopía electrónica</i>	35
3.3.6.1. <i>Microscopía electrónica de transmisión</i>	35
3.3.6.2. <i>Microscopía electrónica de barrido</i>	36
2.4. BIBLIOGRAFÍA	36

3. ANATOMÍA GENERAL DE LAS ACÍCULAS

3.1. INTRODUCCIÓN	43
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS	44
3.3. RESULTADOS	44
3.4. DISCUSIÓN	50
3.5. CONCLUSIONES	52
3.6. BIBLIOGRAFÍA	53

4. CONTENIDO EN NUTRIENTES, PIGMENTOS Y SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES EN LAS ACÍCULAS EN RELACIÓN CON LA ALTITUD Y DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS

4.1. INTRODUCCIÓN	59
4.2. MATERIAL Y MÉTODOS	63
4.3. RESULTADOS	65
4.4. DISCUSIÓN	71
4.5. CONCLUSIONES	74
4.6. BIBLIOGRAFÍA	75

5. INTERCAMBIO GASEOSO EN CONDICIONES NATURALES

5.1. INTRODUCCIÓN	81
5.2. MATERIAL Y MÉTODOS	84
5.2.1. <i>Datos meteorológicos y contenido hídrico del</i> <i>suelo</i>	86
5.2.2. <i>Medidas de intercambio gaseoso,</i> <i>fluorescencia de la clorofila, contenido</i> <i>hídrico y contenido en clorofila de las</i> <i>acículas</i>	86
5.2.3. <i>Análisis estadístico</i>	88

5.3. RESULTADOS	89
5.3.1. <i>Climatología del periodo de estudio</i>	89
5.3.2. <i>Cursos diarios</i>	94
5.3.2.1. <i>Análisis global de los cursos diarios</i>	120
5.3.2.2. <i>Influencia de la edad de las acículas en los cursos diarios</i>	123
5.3.3. <i>Análisis global de los datos de intercambio gaseoso</i>	123
5.3.3.1. <i>Variación de la fotosíntesis neta con los parámetros ambientales y fisiológicos</i>	124
5.3.3.2. <i>Variación de la transpiración y la conductancia frente a algunos parámetros ambientales</i>	131
5.3.4. <i>Variabilidad estacional de la fotosíntesis neta</i>	135
5.4. DISCUSIÓN	142
5.4.1. <i>Climatología del periodo de estudio</i>	142
5.4.2. <i>Cursos diarios</i>	143
5.4.3. <i>Análisis global de los datos de intercambio gaseoso</i>	148
5.4.3.1. <i>Variación de la fotosíntesis neta con los parámetros ambientales y fisiológicos</i>	148
5.4.3.2. <i>Variación de la transpiración y la conductancia frente a algunos parámetros ambientales</i>	151
5.4.4. <i>Variabilidad estacional</i>	152
5.5. CONCLUSIONES	155
5.6. BIBLIOGRAFÍA	156

6. RESPUESTA A UN ESTRÉS HÍDRICO SUAVE

6.1. INTRODUCCIÓN	171
6.2. MATERIAL Y MÉTODOS	172
6.3. RESULTADOS	173
6.4. DISCUSIÓN	183
6.5. CONCLUSIONES	187
6.6. BIBLIOGRAFÍA	188

7. RESISTENCIA DE LAS ACÍCULAS A LAS TEMPERATURAS EXTREMAS

7.1. INTRODUCCIÓN	195
7.2. MATERIAL Y MÉTODOS	197
7.3. RESULTADOS	199
7.3.1. <i>Experimento 1: Acículas procedentes de pinos crecidos a diferente altitud sobre la isla de</i>	

<i>Tenerife</i>	199
7.3.2. <i>Experimento 2: Acículas de diferentes estados de desarrollo</i>	213
7.4. DISCUSIÓN	227
7.4.1. <i>Bajas temperaturas</i>	227
7.4.2. <i>Altas temperaturas</i>	231
7.4.3. <i>Amplitud de los límites térmicos</i>	233
7.5. CONCLUSIONES	234
7.6. BIBLIOGRAFÍA	235
8. CONCLUSIONES GENERALES	243
9. ANEXOS	
9.1. ANEXO I	249
9.2. ANEXO II	254

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

“Las cosas son como son porque fueron como fueron” Fred Hoyle.

Las plantas han colonizado casi todos los rincones del mundo. Desde las gélidas latitudes polares, el agobiante calor de los desiertos, las soleadas costas y laderas, los encharcados manglares... hasta la recóndita oscuridad de los exuberantes sotobosques tropicales. Donde quiera que estén encuentran la manera de sobrevivir y reproducirse en armonía con su ambiente. En cada región de nuestro hermoso planeta viven especies distintas a las demás, en parte debido al pasado geológico de la Tierra y, en parte, debido a sus diversas zonas climáticas, que han hecho que el ambiente haya modelado su forma, sus estrategias y su distribución a lo largo de millones de años.

Allí donde las condiciones son más propicias, las plantas con requerimientos similares o compatibles comparten espacio y tiempo unas con otras y también con otras especies de seres vivos, originando las comunidades ecológicas.

Los bosques constituyen una de las comunidades ecológicas o biomas más complejos y diversos del planeta. Suponen el 21% del área continental y el 76% de la biomasa del planeta (Raghavendra 1991).

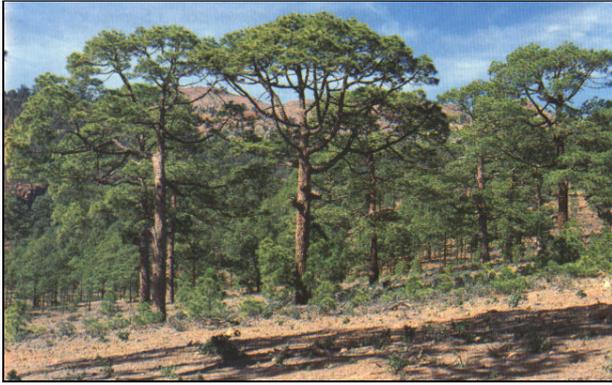


Foto 1.1. Bosque de pinos adultos en el sur de la isla de Tenerife.

1.1. EL PINO CANARIO

1.1.1. *La aparición de los pinos*

En el Carbonífero inferior, hace unos 340 millones de años, se formaron extensas comunidades vegetales, con árboles de más de 30 metros de altura. Eran altos

bosques de gimnospermas procedentes de progimnospermas devónicas.

Las coníferas más antiguas del registro fósil datan de finales del Carbonífero (hace unos 290 millones de años). Se cree que sus acículas, con su característica capacidad de resistencia a la sequía, evolucionaron en el Devónico, una época de aridez generalizada (Margullis y Schwartz 1985).

En el Mesozoico se desarrolló el orden de las pinales que se difundió por todo el mundo, y con sus 6 familias y unas 600 especies, en muchos casos dominantes de las comunidades en que viven, representan el grupo de gimnospermas que ha alcanzado “mayor éxito” (Strasburger 1994).

Tabla 1.1. Distribución del tiempo geológico desde hace aproximadamente 3700 millones de años hasta la actualidad. Fuente: Strasburger 1994.

Distribución del tiempo geológico			
Eonotemas y eones	Eratemas y eras	Sistemas y periodos	Tiempo geológico en millones de años
Fanerozoico	Cenozoico	Cuaternario	1.8 – 0
		Terciario	66 - 1.8
	Mesozoico	Cretácico	141 – 66
		Jurásico	195 – 141
		Triásico	230 – 195
		Pérmico	290 – 230
	Paleozoico	Carbonífero	347 – 290
		Devónico	395 – 347
		Silúrico	438 – 395
		Ordovícico	500 – 438
Cámbrico		570 – 500	
Arqueozoico (Precámbrico)			□ 3700 – 570

La familia pinácea se conoce desde el Jurásico, antes de que comenzara a fragmentarse la gran Pangea. En esta Era habitaban casi exclusivamente el hemisferio boreal, donde predominaban incluso en tierras bajas y, muchas veces, constituían el límite polar del bosque. Más hacia el sur solían circunscribirse a las montañas en algunos de cuyos pisos y, sobre todo, cerca de los límites altitudinales de los bosques, desempeñaban el papel principal (Strasburger 1994).



Figura 1.1. Posición probable de los continentes al final del Cretácico inferior (según Kremp). Fuente: Strasburger 1994.

A finales del Cretácico se abrió el océano Atlántico y todos los continentes adquirieron posiciones cercanas a las actuales (Figura 1.1). En estas etapas iniciales de apertura del Atlántico se formó el fondo oceánico sobre el que se comenzaron a edificar las Islas Canarias en el Terciario, hace unos 30 millones de años (Carracedo Gómez 1983).

En el Cretácico, y a lo largo de un período de 25 millones de años, las angiospermas alcanzaron el predominio en la mayoría de las biocenosis terrestres y relegaron a las gimnospermas y a los pteridófitos, anteriormente dominantes, a un segundo plano (Strasburger 1994).

Tabla 1.II. Variación en el número de especies de gimnospermas, pteridofitos y angiospermas en los últimos 300 millones de años. Fuente: Strasburger 1994.

	Edad (m.a.)	Número de especies		
		Gimnospermas	Pteridófitos	Angiospermas
Actualmente	0	800	10000	240000
Fin del Cretácico	66	500	2000	20000
Comienzo del Cretácico	141	1500	1500	0
Jurásico Medio	170	1500	1500	0
Carbonífero Superior	300	200	300	0

1.1.2. Origen de la flora canaria

En el Terciario superior (Mioceno y Plioceno; época que coincide con las primeras etapas de formación de las Islas Canarias) comenzó en todo el planeta un enfriamiento progresivo que alcanzó su máximo en el período glacial del Cuaternario, hace unos dos millones de años. Al mismo tiempo, la formación de cadenas montañosas como los Alpes, el Himalaya y el Atlas, y la reducción de las masas marinas y límnicas, entre otros sucesos, condujeron a una continentalización generalizada de los climas (Strasburger 1994).

Tabla 1.III. Edad de la Islas Canarias en millones de años. Fuente: Fernández-Palacios y de los Santos 1996.

Islas Canarias	Edad en millones de años
Lanzarote	19
Fuerteventura	16.6
Gran Canaria	13.9
Tenerife	7.2
La Gomera	12
La Palma	1.6
El Hierro	0.7

En el Cuaternario sobrevino un período glacial subdividido en 6 grandes fases interrumpidas por fases interglaciares templado - cálidas. Esto implicó el avance y retroceso sucesivo de las floras del sur de Europa y del norte de África. Gran parte del componente florístico de esta zona se extinguió durante estos avances y retrocesos debido, principalmente, a la existencia de diversas barreras geológicas como altas montañas, en muchos casos cubiertas de hielo, el mar Mediterráneo y las regiones áridas del Sáhara, que fueron obstáculos decisivos.

De esta forma, las zonas climáticas de Europa, junto con su vegetación, fueron desplazadas hacia el sur, hacia el antiguo mar de Tethys, que más tarde se transformaría en el mar Mediterráneo. Debido a este desplazamiento de las vegetaciones, y a causa de la progresiva aridez del norte de África, la primitiva distribución continua de muchos taxones se fraccionó y varias especies vegetales desaparecieron totalmente de esas partes del mundo. Otras encontraron una posibilidad de sobrevivir en los lugares más favorables, como las Islas Atlánticas, el este y sur de África o el este de Asia.

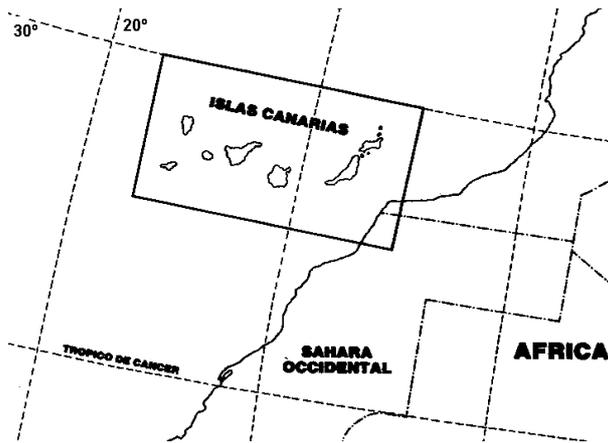


Figura 1.2. Situación general de Canarias en el océano Atlántico al borde de la costa africana.
Fuente: Afonso Pérez 1983.

Canarias se encuentra situada ligeramente al norte del trópico de Cáncer. A la misma latitud, aproximadamente a 100 kilómetros hacia el este, se encuentra Cabo Juby y el Sáhara extendiéndose hasta las costas del Mar Rojo.

La proximidad y la dirección de los vientos dominantes determinan que el continente africano y el sur de Europa sean los principales centros germinativos de

los que se han nutrido las Islas. Un gran número de las especies que observamos hoy en Canarias han formado parte, en algún momento, de los ecosistemas de estas regiones.

El carácter insular garantiza una amortiguación de los cambios climáticos. Por eso, en las Islas existen especies y bosques enteros que son un vestigio de lo que pudo ser el paisaje del norte de África y del sur de Europa en el pasado.

Entre las especies que lograron refugiarse en las Islas Canarias, durante la glaciación del cuaternario, se encuentra el pino canario junto con muchos de los miembros de la famosa laurisilva canaria.

De este modo, la flora endémica de las Islas Canarias parece tener sus mayores afinidades con la flora que en el Terciario rodeaba el antiguo mar de Tethys, ocupando la moderna cuenca del Mediterráneo que se extendía desde las montañas del Cáucaso hasta la región occidental del Himalaya. Las afinidades de esta zona también se extendieron por las cadenas montañosas de África Oriental, desde Etiopía hasta la región del Cabo de Buena Esperanza (Bramwell 1974).

1.1.3. *La historia particular de Pinus canariensis*

El Pino Canario, es el único con tres acículas que sobrevivió a la glaciación del Cuaternario en la parte occidental del Antiguo Mundo. Esta

especie se conoce como fósil de la flora Terciaria. Su pariente más próximo que aún vive es *Pinus roxburghii* sarg (= *Pinus longifolia* Roxb.) que se encuentra a más de 8000 Km de distancia en las laderas australes del Himalaya (Page 1974), presentando también tres acículas por vaina (Bramwell 1974). Este último guarda un extraordinario parecido con el pino canario del que sólo le separan muy pocas diferencias morfológicas (Delgado González 1986).

En el bajo período Cretácico los pinos ya se diferenciaban en dos grupos: *Haploxylon* y *Diploxylon* (Mirov y Stanley 1959). *Pinus canariensis* y *Pinus roxburghii* forman la sección Sula del subgénero *Diploxylon* que se caracteriza por poseer: piñones de ala fija, braquiblastos de tres acículas y piñas persistentes, voluminosas y más o menos apiramidadas.

Se han encontrado restos fósiles de plantas identificadas como *Pinus canariensis* que se extienden hasta el Paso de Goderzi en el suroeste de Rusia (Bramwell 1974), así como fósiles procedentes del Plioceno en Murcia (España) y Grad (Francia). Desde estas regiones, posiblemente las aves transportaron las semillas hasta las Islas Canarias (Del Arco y col. 1992).

Dentro del Archipiélago Canario, Gregor (1979) encontró fósiles de piñas de *Pinus canariensis* del Pleistoceno en La Caldera de Taburiente, en la Isla de La Palma.

1.1.4. Aprovechamiento de los pinares canarios

Todo parece indicar que los guanches, por su reducido número y por su dependencia del medio natural, casi no afectaron a las zonas potenciales de las diferentes formaciones vegetales de las Islas.

No obstante, estos pobladores obtenían del pino variados aprovechamientos, que eran fundamentales en su medio de vida (Del Arco y col. 1992). Entre ellos destacaban la fabricación de armas y bastones, ataúdes, antorchas, objetos domésticos, herramientas de trabajo, y la utilización de algunas partes de los pinos para fines alimenticios y medicinales.

Después de la conquista de las Islas, se extraía del bosque material para la construcción de casas, iglesias, almacenes, puentes y barcos. Los pinos canarios tienen la capacidad de “entearse”, de forma que la parte central del tronco

adquiere una alta concentración de sustancias resinosas que hacen la madera prácticamente imputrescible, y es, por lo tanto, ideal para la construcción de elementos que deban soportar la intemperie, como puertas y ventanas, así como las famosas y bellas balconadas de muchas casas canarias.

La albura de la madera, de peor calidad para la construcción, era quemada en combustión lenta en hoyas carboneras para la obtención del clásico carbón vegetal.

También, la pinocha ha sido muy empleada para empaquetar los plátanos y tomates destinados a la exportación y, localmente, como cama para el ganado.

1.1.5. Situación actual del pino canario

El área natural de la especie *Pinus canariensis* se halla actualmente circunscrita al Archipiélago Canario, aunque ha sido plantado frecuentemente en el litoral mediterráneo, así como en algunas zonas del continente americano (Ceballos y Ruiz 1971).

Los pinares constituyen en la actualidad la principal masa forestal del Archipiélago, estimándose que al iniciarse la Conquista ocupaban el 25% del territorio insular, extensión que se vio reducida a menos de un 12% a finales del siglo XIX. La repoblación ha hecho que en algunas islas la superficie de pinar se haya incrementado considerablemente en los últimos 50 años (Del Arco y col. 1992).

En las Islas forma bosques de importancia en Gran Canaria, Tenerife, La Palma y El Hierro, existiendo muy raros ejemplares sueltos en La Gomera. En Fuerteventura y Lanzarote ésta especie no existe debido a que el relieve no alcanza los niveles necesarios para el desarrollo del bosque de pinos.

Probablemente, el pinar original tuvo mayor difusión en las vertientes meridionales y occidentales de las islas, mientras que en la actualidad se halla más extendido por las umbrías, en parte porque ha colonizado los dominios del fayal-brezal y en parte porque, al ofrecer las vertientes húmedas mayor producción, el hombre lo ha conservado y extendido por medio de repoblaciones y plantaciones.

El área espontánea natural del pinar representa solamente una parte de los dominios que de forma natural corresponden a esta especie y que estuvieron



Figura 1.3. Progresión de la superficie de pinar en Tenerife desde 1950. El mapa superior izquierdo corresponde a 1950, y el derecho a 1960. Los inferiores corresponden, de izquierda a derecha a 1970 y 1987. Fuente: Del Arco y col. 1992

ocupados por ella, puesto que se vio obligada a retroceder debido a la acción del hombre y de los animales. Pero también, dentro de los pinares actuales, existen zonas, no pequeñas, que estuvieron ocupadas por especies más exigentes, que fueron desalojadas por los pinos (Martínez Pulido 1978).

Actualmente existen pinares particularmente bien desarrollados en Tamadaba en Gran Canaria; La Esperanza, Vilaflor y Aguamansa en Tenerife; la región central de El Hierro; regiones de La Caldera, La Cumbrecita y Fuencaliente en La Palma y en La Gomera en el Roque Agando (Bramwell y Bramwell 1990).

En Tenerife, la isla más alta del Archipiélago, el pino canario ocupa un rango altitudinal desde casi el nivel del mar hasta aproximadamente los 2200 metros.

1.1.6. Entorno abiótico

1.1.6.1. Sustrato

A lo largo de la evolución el pino canario se ha adaptado a las condiciones volcánicas de las Islas, por lo que el sustrato sobre el que vive es casi siempre volcánico, principalmente compuesto por rocas basálticas, aunque no falta la representación de rocas holocristalinas de basamento, de sedimentos recientes y otras efusivas de la familia de las riolitas, traquitas y fonolitas (Del Arco y col. 1992).

Su raíz principal, muy activa, le ha permitido colonizar malpaíses y terrenos volcánicos (Serrada y col. 1988), huyendo del fondo de los valles y mostrando preferencia por laderas medias, no importándole la pendiente existente, el terreno erosionado, o la pedregosidad superficial (Blanco y col. 1989).

1.1.6.2. Condiciones climáticas

El pino es capaz de soportar fuertes oscilaciones térmicas ya que, en la franja altitudinal que de manera natural ocupa en las Islas, las temperaturas diurnas y nocturnas pueden ser muy oscilantes, dependiendo también de la época del año. En casos extremos pueden abarcar una banda entre los -10 y los 40 °C (Serrada y col. 1988).

En las zonas más altas del pinar las precipitaciones son muy escasas (350 mm al año o menos) y una cantidad considerable cae en forma de nieve.

La radiación ultravioleta es alta y, a menudo, el viento es muy fuerte, produciendo estrés mecánico que empeora los efectos de la sequía y las bajas temperaturas (Werger y col. 1987).

1.1.7. Entorno biótico

1.1.7.1. Flora endémica asociada al pinar canario

El pinar natural es una formación abierta, tipo sabana, con relativamente poco sotobosque y grandes extensiones de suelo desnudo cubierto únicamente con pinocha. Las especies arbustivas más frecuentes en el sotobosque son *Adenocarpus foliolosus* (el codeso), *Chamaecytisus proliferus* (el escobón), *Cistus symphytifolius* (la jara), *Daphne gnidium* (la torvisca) y diversas especies de *Micromeria*. Entre las hierbas más comunes se encuentran varias especies de *Sideritis*, *Lotus*, *Asphodelus* y *Vicia*. Entre los endemismos locales se incluyen las especies *Micromeria pineolensis* en Gran Canaria y *Lactucosonchus webbii* en La Palma (Bramwell y Bramwell 1990).

En los límites naturales del pinar en la zona norte puede existir una mayor abundancia de brezos (*Erica arborea*) o fayas (*Myrica faya*), especies que caracterizan el piso de vegetación inmediatamente inferior, en plena zona de influencia de los alisios. En los límites superiores del pinar, es frecuente la invasión e incluso la sustitución del bosque por matorrales de leguminosas, esencialmente codesares (*Adenocarpus foliolosus*, *Adenocarpus viscosus*).

Mención aparte merecen los pinares con jara (*Cistus symphytifolius*, *Cistus monspelliensis*), con tomillo (*Micromeria* sp.) y con escobón (*Chamaecytisus proliferus*, *Chamaecytisus palmensis*) que no constituyen transiciones de carácter superficial en los límites inferiores y superiores, sino verdaderas señales de cambios cualitativos y del estado de conservación o de regresión de los bosques de pinos (Serrada y col. 1988).

1.1.7.2. Fauna asociada al bosque de pinos

Dentro de la fauna canaria encontramos, precisamente en el pinar, una de las tres especies de aves endémicas del archipiélago, cuya distribución está restringida a las islas de Tenerife y Gran Canaria: el pinzón azul. Existen dos subespecies, *Fringilla teydea teydea*, de distribución estrictamente tinerfeña y que visita esporádicamente las alturas de las cañadas del Teide, y *Fringilla teydea polatzeki*, exclusivo de los pinares grancanarios.

Otros passeriformes insectívoros típicos de cualquier ecosistema forestal ibérico de coníferas, como pueden ser los herrerillos (*Parus caeruleus*), también presentan variedades insulares. Los picos picapinos (*Dendrocopus major*) también están presentes en estos pinares cumpliendo su función controladora de las plagas de los bosques.

Los mosquiteros, los canarios (*Serinus canarius*), el bisbita caminero (*Anthus berthelotii*), la tórtola y la paloma (*Columba* sp.), el cuervo (*Corvus corax*) y entre las rapaces, el cernícalo y el ratonero, denominado aquí “aguililla”, son algunas de las aves fácilmente observables en el pinar canario. El extinto milano real (*Milvus milvus*) era frecuente en algunas áreas del pinar de Ojeda, Inagua y Pajonales en la isla de Gran Canaria, antes de que los insecticidas que combatieron las terribles nubes de langosta dieran al traste con sus poblaciones.

Entre los mamíferos presentes en estos pinares destacan el conejo y los gatos cimarrones. Entre los reptiles, el perenquén (*Tarentola delalandii*) y, dependiendo de la isla, el lagarto, que en las islas occidentales será el lagarto tizón (*Gallotia galloti*), y en Gran Canaria el lagarto canarión (*Gallotia stehlini*) (Serrada y col. 1988).

1.1.8. Repoblaciones, plantaciones y conservación del pino canario

Aparecen muchos datos de las talas indiscriminadas en los “Acuerdos de los Cabildos Insulares” de comienzos del siglo XVI. Estas instituciones, ante el desastre ambiental y económico que se avecinaba, intentaron controlar las talas forestales. Los síntomas eran claros, se agotaban los nacientes y el agua para los cultivos empezaba a escasear.

En general, puede decirse que el siglo XVI fue nefasto para la naturaleza de Canarias y en particular, para las masas arbóreas. Los bosques termófilos formados por Dragos, Palmeras, Sabinas, Lentiscos y Almácigos prácticamente desaparecieron por completo, llegando hasta nuestro días unos pocos vestigios. La laurisilva de las Islas occidentales quedó seriamente mermada y en una situación crítica en Gran Canaria. Los pinares padecieron grandes talas y se redujo considerablemente su superficie.

A partir de los principales núcleos que quedaron de pinar, después de una utilización masiva del bosque, en la década de los años 40 se inició una intensa tarea de plantación y repoblación en Tenerife, que ha conducido a la existencia de un cinturón casi continuo de pinar en torno a las más altas cumbres insulares.

Gran parte de las repoblaciones de pino se realizaron en el dominio potencial del pinar, otras plantaciones se hicieron por fuera de ese territorio y, en ocasiones, en detrimento de comunidades de gran diversidad y riqueza biológica, como son el monteverde y los escobonales (Del Arco y col. 1992).

Es importante resaltar el hecho de que uno de los cuatro parques nacionales canarios, el de La Caldera de Taburiente en la isla de La Palma, albergue una de las manifestaciones de pinar mejor conservado de las islas, que además ejerce un papel protector sobre el régimen de aguas (Serrada y col. 1988).

En diversas leyes para la gestión del suelo y el Medio Ambiente en Canarias se hace mención al pino canario.

En la ley 7/1991, de 30 de Abril, de símbolos de la naturaleza para las Islas Canarias (BOC núm. 61, de 10 de Mayo de 1991; BOC núm. 70, de 25 de Mayo de 1991), se establece el pino canario (*Pinus canariensis*) como símbolo vegetal para la isla de La Palma y el canario (*Serinus canarius canarius*) y el pinzón azul (*Fringuilla teydea teydea*), dos especies de aves claramente relacionadas con el ecosistema del pinar, como símbolos animales de todo el Archipiélago y de la isla de Tenerife, respectivamente.

En la ley 12/1994 de 19 de Diciembre, de espacios naturales de canarias (BOC núm. 157, de 24 de Diciembre de 1994), se declara Parque Nacional al de La Caldera de Taburiente en La Palma, Reserva Natural al pinar de Garafía, también en La Palma, Parque Natural al de la Corona Forestal en Tenerife, Paisajes protegidos a Las Lagunetas, igualmente en Tenerife... englobando en estas áreas grandes dominios de pinar. Así se defiende la integridad de estos ambientes, y de otros que perviven en las Islas, evitando su merma, alteración o contaminación.

En la orden de 20 de Febrero de 1991, sobre protección de especies de la flora vascular silvestre de la Comunidad Autónoma de Canarias (BOC núm. 35, de 18 de Marzo de 1991), se incluyen al pino canario en el Anexo III (Consejería de Política Territorial del Gobierno de Canarias 1995).

1.2. OBJETIVOS GENERALES

El indudable interés científico y forestal del pino canario, ha merecido la atención de numerosos investigadores, que lo han estudiado desde el punto de vista fitosociológico (Ceballos y Ortuño 1951), de su propagación (Martínez Pulido 1990), ecológico (Blanco y col. 1989; Fernández-Palacios 1992; Fernández-Palacios y De Nicolás 1995), cartográfico (Del Arco y col. 1992; Pérez de Paz y col. 1994a y b), genético (Climent y col. 1996), histológico (Climent y Gil 1993; Climent y col. 1993), de sus regiones de procedencia (Climent y col., 1996), de su respuesta a la contaminación ambiental (Barreno y col. 1996) y de la interceptación de la lluvia en los bosques de pinos (Aboal y col. 2000).

Sin embargo, el estudio del pino canario nunca había sido abordado desde el punto de vista ecofisiológico. Es decir, hasta ahora no se han realizado estudios sobre diversos aspectos de su fisiología que aclaren las preguntas no contestadas acerca de su distribución, de los óptimos ambientales para alcanzar la fotosíntesis máxima, de los principales factores que la limitan bajo condiciones naturales, de cómo responde a los diversos estreses, o de los límites de temperatura que pueden soportar sus acículas, entre otras muchas.

Dada su amplia distribución altitudinal, es importante conocer las características que la determinan. Evidentemente, la variación en pigmentos, el estado de oxidación de los compuestos antioxidantes, e incluso el contenido en nutrientes, así como la eficiencia cuántica potencial del fotosistema II, junto con el estudio de los posibles daños al cloroplasto mediante la observación de su ultraestructura, revelarán la estrategia de esta especie para vivir en las condiciones de su hábitat y conocer si los estreses a los que está sometida, según los sitios (como altas temperaturas, sequía, exceso de radiación...), producen serios daños o cambios en su actividad.

Asimismo, estudiar las características relativas al intercambio gaseoso en relación con los parámetros ambientales medidos *in situ* mediante ciclos diarios repetidos a lo largo de un año de estudio, permitirá conocer los óptimos ambientales para su óptimo funcionamiento, así como los factores que más lo limitan. Realizando las medidas en diferentes tipos de acículas (edad, situación en el dosel) la información obtenida será más completa. La realización de estudios paralelos con plantas en maceta a las que se somete a un estrés determinado, por ejemplo sequía, permitirá llegar a conclusiones más exactas.

Otro punto interesante de su ecofisiología es conocer los límites térmicos que son capaces de soportar las acículas y si sufren algún grado de aclimatación según las condiciones ambientales en que se desarrollan, máxime considerando que el pino canario quedó relegado a las Islas Canarias como consecuencia de los cambios climáticos ocurridos en el pasado.

El objetivo, por tanto, de esta tesis doctoral, es afrontar un estudio ecofisiológico del pino canario, enfocado, principalmente, en los puntos mencionados anteriormente, intentando responder a algunas de las cuestiones planteadas. Para ello se comenzará por realizar el análisis estructural y ultraestructural de las acículas, como paso previo y básico, ya que toda función se asienta en una estructura y, en este caso, las funciones se estudiarán a nivel de las acículas (capítulo 3).

Posteriormente se analizará el contenido en nutrientes, pigmentos y antioxidantes en pinos a lo largo de un gradiente altitudinal para determinar su grado de plasticidad y su adaptación a los posibles estreses según su distribución natural en la isla (capítulo 4).

Después se afrontará el estudio del intercambio gaseoso en una parcela experimental establecida a tal efecto, con el fin de conocer las características de la fotosíntesis, transpiración, eficiencias en el uso del agua (instantánea e intrínseca) y los factores que limitan la fotosíntesis a lo largo del año (capítulo 5). Este estudio se completará con la realización de un experimento con plantas crecidas en maceta y sometidas a un estrés hídrico suave (capítulo 6).

Por último, se afrontará el estudio de la resistencia de las acículas a las temperaturas extremas, tomando muestras de diferentes sitios a lo largo de un gradiente altitudinal, para estudiar la posible aclimatación de las acículas en relación con la temperatura, y en acículas de diferentes edades: cotiledones, acículas primarias y acículas de 6, 12 y 24 meses de edad, para ver la variación de la resistencia con la edad (capítulo 7).

Con este estudio se pretende tener un mayor conocimiento de la fisiología del pino canario en condiciones naturales y, de esta manera, contribuir a tener una base más firme para poder interpretar y contestar los interrogantes planteados al principio. Aún así es evidente que serán necesarios

trabajos posteriores que analicen un mayor número de aspectos diferentes acerca de las respuestas de esta especie a su entorno natural.

Cualquier estudio de la fisiología de una planta en condiciones naturales es un gran reto debido a la inmensa cantidad de factores que influyen sobre la planta en su hábitat natural y a la variedad de sus respuestas adaptativas. El estudio de la ecofisiología en árboles tiene algunas complicaciones añadidas, como los problemas de accesibilidad o el hecho de tener que desplazarse al bosque para realizar las medidas con los aparatos. Esto ha hecho que, durante mucho tiempo, este tipo de investigaciones hayan estado en un segundo plano. Sin embargo, el indudable interés de estos estudios en relación con los cambios ambientales de nuestro planeta, ha permitido que, durante los últimos años, una gran proporción de los fisiólogos vegetales hayan querido enfocar sus trabajos en esta dirección.

Así, el presente trabajo, estudiando desde diferentes puntos de vista las respuestas a los cambios en su entorno del pino canario, supone una aproximación al funcionamiento bajo diferentes condiciones ambientales de una de las especies arbóreas más emblemáticas de nuestras Islas.

1.3. OBJETIVOS CONCRETOS

Los objetivos concretos de esta tesis doctoral han sido:

- ❖ Analizar la anatomía de las acículas de *Pinus canariensis* con el fin de comprender mejor los resultados de las medidas posteriores.
- ❖ Determinar el contenido en nutrientes, pigmentos y antioxidantes de esta especie a lo largo de un perfil altitudinal sobre la isla de Tenerife, así como parámetros de fluorescencia para determinar el posible daño debido a los estreses que se producen según su distribución natural.
- ❖ Estudiar la respuesta del intercambio gaseoso a diferentes factores ambientales como la luz, la temperatura y el déficit de presión de vapor del aire, en una parcela concreta de bosque.
- ❖ Analizar las variaciones en el intercambio gaseoso que se producen a lo largo del día y a lo largo del año.

❖ Ver la influencia de la edad de las acículas y de su posición en el dosel vegetal en el intercambio gaseoso.

❖ Caracterizar la respuesta de plantas de pino crecidas en maceta frente a una situación de estrés hídrico suave.

❖ Conocer la resistencia de las acículas de *Pinus canariensis* a las temperaturas extremas, dependiendo de su procedencia a lo largo de un perfil vertical en la isla de Tenerife, así como de la edad de las acículas.

1.4. BIBLIOGRAFÍA

ABOAL, J.R., M.S. JIMÉNEZ, D. MORALES y P. GIL (2000). Effects of thinning on throughfall in Canary Islands pine forest – The role of fog. *Journal of Hydrology*. 238: 218-230.

AFONSO PÉREZ, L. (1983). El archipiélago canario. Geografía descriptiva. En: Geografía de Canarias. Editorial Interinsular Canaria, S.A. Pp: 9-12.

DEL ARCO AGUILAR, M.J., P.L. PÉREZ DE PAZ, O. RODRÍGUEZ, M. SALAS y W. WILDPRET (1992). Atlas cartográfico de los pinares de Canarias II. Tenerife. Dirección General de Medio Ambiente y Conservación de la Naturaleza. Gobierno de Canarias. Santa Cruz de Tenerife. 228pp.

BARRENO, E., S. FOS, A. SANTOS, P. PÉREZ-ROVIRA, C. VIVES, E. CEBRIAN y J.C. TORMO ALBERT (1996). Caracterización y tipificación de daños en vegetales para el establecimiento de una red biológica de calidad ambiental en los pinares de Tenerife (Islas Canarias). Edita: Jardín Botánico de Valencia. Universidad de Valencia. Proyecto subvencionado por UNELCO (Unión Eléctrica de Canarias S.A.). 168pp.

BLANCO, A., M. CASTROVIEJO, J.L. FRAILE, J.M. GANDULLO, L.A. MUÑOZ y O. SÁNCHEZ PALOMARES (1989). Estudio ecológico del pino canario. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. ICONA. Serie Técnica. Número 6. Madrid. 199pp.

BRAMWELL, D. (1974). Los bosques de Canarias, su historia y desarrollo. Jardín Botánico “Viera y Clavijo” del Excelentísimo Cabildo Insular de Gran Canaria. Separata de la Revista El Museo Canario XXXV.

BRAMWELL, D. y Z.I. BRAMWELL (1990). Flores silvestres de las Islas Canarias. Editorial Rueda. S.L. Madrid.

- CARRACEDO GÓMEZ, J.C. (1983). Origen y formación de las Islas Canarias. En: Geografía de Canarias. Editorial Interinsular Canaria S.A. Dirección y coordinación: Leoncio Afonso Pérez.
- CEBALLOS, L. y F. ORTUÑO (1951). Vegetación y flora forestal de las Canarias Occidentales. Ministerio de Agricultura. Dirección General de Montes, Caza y Pesca Fluvial. I.F.I.E. Madrid. 465pp.
- CEBALLOS, L. y J. RUIZ (1971). Árboles y arbustos de la España peninsular. Edita el Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias. Madrid.
- CLIMENT, J. y L. GIL (1993). Anatomía del xilema de *Pinus canariensis* Smith: Aspectos histológicos relacionados con el enteamiento. Actas del I Congreso Forestal Español. Pontevedra, 14-18 de Junio de 1993: 159-163.
- CLIMENT, J., J. PARDOS y L. GIL (1993). Heartwood and sapwood development and its relationship to growth and environment in *Pinus canariensis* Chr. Sm. ex DC. Forest Ecology and Management. 59: 165-174.
- CLIMENT, J., L. GIL y M. DE TUERO (1996). Las regiones de procedencia de *Pinus canariensis* Chr. Sm. ex DC. (ICONA ed.). Madrid. 49pp.
- CONSEJERÍA DE POLÍTICA TERRITORIAL DEL GOBIERNO DE CANARIAS. (1995). Legislación canaria del suelo y el medio ambiente. 296pp.
- DELGADO GONZÁLEZ, J.C. (1986). Propagación de árboles canarios. Centro de planificación e interpretación de parques nacionales y espacios naturales. 188pp.
- 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 J.P. DE NICOLAS (1995). Altitudinal pattern of vegetation variation on Tenerife. Journal of Vegetation Science. 6: 183-190.
- FERNÁNDEZ-PALACIOS, J.M. y A. DE LOS SANTOS (1996). El contexto ecológico de las Islas Canarias. En: Ecología de las Islas Canarias. Muestreo y análisis de poblaciones y comunidades. Edita Sociedad La Cosmológica. Pp: 15-37.
- GREGOR, H.J. (1979). Fünde von *Pinus canariensis* Ch. Smith fossilis aus dem neogen von La Palma (Kanarische Inseln). Vieraea. 9 (1-2): 57-64.
- MARGULLIS, L. y K.V. SCHWARTZ (1985). Coniferófitos. En: Cinco reinos. Guía ilustrada de los phyla de la vida en la Tierra. Editorial Labor, S.A. Calabria. Barcelona. Pp: 264-265.

- MARTÍNEZ PULIDO, C. (1978). Actividad biológica de extractos obtenidos del *Pinus canarinesis*. Tesis de licenciatura de la Universidad de La Laguna. 164pp.
- MARTÍNEZ PULIDO, C. (1990). Cultivo de tejidos vegetales. Multiplicación vegetativa *in vitro* del pino canario. Secretariado de publicaciones de la Universidad de La Laguna. Serie Informes N° 28. 123pp.
- MIROV, N.T. y R.G. STANLEY (1959). The pine tree. Annual Review of Plant Physiology. 10: 223-238.
- PAGE, C.N. (1974). Morphology and affinities of *Pinus canariensis*. Notes of the Royal Botanical Garden of Edinburgh. 33: 317-323.
- PÉREZ DE PAZ, P.L., M. DEL ARCO, O. RODRÍGUEZ, J. ACEBES, M. MARRERO y W. WILDPRET (1994a). Atlas cartográfico de los pinares canarios: La Palma. Dirección General de Medio Ambiente y Conservación de la Naturaleza. Gobierno de Canarias. Santa Cruz de Tenerife. 160pp.
- PÉREZ DE PAZ, P.L., M. DEL ARCO, O. RODRÍGUEZ, J. ACEBES, M. MARRERO y W. WILDPRET (1994b). Atlas cartográfico de los pinares canarios: Gran Canaria, Lanzarote y Fuerteventura. Dirección General de Medio Ambiente y Conservación de la Naturaleza. Gobierno de Canarias. Santa Cruz de Tenerife. 199pp.
- RAGHAVENDRA, A.S. (1991). Physiology of trees. Wiley-Interscience Publication. John Wiley y Sons. Inc.
- SERRADA, J., L. PASCUAL, G. DÍAZ, A. MARRERO. y C. SUÁREZ (1988). Enciclopedia de la Naturaleza de España. Año Europeo del Medio Ambiente. Dirigida por Borja Cardelús. Canarias. Debate/Círculo.
- STRASBURGER, E. (1994). Historia de las floras y de la vegetación. En: Tratado de Botánica. Octava Edición. P. Sitte, H. Ziegler, F. Ehrendorfer, A. Bresinsky, editores. Pp: 943-958.
- WERGER, M.J.A., H.J. DURING y H. VAN RIJNBERK (1987). Leaf diversity of three vegetation types of Tenerife, Canary Islands. En: Vegetation between land and sea. A.H.L. Huiskes, C.W.P.M. Blom y J. Rozema, editores. Publicaciones: Dr. W. Junk. Dordrecht. Boston. Lancaster. Impreso en Holanda.

2. MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES

“El azar interviene con frecuencia allí donde la sensatez del proyecto ha dejado un hueco” Arthur Koestler.

2.1. MATERIAL VEGETAL

Tabla 2.I. Sistemática de la especie *Pinus canariensis*.

División:	Espermatophyta
Subdivisión:	Gimnospermae
Clase:	Coniferae
Orden:	Pinales
Familia:	Pinaceae
Subfamilia:	Pinoideae
Género:	<i>Pinus</i>
Especie:	<i>Pinus canariensis</i>
D.C.	
Syn.- <i>P. canariensis</i> Sweet, ex Spreng. = <i>P.canariensis</i> C. Sm.	
Nombre vulgar: Pino. Pino canario.	

Normalmente, los individuos de *Pinus canariensis* alcanzan una altura de 15 a 25 metros, aunque se han encontrado ejemplares extraordinarios que llegan a los 60 metros de altura, pudiendo llegar a ser el más corpulento de los pinos europeos (Serrada y col. 1988).

La longevidad normal del pino canario es de unos 250 a 300 años, aunque muchos alcanzan los 500 y hasta 600 años.

Tienen una raíz principal fuerte y penetrante y las raíces secundarias tienden a serlo, aunque quedan superficiales en terrenos pedregosos.

Su corteza es casi lisa durante los primeros años de crecimiento, aunque luego se resquebraja y adquiere gran grosor. Esta corteza sirve de protección frente al fuego, lo que permite al pino canario rebrotar sin dificultad tras los incendios.

Los ejemplares viejos tienen la parte central del tronco muy lignificada y teñida de color marrón oscuro. Esta parte del tronco - denominada tea - es muy apreciada para la ebanistería, por su calidad y dureza.

Las acículas miden de 20 a 30 centímetros de longitud y 1 milímetro de grueso y persisten sobre el árbol de 2 a 3 años (Blanco y col. 1989). Las acículas de los brotes adventicios y las de primera edad son de distinta coloración y mucho más cortas.

Es una especie monoica, es decir que un mismo ejemplar tiene a la vez inflorescencias masculinas y femeninas. Las primeras son de tamaño pequeño y se agrupan en racimos en el extremo de las ramas. Las inflorescencias femeninas (piñas) aparecen solitarias o en grupos de 2-3 en las axilas de las ramas, siendo además mucho más grandes. Las piñas maduran en otoño del año siguiente a la floración (Serrada y col. 1988). Las semillas (piñones) están provistas de alas membranosas que facilitan su dispersión por el viento.

La copa tiene forma cónica cuando el árbol es joven, pero se torna irregular en los ejemplares más viejos debido a múltiples ramificaciones.

2.2. ÁREA DE ESTUDIO

La parcela en la que se llevaron a cabo las medidas de intercambio gaseoso de esta tesis se encuentra en el Morro de Isarda, en la zona del Monte El Gaitero (municipio de La Victoria, Tenerife), cerca de la carretera dorsal que comunica la ciudad de La Laguna con el Parque Nacional de las Cañadas del Teide. La altitud aproximada es de 1650 m s.n.m. y las coordenadas UTM: X = 358, Y = 3141.

El área de estudio pertenece al Parque Natural de la Corona Forestal y fue repoblado en 1950.

La temperatura media en el periodo de 1986 a 1994, medida en la estación meteorológica de El Gaitero por el Instituto Nacional de Meteorología, fue de 12.6 °C, con máxima absoluta de 31.2 °C y mínima absoluta de -4.2 °C. La humedad relativa media en este mismo periodo fue de 52% con grandes variaciones a lo largo del año (Aboal y col. 2000).

Además, también se tomaron muestras de otros sitios a los largo de un gradiente altitudinal sobre la isla de Tenerife, que se describirán en los apartados correspondientes.

2.3. TÉCNICAS Y APARATOS DE MEDIDA

2.3.1. Estación meteorológica y datos climáticos

En una torre de madera de 16 metros de altura (foto 2.1.), construida en la parcela del Morro de Isarda descrita anteriormente, se colocó una estación meteorológica (foto 2.2.) con el fin de obtener un registro continuo de temperatura y humedad (mediante un sensor RHA1, Delta-T, Cambridge, U.K.), velocidad y dirección del viento, precipitación (sensor Skye Inst.



Foto 2.1. Torre construida en la parcela de pinar del Morro de Isarda para facilitar el acceso a los pinos en los que se realizaron las investigaciones ecofisiológicas.



Foto 2.2. Estación meteorológica instalada en la torre del Morro de Isarda.

Llandridd, U.K.) y humedad del suelo (Theta Probe Devices, U.K.). Todos estos sensores se conectaron a un procesador de datos (DL2, Delta-T, Cambridge, U.K.) que hace la media en intervalos de treinta minutos, de los valores obtenidos cada minuto. Posteriormente, los datos se importaron a un ordenador para su análisis.

2.3.2 Analizador de gases por infrarrojo para medidas del intercambio gaseoso

Las medidas de intercambio gaseoso en condiciones naturales se realizaron con un analizador de gases por infrarrojo (IRGA: Infra Red Gas Analyser) portátil de sistema abierto ADC (Analytical Development Co. Ltd., Hoddesdon, Herts, U.K.) que trabaja en modo pseudodiferencial (LCA4). Este analizador está asociado a un registrador de datos, una cámara con sensores de radiación, humedad y temperatura, y un mástil portátil para tomar aire relativamente homogéneo a una altura de unos tres metros por encima del punto de medida, de forma que el intercambio gaseoso realizado por los seres que van a rodear al aparato (como los propios investigadores o el resto de las plantas del bosque) no interfiera en las medidas.

El IRGA proporciona medidas de intercambio de CO₂ y vapor de H₂O de la hoja encerrada en la cámara. Las medidas se determinan en base al estado del gas que entra al aparato y del aire que pasa a través de la muestra que se encuentra en la cámara. Así, el IRGA es capaz de medir simultáneamente el CO₂ y el H₂O, gracias a un sistema óptico dual que se basa en las propiedades de absorción de los dos gases en la región del infrarrojo.

El sistema óptico del IRGA consiste en dos células de medida en serie (una para el CO₂ y otra para el H₂O) que comparten una fuente infrarroja modulada común. Cada célula usa un detector piroeléctrico combinado con filtros adecuados para medir la diferencia en absorción en el infrarrojo de los diferentes niveles de estos gases.

El aire entra a través de la unidad reguladora del flujo cuyo propósito es acondicionar el aire antes de que entre al aparato, asegurando una composición de aire homogénea, sobre todo en lo que respecta al CO₂.

Las hojas se colocan en el interior de la cámara, a través de la cual el aparato bombea aire del exterior a un flujo constante gracias a la unidad reguladora del flujo. Al mismo tiempo, el aparato toma también aire del exterior directamente, aire que, al no pasar por la cámara ni por las acículas, no ha podido ser influenciado por ellas (aire de referencia) y comparando entre las concentraciones de H₂O y de CO₂ en el aire del exterior y el aire tras su paso por la cámara donde se encuentran las hojas (aire de análisis), el aparato detecta si las concentraciones de los gases han variado.

Para hacer el cero de las concentraciones de CO₂ y de H₂O el aparato dispone de unas columnas adosadas que contienen productos químicos como drierita, que absorbe el agua (un producto con las mismas propiedades que la más conocida sílica gel), y soda lima, que absorbe el dióxido de carbono.

Por medio de una serie de ecuaciones, basadas en los estudios de von Caemmerer y Farquhar (1981) y descritas con detalle en el anexo I, el IRGA es capaz de cuantificar las medidas dándonos la absorción neta de CO₂ (P_n), la transpiración (E) y, a partir de éstas, la concentración interna de CO₂ en el mesófilo de las acículas (C_i) y la conductancia estomática (G_s).

La cámara utilizada no fue especial para coníferas, sino una cámara de 6.25 centímetros cuadrados de área de exposición, diseñada para especies de hoja ancha. La razón de no utilizar la cámara especialmente diseñadas para especies de hojas aciculares fue que al ser las acículas de esta especie de unos 25 centímetros de longitud, el brote entero no cabía en ella y consideramos que implicaba menos error si introducíamos las acículas en la cámara asemejándolas a una hoja ancha. Así, para realizar el cálculo de los diversos parámetros, se introdujo en el aparato un área promedio para 10 acículas de la especie *Pinus canariensis* calculada mediante un estudio previo.

En su interior, la cámara del IRGA dispone de un pequeño ventilador que asegura una mínima resistencia de la capa límite (o "boundary layer"), una homogeneización del aire dentro de la cámara y una rápida respuesta del sistema.

La temperatura de las acículas se podría medir directamente gracias a un termopar adosado a la cámara pero, por razones prácticas, la temperatura de las acículas se midió indirectamente por una fórmula de balance energético que implica la radiación, la temperatura del aire de la cámara y la transpiración de las acículas (ver anexo I).

El diseño de la cámara afecta a varios parámetros, que son constantes para un diseño determinado, como la resistencia de la capa límite, el nivel de radiación energética que afecta a la hoja y el factor de transmisión de la ventana de la cámara para la radiación fotosintéticamente activa (PAR). Para estos parámetros usamos los valores de 0.8 m s mol⁻¹, 0.160 y 0.90, respectivamente, definidos como estándar para la cámara utilizada.

Los cálculos, las correcciones, las conversiones y las compensaciones empleadas por el aparato se describen con detalle en el anexo I.

2.3.3. Medidas de la fluorescencia de la clorofila

2.3.3.1. La fluorescencia de la clorofila

Las plantas verdes contienen dos tipos de clorofilas: a y b. Estas sustancias aparecen verdes en luz blanca porque absorben luz en las regiones del azul y del rojo del espectro y transmiten y reflejan en la región del verde.

Cuando la luz ilumina la planta, la energía contenida en los componentes azul y rojo de la luz es absorbida por las moléculas de clorofila. Esta energía se usa luego en diferentes procesos. Una parte se invierte en las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis y la energía restante se pierde de diversas formas incluyendo calor, desexcitación sin emisión de radiación y reemisión en forma de luz. Este último fenómeno se conoce como fluorescencia.

Debido a que entre los fenómenos de absorción y reemisión se pierde algo de energía, la señal de fluorescencia emitida contiene luz de un contenido menor en energía que la luz absorbida, por lo tanto luz de una longitud de onda mayor. Por ello la emisión de fluorescencia es siempre de mayor longitud de onda que la luz absorbida.

2.3.3.2. Inducción de la fluorescencia

Cuando una hoja se ilumina con una intensidad constante tendrá una fluorescencia estacionaria. Sin embargo, si la hoja se deja en oscuridad durante varios minutos y luego se ilumina con luz brillante, la fluorescencia pasará rápidamente de un nivel bajo (F_0), pasando por varios niveles intermedios (I), hasta una fluorescencia pico (P), y luego decaerá gradualmente, a través de varios máximos intermedios, hasta un nivel cercano al nivel original (F_s) (figura 2.1). La cinética de esta respuesta se denomina efecto Kautsky, en honor al científico que lo describió junto con el Profesor Hirsch (Kautsky y Hirsch 1931). El punto inicial de ésta subida de fluorescencia (F_0) es el nivel que corresponde a la señal de emisión de fluorescencia cuando todos los aceptores primarios de electrones están oxidados.

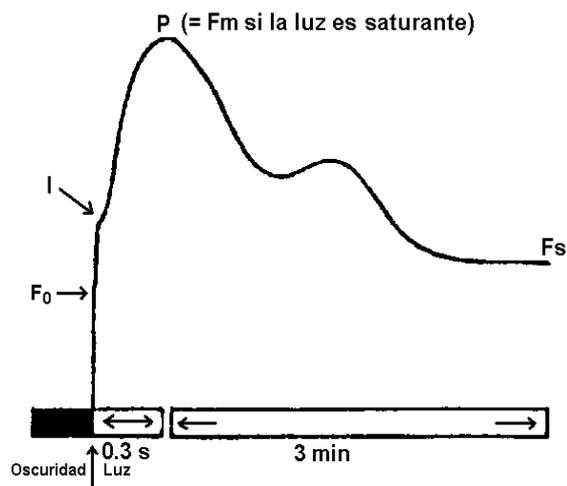


Figura 2.1. Curva de inducción de la fluorescencia de la clorofila en una hoja sana.

Cuando la luz ilumina la hoja, la señal de fluorescencia continúa subiendo hasta que todos los aceptores primarios del fotosistema II están reducidos. La señal de fluorescencia alcanza un nivel pico antes de disminuir lentamente. Si la luz es de intensidad saturante para la hoja, el valor pico será el máximo que puede alcanzar el nivel de

fluorescencia. A este valor se le conoce como F_m (fluorescencia

máxima).

La diferencia entre la señal de fluorescencia máxima (F_m) y el nivel base de fluorescencia (F_0) se llama componente variable de fluorescencia (F_v).

La relación F_v/F_m puede calcularse a partir de los valores obtenidos. Se ha visto que esta relación es proporcional al rendimiento cuántico de la fotoquímica (Butler y Kitajama 1975) y muestra un alto grado de correlación con el rendimiento cuántico de la fotosíntesis neta de hojas intactas (Björkman y Demmig 1987).

Lo que al principio se consideró una señal "rica y ambigua" que proporciona información dudosa y compleja (Lavorell y Etienne 1977), se ha aceptado finalmente como "un indicador intrínseco de las reacciones fotosintéticas en el cloroplasto de las plantas verdes" (Schreiber y Bilger 1987).

Una de las mayores ventajas de este método es que las medidas de fluorescencia son no destructivas y no invasivas, permitiendo realizar estudios sobre la vitalidad de una parte de la planta sin alterarla.

Muchos factores ambientales afectan directa o indirectamente a la tasa de fotosíntesis. Se puede detectar tempranamente una reducción de la capacidad fotosintética por medidas de la fluorescencia de la clorofila usando este aparato. Incluso, en algunas ocasiones, los cambios en la fluorescencia de la clorofila pueden detectarse antes de que se detecte cualquier signo de deterioro físico (Bolhár-Nordenkamp y col. 1989).

2.3.3.3. Las medidas con el fluorímetro (PEA) y los accesorios necesarios

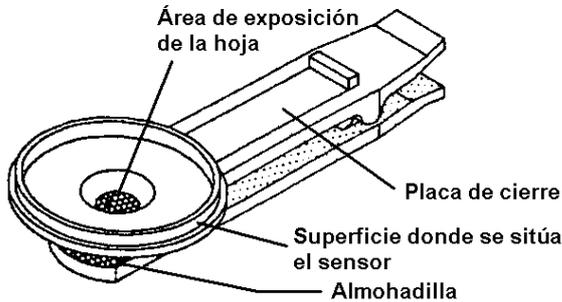


Figura 2.2. Dibujo esquemático de un clip de adaptación a la oscuridad.

El primer paso para medir es cubrir las hojas o acículas con un pequeño y ligero clip (figura 2.2). El clip tiene una pequeña placa de cierre que debe cerrarse sobre la hoja para que no pueda darle la luz y se encuentre en completa oscuridad. Si bien depende de la especie vegetal, los niveles de luz anteriores a la transición a la oscuridad y si la planta está o no estresada, típicamente el periodo de adaptación a la oscuridad requerido suele ser de unos 20 a 30 minutos. Nosotros hemos usado un periodo de adaptación a la oscuridad de 30 minutos en todas las medidas. Los clips son blancos para minimizar el efecto del calor y las hojas o acículas descansan sobre una almohadilla de espuma para evitar daños a su estructura. Por razones de estabilidad del clip en los estudios de fluorescencia realizados en *Pinus canariensis* pegamos las acículas entre sí con un poco de cinta adhesiva por la parte posterior.

El sensor se coloca sobre el clip de forma que la luz solar quede excluida. Luego se abre la placa de cierre del clip para exponer la hoja a la iluminación y que el aparato mida la fluorescencia. El sensor contiene un dispositivo óptico que proporciona una poderosa iluminación de la hoja para la detección de la señal de fluorescencia (figura 2.3). La iluminación la proporcionan 6 diodos emisores de luz de alta intensidad (LEDs) que están dirigidos sobre la superficie de la hoja y emiten luz roja con un pico a 650 nanómetros, que es absorbida por los cloroplastos. Los LEDs tienen la ventaja de emitir muy bajos niveles de calor y de alcanzar su intensidad total muy rápidamente (en cuestión de microsegundos) tras su encendido. Existe un mecanismo de retroalimentación mediante el cual se

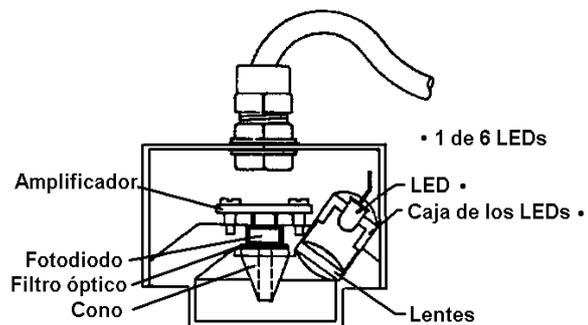


Figura 2.3. Esquema del interior del sensor.

corrigen los cambios en la intensidad de los LEDs. El detector es un fotodiodo de alta resolución con un circuito amplificador asociado.

Todos los circuitos electrónicos del PEA están contenidos en una caja plástica diseñada para minimizar la posibilidad de daño en el campo (figura 2.4). La energía la proporciona una batería interna recargable pero también se puede enchufar a un cargador en caso de que la batería falle o para recargarla.

La pantalla impermeable permite seleccionar variables y datos y hacer cambios en la configuración del aparato (como el porcentaje de intensidad de luz de los LEDs, que para el pino canario resultó ser óptima con un 60%, o el tiempo de medida).

La señal de fluorescencia recibida por el sensor durante la medida es traducida en la caja control. Durante los primeros dos milisegundos de

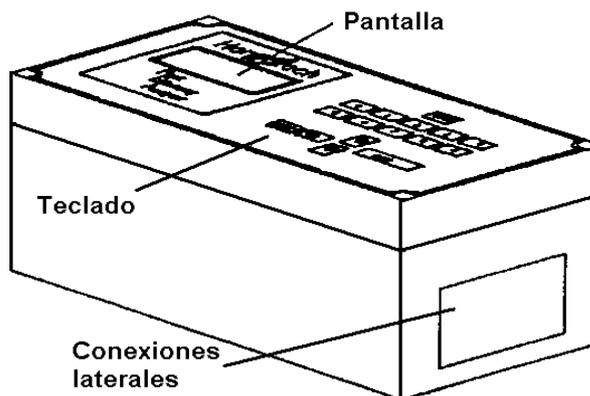


Figura 2.4. Esquema de la caja control del fluorímetro.

medida la tasa de recolección de datos es de 100 lecturas cada segundo. Luego esta tasa disminuye y finalmente se adopta una adquisición de datos lenta de 10 lecturas por segundo durante la disminución hacia los niveles de fluorescencia de estado estacionario. Los parámetros F_0 , F_v , F_m y la relación F_v/F_m se calculan automáticamente y se pueden mostrar en la pantalla al final de cada medida. Cada medida puede ser salvada en la memoria de la caja control. Cuando se salvan, una técnica de compresión de datos reduce los 5000 puntos obtenidos a 150. Se pueden salvar un máximo de 100 medidas en la memoria. Los datos pueden transferirse a una impresora, a un registrador de datos o a un ordenador para el almacenamiento y un posterior análisis detallado de los datos.

2.3.4. Medidas de la liberación de electrolitos

2.3.4.1. La liberación de electrolitos

El intercambio de materia entre la célula y el ambiente que la rodea está controlado, principalmente, por proteínas presentes en determinadas regiones a lo largo de la membrana celular. Cuando un tejido sano se pone en agua libre de iones, existe una ligera liberación de contenido celular al agua circundante, que se puede detectar usando un conductivímetro. Si la membrana celular se rompe o las bombas proteicas transmembrana se dañan, el contenido celular se libera a una tasa mayor de la habitual. Por ello la liberación de electrolitos es una medida del daño a las membranas celulares.

La tasa de liberación de electrolitos se ha usado desde los años 30 para estudiar la viabilidad de los tejidos vegetales (Dexter y col. 1930; 1932). Este método se usó en la década de los 50 para comparar niveles de daño por helada, gracias a los trabajos pioneros de Wilner en 1955 y 1959. Desde entonces, se han usado modificaciones de esta técnica de forma rutinaria para estudiar el nivel de daño causado durante tests de aclimatación al frío de diversas partes de las plantas (Palta y col. 1977a y b; Burr y col. 1986; Colombo y Hickie 1987; Hallam y Tibbits 1988; Mackay y Mason 1991; Mackay 1994), así como para determinar daños causados por sequía (Dlugokecka y Kacperska-Palacz 1978; Martin y col. 1987).

2.3.4.2. La preparación de las muestras y las medidas de conductividad

Para la evaluación del daño producido por un determinado tratamiento en las muestras vegetales se cortan porciones similares de aproximadamente 15 milímetros de la porción media de las acículas, y con un peso aproximado de unos 0.1 gramos, y se introducen en 3 mililitros de agua destilada durante 24 horas midiéndose luego la conductividad (C1), indicadora de la liberación de electrolitos, con un conductivímetro portátil (Dist 4, Hanna Instruments, Mauritius). Posteriormente, las mismas secciones se trataron con nitrógeno líquido, que congela totalmente el tejido y lo preserva hasta que, por un proceso de descongelación lenta, se rompen las estructuras y se destruye la

integridad de la membrana celular, midiéndose de nuevo la conductividad (C2). Asimismo, se midió C1 y C2 en muestras control que no habían recibido ningún tipo de tratamiento (C'1 y C'2). Los resultados se expresaron por medio del índice de daño de Flint y col. (1967):

$$I_t = 100 * (R_t - R_0) / (1 - R_0)$$

donde I_t es el índice de daño, $R_t = C1/(C1+ C2)$ y $R_0 = C'1/(C'1+ C'2)$. El valor de I_t estará más cerca de cero en tejidos menos dañados y cerca de cien en tejidos totalmente dañados (Read y Hill 1988).

Algunos investigadores representan I_t como una función de la temperatura e interpolan para obtener la temperatura a la que ocurre el 10% y el 50% de la liberación de electrolitos, que corresponden a la temperatura de daño incipiente (LT_{10}) y a la temperatura de muerte del tejido (Manley y Hummel 1996), TK_{50} (Piotrowska y Kacperska 1990) o LT_{50} (Kacperska y Szaniawski 1993), respectivamente.

2.3.5. Análisis de las concentraciones de pigmentos y antioxidantes

Para la preparación de muestras para el análisis de pigmentos y sustancias antioxidantes por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), éstas se sumergieron en nitrógeno líquido y posteriormente se llevaron al laboratorio para su liofilización o desecación. Cuando se realizó una liofilización, ésta se llevó a cabo sometiendo las muestras primero a una temperatura de 0 °C y vacío durante 1 hora y, pasado este tiempo, a 25 °C y vacío durante 48 horas. Cuando lo que se realizó fue una desecación, se sometieron las muestras congeladas en nitrógeno líquido directamente a 25 °C y vacío durante 48 horas, realizando de esta forma sólo la segunda fase de la liofilización.

Posteriormente, las muestras se molieron y se almacenaron en viales de plástico herméticos en un congelador a -80 °C hasta el momento de los análisis bioquímicos.

Se adjuntan, en el anexo II, los protocolos detallados de preparación de muestras para los diversos análisis.

El análisis de los pigmentos se llevó a cabo según el método descrito por Pfeifhofer (1989). A partir del polvo de muestra se extrajeron los pigmentos con acetona y se sometieron a una HPLC en gradiente, utilizando acetona : etilacetato (2 : 1) como solvente polar y acetonitrilo : agua destilada : metanol (100 : 10 : 5) como solvente apolar. La absorbancia de la muestra se midió a una longitud de onda de 440 nanómetros.

El tocoferol se determinó siguiendo el método de Wildi y Lütz (1996). La extracción se realizó con acetona, junto con la extracción de pigmentos, y se sometió la muestra a una HPLC isocrática utilizando metanol como solvente. El tocoferol se detectó directamente por fluorimetría, con una longitud de onda de excitación de 295 nanómetros y una longitud de onda de emisión de 325 nanómetros. La identificación del tocoferol se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención de las muestras con el tiempo de retención de soluciones estándar de alfa, gamma y delta-tocoferol.

El glutation se determinó gracias al método de Kranner y Grill (1996). El polvo de muestra, junto con ácido clorhídrico, se incubó 1 hora con ditioneitol (DTT) para reducir los grupos tioles. Los grupos sulfhidrilos se redujeron con monobromobimane. La separación y determinación de los derivados tioles se realizó mediante HPLC en gradiente usando como solventes mezclas de metanol, agua y ácido acético. Los grupos tioles se detectaron por fluorimetría, con una longitud de onda de excitación de 380 nanómetros y una longitud de onda de emisión de 480 nanómetros.

Los ácidos ascórbico y dehidroascórbico se determinaron simultáneamente siguiendo un proceso derivado con ortofenildiamina (Tausz y col. 1996). El polvo de muestra en ácido metafosfórico se trató con ortofenildiamina y la separación se realizó mediante una HPLC isocrática usando, como agente iónico, bromuro de hexadecilmetilamonio y, como solvente, metanol acuoso. La absorbancia de la columna se registró a 248 nanómetros para el ácido ascórbico y 348 nanómetros para su derivado, el ácido dehidroascórbico.

2.3.6. Estudio de la ultraestructura mediante microscopía electrónica

2.3.6.1. Microscopía electrónica de transmisión

Para la preparación de muestras para su análisis con el microscopio electrónico de transmisión, se cortaron secciones (tanto longitudinales como transversales), lo más finas posibles, de la zona central de las acículas y se realizó una prefijación de las proteínas contenidas en las muestras dejándolas unas seis horas en glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 2% en tampón fosfato 0.1 M, con pH 7.2, y Sacarosa 0.1 M y, seguidamente, se lavaron las muestras con tampón fosfato, pH 7.2 y Sacarosa 0.1 M.

La fijación de los lípidos contenidos en los tejidos se realizó con una mezcla en proporción 1 : 1 durante tres horas de tetróxido de osmio al 2% en tampón fosfato (pH 7.3) y cromato potásico al 4% que se ajusta a pH 7.3 con potasa 2.5 M.

Posteriormente, se realizaron lavados con agua bidestilada, para eliminar la mezcla tóxica de la superficie de las muestras, y se deshidrataron con una serie de etanol; 50%, 70%, 90% y 100%.

Para la inmersión en resina se pasó previamente por óxido de propileno que es miscible tanto en etanol como en la resina comercial utilizada. Primero se incluyeron los cortes en una mezcla etanol : óxido de propileno en proporción 1 : 1. Posteriormente se dejaron las muestras 10 minutos en óxido de propileno puro, para luego ir las pasando a la resina Epon.

Epon : óxido de propileno

1 : 3 (durante una hora)

1 : 1 (durante una hora)

3 : 1 (durante tres horas)

La resina Epon utilizada consistió en una mezcla de Epon 812, DDSA (anhídrido dodecenil succínico), MNA (anhídrido metil nádico) y BDMA (benzil dimetilamina) [Para unos 12 gramos de Epon: 6g de Epon 812, 4g de DDSA, 2.5g de MNA y 0.325g de BDMA].

Finalmente se realizó la inclusión en resina Epon pura y se vertió la resina conteniendo los cortes sobre placas y se polimerizó la resina en la estufa a 60 °C.

De la resina polimerizada se cortaron bloques que contenían los cortes que nos interesaba analizar y se hicieron pirámides, eliminando la resina con un aparato especialmente diseñado para ello. Las pirámides, que contenían las muestras embebidas en resina, se cortaron con el microtomo o el ultramicrotomo, obteniendo cortes que se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranio y se analizaron por medio de un microscopio electrónico de transmisión de la marca Philips CM 10.

2.3.6.2. Microscopía electrónica de barrido

Para su análisis por microscopía electrónica de barrido, las acículas se secaron al aire y se cortaron secciones de la porción media, que se montaron en botones de aluminio por medio de papel doble adhesivo. Las muestras se cubrieron con una lámina de oro y se examinaron mediante un microscopio electrónico de barrido marca Leitz AMR-1000, operando a 20 kV y 20° de inclinación de la muestra (Bermadinger-Stabentheiner 1995). En los casos en los que se eliminaron las ceras epicuticulares, las muestras se trataron previamente con cloroformo.

2.4. BIBLIOGRAFÍA

- ABOAL, J.R., M.S. JIMÉNEZ, D. MORALES y P. GIL (2000). Effects of thinning on throughfall in Canary Islands pine forest – The role of fog. *Journal of Hydrology*. 238: 218-230.
- BERMADINGER-STABENTHEINER, E. (1995). Physical injury, re-crystallization of wax tubes and artefacts: identifying some causes of structural alteration to spruce needle wax. *New Phytologist*. 130: 67-74.
- BLANCO, A., M. CASTROVIEJO, J.L. FRAILE, J.M. GANDULLO, L.A. MUÑOZ y O. SÁNCHEZ PALOMARES (1989). Estudio ecológico del pino canario.

- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. ICONA. Serie Técnica. Número 6. Madrid. 199pp.
- BJÖRKMAN, O. y B. DEMMIG (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*. 170: 489-504.
- BOLHÁR-NORDENKAMPF, H.R., S.P. LONG, N.R. BAKER, G. ÖQUIST, U. SCHREIBER y E.G. LECHNER (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.
- BURR, K.E., R.W. TINUS, S.J. WALLNER y R.M. KING (1986). Comparison of four cold hardiness tests on three western conifers. En: *Proceedings of the Combined Western Forest Nursery Council and Intermountain Nursery Association Meeting, 12-15 Aug. 1986. Tumwater. Wash. U.S. For. Serv. Rocky Mt. For. Range Exp. Stn. Gen. Tech. Rep. RM.137. 87-95.*
- BUTLER, W.L. y M. KITAJAMA (1975). A tripartite model for chloroplast fluorescence. En: *Proceedings of the 3rd International Congress on Photosynthesis. M. Avron, ed. Elsevier. Amsterdam. 13-24.*
- VON CAEMMERER, S. y G.D. FARQUHAR (1981). Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and gas exchange of leaves. *Planta*. 153: 376-397.
- COLOMBO, S.J. y D.F. HICKIE (1987). A one-day test for determining frost hardiness using the electrical conductivity technique. Ministry of Natural Resources, Ontario. Forest Research Note 45.
- DEXTER, S.T., W.E. TOTTINGHAM y L.F. GRUBER (1930). Preliminary results in measuring the hardiness of plants. *Plant Physiology*. 5: 215-223.
- DEXTER, S.T., W.E. TOTTINGHAM y L.F. GRUBER (1932). Investigations of the hardiness of plants by measurement of electrical conductivity. *Plant Physiology*. 7: 63-78.
- DLUGOKECKA, E. y A. KACPERSKA-PALACZ (1978). Re-examination of electrical conductivity method for estimation of drought injury. *Biologia Plantarum*. 20: 262-267.
- FLINT, H.L., BOYCE, B.R. y BEATTIE, D.U. (1967). Index of injury - a useful expression of freezing injury to plant tissues as determined by electrolyte method. *Canadian Journal of Plant Science*. 47: 229-230.

- HALLAM, P.M. y W.N. TIBBITS (1988). Determination of frost hardiness of *Eucalyptus* using the electrical conductivity of diffusate in conjunction with a freezing chamber. *Canadian Journal of Forest Research*. 18: 595-600.
- KACPERSKA, A. y R.K. SZANIAWSKI (1993). Frost resistance and water status of winter rape leaves as affected by differential shoot/root temperature. *Physiologia Plantarum*. 89: 775-782.
- KAUTSKY, H. y A. HIRSCH (1931). Neue versuche zur kohlenstoffassimilation. *Naturwissenschaften*. 19: 964.
- KRANNER, I. y D. GRILL (1996). Determination of glutathione disulfide in lichens: A comparison of frequently used methods. *Phytochemical Analysis*. 7: 24-28.
- LAVORELL, J. y A.L. ETIENNE (1977). *In vivo* chlorophyll fluorescence. En: *Primary Processes in Photosynthesis*. J. Barber, ed. Elsevier. North Holland Biomedical Press. Amsterdam. 203-268.
- MANLEY, R.C. y R.L. HUMMEL (1996). Index of injury compared to tissue ionic conductance for calculating freeze damage of cabbage tissue. *Journal of American Society for Horticulture Science*. 121 (6): 1141-1146.
- MARTIN, U., S.G. PALLARDY y Z.A. BAHARI (1987). Dehydration tolerance of leaf tissues of six woody angiosperm species. *Physiologia Plantarum*. 69: 182-186.
- MACKAY, H.M. (1994). Frost hardiness and cold-storage tolerance of the root system of *Picea sitchensis*, *Pseudotsuga mensiesii*, *Larix kaempferi* and *Pinus sylvestris* bare-root seedlings. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 23: 337-342.
- MACKAY, H.M. y M. MASON (1991). Physiological indicators of tolerance to cold storage in Sitka spruce and Douglas-fir seedlings. *Canadian Journal of Forest Research*. 21: 890-901.
- PALTA, J.P., J. LEVITT y E.J. STADELMANN (1977a). Freezing injury in onion bulb cells. I. Evaluation of the conductivity method and analysis of ion and sugar efflux from injured cells. *Plant Physiology*. 60: 393-397.
- PALTA, J.P., J. LEVITT y E.J. STADELMANN (1977b). Freezing injury in onion bulb cells. II. Post-thawing injury or recovery. *Plant Physiology*. 60: 398-401.

- PFEIFHOFER, W. (1989). Evidence of chlorophyll b and lack of lutein in *Neottia nidus-avis* plastids. *Biochemische Physiologie der Pflanzen*. 184: 55-61.
- PIOTROWSKA, G. y A. KACPERSKA (1990). Utility of leaf disks cultured in vitro for studies on frost resistance. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 22: 21-26.
- READ, J. y R.S. HILL (1988). Comparative responses to temperature of the major canopy species of Tasmanian cool temperate rainforest and their ecological significance. I. Foliar frost resistance. *Australian Journal of Botany*. 36: 131-143.
- SCHREIBER, U. y W. BILGER (1987). Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements. En: *Plant Response to Stress*. J.D. Tenhunen y colaboradores, eds. NATO ASI Series. Volumen G15. Springer Verlag. Berlin. Heidelberg.
- SERRADA, J., L. PASCUAL, G. DÍAZ, A. MARRERO. y C. SUÁREZ (1988). *Enciclopedia de la Naturaleza de España. Año Europeo del Medio Ambiente*. Dirigida por Borja Cardelús. Canarias. Debate/Círculo.
- TAUSZ, M., I. KRANNER y D. GRILL (1996). Simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plant materials by high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*. 7: 69-72.
- WILDI, B. y C. LÜTZ (1996). Antioxidant composition of selected high alpine plant species from different altitudes. *Plant, Cell and Environment*. 19: 138-146.
- WILNER, J. (1955). Results of laboratory tests for winter hardiness of woody plants by electrolyte methods. *Proc. Am. Hortic. Sci.* 66: 93-99.
- WILNER, J. (1959). Note on an electrolytic procedure for differentiating between frost injury of roots and shoots in woody plants. *Canadian Journal of Plant Science*. 39: 512-513.

3. ANATOMÍA GENERAL DE LAS ACÍCULAS

“Si quieres comprender la función, estudia la estructura” Francis Crick.

3.1. INTRODUCCIÓN

La estructura interna y externa de las hojas está relacionada con su papel en los procesos que éstas realizan, así como con el ambiente en el que se desarrollan.

La función primordial de las hojas consiste en la fabricación de hidratos de carbono por medio del proceso de la fotosíntesis, que estudiaremos en detalle para el pino canario un poco más adelante. Las hojas son órganos vegetales especialmente diseñados y adaptados para realizar este proceso, conteniendo abundante cantidad de clorofila, que es el pigmento esencial para captar la energía de la luz, y disponiendo de una determinada estructura y disposición en el tallo (Font Quer 1979).

Con el estudio de las propiedades estructurales y ultraestructurales de las acículas de *Pinus canariensis* nos proponemos obtener datos básicos de gran importancia para la comprensión y la interpretación de la fisiología, la bioquímica y las respuestas ultraestructurales de esta especie a las variaciones ambientales debidas a diferentes situaciones, tanto en condiciones naturales como cuando la planta está sometida a situaciones de estrés.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

El material vegetal utilizado fueron acículas de un año de edad de *Pinus canariensis* Chr. Sm. ex DC., recolectadas de árboles que crecían en la vertiente sur de Tenerife, en el municipio de Arico, y acículas del año en curso de plántulas de un año crecidas en macetas en el invernadero del Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de La Laguna.

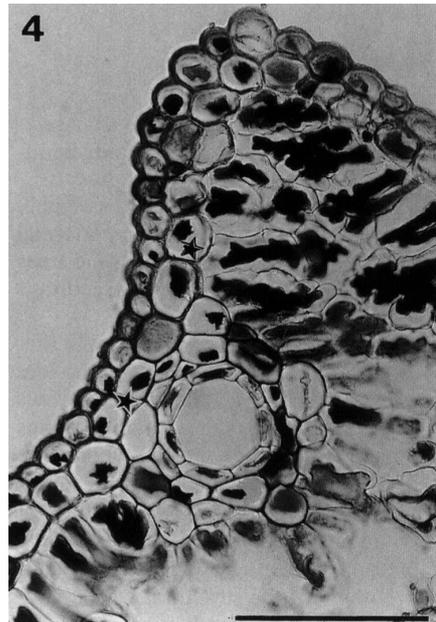
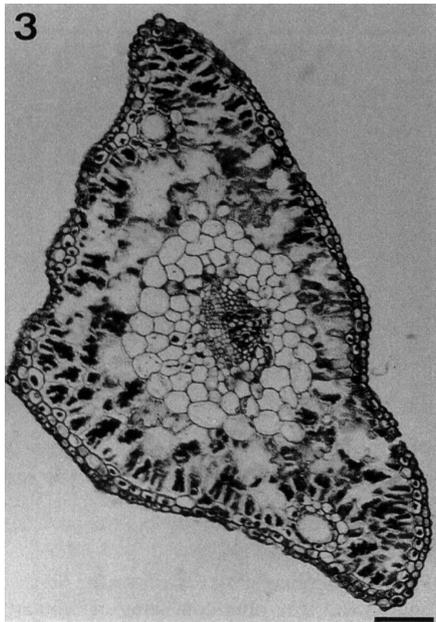
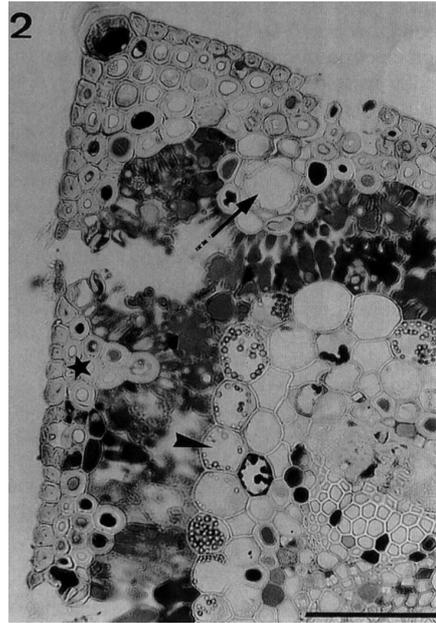
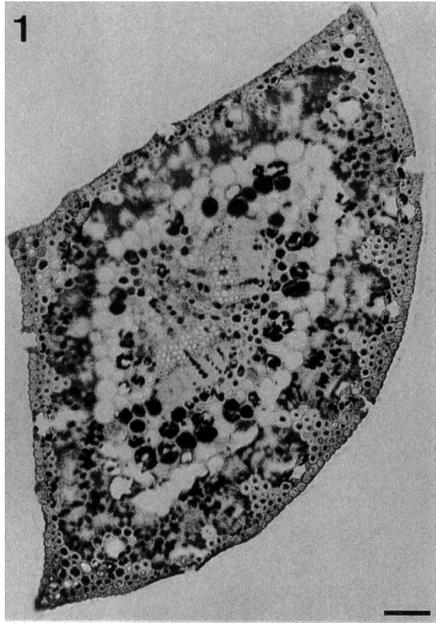
Para los estudios de microscopía óptica se cortaron secciones de aproximadamente 5 mm de la porción media de las acículas y se fijaron en formalina - ácido acético - etanol (FAA) (formol al 37%, ácido acético glacial y etanol al 70% en proporción 5 : 5 : 90). Se deshidrataron a través de una serie de alcohol butílico terciario y fueron embebidas en parafina. Se cortaron secciones transversales de 10 a 20 μm , se pusieron en un portaobjetos y se tiñeron con la doble coloración de safranina - verde rápido (Johansen 1940).

Para el microscopio electrónico de transmisión y el microscopio electrónico de barrido se tomaron secciones de la porción media de las acículas y se siguió el protocolo ya explicado en el apartado de material y métodos generales.

3.3. RESULTADOS

Pinus canariensis tiene hojas aciculares de hasta 30 centímetros de longitud y de cerca de 1 milímetro de grosor, agrupadas en fascículos de tres acículas. Como especie de tres acículas por braquiblasto, tienen forma triangular en sección transversal siendo la superficie abaxial hemisférica (figuras 3.1 y 3.3).

La epidermis consta de una capa sencilla de células con paredes extremadamente gruesas, superando en grosor incluso a las células hipodérmicas subyacentes en acículas de un año de edad de pinos adultos (figura 3.2), y con paredes más delgadas en acículas de plántulas (figura 3.4).



Figuras 3.1-4. Micrografías ópticas de secciones transversales de *Pinus canariensis*. Barras = 100 μ m.

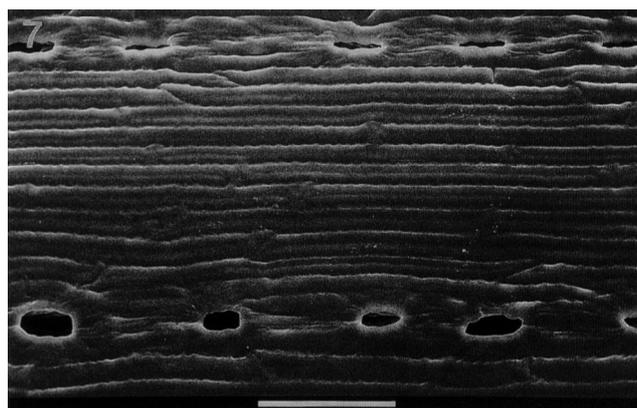
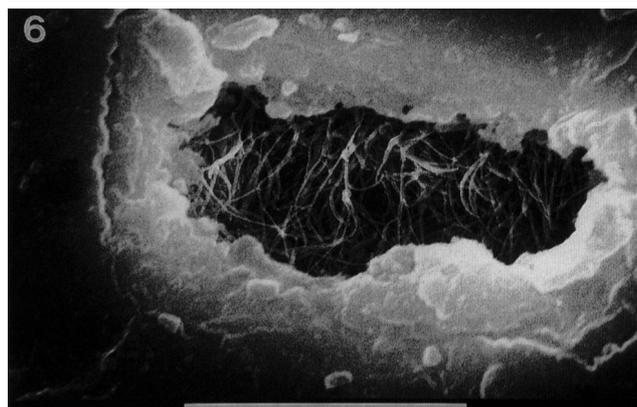
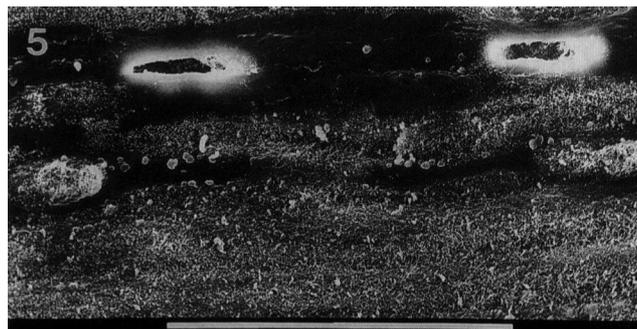
Figura 3.1. Visión general de una acículas de un año de edad de un pino sano. Obsérvese que la superficie abaxial es hemisférica.

Figura 3.2. Detalle de la figura 3.1, mostrando la epidermis con estomas, células hipodérmicas esclerificadas (*), tejido mesofílico, un conducto de resina (flecha) y la endodermis (cabeza de flecha) bordeando el tejido de transfusión y parte del haz vascular.

Figura 3.3. Visión general de una acícula de una plántula de pino.

Figura 3.4. Detalle de la figura 3.3, mostrando la epidermis con paredes celulares más finas y una hipodermis menos desarrollada (*) con paredes más delgadas que en la figura 3.2. También pueden verse el tejido mesofílico y un conducto de resina.

La superficie de las acículas está cubierta de ceras epicuticulares. Embebidas en una capa de ceras amorfa, las estructuras tubulares se localizan especialmente entre las filas de estomas (figuras 3.5 y 3.6). En acículas del año en curso las ceras cristalinas también cubren los bordes de los estomas (no mostrados), mientras que en acículas de un año de edad, estos bordes revelan una apariencia amorfa (figura 3.6). También existe una densa malla entretejida de ceras tubulares dentro de la cámara epiestomática, bajo la apertura externa que cubre las células guarda (figura 3.6). La eliminación de las ceras estructurales tras inmersión en cloroformo revela una superficie lisa y una disposición regular paralela de las células epidérmicas alargadas así como un borde elíptico de la cámara epiestomática (figura 3.7). La parte más interna de este borde consiste sólo en una delgada cutícula, que es la causa del elevado brillo observado en las fotografías de microscopio electrónico de barrido (figura 3.5-7).

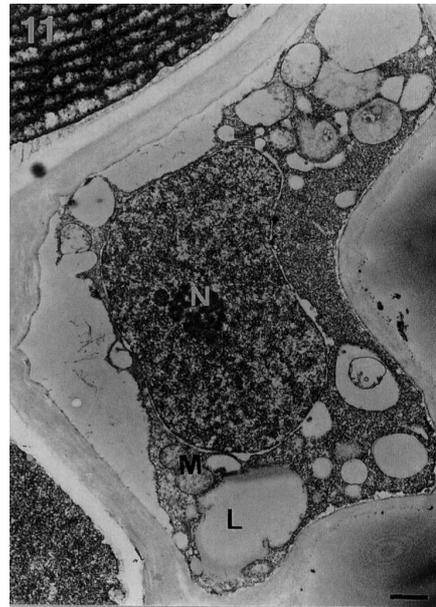
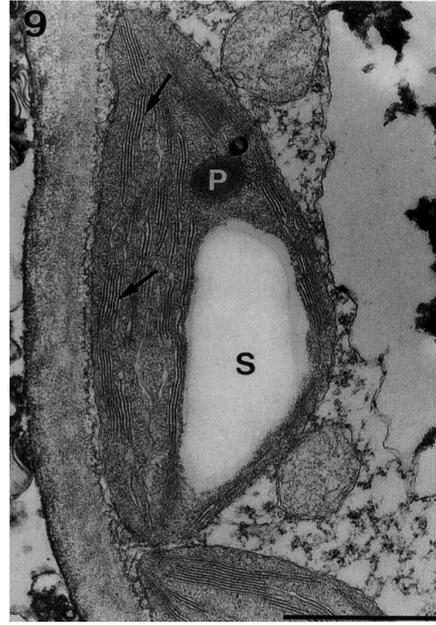
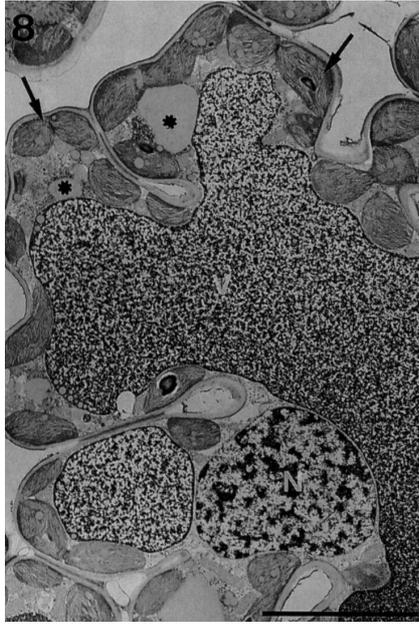


Figuras 3.5-7. Micrografías electrónicas de barrido de acículas de un año de edad de *P. canariensis*. Barras = 100 μm (excepto la figura 3.6 = 10 μm).

Figura 3.5. Ceras epicuticulares cubriendo la superficie entre las filas de estomas como una densa capa de tubos de cera.

Figura 3.6. Ceras epicuticulares cubriendo los bordes de los estomas (amorfas) y ceras tubulares en el interior de la cámara epiestomática debajo de la apertura exterior.

Figura 3.7. Las ceras epicuticulares se eliminaron con cloroformo revelando una superficie lisa en la que se pueden ver dos filas paralelas de estomas.



Figuras 3.8-11. Micrografías electrónicas de transmisión de acículas de un año de edad de *Pinus canariensis*. Barras = 1 μ m (excepto figura 3.8 = 10 μ m).

Figura 3.8. Células del mesófilo con invaginaciones hacia el interior de la célula, cloroplastos (flechas) próximos a la pared celular, cuerpos lipídicos en el citoplasma (*), taninos granulares finos en la vacuola (V) y núcleo (N).

Figura 3.9. Cloroplasto con muchos grana (flechas), pocos plastoglóbulos (P) y un grano de almidón (S).

Figura 3.10. Cloroplasto posiblemente en división.

Figura 3.11. Células epiteliales de un conducto de resina mostrando un gran núcleo (N), mitocondrias (M) y partículas lipídicas (L) en el citoplasma.

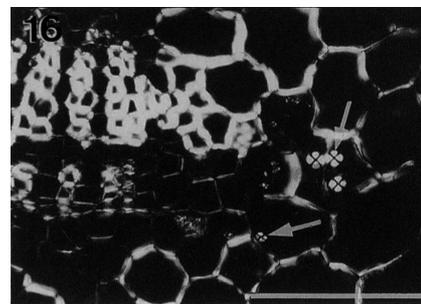
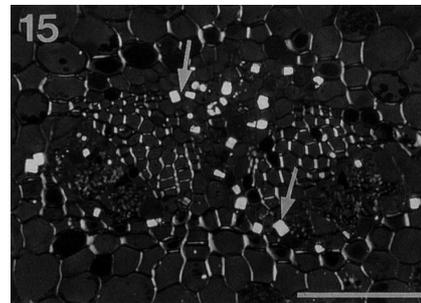
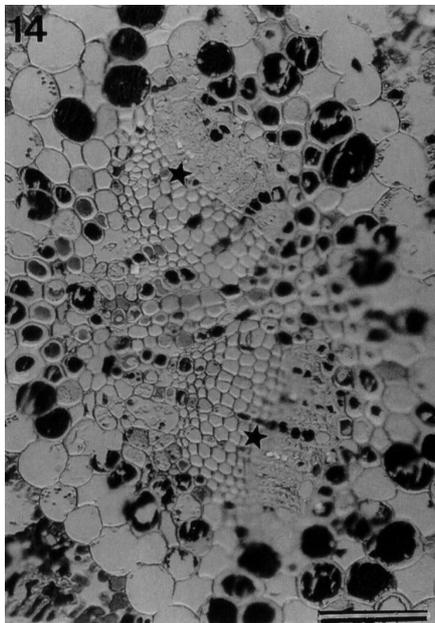
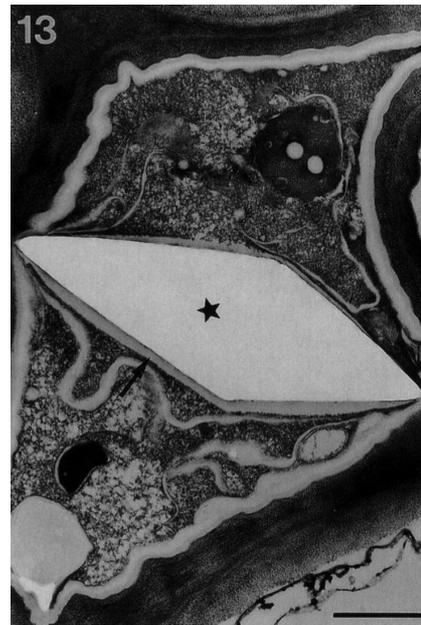
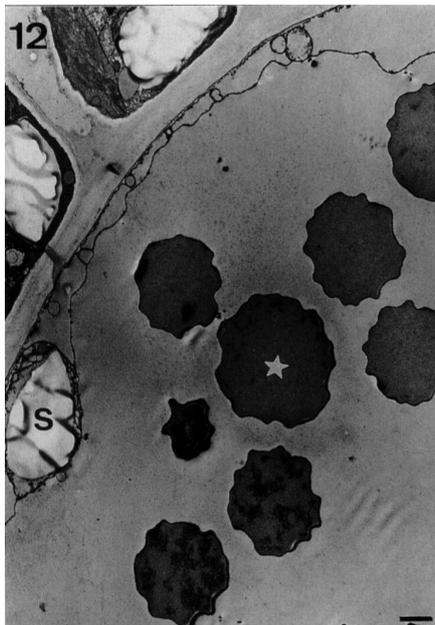


Figura 3.12. Célula endodérmica con granos de almidón (S) y tanino granular (*).

Figura 3.13. Célula del parénquima de transfusión con un cristal romboide de oxalato cálcico (*) rodeado por material de la pared celular (flecha).

Figuras 3.14-16. Micrografías ópticas de secciones de acículas de un año de edad de *Pinus canariensis*. Barras = 10 μ m.

Figura 3.14. Haz vascular (*) y tejido de transfusión con microscopio de contraste de fase.

Figura 3.15. Cristales de oxalato (flechas) en el tejido de transfusión vistos con microscopio de contraste de fase y de polarización.

Figura 3.16. Granos de almidón (flechas) con cruces de malta en el tejido de transfusión visto con el microscopio de contraste de fase y de polarización.

Igual que en otras especies de pinos los estomas están dispuestos en filas sobre las superficies adaxial y abaxial de las acículas. Las células guarda están profundamente hundidas y bordeadas de células subsidiarias formando un conspicuo borde periestomático que es la única parte del complejo estomático siempre visible en visión superficial. En sección transversal, las células guarda aparecen elípticas con paredes celulares gruesamente lignificadas. Las células hipodérmicas lateralmente adyacentes a las células guarda son diferentes al resto en tamaño y forma y han sido denominadas células hipodérmicas subsidiarias; están en contacto con las células epidérmicas subsidiarias en el complejo estomático (figura 3.2).

Bajo la epidermis, y bordeando el mesófilo, existe una capa hipodérmica con células de pared gruesa. Esta capa tiene un número variable de células esclerificadas excepto en las áreas bajo los estomas, donde se encuentra la cámara subestomática, y enmascara un tejido mecánico que está más desarrollado en los márgenes y se introduce entre las células del mesófilo como si fueran nervios. Esta capa hipodérmica está menos desarrollada en acículas de plántulas, donde está formada por una, ocasionalmente dos, capas celulares con paredes más delgadas (figuras 3.2 y 3.4).

Las células parenquimáticas del mesófilo están profundamente plegadas internamente, sus paredes tienen invaginaciones características (figura 3.8). Estas células contienen principalmente cloroplastos elipsoidales con un tamaño medio de 4-6 μm distribuidos de manera uniforme en el citoplasma, cerca de la pared celular. Tienen un sistema tilacoidal bien desarrollado con un arreglo de grana determinado dentro del estroma, donde se observan pocos plastoglóbulos de tamaño variable (de diámetro hasta 0.8 μm) así como uno o dos granos de almidón (figura 3.9). Además se observaron cloroplastos irregulares más alargados que parecían estar en proceso de división (figura 3.10). En el citoplasma existen un número variable de cuerpos lipídicos con un tamaño da hasta 6 μm . La vacuola central está llena de tanino granular fino.

Un número variable de conductos de resina (2-5) están presentes en el mesófilo, paralelos al eje longitudinal de la hoja. Estructuralmente son largos espacios intercelulares bordeados de células epiteliales productoras de resina rodeadas de una vaina de células de pared gruesa. Las células epiteliales contienen mitocondrias y cuerpos lipídicos (figura 3.11).

La endodermis es una capa sencilla de células grandes y ovales con paredes bastante gruesas, dispuestas como una vaina entre el mesófilo exterior y el tejido interno de transfusión. Las células contienen gránulos de almidón y diferentes cantidades de taninos (figura 3.12).

En el centro de la acícula, en sección transversal, hay dos haces vasculares cercanos el uno al otro, con el floema en la parte abaxial (figura 3.14). Los haces están rodeados de tejido de transfusión consistente en traqueidas y células parenquimáticas vivas. Las células parenquimáticas contienen taninos, cristales de oxalato cálcico (figuras 3.13 y 3.15) y también almidón, como puede verse por las cruces de malta en el microscopio de polarización (figura 3.16). Cerca del floema hay células de citoplasma denso que se interpreta que son células de Strassburger.

3.4. DISCUSIÓN

La estructura de las acículas de *Pinus canariensis* es similar a la de otras acículas de pinos, aunque con ciertas particularidades. Como en otras coníferas la superficie de las acículas de *Pinus canariensis* está cubierta por ceras que forman estructuras tubulares (Bermadinger-Stabentheiner 1995). Debido a que los dioles secundarios, y especialmente el 10-nonacosanol, determinan la estructura tubular (Jetter y Riederer 1995), se puede asumir que estos componentes son también los componentes principales de las ceras epicuticulares de *Pinus canariensis*. Las ceras epicuticulares estructurales determinan la impermeabilidad de las superficies vegetales y, por ello, influyen en procesos como la lixiviación, la absorción de xenobióticos y nutrientes y también la formación de microflora epifítica (Riederer y Marktädter 1996). Adicionalmente, tienen un papel muy importante en la reducción de la pérdida de agua por transpiración (Grncarevic y Radler 1967; Denna 1970a y b) y proporcionan protección frente a la abrasión física, la lluvia, el viento, las heladas, la radiación y el daño por hongos, insectos y bacterias (Turunen y Huttunen 1990). *Pinus canariensis* se caracteriza por aperturas muy estrechas de la cámara epiestomática. En cambio, *Pinus sylvestris*, por ejemplo, tiene aperturas epiestomáticas bastante anchas (Crossley y Fowler 1986; Turunen y Huttunen 1990). Estas estrechas aperturas junto con las acumulaciones de cera

dentro de la cámara epiestomática, seguramente son medidas bastante eficientes contra la pérdida de agua por transpiración. Las estructuras de ceras epicuticulares sobre las acículas de vida larga cambian en respuesta a factores medioambientales y durante el proceso de envejecimiento (Van Gardingen y col. 1991), se ven afectadas por diferentes contaminantes aéreos (Riding y Percy 1985; Grill y col. 1989) y también por “sprays” marinos (Krause 1982; Altieri y col. 1994). Estos agentes producen un deterioro prematuro de las estructuras tubulares. Las alteraciones de estas superficies dependen de la edad acicular y las características del hábitat en el que se desarrollan los pinos.

La estructura general del complejo estomático en las especies de *Pinus* está bien conocida (Fahn 1974; Esau 1977) pero las descripciones detalladas para las diferentes especies son escasas (ver Jonson y Riding 1981). Sin embargo, si comparamos la cámara epiestomática con la de *Pinus merkusii* (Esau 1965), *Pinus strobus* y *Pinus banksiana* (Johnson y Riding 1981), ésta es mayor y las células oclusivas están más profundamente hundidas.

Los estomas profundamente hundidos y las ceras que cubren las células epidérmicas así como la cámara epiestomática, constituyen una buena adaptación para evitar la pérdida de agua, permitiendo a ésta especie vivir en regiones secas y rocosas, como en la vertiente sur de las Islas.

El tejido mecánico que hay debajo de la epidermis contribuye a una mayor resistencia a la sequía. Debido a la gran longitud de las acículas este tejido también contribuye a sostenerlas y mantenerlas rígidas. En las acículas de plántulas este tejido es de menor tamaño y no está tan bien desarrollado.

El análisis ultraestructural de acículas de *Pinus canariensis*, no dañadas de forma visible, muestra cloroplastos de las células del mesófilo que son similares en estructura a los de *Pinus pinaster* (González y col. 1993). En contraposición con los grandes plastoglóbulos encontrados en *Pinus canariensis*, los cloroplastos de *Pinus sylvestris* (Soikkeli 1980; Palomäki y Holopainen 1995) y *Pinus halepensis* (Antonnen y col. 1995) contienen sólo plastoglóbulos pequeños. Los síntomas de daño celular, frecuentemente se manifiestan primero en los cloroplastos del mesófilo (Meyberg y col. 1988; Antonnen y col. 1995). Dichos cambios, como estroma granular electrónicamente denso, abultamientos tilacoidales y disrupciones de la membrana no fueron visibles en las muestras investigadas. Los cuerpos lipídicos en el citoplasma de las células del mesófilo son comunes también en otras especies de *Pinus* (cf. Walles y col.

1973; Soikkeli 1980; González y col. 1993), pero su cantidad y tamaño normales se ha visto que depende de diferentes parámetros como la edad de la acícula o diversos tipos de estreses (Antonnen 1992). Además de su existencia en el citoplasma, también pueden encontrarse en la vacuola con el aumento de la edad de la acícula (Kärenlampi 1987; Antonnen 1992) o por deficiencia de nutrientes (Holopainen y Nygren 1989).

El papel del tejido de transfusión en la concentración de solutos de la corriente transpiratoria y en la recuperación selectiva de solutos que eventualmente se liberan al floema (Canny 1993) es muy importante, igual que la endodermis que hay en la confluencia de dos flujos opuestos: metabolitos fotosintéticos elaborados en el mesófilo por medio de las células de Strassburger hacia el tejido del floema, y agua desde el xilema por traqueidas de transfusión hacia el mesófilo y los estomas.

3.5. CONCLUSIONES

Los estomas profundamente hundidos, la presencia de ceras que cubren las células epidérmicas, la estrecha cámara epiestomática y el tejido mecánico que subyace a la epidermis, constituyen una adaptación ideal para evitar la pérdida de agua, permitiendo a esta especie vivir en regiones con cierto grado de sequía.

Paralelamente, el profundo plegamiento de las células parenquimáticas, que favorece la disposición superficial de los cloroplastos cerca de la pared, supone una ventaja para la captación de la energía lumínica y el intercambio gaseoso por estos orgánulos, efecto que se traduce en un mayor rendimiento fotosintético.

Todas estas propiedades estructurales y ultraestructurales de *Pinus canariensis* constituyen la base para el entendimiento de sus respuestas fisiológicas y bioquímicas a cambios en las condiciones ambientales.

3.6. BIBLIOGRAFÍA

ALTIERI, A., L. DEL CALDO y F. MANES (1994). Morphology of epicuticular waxes in *Pinus pinea* needles in relation to deason and pollution-climate. European Journal of Forest Pathology. 24: 79-91.

- ANTONNEN, S. (1992). Changes in lipids of *Pinus sylvestris* needles exposed to industrial air pollution. *Ann. Bot. Fennici*. 29: 89-99.
- ANTONNEN, S., J. HERRANEN, P. PEURA y L. KÄRENLAMPI (1995). Fatty acids and ultrastructure of ozone-exposed Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) needles. *Environment and Pollution*. 87: 235-242.
- BERMADINGER-STABENTHEINER, E. (1995). Physical injury, re-crystallization of wax tubes and artefacts: identifying some causes of structural alteration to spruce needle wax. *New Phytologist*. 130: 67-74.
- CANNY, M.J. (1993). Transfusion tissue of pine needles as a site of retrieval of solutes from the transpiration stream. *New Phytologist*. 123: 227-232.
- CROSSLEY, A. y D. FOWLER (1986). The weathering of Scots pine epicuticular wax in polluted and clear air. *New Phytologist*. 103: 207-218.
- DENNA, D.W. (1970a). Transpiration and the waxy bloom in *Brassica oleracea* L. *Australian Journal of Biological Science*. 23: 27-31.
- DENNA, D.W. (1970b). Leaf wax and transpiration in *Brassica oleracea* L. *Journal of American Society for Horticultural Science*. 95: 30-32.
- ESAU, K. (1965). *Plant anatomy*. Wiley. Nueva York.
- ESAU, K. (1977). *Anatomy of seed plants*. Wiley. Nueva York.
- FAHN, A. (1974). *Plant anatomy*. Pergamon Press. Oxford.
- FONT QUER, P. (1979). *Diccionario de Botánica*. Editorial Labor, S.A. 7ª Reimpresión.
- GONZÁLEZ, R., A. SEGURA y M.L. GONZÁLEZ (1993). Ultrastructure of chloroplasts of pine needles exposed to an industrial environment. *Biologia Plantarum*. 35: 407-416.
- GRILL, D., H. GUTTENBERGER, G. ZELLNIG y E. BERMADINGER (1989). Reactions of plant cells to air pollution. *Phyton (Austria)*. 29: 277-290.
- GRNCAREVIC M. y F. RADLER (1967). The effects of wax components on cuticular transpiration-model experiments. *Planta*. 75: 23-27.
- HOLOPAINEN, T. y P. NYGREN (1989). Effect of potassium deficiency and simulated acid rain alone and in combination on the ultrastructure of Scots pine needles. *Canadian Journal of Forest Research*. 19: 1402-1411.
- JETTER, R. y M. RIEDERER (1995). In vitro reconstruction of epicuticular wax crystals: formation of tubular aggregates by long-chain secondary alkanediols. *Botanica Acta*. 108: 111-120.
- JOHANSEN, D.A. (1940). *Plant microtechnique*. Mc Graw-Hill. New York.

- JOHNSON, R.W. y R.T. RIDING (1981). Structure and ontogeny of the stomatal complex in *Pinus strobus* L. and *Pinus banksiana* LAMD. American Journal of Botany. 68: 260-268.
- KÄRENLAMPI, L. (1987). Visible symptoms and mesophyll cell responses to air pollution in lowland pines (*Pinus radiata* and *P. halepensis*) in southern California. Savonia 9: 1-12.
- KRAUSE, C.R. (1982). Identification of salt spray injury to *Pinus* species with scanning electron microscopy. Phytopathology. 72: 382-386.
- MEYBERG, M., J. LOCKHAUSEN y U. KRISTEN (1988). Ultrastructural changes in mesophyll cells of spruce needles from a declining forest in northern Germany. European Journal of Forest Pathology. 18: 169-175.
- PALOMÄKI, V. y T. HOLOPAINEN (1995). Effects of nitrogen deficiency and recovery fertilization on ultrastructure, growth, and mineral concentrations of Scots pine needles. Canadian Journal of Forest Research. 25: 198-207.
- RIDING, R.T. y K.E. PERCY (1985). Effects of SO₂ and other air pollutants on the morphology of epicuticular waxes on needles of *Pinus strobus* and *Pinus banksiana*. New Phytologist. 99: 555-563.
- RIEDERER, M. y C. MARKSTÄDTER (1996). Cuticular waxes: a critical assessment of current knowledge. 189-200. En: Plant Cuticles – an integrated functional approach. Kerstiens G. (ed.). Ecomed. Alemania.
- SOIKKELI, S. (1980). Ultrastructure of the mesophyll in Scots pine and Norway spruce: Seasonal variation and mortality of the fixative buffer. Protoplasma 103: 241-252.
- TURUNEN, M. y S. HUTTUNEN (1990). A review of the response of epicuticular wax on conifer needles to air pollution. J. Environ. Qual. 19: 35-45.
- VAN GARDINGEN, P.R., J. GRACE y C.E. JEFREE (1991). Abrasive damage by wind to the needle surface of *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. And *Pinus sylvestris* L. Plant, Cell and Environment. 14: 185-193.
- WALLES, B., B. NYMAN y T. ALLEN (1973). On the structure of needles of *Pinus sylvestris* L. Studia Forestalia Suecica. 106: 1-26.

4. CONTENIDO EN NUTRIENTES, PIGMENTOS Y
SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES EN LAS ACÍCULAS EN
RELACIÓN CON LA ALTITUD Y DIFERENTES SITUACIONES
DE ESTRÉS

“Hay más por ver que lo que entra por los ojos” Norwood Russell Hanson.

4.1. INTRODUCCIÓN

El estado nutricional de los árboles del bosque ha sido evaluado por el análisis del contenido en nutrientes de las acículas en numerosos estudios (Oren y col. 1993; Tausz y col. 1996a y b). En este sentido las coníferas se han usado en numerosas ocasiones como bioindicadores en los bosques templados. Así por ejemplo, el análisis de los elementos acumulados en las acículas de píceas es una herramienta importante para el control ambiental y los límites para las concentraciones de azufre, flúor, y cloro han quedado recogidos en las legislaciones de varios países (Austrian Federal Law gazette 1984).

En los últimos años, los conceptos relacionados con la fisiología del estrés han sido ampliamente aceptados y se han incluido las medidas de variables relacionadas con el estrés en investigaciones de campo (Polle y Rennenberg 1992; Tausz y col. 1994). La disminución en el contenido en clorofila y las modificaciones en la composición de pigmentos se han usado como bioindicadores fisiológicos para estudiar las primeras etapas del daño (Oren y col. 1993; Tausz y col. 1996a).

El análisis de los componentes del sistema de antioxidantes es muy útil para la evaluación de estreses ambientales no acumulativos, como contaminantes aéreos fotooxidativos, sequía o radiación (Tausz y col. 1994; Tausz y col. 1996a, b y c). Bajo la influencia de estos factores de estrés se pueden encontrar elevados contenidos de ácido ascórbico (Schmieden y Wild

1994; Tausz y col. 1994; Tausz y col. 1996a, b y c; Wildi y Lütz 1996), glutation (Tausz y col. 1996a, b y c; Wildi y Lütz 1996), o tocoferol (Schmieden y Wild 1994; Wildi y Lütz 1996).

La influencia sobre las plantas de los diversos factores de estrés provoca la producción de especies tóxicas de oxígeno dentro de las células, algunas de las cuales son radicales libres. Este tipo de sustancias inician procesos destructivos como el blanqueamiento de la clorofila, la peroxidación de lípidos o la oxidación de proteínas, en el caso de no ser eliminados por los sistemas protectores (Elstner y Osswald 1994).

El exceso de energía luminosa absorbida cuando la fotosíntesis de la planta se encuentra limitada por factores de estrés, puede ser disipada como calor a través de los carotenoides. El ciclo de las xantofilas implica los carotenoides violaxantina, anteraxantina y zeaxantina, que forman un sistema flexible para adaptar la eficiencia de conversión de la energía en las membranas fotosintéticas (Adams III y Demmig-Adams 1994). La violaxantina, que contiene dos grupos epóxidos, puede ser convertida en zeaxantina de forma reversible y rápida (en cuestión de minutos) por desepoxidación de los grupos epoxidados. Este proceso cuenta con la anteraxantina como intermediario. Al contrario que la violaxantina, la zeaxantina es muy efectiva en la disipación por calor de la energía luminosa. Un mayor estado de desepoxidación de este ciclo (es decir, más zeaxantina que violaxantina) garantiza una protección más fuerte del aparato fotosintético. Otros carotenoides, como la luteína, también contribuyen a la disipación de la energía. otro ejemplo es el β -caroteno, que amortigua el oxígeno singlete que se produce a partir del oxígeno molecular por transferencia de la energía de excitación, directamente dentro del "colchón de pigmentos".

Alternativamente, el exceso de energía puede usarse también en la vía fotorrespiratoria o en la reacción de Mehler, que puede contribuir a la protección del aparato fotosintético (Asada 1999). En estos casos se producen especies activas de oxígeno que la planta tiene que mantener bajo control y de esto se encarga el sistema de antioxidantes.

El sistema de defensa antioxidativo está compuesto por antioxidantes hidrofílicos (ascorbato y glutation) y lipofílicos (α -tocoferol), la acción de enzimas destoxicadoras y procesos enzimáticos de reparación y regeneración (Foyer 1997). Puesto que la sobreproducción de especies activas de oxígeno,

que se produce por efecto de las situaciones de estrés, está dirigida por la energía luminosa (Eltner y Osswald 1994), la disipación fotoprotectora de energía en los tilacoides es la primera línea de defensa bioquímica (Adams III y Demig-Adams 1994). El ácido ascórbico, el glutatión y el tocoferol son antioxidantes de bajo peso molecular capaces de destoxificar directamente las especies activas de oxígeno (Foyer 1997). El ascorbato no sólo es un destoxificador eficiente de radicales libres tóxicos, sino que también es necesario para la formación de zeaxantina, el amortiguador más importante del exceso de energía luminosa (Adams III y Demig-Adams 1994), y para la regeneración de α -tocoferol, que es muy importante como protector de las membranas tilacoidales (Fryer 1992). Durante estos procesos, el ascorbato se oxida a ácido dehidroascórbico, y puede ser regenerado por el glutatión, que es a su vez regenerado por el poder reductor procedente de la fotosíntesis (Foyer 1997). La capacidad de las defensas antioxidativas celulares está determinada por los tamaños del pool de antioxidantes y también por la habilidad del metabolismo de mantenerlos en estado activo, es decir en estado reducido.

Los cambios en el sistema de antioxidantes indican respuestas tempranas de las células vegetales al estrés (Polle y Rennenberg 1992). En el caso de indicadores bioquímicos del estrés se ha prestado gran atención a las investigaciones de antioxidantes y pigmentos protectores en estudios de campo en árboles. La mayoría de estos estudios han tenido como objetivo la detección de los efectos de la contaminación sobre los ecosistemas. En comparación, las investigaciones sobre las respuestas de los antioxidantes de los árboles a los estreses ambientales en su ambiente han sido muy escasas. Como la producción de radicales libres tóxicos y de especies de oxígeno es un estado inicial del daño celular producido por muchos impactos ambientales diferentes (incluyendo factores naturales: Eltner y Osswald 1994), es necesario saber más acerca de las reacciones bioquímicas de los árboles en respuesta a situaciones de estrés natural. La salud de las plantas en un ecosistema puede ponerse en peligro no sólo por contaminación ambiental antropogénica, sino también por factores naturales. El abastecimiento de agua es la fuente más sensible en los ecosistemas terrestres, y el estrés de sequía es una situación con la cual las plantas tienen que enfrentarse frecuentemente. Durante un déficit hídrico la limitación de la fotosíntesis y la exposición simultánea a alta radiación aumenta la tasa de formación de las especies activas de oxígeno y hace aumentar la

actividad de las reacciones de defensa antioxidativa (Smirnoff 1993). Por otro lado, el abastecimiento de agua ha sido reconocido como un factor esencial que modifica el impacto de los estreses debidos a contaminantes y al hombre sobre la vegetación (Fuhrer y col. 1997).

El uso de medidas de fluorescencia de la clorofila ha sido introducido como un medio valioso para la investigación en condiciones de campo (Saarinen 1993), puesto que es un buen indicador del estrés de las plantas (Lichtenthaler 1988; Bolhár-Nordenkampf y col. 1989; Larcher y col. 1991). Algunos estudios han revelado, asimismo, modificaciones a nivel de la estructura de los cloroplastos en coníferas sometidas a estrés medioambiental (Zellnig y col. 1989).

La mayor parte de este tipo de estudios se han llevado a cabo en bosques templados de Europa y Norteamérica, pero los estudios sobre especies mediterráneas aun son escasos (Elvira y col. 1995; Schwarz y Polle 1998; García-Plazaola y col. 2000).

El objetivo de este estudio es el de evaluar el estado nutricional y de estrés fisiológico de árboles de *Pinus canariensis*, creciendo a diferentes altitudes, por medio de medidas de nutrientes, pigmentos y análisis de antioxidantes, acompañados de medidas de la fluorescencia de la clorofila y estudios de la ultraestructura de los cloroplastos en pinos procedentes de parcelas seleccionadas a lo largo de un perfil altitudinal sobre la isla de Tenerife.

Esto nos dará una idea de la incidencia de los factores de estrés ambientales y los mecanismos de protección de *Pinus canariensis* en Tenerife y nos ayudará a explicar por qué los pinos son capaces de crecer bajo condiciones ecológicas diferentes sin presentar síntomas severos de estrés. Además, la evaluación del estado de estrés de los pinos en diferentes sitios en condiciones naturales, será de interés para obtener un mayor éxito en el uso de *Pinus canariensis* en las repoblaciones en las Islas Canarias.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Las investigaciones se realizaron en acículas de *Pinus canariensis* que se recolectaron, en verano, en cuatro parcelas de la vertiente sureste de la Isla de Tenerife: Sitio I, a 550 m sobre el nivel del mar cerca del pueblo de Candelaria, y sitios II, III y IV, a 850, 1500 y 1950 m, respectivamente, sobre la villa de Arico (figura 4.1). Se cortaron ramas de orientación sur expuestas a la luz a una altura de unos 3-4 m de cinco pinos representativos de cada sitio, de unos 40-50 años de edad. Las muestras se guardaron a saturación en el laboratorio toda la noche y, al día siguiente, las acículas se cortaron bajo condiciones de luz y temperatura constantes, se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se liofilizaron para los estudios bioquímicos, y se secaron en la estufa a 105 °C para el análisis de los elementos. El material se molió en un homogenizador y

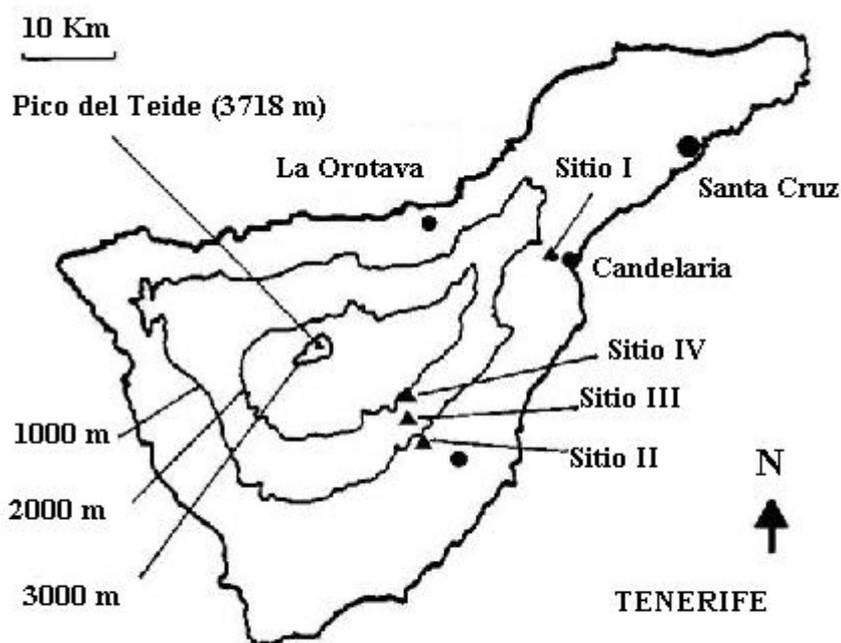


Figura 4.1. Situación de las parcelas sobre la isla de Tenerife. El sitio I se encuentra situado cerca del pueblo de Candelaria y los sitios II, III y IV sobre la villa de Arico.

el polvo liofilizado se almacenó en viales herméticos en el congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis.

El azufre y el cloro se midieron por HPLC de intercambio iónico tras una combustión de Schöninger, el nitrógeno se midió por el procedimiento estándar de Kjeldahl, el fósforo por colorimetría, y el magnesio, el sodio, el potasio y el calcio se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica (Shimadzu); los pigmentos, el ácido ascórbico y el glutatión se midieron según Tausz y col. (1996b y c), y el α -tocoferol según Wildi y Lütz (1996), como se describe en el capítulo de material y métodos generales.

La fluorescencia de la clorofila se midió por medio del fluorímetro portátil (PEA, Hansatech, U.K.) en acículas de las mismas ramas usadas para las determinaciones de nutrientes, pigmentos y antioxidantes, que se mantuvieron en las mismas condiciones de saturación acuosa, oscuridad y temperatura ambiente toda la noche.

Para el estudio de la ultraestructura se siguió el protocolo descrito en el capítulo de material y métodos generales.

La evaluación estadística se hizo por medio del paquete Statistica (StatSoft, USA). Las diferencias entre sitios se calcularon por un test no-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido por comparaciones cruzadas de acuerdo con Schaich y Hamerle (Bortz y col. 1990). Las figuras muestran las medianas y el rango de percentiles 20-80. Las diferentes letras de las figuras representan diferencias significativas ($P < 0.05$). Las correlaciones entre los datos de fluorescencia y la composición de carotenoides se calculó mediante un modelo complejo de ajuste indicado en las figuras, con la calidad de ajuste indicado mediante el coeficiente de correlación entre los valores predichos y los observados, así como por la fracción de varianza explicada por el modelo.

4.3. RESULTADOS

Los resultados de los análisis de los elementos en las acículas se muestran en las figuras 4.2 A, B, C y D. Las acículas de *Pinus canariensis* en los cuatro sitios contienen cantidades similares de magnesio y potasio. Las acículas recolectadas en el sitio III mostraron significativamente menor contenido de calcio que las del sitio I y II. Los contenidos en sodio y en cloro fueron significativamente mayores en los sitios I y II. Los contenidos en fósforo fueron significativamente menores en el sitio IV comparado con los sitios I y II. El contenido en nitrógeno de las acículas fue diferente según los sitios. Las acículas mostraron mayor contenido en azufre en los sitios de menor altitud y menor contenido de este elemento en altitudes más elevadas.

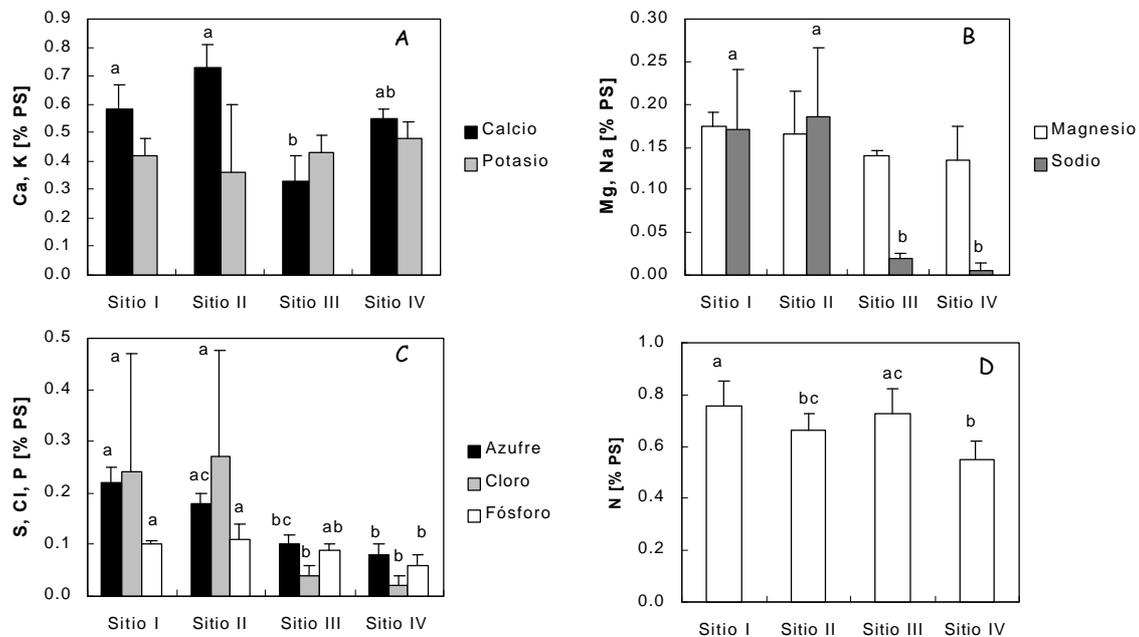


Figura 4.2. Contenido en elementos de acículas de *Pinus canariensis* de un año de edad (PS = peso seco de las acículas) en los cuatro sitios citados. Las columnas representan las medianas y las barras los percentiles 80%. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios para los elementos respectivos ($P < 0.05$).

Los contenidos en clorofila fueron menores en los sitios III y IV (figura 4.3 columnas). Las variaciones de la relación clorofila a/b con la altitud no fueron tan claras (figura 4.3 puntos), mostrando un descenso en el sitio III. Junto con las disminuciones de la clorofila de las acículas, en los sitios más

elevados se observa una mayor proporción de carotenoides por unidad de clorofila y menores relaciones α -/ β - caroteno (figura 4.4).

El estado de epoxidación del ciclo de las xantofilas por la mañana no fue significativamente diferente entre los diversos sitios (figura 4.5).

Los contenidos en ácido ascórbico fueron significativamente mayores en los sitios III y IV respecto al sitio II (Figura 4.6 A). Sin embargo, los niveles de los antioxidantes glutatión y α -tocoferol no variaron mucho entre los sitios (Figuras 4.6 B y C), así como tampoco lo hicieron los niveles de dehidroascorbato y de glutatión oxidado (figuras 4.6 A y B).

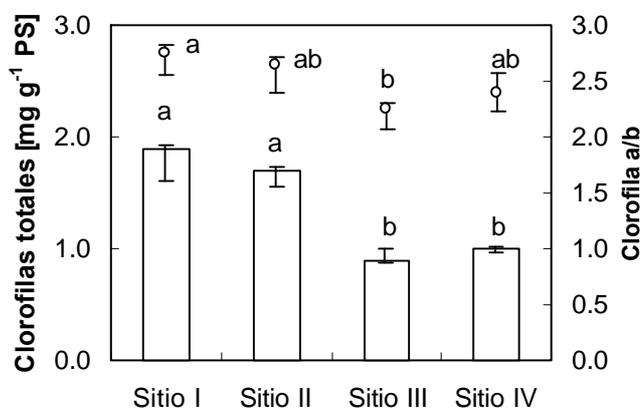


Figura 4.3. Contenido en clorofilas totales (barras) y relación clorofila a/b (puntos) en acículas de un año de *Pinus canariensis* en los cuatro sitios de medida. Las columnas y puntos representan las medianas y las barras los percentiles 80%. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios para los elementos respectivos (P<0.05).

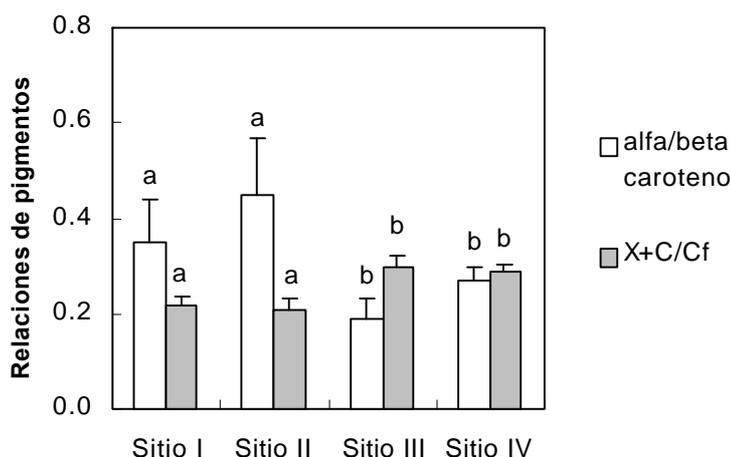


Figura 4.4. Relaciones de α / β caroteno y (xantofilas + carotenos) / clorofilas en acículas de pino canario en los cuatro sitios. Las columnas representan las medianas y las barras los percentiles 80%. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios para los elementos respectivos (P<0.05).

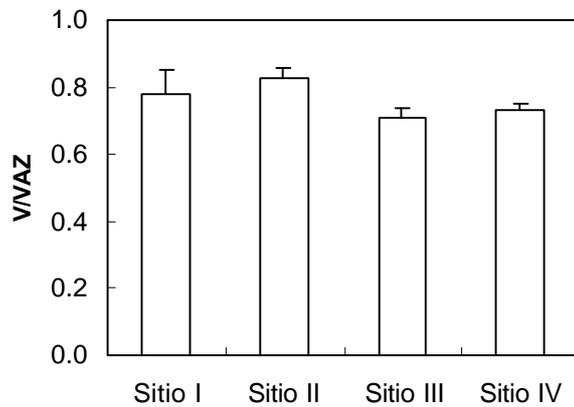


Figura 4.5. Relación violaxantina/pool del ciclo de las xantofilas (violaxantina + anteraxantina + zeaxantina). Las columnas representan las medianas y las barras los percentiles 80%.

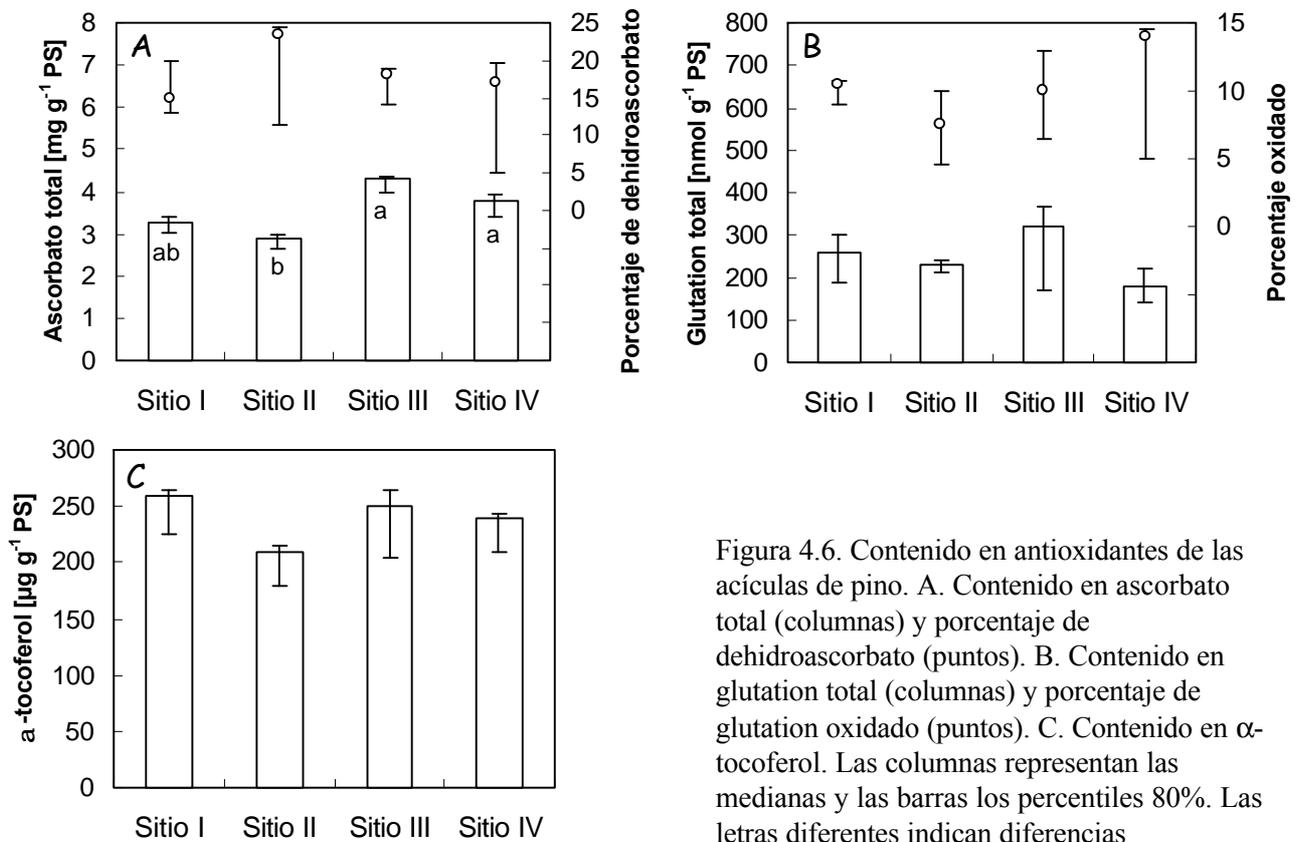


Figura 4.6. Contenido en antioxidantes de las acículas de pino. A. Contenido en ascorbato total (columnas) y porcentaje de dehidroascorbato (puntos). B. Contenido en glutation total (columnas) y porcentaje de glutation oxidado (puntos). C. Contenido en α -tocoferol. Las columnas representan las medianas y las barras los percentiles 80%. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios para los elementos respectivos ($P < 0.05$).

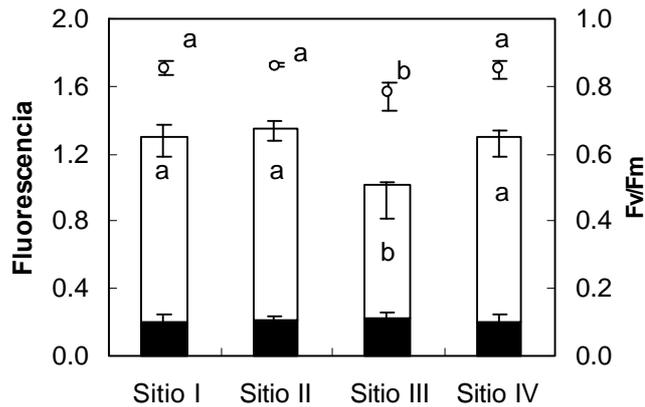


Figura 4.7. Fluorescencia de la clorofila (en unidades relativas) de las acículas en los cuatro sitios estudiados. Columnas negras = F_0 ; columnas blancas = F_v ; columnas totales = F_m ; □ = F_v/F_m .

Las medidas de fluorescencia de la clorofila por la mañana mostraron relaciones más bajas de F_v/F_m en las acículas del sitio III (Figura 4.7). En los sitios I, II y IV, los valores de F_v/F_m fueron mayores de 0.83, mientras que en el sitio III fueron significativamente más bajos aunque con un valor de 0.77, dentro del rango óptimo teórico dado por Bolhár-Nordenkampf y Lechner (1990).

La disminución de F_v/F_m ocurrió paralelamente a la disminución en las relaciones α -caroteno/ β -caroteno (figura 4.8 B) y la disminución en la relación de violaxantina respecto al total de carotenoides del ciclo de las xantofilas (violaxantina + anteraxantina + zeaxantina) (figura 4.8 A).

A nivel ultraestructural no se observaron diferencias características en los cloroplastos de las células del mesófilo en los cuatro sitios. En general, los cloroplastos estaban en buenas condiciones y no mostraron daños severos en sus parámetros estructurales principales, como el desarrollo tilacoidal, el número de plastoglobulos, el contenido en almidón y la densidad del estroma (foto 4.1 a y b).

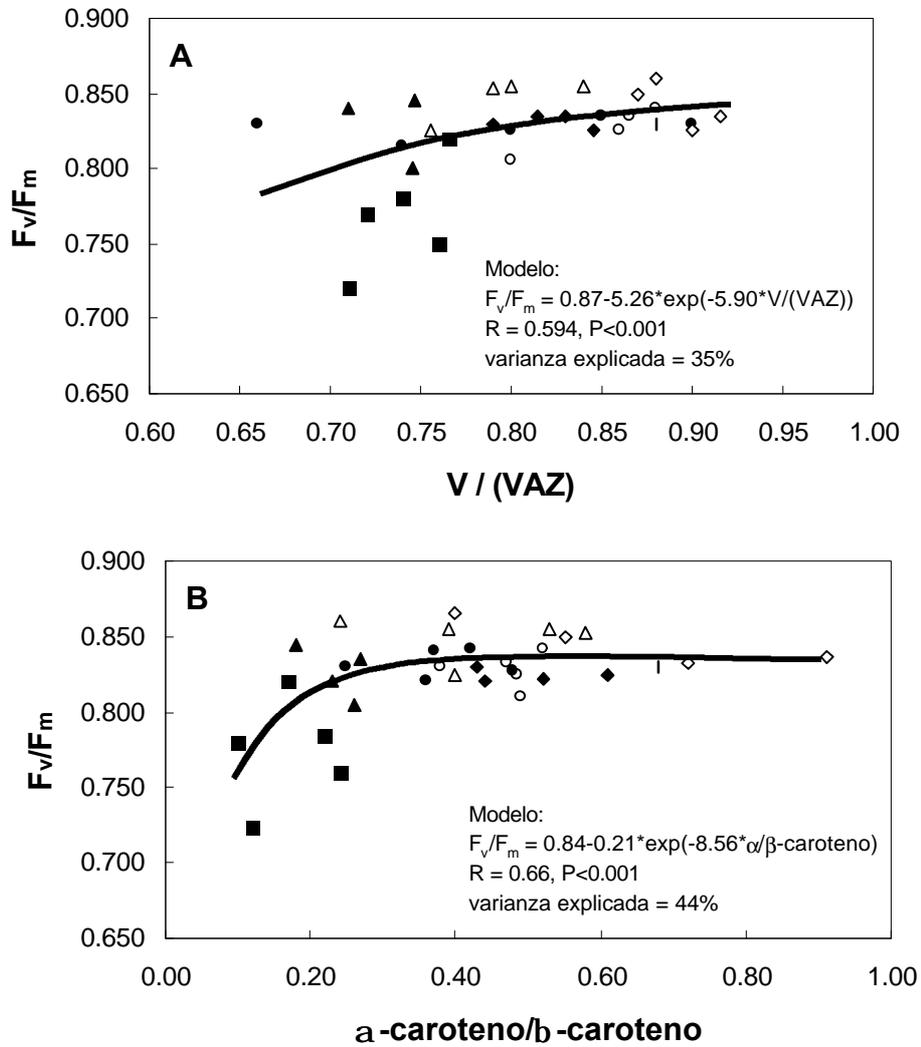


Figura 4.8. Correlaciones entre la composición de carotenoides y fluorescencia de la clorofila. □, ○ Sitio I; ◆, ♣ Sitio II; □ Sitio III; □, ⚡ Sitio IV. Los símbolos abiertos se refieren a acículas del año en curso y los símbolos negros a acículas del año anterior. A. Estado del ciclo de las xantofilas frente a F_v/F_m . V= Violaxantina, A = Anteraxantina, Z = Zeaxantina. B. Relación α -caroteno/ β -caroteno frente a F_v/F_m .

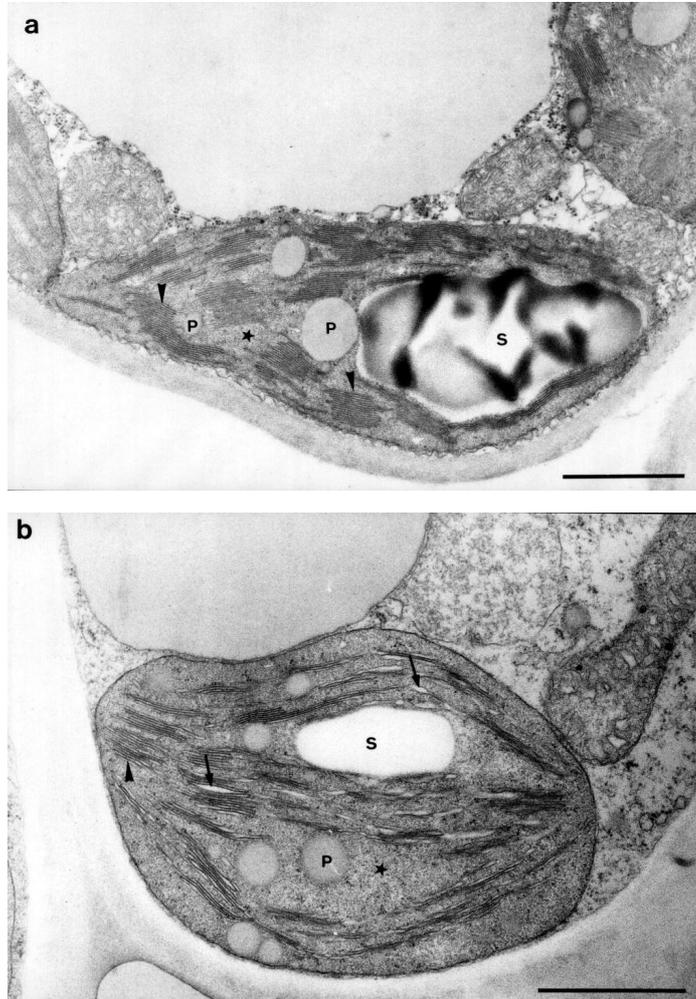


Foto 4.1. Micrografías electrónicas de los cloroplastos del mesófilo de acículas del sitio I (a) y del sitio III (b). Los cloroplastos muestran muchos grana tilacoidales (cabezas de flecha), algunos plastoglóbulos transparentes a los electrones (P), gránulos de almidón (S) y una apariencia normal del estroma (*). (b) A veces también pueden existir pequeños abultamientos de las tilacoides (flechas). Barras de escala = $1\mu\text{m}$.

4.4. DISCUSIÓN

Las fuertes correlaciones entre las concentraciones de sodio y cloro reflejan el impacto del transporte de agua de mar por medio del aire a los sitios menos elevados.

Investigaciones hechas en *Pinus halepensis* revelan contenidos comparables a los encontrados aquí en fósforo y nitrógeno y algo mayores en calcio (Elvira y col. 1995). Estos autores encontraron variaciones anuales pronunciadas en el contenido de nitrógeno, fósforo y magnesio con un mínimo en el verano tardío y un máximo en la primavera temprana, insensibles a los tratamientos de ozono que llevaron a cabo en su estudio.

Las acículas de *Pinus canariensis* contienen más azufre en los sitios menos elevados, I y II, comparadas con los contenidos de las acículas de otras coníferas en estudios de campo, pero los valores de azufre disminuyeron con el aumento de la altitud. Como las grandes variaciones en el contenido en azufre de las acículas están causadas, principalmente, por la entrada de gases sulfurosos a través de los estomas, esta variable puede usarse para bioindicación del impacto de SO₂ (Austrian Federal Law Gazette 1984). Aunque los datos de azufre y cloro están correlacionados de forma significativa, no parece probable que el azufre estuviera depositado como sulfato derivado del agua salada del mar, puesto que la relación Cl/S del agua de mar está, generalmente, por encima de 10 (Larcher 1994). Los datos apuntan a que existe una fuerte deposición de SO₂ en las zonas de menor altitud en esta parte de la isla por su proximidad a la autopista y a la central eléctrica de Candelaria.

Los resultados de las concentraciones de pigmentos están de acuerdo con estudios hechos en píceas en los Alpes, que revelan una disminución en el contenido en pigmentos en sitios más elevados debido a niveles crecientes de estrés oxidativo (Polle y Rennenberg 1992; Tausz y col. 1996a, b y c).

El aumento en las relaciones carotenoides/clorofilas, observado en los sitios más elevados, puede reflejar una mayor necesidad de fotoprotección de las clorofilas por medio de carotenoides. Esta relación ha sido usado como un indicador temprano de la clorosis de las acículas (Lichtenthaler 1993).

La disminución de las relaciones α/β -caroteno pueden reflejar procesos de oxidación dentro de las membranas tilacoidales, que pueden ocurrir bajo

condiciones de estrés oxidativo y se han encontrado en repetidas ocasiones en acículas dañadas (Siefermann-Harms 1994; Tausz y col. 1996a, b y c).

Se encontró un menor estado de epoxidación del ciclo de las xantofilas por la mañana en el sitio III, probablemente como consecuencia de un estrés prolongado, que podría indicar un aumento de la fotoprotección a costa de la eficiencia fotosintética (Adams III y Demmig-Adams 1994).

El hecho de encontrar mayores contenidos de ácido ascórbico en los sitios más elevados, igual que en el caso del aumento en las relaciones carotenoides/clorofilas, puede reflejar una mayor necesidad de protección a mayor altitud (Polle y Rennenberg 1992; Tausz y col. 1996b).

En contraste con estudios hechos en píceas, que reflejaron diferencias altitudinales en los niveles de glutatión y α -tocoferol (Tausz y col. 1996b), en el estudio que aquí se presenta no se encontraron respuestas en las concentraciones de estas sustancias al estrés altitudinal.

Como el glutatión no sólo es un antioxidante importante sino también la forma mayoritaria de transporte del azufre reducido, su concentración podría aumentar también por una disponibilidad excesiva de azufre en forma de SO_2 (Tausz y col. 1996c).

Asimismo, el α -tocoferol proporciona poder antioxidativo directamente en la membrana, predominantemente en las membranas del cloroplasto. Su contenido puede verse aumentado después de que un ataque masivo de contaminantes cause daño a las membranas, lo cual, evidentemente, no fue el caso en este estudio.

Todos los resultados anteriores, junto con las investigaciones ultraestructurales, indican que los pinos no estaban sufriendo ningún estrés grave. La pequeña reducción de la relación F_v/F_m en el sitio III (dentro de los valores normales teóricos dados por Bolhár-Nordenkampf y col. 1989) no estuvo acompañada de ninguna alteración en el aparato fotosintético, los valores de F_0 permanecieron constantes y sólo los valores de F_m y F_v disminuyeron ligeramente y esto pudo ser debido a la influencia de un estrés hídrico suave en este sitio.

Podemos concluir que los sitios I y II están claramente influenciados por cloruro sódico procedente de la maresía. Además, las acículas de *Pinus*

canariensis en estos sitios muestran contenidos en azufre muy elevados que, probablemente, son de origen antropogénico. Sin embargo, esta especie parece estar bien adaptada a las situaciones ambientales en estos sitios, puesto que las medidas fisiológicas (contenido en pigmentos y datos de fluorescencia) y estructurales no revelaron daños en el metabolismo. Los estudios sobre las respuestas de los antioxidantes al SO₂ son contradictorios en la bibliografía, pero, de cualquier forma, no se encontraron alteraciones severas en el presente estudio. Como demuestran los datos de los contenidos en sodio y cloro, la influencia del agua de mar, en los sitios III y IV, fue despreciable. Lo mismo sucede para el posible impacto de fuentes antropogénicas de azufre, puesto que los contenidos en azufre de las acículas son menores en estos sitios.

Por otro lado, en los sitios III y IV, los contenidos en clorofila son menores y los contenidos de ácido ascórbico son mayores que en los sitios I y II. Junto con alteraciones observadas en la composición de pigmentos (menores relaciones de α/β -caroteno y mayores de carotenoides/clorofila), estos resultados se ajustan a un modelo de niveles crecientes de estrés oxidativo con el aumento en altitud. Los niveles crecientes de ozono contribuyen al estrés medioambiental a grandes altitudes. En Tenerife, la media de los tres meses de verano aumenta desde cerca de 25 ppb a nivel del mar hasta cerca de 55 ppb a 2000 m (comunicación personal de Emilio Cuevas). Pero, como demuestran los datos de fluorescencia, incluso cerca de los 2000 m (en el sitio IV) los árboles de *Pinus canariensis* son capaces de evitar daños en el aparato fotosintético. Ni el estrés altitudinal, que debería ser más severo en el sitio IV, ni el efecto del azufre, que se detectó en los sitios I y II, debilitan la vitalidad fisiológica de los árboles investigados. Se deben tener en cuenta factores adicionales que expliquen la situación del sitio III, que mostró una pequeña bajada en su eficiencia fotosintética.

La existencia de numerosos factores microclimáticos en las Islas Canarias es bien conocida. La influencia de los vientos alisios del noreste que traen la humedad desde el océano forman un mar de nubes en las elevaciones medias, variando su localización altitudinal a lo largo del año y siendo más variable en la vertiente sur de las Islas, donde están situadas las cuatro parcelas experimentales. Esto enmascara, en parte, el efecto altitudinal, siendo probablemente los diversos factores ambientales la causa del estrés en los diferentes sitios.

En un ecosistema de tipo mediterráneo, con pronunciada sequía en verano, el estrés hídrico es un factor importante que provoca el desarrollo de un estrés oxidativo en sus células (Smirnoff 1993). *Pinus canariensis* es, ciertamente, una especie bien adaptada contra la pérdida de agua y, un cierre estomático prolongado en condiciones de alta irradiancia conducirá a una situación de fotoestrés debido a la disminución del CO₂ disponible en los espacios intercelulares (ver capítulos 5 y 6), lo que explica el aumento de sustancias antioxidantes en los sitios de mayor sequía y en condiciones de alta irradiancia.

4.5. CONCLUSIONES

Los sitios I y II están claramente influenciados por cloruro sódico procedente del mar. Además, en estos sitios se encontró una concentración elevada de azufre en las acículas, probablemente de origen antropogénico. Ambos efectos fueron despreciables en los sitios III y IV.

En los dos últimos sitios los contenidos en clorofila fueron menores, siguiendo la tendencia altitudinal encontrada por otros autores. La relación carotenoides/clorofilas y los contenidos en ácido ascórbico fueron mayores que en los sitios I y II, debido a una mayor necesidad de fotoprotección con la altitud. En ninguno de los sitios se encontraron daños mostrados por la ultraestructura de las acículas o por la relación F_v/F_m .

De los resultados obtenidos en este estudio, donde el muestreo se realizó en verano bajo condiciones de extrema sequía y altas temperaturas, podemos concluir que *Pinus canariensis* es una especie bien adaptada a vivir en su área de distribución natural, no presentando síntomas de estrés severo en ninguno de los sitios estudiados.

4.6. BIBLIOGRAFÍA

- ASADA, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50: 601-639.
- ADAMS III, W.W. y B. DEMMIG-ADAMS (1994). Carotenoid composition and down regulation of photosystem II in three conifer species during the winter. *Physiologia Plantarum*. 92: 451-458.
- AUSTRIAN FEDERAL LAW GAZETTE (1984). 2. Verordnung gegen forstschädliche Luftverunreinigungen. *Bundesgesetzblatt* 199. Viena.
- BOLHÁR-NORDENKAMPF, H.R. y E.G. LECHNER (1990). The determination of the “photosynthetic capacity” using chlorophyll fluorescence to measure stress levels in leaves. En: *Trends in photosynthesis research, advanced course*. Palma de Mallorca. Pp: 71-75.
- BOLHÁR-NORDENKAMPF, H.R., S. LONG, N.R. BAKER, G. ÖQUIST, U.SCHREIBER y E.G. LECHNER (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.
- BORTZ, J., G.A. LIENERT y K. BOENKE (1990). *Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik*. Springer Verlag. Berlin.
- ELSTNER, E.F. y W. OSSWALD (1994). Mechanisms of oxygen activation during plant stress. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh B Biology*. 102: 131-154.
- ELVIRA, S., R. ALONSO, R. INCLÁN, V. BERMEJO, F.J. CASTILLO y B.S. GIMENO (1995). Ozone effects on Aleppo pine seedlings (*Pinus halepensis* Mill.) grown in open top chambers. *Water Air and Soil Pollution*. 85: 1387-1392.
- FOYER, C. (1997). Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. En: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defence*. Scandalios G. (editor). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. Pp: 687-621.
- FRYER, M.J. (1992). The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E (α -Tocopherol). *Plant Cell and Environment*. 15: 381-392.
- FUHRER, J., L. SKÄRBY y M.R. ASHMORE (1997). Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe. *Environment and Pollution*. 97: 91-106.

- GARCÍA-PLAZAOLA, J.I., A. HERNÁNDEZ y J.M. BECERRIL (2000). Photoprotective responses to winter stress in evergreen mediterranean ecosystems. *Plant Biology*. 2: 530-535.
- LARCHER, W., J. WAGNER, G. NEUNER, M. MÉNDEZ, M.S. JIMÉNEZ y D. MORALES (1991). Thermal limits of photosynthesis function and viability of leaves in *Persea indica* and *Persea americana*. *Acta Oecologica*. 12: 529-541.
- LARCHER, W. (1994). *Ökophysiologie der Pflanzen*. 5^a Edition. Ulmer. Stuttgart.
- LICHTENTHALER, H.K. (1988). In vivo chlorophyll fluorescence as a tool for stress detection in plants. En: *Applications of chlorophyll fluorescence*. H.K. Lichtenthaler, editor. Kluwer Academic Publishers. Pp: 129-142.
- LICHTENTHALER, H.K. (1993). The plant prenyllipids, including carotenoids, chlorophylls, and prenylquinones. En: *Lipid metabolism in plants* (editado por T.S. Moore). Pp: 427-470. CRC Press. Boca Ratón. Ann Arbor. Londres. Tokyo.
- OREN, R., K.S.WERK, N. BUCHMANN y R. ZIMMERMANN (1993). Chlorophyll-nutrient relationships identify nutritionally caused decline in *Picea abies* stands. *Canadian Journal of Forest Research*. 23: 1187-1195.
- POLLE, A. y H. RENNENBERG (1992). Field studies of Norway spruce trees at high altitudes: II. Defence systems against oxidative stress in needles. *New Phytologist*. 121: 635-642.
- SAARINEN, T. (1993). Chlorophyll fluorescence, and nitrogen and pigment content of Scots pine (*Pinus sylvestris*) needles in polluted urban habitats. *Ann. Bot. Fennici*. 30: 1-7.
- SCHMIEDEN, U. y A. WILD (1994). Changes in levels of α -tocoferol and ascorbate in spruce needles at three low mountain sites exposed to Mg^{2+} -deficiency and ozone. *Zeitschrift für Naturforschung*. 49c: 171-180.
- SCHWARZ, P. y A. POLLE (1998). Antioxidative systems, pigment and protein content in leaves of adult Mediterranean oak species (*Quercus pubescens* and *Quercus ilex*) with lifetime exposure to elevated CO_2 . *New Phytologist*. 140: 411-423.
- SIEFERMENN-HARMS, D. (1994). Light and temperature control of season-dependent changes in α - and β -carotene content of spruce needles. *Journal of Plant Physiology*. 143: 488-494.

- SMIRNOFF, N. (1993). The role of active oxygen in response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*. 125: 27-58.
- TAUSZ, M., M. MÜLLER, E. STABENTHEINER y D. GRILL (1994). Stress-physiological investigations and chromosomal analysis on Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) – a field study. *Phyton* (Austria). 34: 291-308.
- TAUSZ, M., D. GRILL y E. BERMADINGER-STABENTHEINER (1996a). Physiological responses of spruce trees to air pollutants – a tool for bioindication. Proceedings of the 16th International Meeting for Specialists in Air Pollution Effects on Forest Ecosystems. ‘Air Pollution & Multiple Stresses’. September 7-9, 1994. Fredericson. New Brunswick. Canada. Canadian Forest Service- Atlantic Centre (ISBN 0-662-24845-7). Pp: 167-173.
- TAUSZ, M., G. ZELLNIG, E. BERMADINGER-STABENTHEINER, D. GRILL, K. KATZENSTEINER y G. GLATZEL (1996b). Physiological, structural, and nutritional parameters of Norway spruce needles from different forest stands in Austria. *Canadian Journal of Forest Research*. 26: 1769-1780.
- TAUSZ, M., L.J. DE KOCK, I. STULEN y D. GRILL (1996c). Physiological responses of Norway spruce trees to elevated CO₂ and SO₂. *Journal of Plant Physiology*. 148: 362-367.
- WILDI, B. y C. LÜTZ (1996). Antioxidant composition of selected high alpine plant species from different altitudes. *Plant Cell and Environment*. 19: 138-146.
- ZELLNIG, G., M. GEILHOFER, H.W. PFEIFHOFER y D. GRILL (1989). Ultrastructure and pigment composition of chloroplasts of differently damaged green and yellowed needles of *Picea abies*. *Phyton* (Austria). 29 (2): 213-225.

5. INTERCAMBIO GASEOSO EN CONDICIONES NATURALES

“Los hechos son los puntos débiles de las teorías” Helmar Nahr.

5.1. INTRODUCCIÓN

El estudio del intercambio gaseoso de las plantas en condiciones naturales es un terreno esencial para conocer su respuesta real a los cambios en el ambiente en el que se desarrollan. La interpretación de las medidas realizadas en condiciones naturales es bastante compleja, debido a la gran variabilidad de factores y a posibles sinergismos entre éstos, pero actualmente este tipo de estudios adquiere aún mayor interés debido a los efectos del cambio climático global y a la alteración del entorno natural de los seres vivos.

Este tipo de estudios en árboles es más limitado, aunque una de las primeras revisiones acerca del intercambio gaseoso en plantas leñosas fue realizado por Larcher ya en 1969. En ella se incluyen las tasas de fotosíntesis máxima y respiración de oscuridad para numerosas especies. Posteriormente, Schulze (1982) y Jarvis y Sandford (1986) relacionaron la forma de crecimiento con la productividad de árboles que formaban parte de un bosque. Revisiones más recientes sobre la fotosíntesis en árboles se pueden encontrar en los trabajos de Ceulemans y Saugier (1991), Larcher (1992) y Jiménez (1996).

En árboles adultos, las medidas de intercambio gaseoso en condiciones naturales son, ya de por sí, escasas, pero tratándose de coníferas lo son aún más. Incluso en *Picea abies*, con diferencia la especie forestal de conífera más importante en cuanto a producción en los bosques europeos, se han hecho profundos estudios fisiológicos en plántulas y en condiciones más o menos

controladas, pero sólo unas pocas investigaciones ecofisiológicas en árboles adultos bajo condiciones de campo (Lu y col. 1995). Aun así, estos estudios han propiciado incluso la elaboración de algunos modelos para explicar la respuesta del intercambio gaseoso de esta especie a las condiciones de su hábitat (Falge y col. 1996; Tselniker y col. 1998).

También sobre *Pinus radiata*, el pino más ampliamente plantado en el mundo, se han hecho numerosos estudios de intercambio gaseoso en laboratorio (ej.: Squire y col. 1988; Sheriff y Rook 1990; Sheriff y Mattay 1995) y también en el campo (ej.: Attiwill y Cromer 1982; Thompson y Wheeler 1992), aunque siempre estudiando efectos o tratamientos particulares (Sheriff 1995).

A pesar de todo, en comparación con otras especies arbóreas la fisiología y la fotosíntesis del género *Pinus* han recibido considerable atención (Teskey y col. 1994). Sin embargo, aunque el intercambio de CO₂ es un proceso fisiológico clave responsable del crecimiento y la productividad vegetal, no todas las especies de pino han sido estudiadas en este contexto (Oleksyn y col. 1997). Este es también el caso del pino canario que, a pesar de haber sido estudiado desde diversos puntos de vista (ver el apartado de introducción y objetivos), aun no ha sido estudiado desde el punto de vista de su intercambio gaseoso.

Los trabajos más recientes relacionados con el intercambio gaseoso de diferentes especies de coníferas se ha dirigido en mayor medida al estudio de los parámetros relacionados con este fenómeno bajo las nuevas condiciones de cambio climático global como: elevado CO₂ (Ellsworth y col. 1995; Hogan y col. 1996; Kellomäki y Wang 1997a, b y c; Murthy y col. 1997; Teskey 1997; Tissue y col. 1997; Walcroft y col. 1997; Will y Teskey 1997; Kellomäki y Wang 1998; Roberntz y Stockfors 1998; Tjoelker y col. 1998; Ellsworth 1999; Gavazzi y col. 2000); alta temperatura (Teskey 1997; Tjoelker y col. 1998; Tjoelker 1997; Day 2000); condiciones de estrés hídrico (Eastman y Camm 1995; Stewart y Bernier 1995; Lu y col. 1995; Major y Johnsen 1995; Sellin 1996; Sellin 1997; Tan y Blake 1997; Zhang y col. 1997; Arneth y col. 1998; Lebourgeois y col. 1998; Kolb y Stone 2000) o contaminación ambiental, bien relacionada con el ozono (Kellomäki y Wang 1997b y c; Wieser 1997; Wieser y col. 1998; Kellomäki y Wang 1998; Kronfuss y col. 1998; Kume y col. 2000), con el SO₂ y el NO₂ (ej.:

Strand 1995; Kume y col. 2000), o con la lluvia ácida (ej.: Mena-Petite y col. 2000).

Asimismo, se han realizado otro tipo de estudios muy interesantes entre los cuales cabe destacar los de Martin y col. (1996) sobre la evapotranspiración en un bosque natural de *Abies amabilis*; Mohammed y col. (1998) sobre la competencia de especies herbáceas con los pinos en un bosque de *Pinus banksiana*; Kaipiainen y col. (1998) sobre el papel de xilema en el intercambio de CO₂ en *Pinus sylvertris*; sobre el efecto de las bajas temperaturas sobre la tasa fotosintética (Reich y col. 1996; Vogg y col. 1998; Lamontagne y col. 2000)...

También encontramos algunos trabajos recientes realizados mayoritariamente en condiciones naturales (Sheriff 1995; Lu y col. 1995; Luoma 1997; Radoglou y Teskey 1997; Schwarz y col. 1997; Sullivan y col. 1997; Porté y Loustau 1998; Schaberg y col. 1998; Hubbard y col. 1999; Schoettle y Smith 1999; Kolb y Stone 2000).

Teniendo en cuenta estos antecedentes se comprende que el estudio del intercambio gaseoso del pino canario es muy importante, no sólo por el hecho en sí de profundizar en el estudio holístico de esta especie endémica canaria, aportando datos de interés para su mejor gestión y conservación, sino también desde el punto de vista de las investigaciones mundiales, aportando información sobre el intercambio gaseoso de otra especie más de pino bajo las condiciones de su propio hábitat en el bosque.

Así, el objetivo principal de este capítulo es el análisis detallado del intercambio gaseoso en condiciones naturales de *Pinus canariensis* a lo largo del día, así como a lo largo de todo un curso anual, para determinar el potencial fotosintético, sus tasas transpiratorias y de conductancia estomática en diferentes épocas del año, dependiendo de la edad de las acículas y de su posición en el dosel vegetal. También, conocer las respuestas de estos parámetros a la luz, la temperatura, el déficit de presión de vapor, conociendo los óptimos ambientales para una fotosíntesis máxima.

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Las investigaciones se llevaron a cabo en la parcela experimental de pinar situada a 1650 metros s.n.m. en la vertiente Norte de la Isla de Tenerife en el Morro de Isarda, descrita con detalle en la sección de material y métodos generales (foto 5.1, en la página siguiente: Visión aérea de la parcela de estudio. La flecha localiza la zona exacta donde se encuentra la torre y la línea roja en la parte inferior representa la carretera dorsal que une La Laguna con Las Cañadas del Teide. Cortesía del Gobierno de Canarias. Grafcan).

358.400

358.600

358.800

3.141.900

3.141.900

3.141.700

3.141.700

3.141.500

3.141.500

3.141.300

3.141.300

358.400

358.600

358.800

MORRO DE ISARDA



Gobierno de Canarias

Información Técnica

Sistema de Referencia ITRF93
Elipsoide WGS84:
- semieje mayor: a = 6.378.137
- aplamiento: f = 298,257223563
Red geodésica REGCAN95
Sistema cartográfico de representación UTM
Huso 28

Escala 1 : 3.000

Fecha de Impresión: 22, febrero 2001

CEPLAM TF



GRAFCAN

5.2.1. Datos meteorológicos y de contenido hídrico del suelo

Las condiciones climáticas de cada día de medida se registraron gracias a la estación meteorológica instalada en la torre, en la parte superior del dosel vegetal (ver apartado de material y métodos generales) y, mediante estos datos, podemos hacernos una idea de las condiciones climáticas del periodo concreto en el que hemos hecho las medidas fisiológicas. Esta estación registró datos de temperatura, humedad relativa, velocidad y dirección del viento, precipitación y humedad del suelo (a 40 centímetros de profundidad).

Asimismo, se tomaron muestras de suelo cerca de la torre, en superficie y, aproximadamente, a 10 centímetros de profundidad, con el fin de conocer su contenido hídrico. Para ello, al finalizar cada día de medida, se recogieron las muestras de tierra y se depositaron en bolsas plásticas herméticamente cerradas para evitar la pérdida de agua y se transportaron al laboratorio donde se pesó su peso fresco. Posteriormente se introdujeron en la estufa a 100 °C durante varios días, hasta alcanzar un peso constante, y se pesaron de nuevo para obtener el valor del peso seco. El contenido hídrico del suelo se expresó en porcentaje de peso seco.

5.2.2. Medidas de intercambio gaseoso, fluorescencia de la clorofila, contenido hídrico y contenido en clorofila de las acículas

Los ciclos diarios de medida de intercambio gaseoso se realizaron con el analizador de gases por infrarrojo portátil (para una descripción detallada ver el capítulo de material y métodos generales), aproximadamente cada 15 días, durante el periodo entre enero de 1999 y marzo de 2000, a intervalos de una hora desde el amanecer hasta el anochecer. También cada día de medida se analizó la fluorescencia de la clorofila (por medio del fluorímetro portátil PEA, Hansatech, U.K.), el contenido hídrico relativo (mediante el método de pesada) y el contenido en clorofila de las acículas (después de una extracción con acetona al 80% se midió su absorbancia por medio de un espectrofotómetro (UV-160^a Shimadzu, Japón), calculándose luego su concentración según las ecuaciones de Arnon (1949)).

El estudio se realizó en las acículas jóvenes (que ya habían alcanzado su madurez, oscilando su edad entre 4 y 17 meses) y en acículas viejas (que tenían en cada momento exactamente un año más que las anteriores), en la parte superior de la torre, a unos 17 metros de altura (nivel superior), y en la plataforma inmediatamente inferior, a unos 15 metros de altura (nivel inferior), excepto para la fluorescencia, el contenido hídrico relativo y el contenido en clorofila de las acículas, que se determinaron sólo en acículas del nivel superior.

Se realizaron tres medidas en grupos de 10 acículas de las dos edades diferentes de tres pinos distintos a los que se tenía acceso desde la torre. Medidas preliminares del grosor de las acículas, realizadas mediante cortes transversales y análisis al microscopio óptico, arrojaron un valor aproximado de 1.2 mm por acículas. Debido a que el ancho de la cámara utilizada es de 25 mm se decidió introducir en la cámara un número de 10 acículas, que equivalen así a un área proyectada de 300 milímetros cuadrados (puesto que $1.2 * 10 * 25 = 300$), o lo que es lo mismo 3 centímetros cuadrados.

Se hicieron medidas similares en tres grupos de acículas de las dos edades consideradas (jóvenes y viejas). Para cada edad y nivel sobre la torre se midieron al menos tres réplicas. Debido a que la altura de la torre no permitía el acceso a la parte más alta de la copa de los pinos y a que, por lo tanto, la luz a lo largo del día varió dependiendo de la posición del sol, en la representación gráfica de los cursos diarios se muestran sólo los datos correspondientes a las acículas que recibían luz solar directa. El número de datos incluidos en cada valor medio fue, como mínimo tres (cuando sólo un pino recibía luz solar directa) y como máximo nueve (cuando los tres pinos cumplían esta condición).

Para el análisis global de los datos de intercambio gaseoso se incluyeron todos los datos obtenidos durante todos los días de medida en condiciones naturales. A partir de aquí, y mediante el trazado de la "línea envolvente" se obtuvieron las primeras aproximaciones de los rangos óptimos para los diferentes parámetros respecto a los factores ambientales y fisiológicos de las propias acículas. Este tipo de resultados son muy comunes en medidas hechas en el campo y han sido evaluados de esta manera por otros autores como Masarovicová y Elias (1986), Cheeseman y col. (1991), Larcher (1995) y Cheeseman y Lexa (1996).

El ajuste de la relación, en condiciones óptimas, entre la fotosíntesis neta y la densidad de flujo fotónico, se realizó mediante el programa "Photosyn Assistant": Windows software for analysis of photosynthesis. Versión 1.1. (desarrollado por Richard Parson y Simon A. Ogston. Dundee. Escocia. U.K.) (figura 5.1).

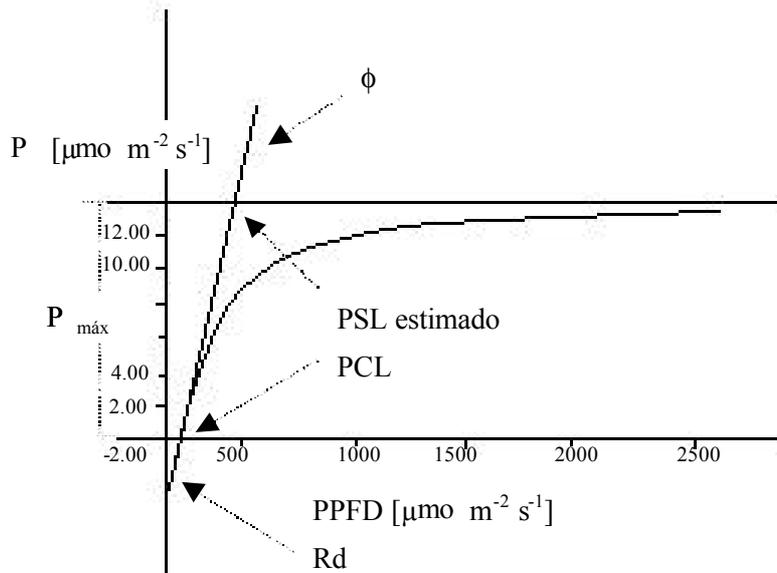


Figura 5.1. Curva de respuesta de la fotosíntesis neta a la luz con los parámetros calculados gracias al programa de ajuste. ϕ = Rendimiento cuántico aparente; PSL estimado = Punto de saturación luminoso estimado; PCL = Punto de compensación luminoso; Pn = Fotosíntesis neta; PPFD = Densidad de flujo fotónico fotosintético.

5.2.3. Análisis estadístico

Las pruebas de comparación de medias (ANOVA/MANOVA) entre los datos obtenidos para las concentraciones de clorofilas a lo largo del periodo de medida, las medidas de fluorescencia y de contenido hídrico relativo a lo largo del día, las medidas de F_v/F_m antes del amanecer a lo largo del año y los diferentes parámetros medidos con el analizador de gases por infrarrojo, se realizaron mediante el programa estadístico SPSS 10.0.6 Inc., 1999. Las comparaciones post-hoc para efectos significativos ($P < 0.05$) se realizaron mediante un test de Tukey.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Climatología del período de estudio

Las características climáticas generales del periodo de estudio (desde febrero de 1999 a marzo de 2000) se resumen en la figura 5.2.

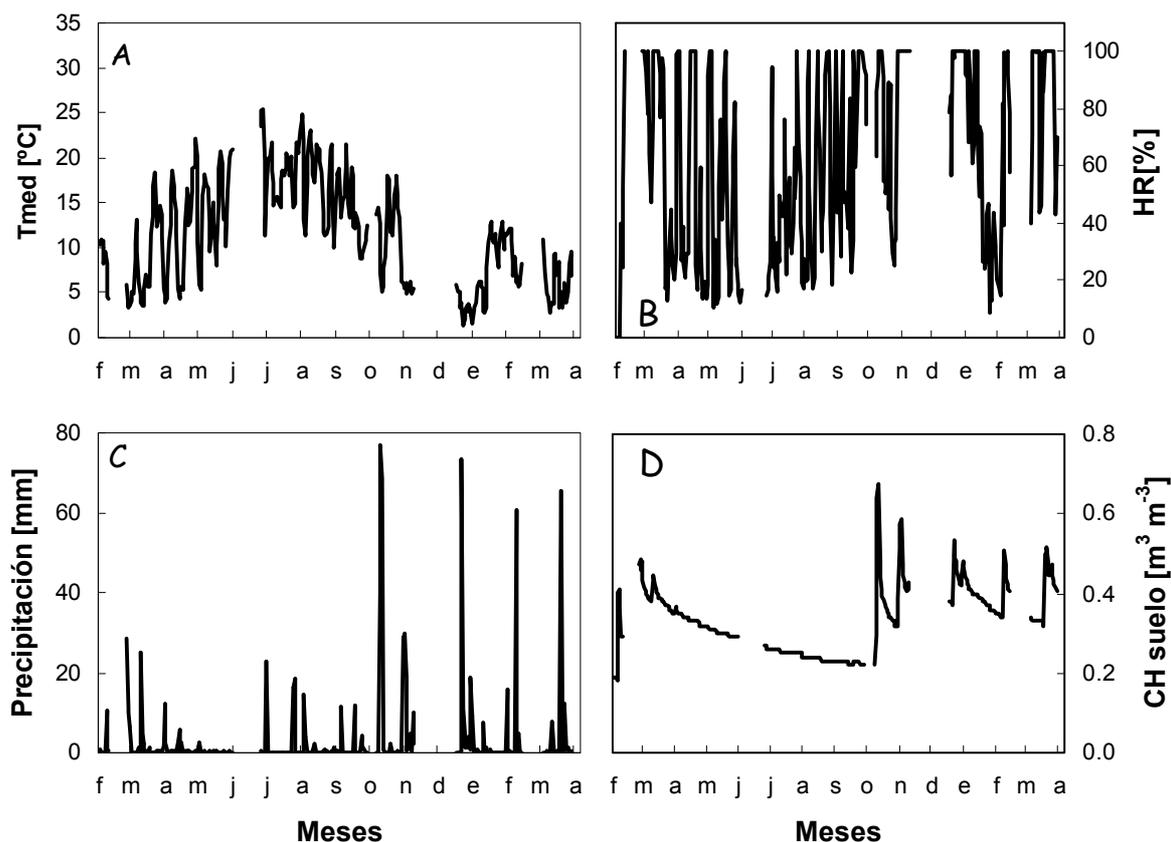


Figura 5.2. Datos climáticos medidos con la estación meteorológica colocada en la torre del sitio de estudio. A) Temperatura media diaria. B) Humedad relativa media diaria. C) Precipitación diaria a lo largo del periodo de estudio. D) Media diaria del contenido hídrico del suelo a 40 centímetros.

La temperatura media del periodo de medida fue de 11.73 °C, siendo la media más alta de unos 25 °C en Julio de 1999 y la más baja de unos 2 °C en diciembre de 1999 (figura 5.2 A). Alrededor del mediodía del día 12 de julio de 1999 se registró la temperatura absoluta más alta, que fue de 29.05 °C y la temperatura absoluta más baja del periodo de medida fue de 0.47 °C y se alcanzó en la madrugada del día 15 de enero de 2000. Se puede observar una clara

estacionalidad de los valores de temperatura media diaria, con una época más seca y cálida entre los meses de abril a septiembre, que denominaremos verano y una época más húmeda y fría entre los meses de octubre hasta marzo, que llamaremos invierno.

La humedad relativa osciló enormemente, dependiendo de las condiciones de los diferentes días, desde cerca del 10 hasta el 100% (figura 5.2 B).

Aunque debemos tener en cuenta que hubo días en los que no se registraron datos en la estación meteorológica, la precipitación registrada a lo largo del periodo de estudio fue de 930.4 mm. Se detectaron las mayores precipitaciones desde octubre de 1999 hasta enero de 2000, época en la que se registraron 569.2 mm, lo que supone el 61.17% de la precipitación total. El día de mayor precipitación fue el 25 de octubre de 1999 con un valor de 77 mm (figura 5.2 C).

El contenido hídrico del suelo fue especialmente alto los días de lluvia, disminuyendo progresivamente a partir de estos días hasta alcanzar de nuevo valores más bajos. Podemos ver que la humedad del suelo, a 40 centímetros de profundidad, va paralela a la precipitación en la mayor parte de los casos (figura 5.2 D), al igual que cuando se representa el contenido hídrico del suelo en la superficie y a 10 centímetros de profundidad en los diferentes días de

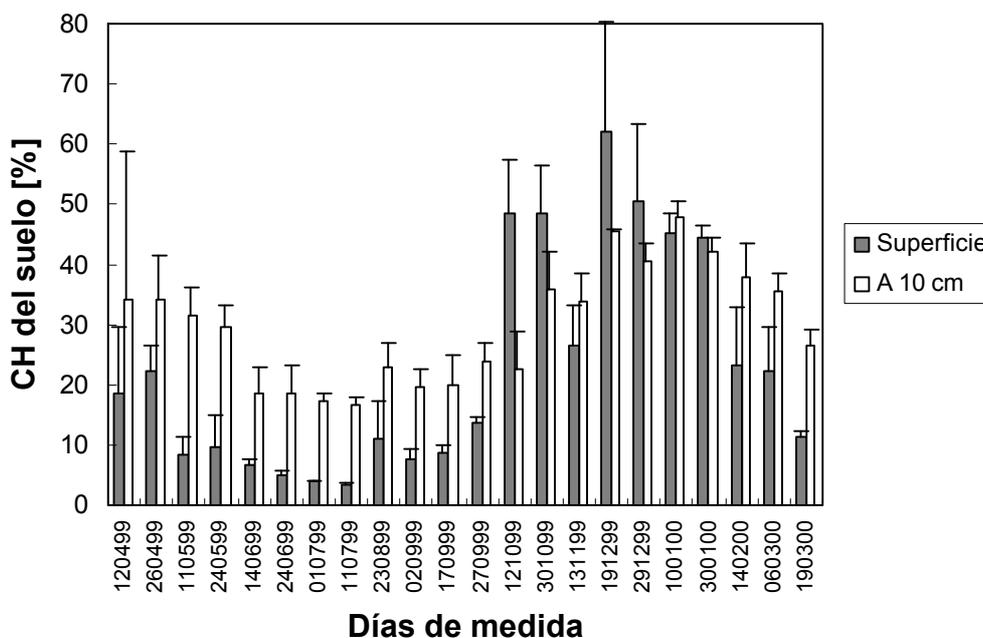


Figura 5.3. Contenido hídrico del suelo en % de peso seco, en superficie y a 10 centímetros de profundidad, a lo largo del curso anual de medida.

medida (figura 5.3), donde se observa como los valores más bajos de contenido hídrico del suelo se registran en los meses de junio, julio, agosto y septiembre de 1999 (a veces por debajo, incluso, del 5%), debido a la escasez de lluvias en esta época del año, a la bajada en los valores de humedad relativa del aire y al aumento de las temperaturas y de la radiación solar. Podemos ver como, generalmente, la capa más profunda de suelo presenta un contenido hídrico mayor que la capa superficial y que las diferencias a lo largo del año son mucho menos acusadas a mayor profundidad. Los datos puntuales en los que el contenido hídrico en la superficie del suelo es mayor que a 10 centímetros de profundidad se debe a precipitaciones recientes anteriores a los días concretos de medida, que aun no se habían infiltrado bien en el suelo. Los valores más altos de contenido hídrico del suelo se registraron en los meses de octubre de 1999 a febrero de 2000, periodo en el que se registraron también las mayores precipitaciones (ver figura 5.2 C).

En las figuras 5.4 A y B se presentan las condiciones meteorológicas registradas en la estación situada en la torre. La mayoría de los días de medida fueron días despejados con una alta luminosidad, incluso en invierno. Las temperaturas máximas no pasaron de 30 °C (máxima el día 11 de julio de 1999 con 28.75 °C) y los DPV de 35 mbar. Sin embargo, al encontrarse las acículas expuestas al sol, cuando éstas se midieron registraron temperaturas mucho más altas (próximas a los 40 °C) y el DPV registrado en la cámara también fue más alto alcanzando incluso los 72 mbar (figura 5.13).

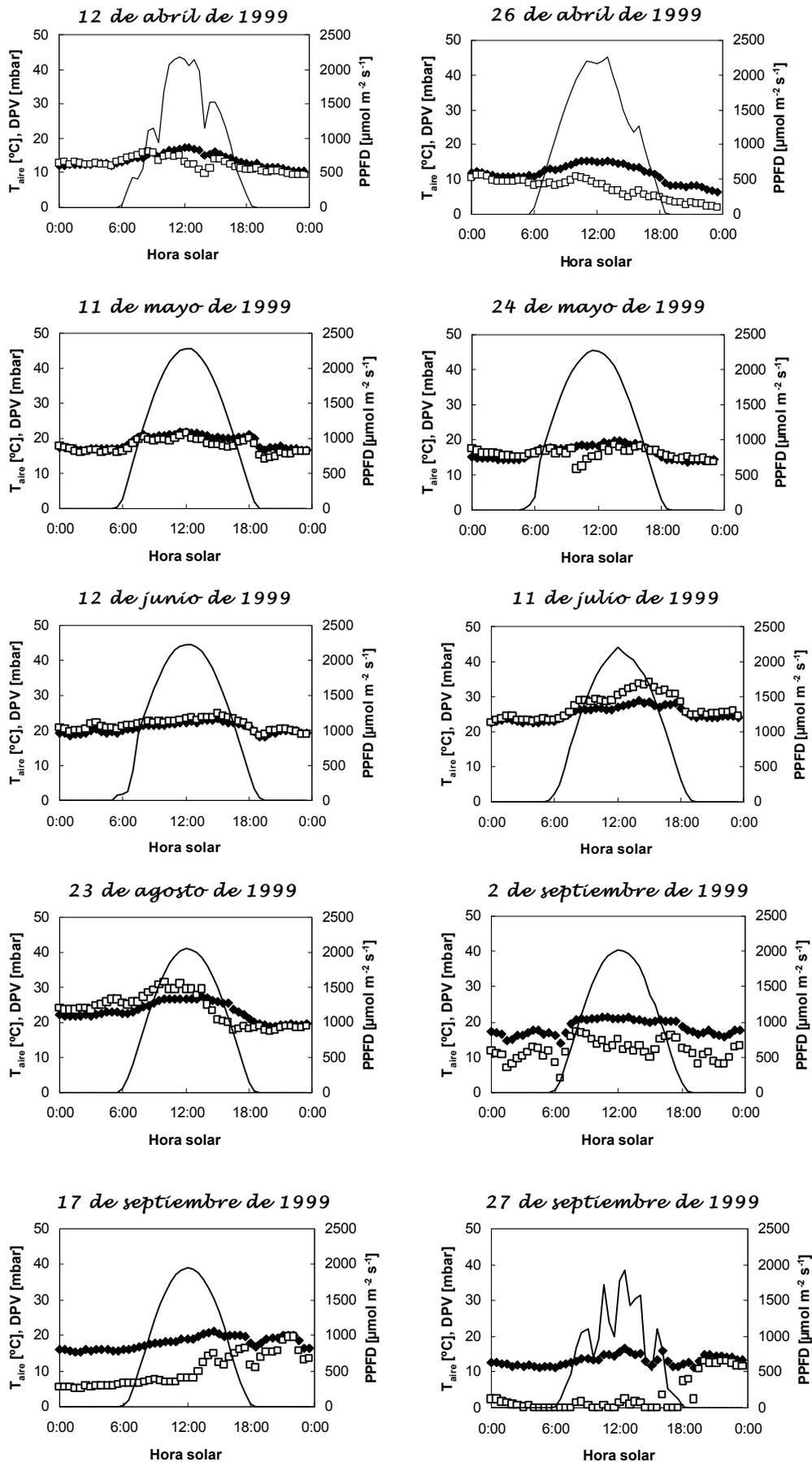


Figura 5.4. A. Datos climáticos recogidos en la estación meteorológica los días concretos de medida en el bosque en la época de verano. Faltan aquí algunos días debido a que no existen datos de la estación meteorológica de esos días. Símbolos: $T_{\text{acículas}} = \blacklozenge$; DPV = \square ; PPFD = $--$.

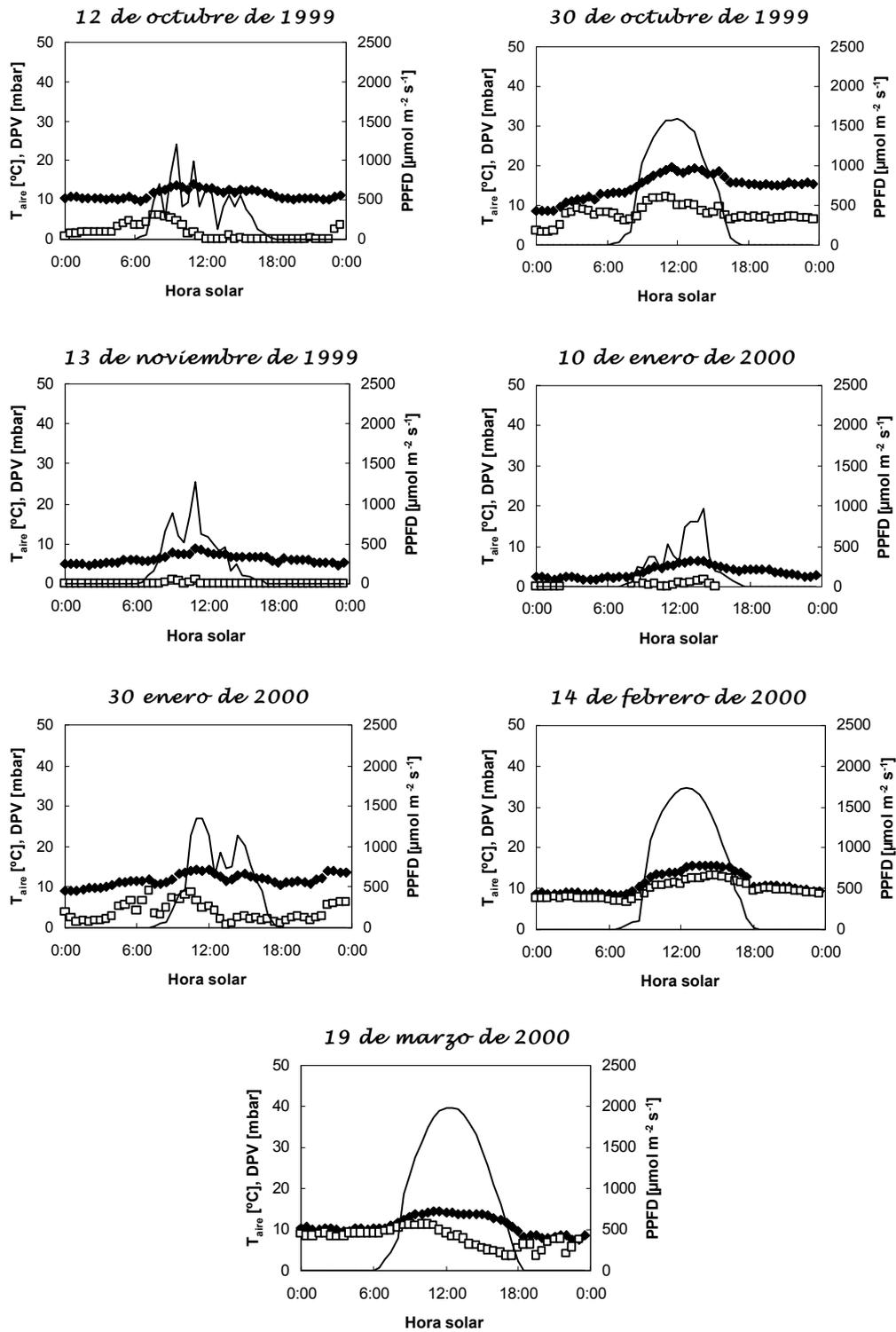


Figura 5.4. B. Datos climáticos recogidos en la estación meteorológica los días concretos de medida en el bosque en la época de invierno. Faltan aquí algunos días debido a que no existen datos de la estación meteorológica de esos días. Símbolos: $T_{\text{acículas}}$ = \blacklozenge ; DPV = \square ; PPFD = $--$.

5.3.2. *Cursos diarios*

En las figuras 5.5-29 se representan las tendencias de los diferentes parámetros de intercambio gaseoso a lo largo de los días de medida en acículas jóvenes y viejas en el nivel superior de la torre del pinar. Las tendencias de estos parámetros para el nivel inferior fueron similares, incluso algunas veces más confusos, enmascarados por el efecto del sombreado de las acículas del nivel superior. Debido a ello, se presentan únicamente los resultados correspondientes al nivel superior.

Se presentan algunas variables ambientales representativas (temperatura de las acículas: $T_{acícula}$, déficit de presión de vapor de agua en el aire dentro de la cámara de medida: DPV, y la densidad de flujo fotónico fotosintético incidente en las acículas: PPF), así como la tasa de fotosíntesis neta (P_n), transpiración (E), conductancia estomática (G_s), eficiencias en el uso del agua instantánea (P_n/E) e intrínseca (P_n/G_s) y la concentración de CO_2 en el mesófilo (C_i).

3 de enero de 1999

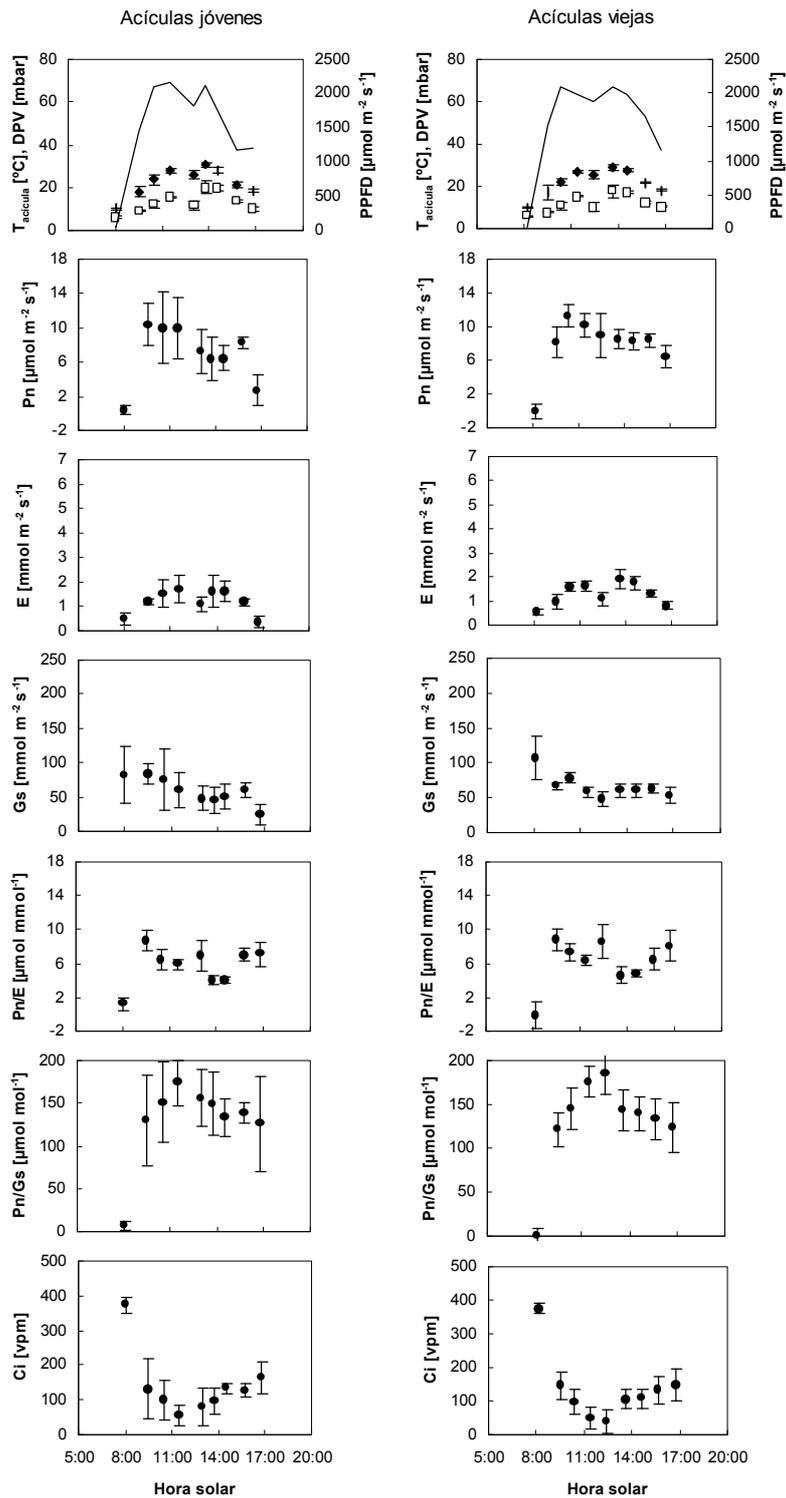


Figura 5.5. Curso diario de intercambio gaseoso del día 3 de enero de 1999. T_{acicula} = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético (---); P_n = fotosíntesis neta; E = transpiración; G_s = conductancia estomática; P_n/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; P_n/G_s = EUA intrínseca; C_i = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

2 de febrero de 1999

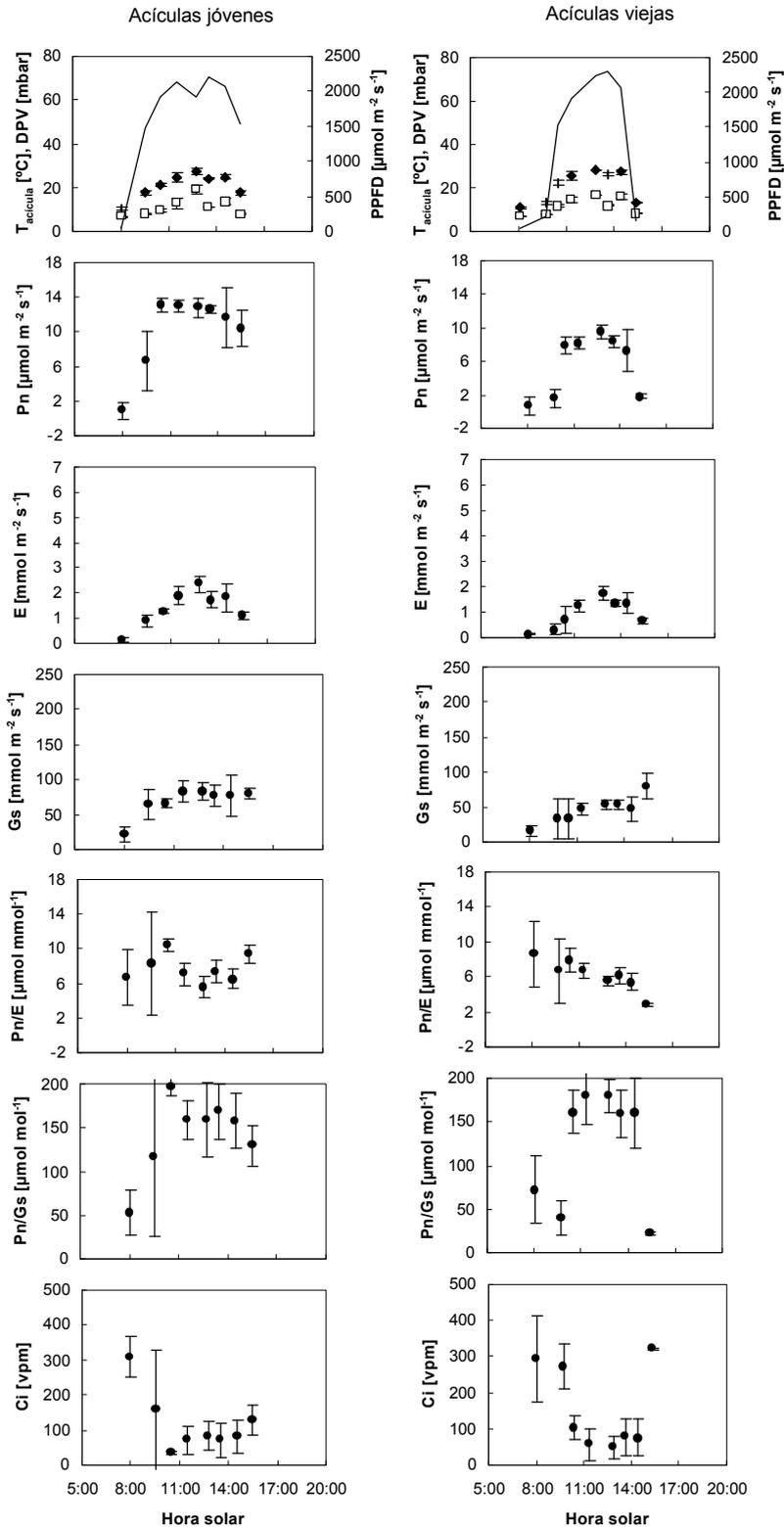


Figura 5.6. Curso diario de intercambio gaseoso del día 2 de febrero de 1999. T_{acicula} = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético ($-$); P_n = fotosíntesis neta; E = transpiración; G_s = conductancia estomática; P_n/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; P_n/G_s = EUA intrínseca; C_i = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

12 de abril de 1999

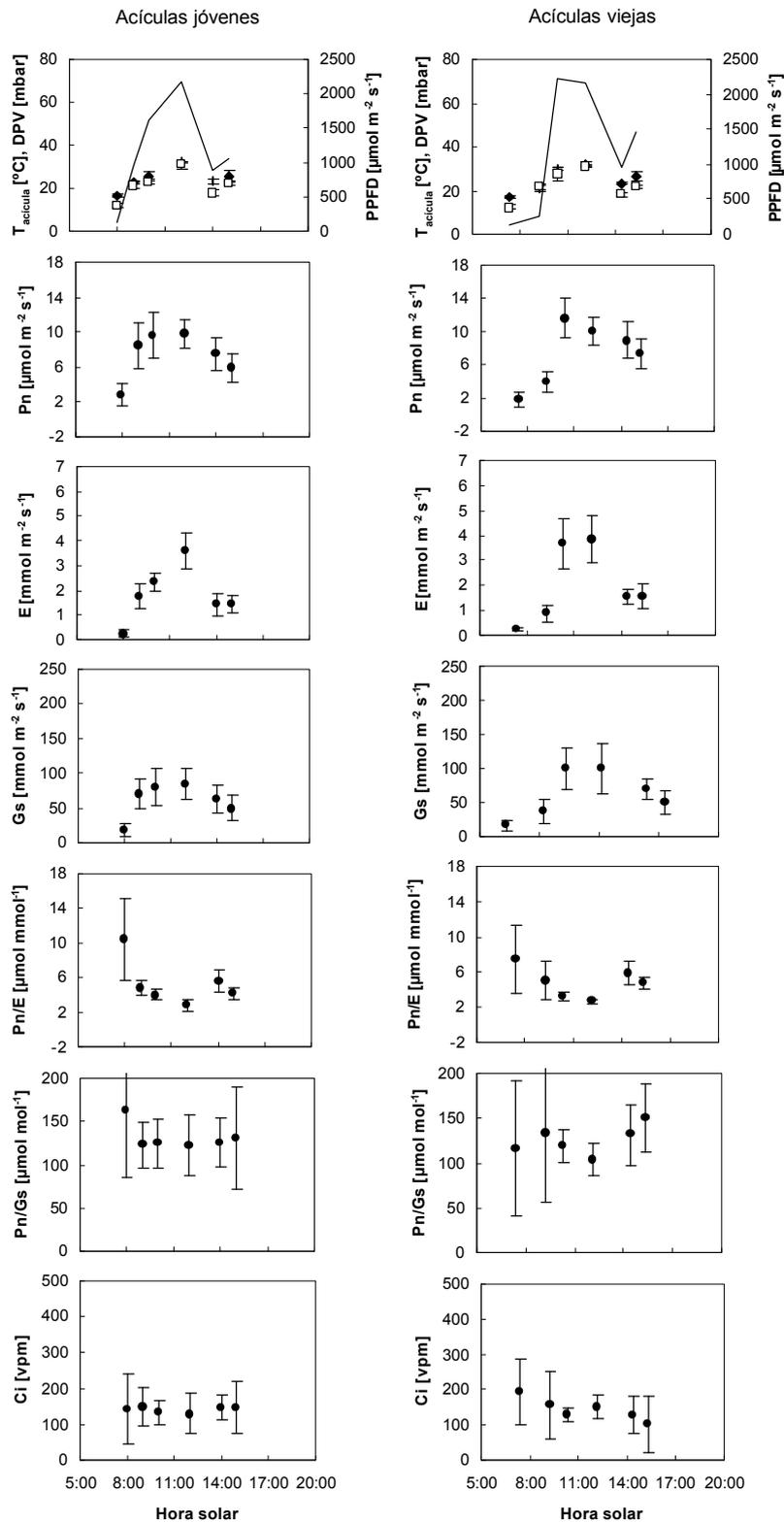


Figura 5.7. Curso diario de intercambio gaseoso del día 12 de abril de 1999. T_{acicula} = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPF = densidad de flujo fotónico fotosintético ($--$); Pn = fotosíntesis neta; E = transpiración; Gs = conductancia estomática; Pn/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; Pn/Gs = EUA intrínseca; Ci = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

26 de abril de 1999

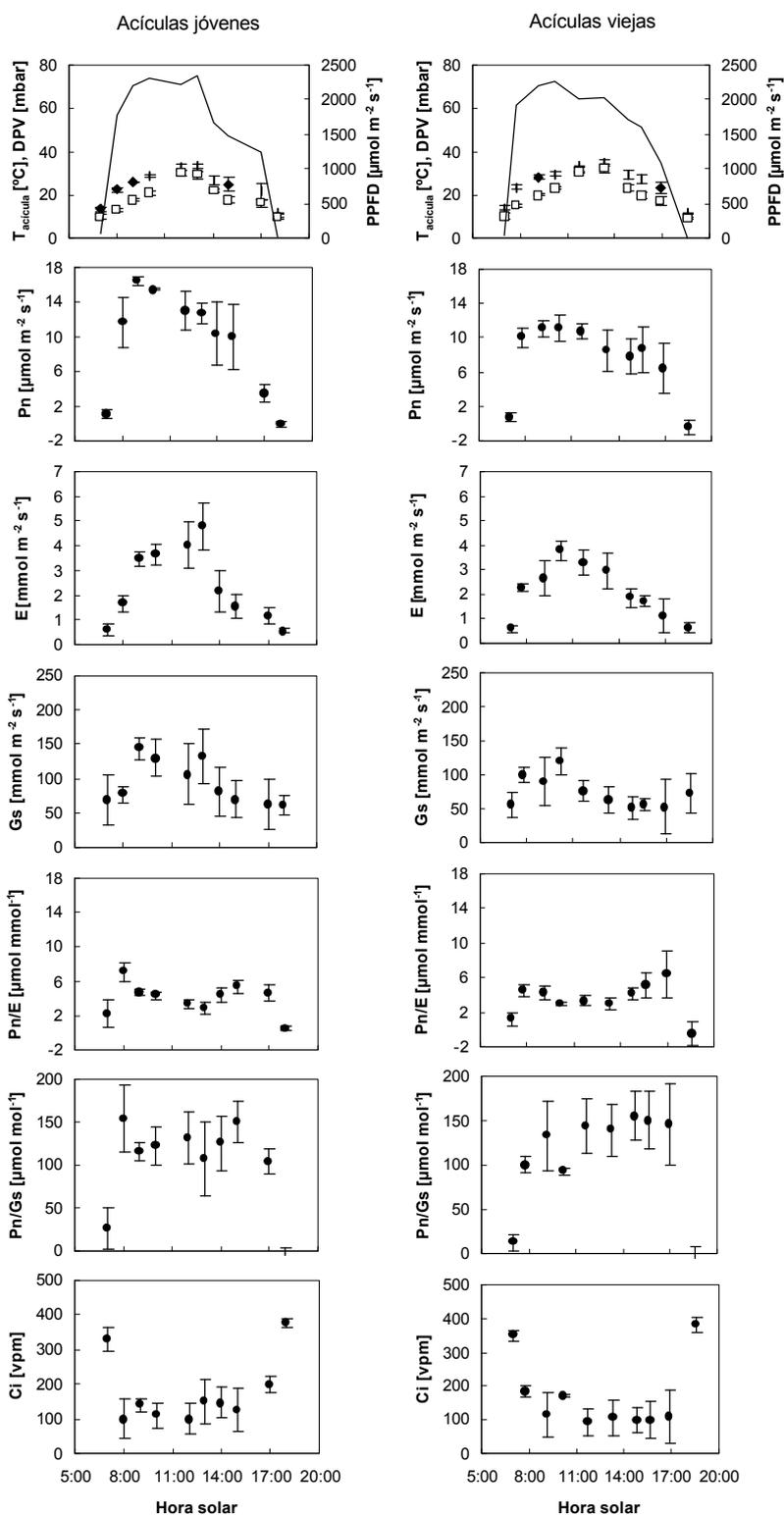


Figura 5.8. Curso diario de intercambio gaseoso del día 26 de abril de 1999. T_{acicula} = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético ($--$); Pn = fotosíntesis neta; E = transpiración; Gs = conductancia estomática; Pn/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; Pn/Gs = EUA intrínseca; Ci = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

11 de mayo de 1999

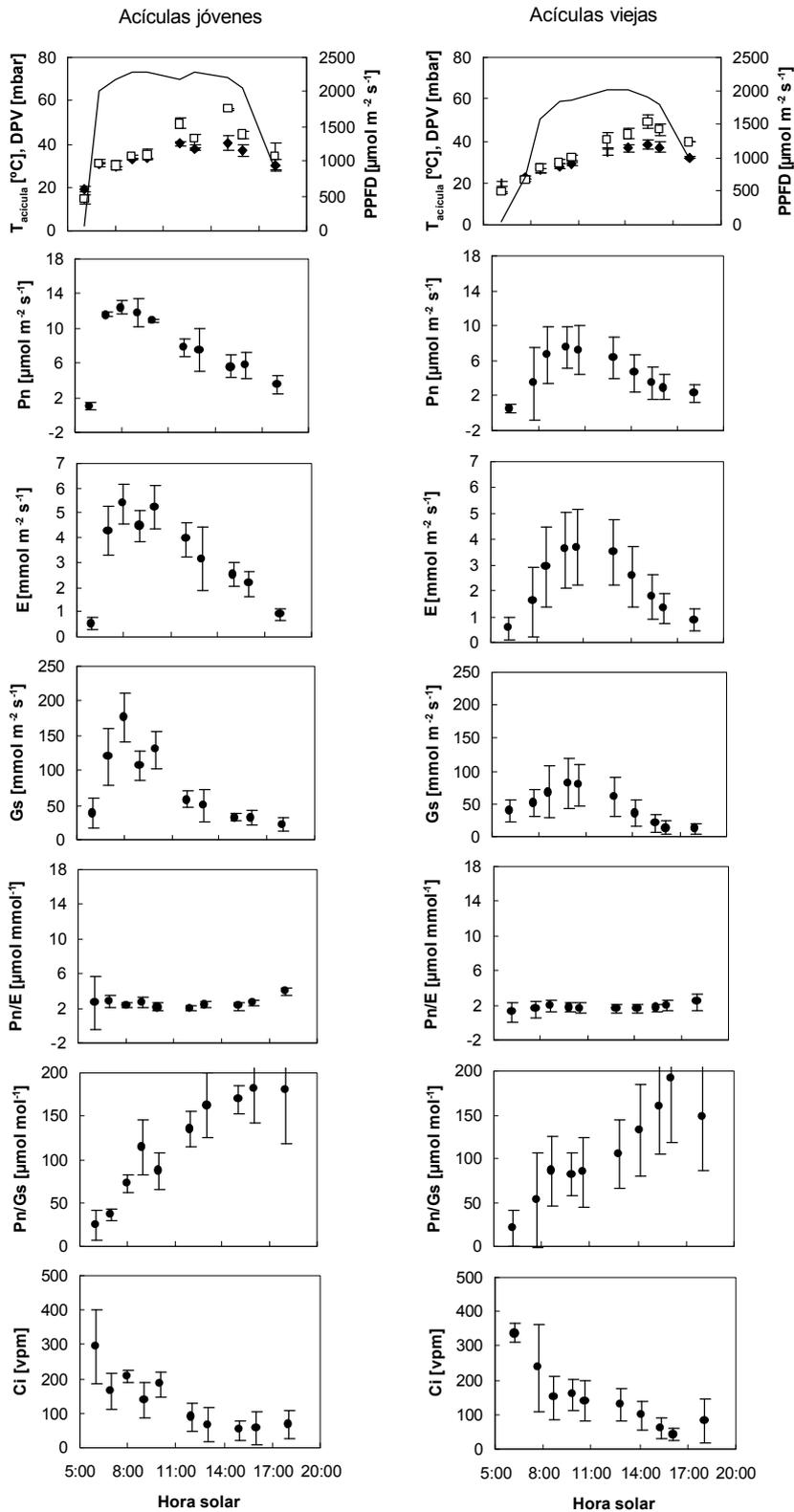


Figura 5.9. Curso diario de intercambio gaseoso del día 11 de mayo de 1999. $T_{\text{acícula}}$ = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético (---); Pn = fotosíntesis neta; E = transpiración; Gs = conductancia estomática; Pn/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; Pn/Gs = EUA intrínseca; Ci = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

24 de mayo de 1999

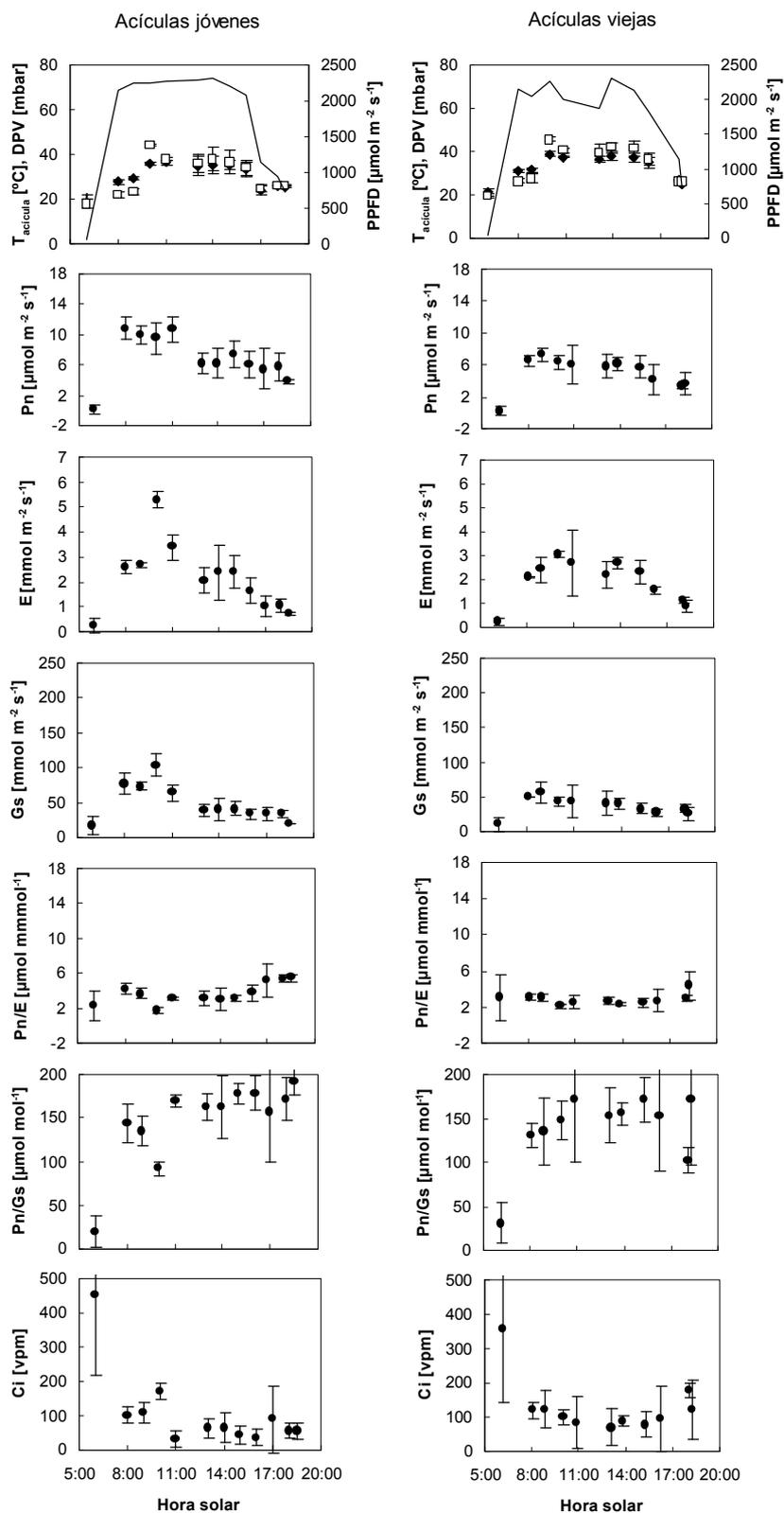


Figura 5.10. Curso diario de intercambio gaseoso del día 24 de mayo de 1999. T_{acicula} = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético (---); Pn = fotosíntesis neta; E = transpiración; Gs = conductancia estomática; Pn/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; Pn/Gs = EUA intrínseca; Ci = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

14 de junio de 1999

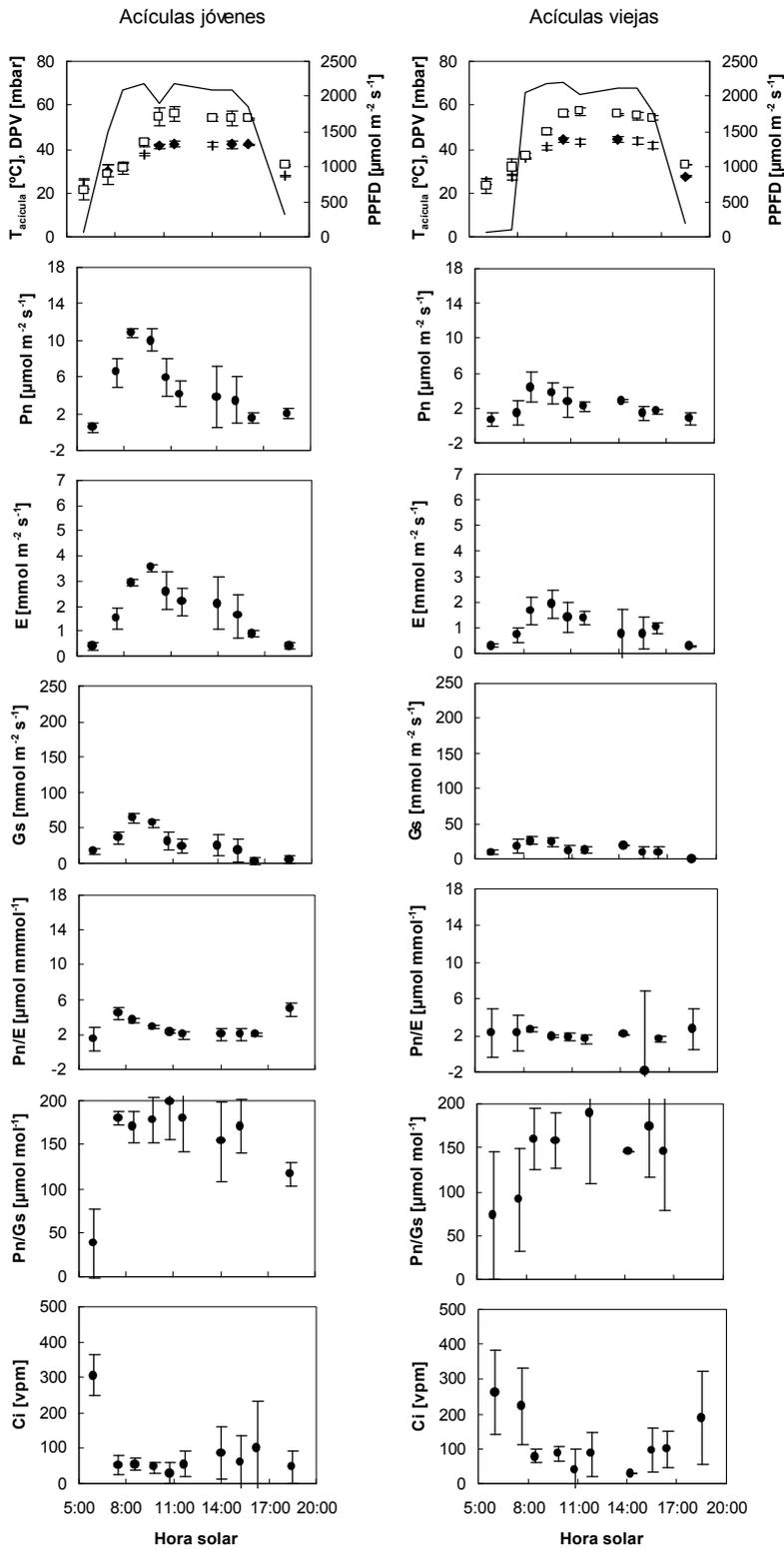


Figura 5.11. Curso diario de intercambio gaseoso del día 14 de junio de 1999. T_{acicula} = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético ($--$); Pn = fotosíntesis neta; E = transpiración; Gs = conductancia estomática; Pn/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; Pn/Gs = EUA intrínseca; Ci = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

24 de Junio de 1999

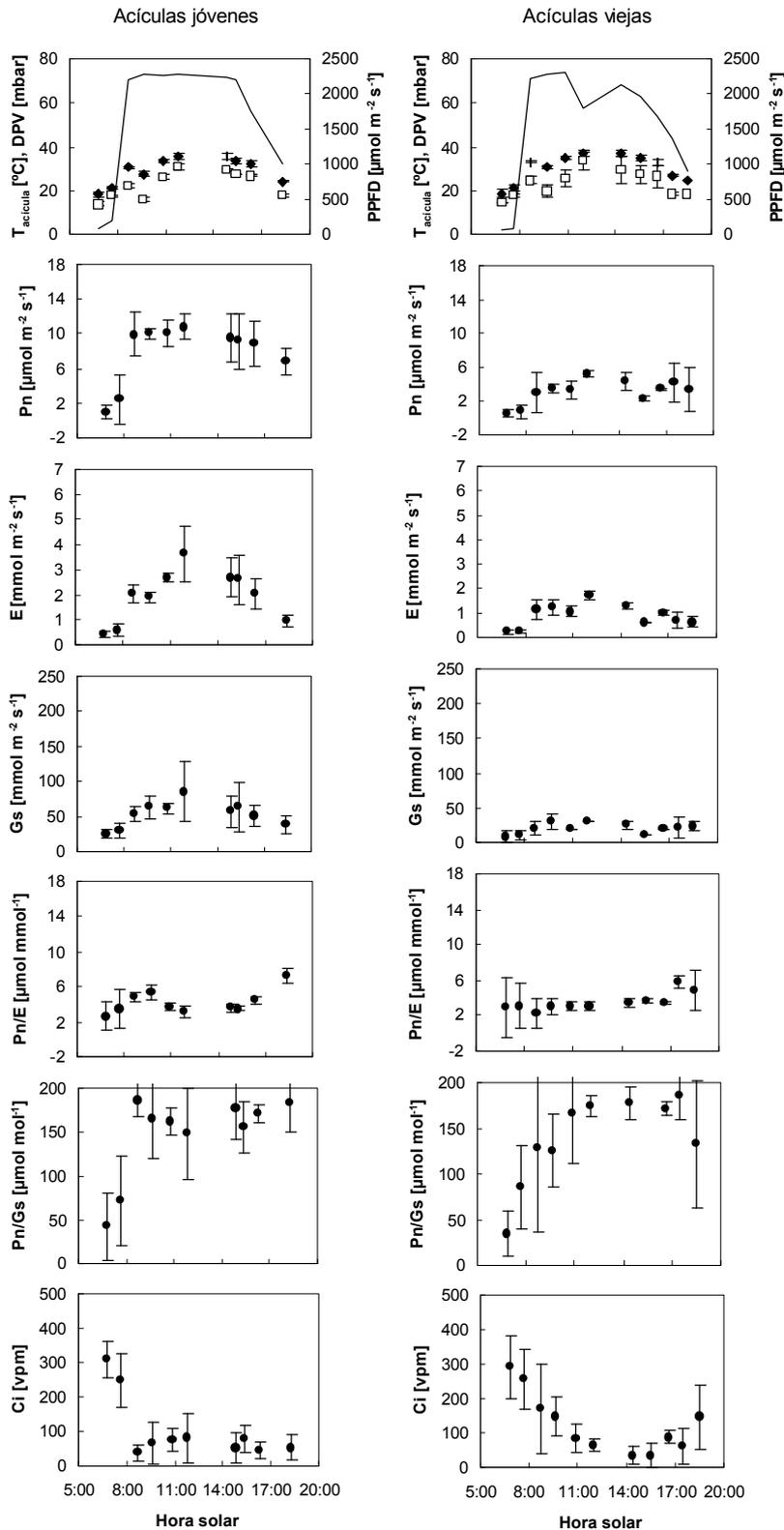


Figura 5.12. Curso diario de intercambio gaseoso del día 24 de junio de 1999. $T_{\text{acícula}}$ = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PFD = densidad de flujo fotónico fotosintético (---); Pn = fotosíntesis neta; E = transpiración; Gs = conductancia estomática; Pn/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; Pn/Gs = EUA intrínseca; Ci = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

1 de julio de 1999

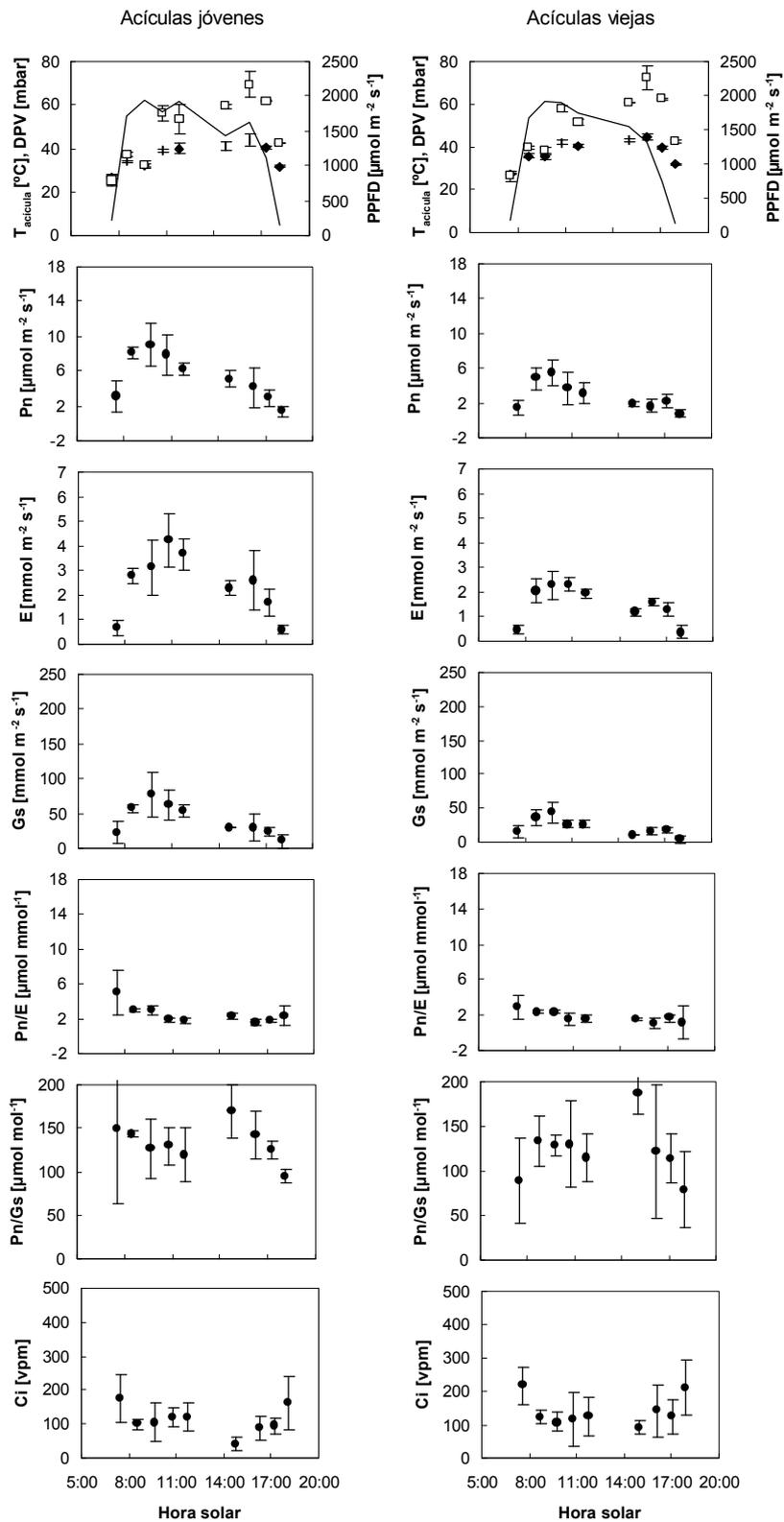


Figura 5.13. Curso diario de intercambio gaseoso del día 1 de julio de 1999. T_{acicula} = temperatura de las acículas (•); DPV = déficit de presión de vapor del aire (□); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético (---); P_n = fotosíntesis neta; E = transpiración; G_s = conductancia estomática; P_n/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; P_n/G_s = EUA intrínseca; C_i = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

11 de julio de 1999

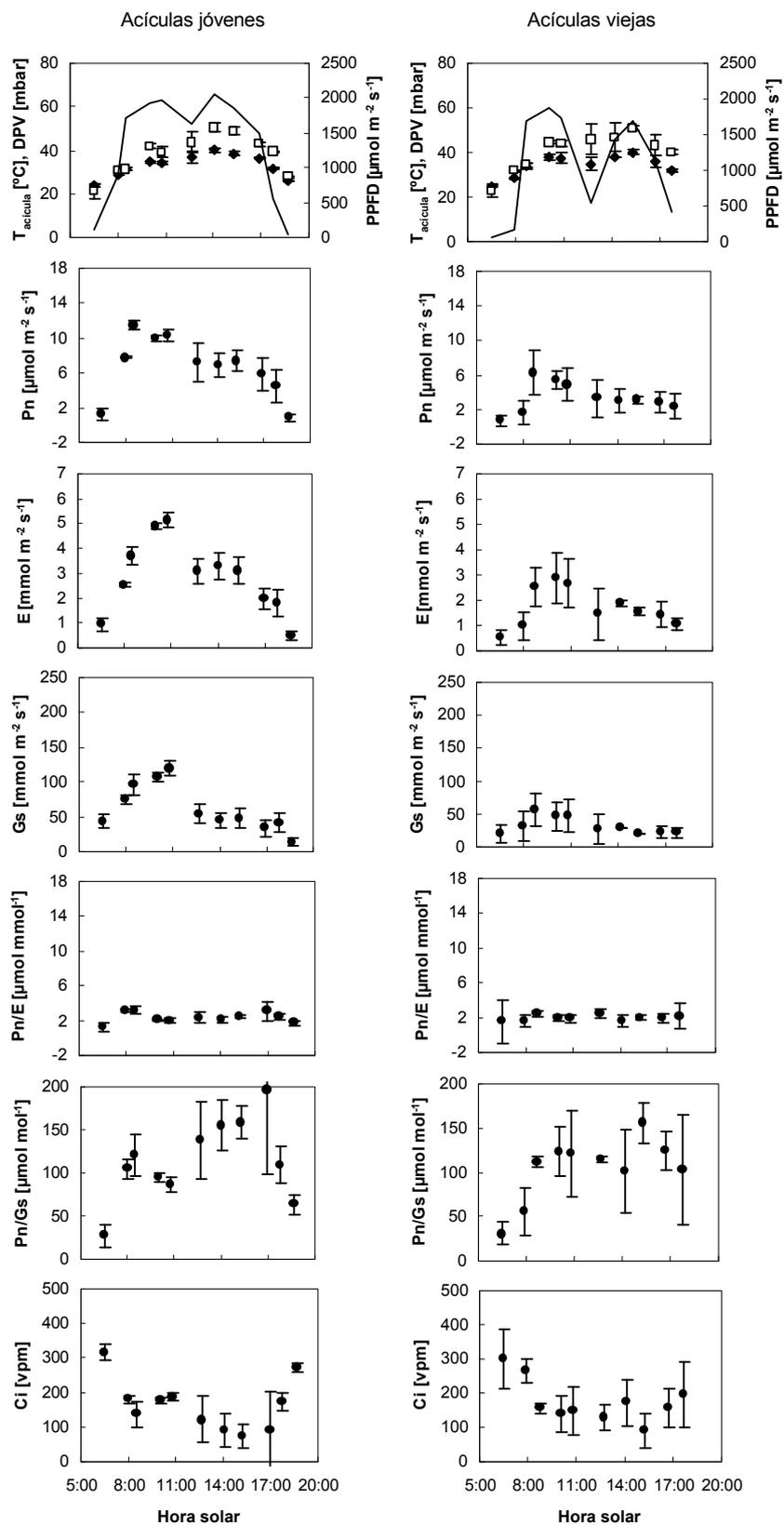


Figura 5.14. Curso diario de intercambio gaseoso del día 11 de julio de 1999. $T_{\text{acícula}}$ = temperatura de las acículas (•); DPV = déficit de presión de vapor del aire (□); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético (–); Pn = fotosíntesis neta; E = transpiración; Gs = conductancia estomática; Pn/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; Pn/Gs = EUA intrínseca; Ci = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

23 de agosto de 1999

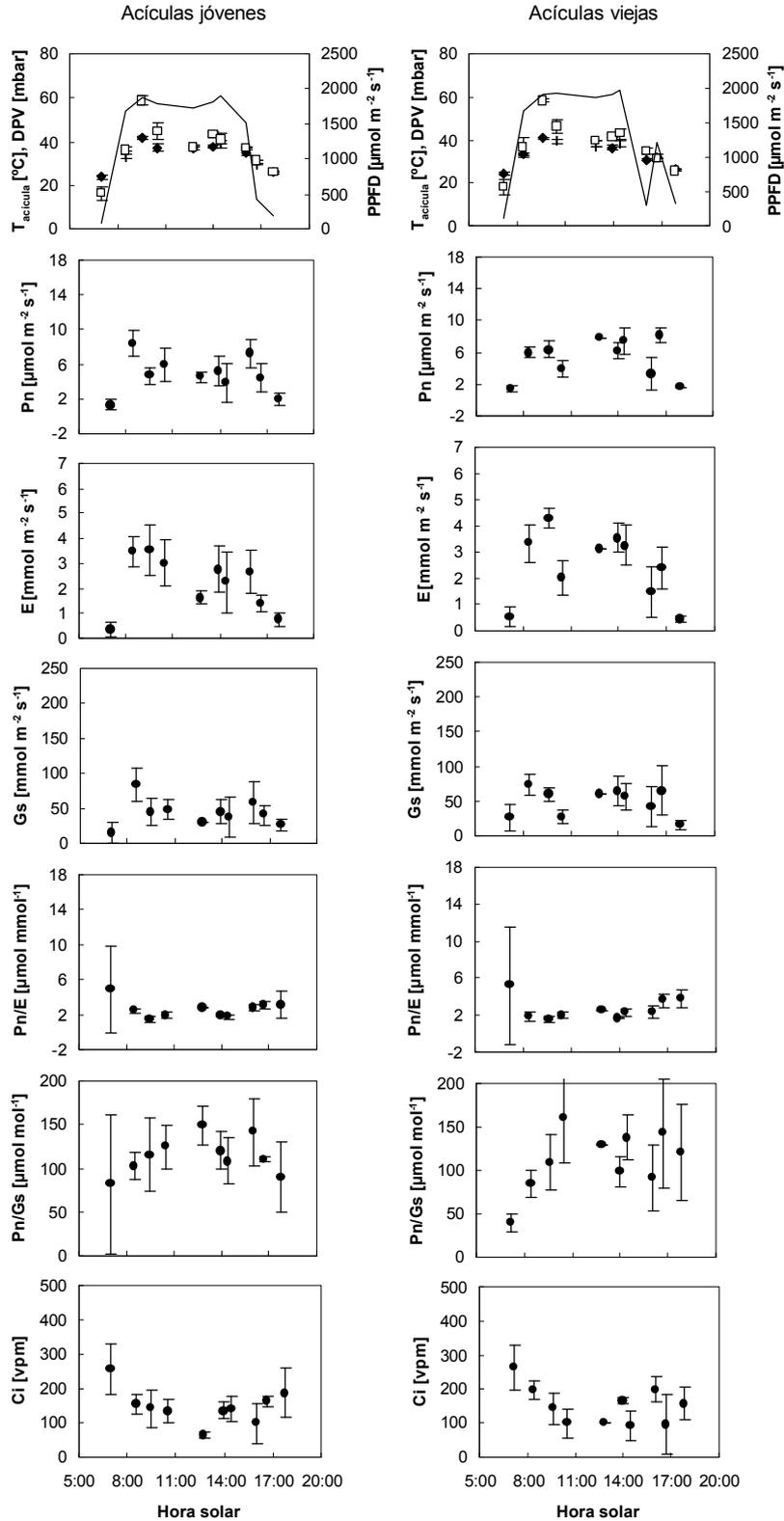


Figura 5.15. Curso diario de intercambio gaseoso del día 23 de agosto de 1999. T_{acicula} = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético (---); Pn = fotosíntesis neta; E = transpiración; Gs = conductancia estomática; Pn/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; Pn/Gs = EUA intrínseca; Ci = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

2 de septiembre de 1999

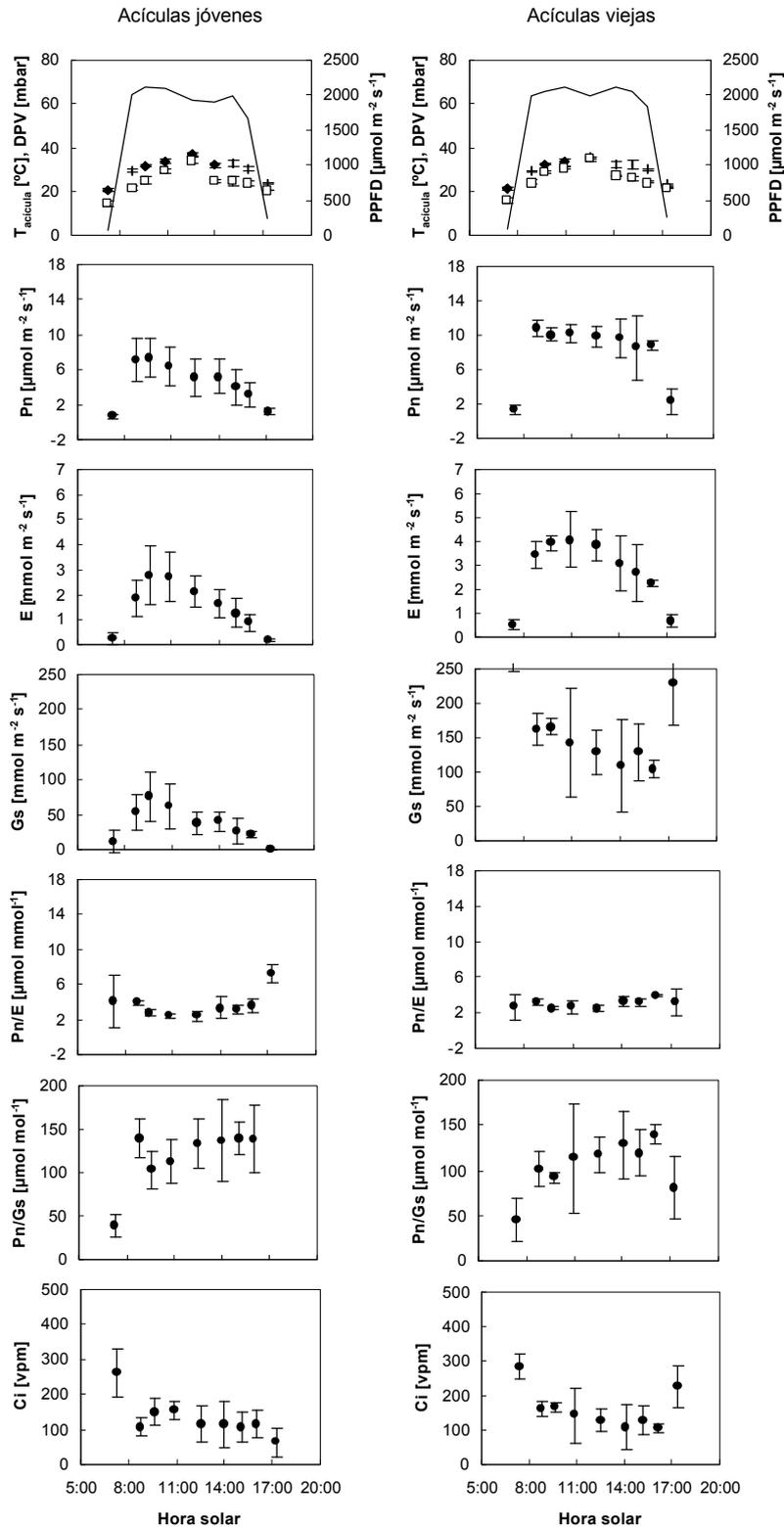


Figura 5.16. Curso diario de intercambio gaseoso del día 2 de septiembre de 1999. T_{acicula} = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPF = densidad de flujo fotónico fotosintético (---); Pn = fotosíntesis neta; E = transpiración; Gs = conductancia estomática; Pn/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; Pn/Gs = EUA intrínseca; Ci = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

17 de septiembre de 1999

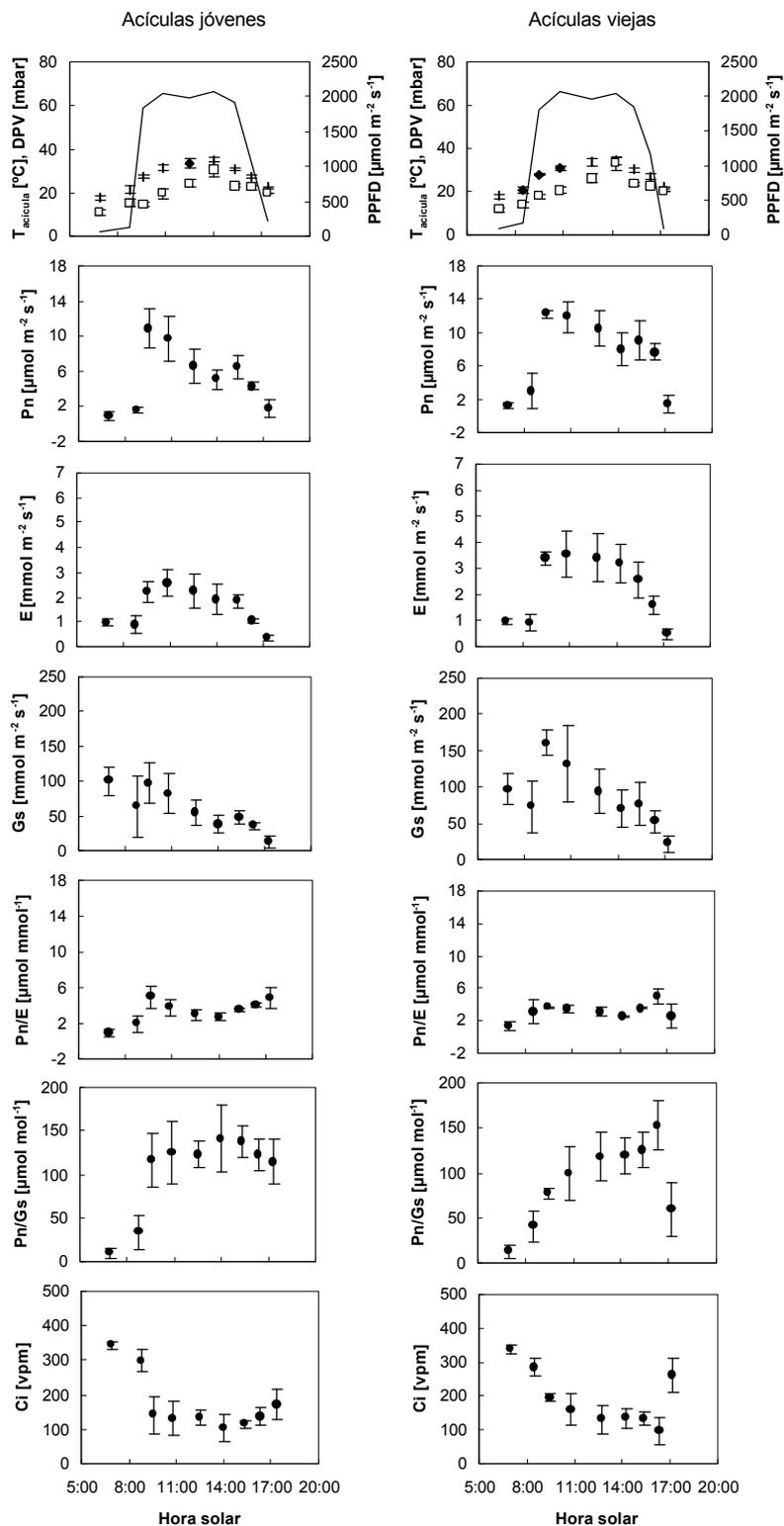


Figura 5.17. Curso diario de intercambio gaseoso del día 17 de septiembre de 1999. T_{acicula} = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético (---); Pn = fotosíntesis neta; E = transpiración; Gs = conductancia estomática; Pn/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; Pn/Gs = EUA intrínseca; Ci = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

27 de septiembre de 1999

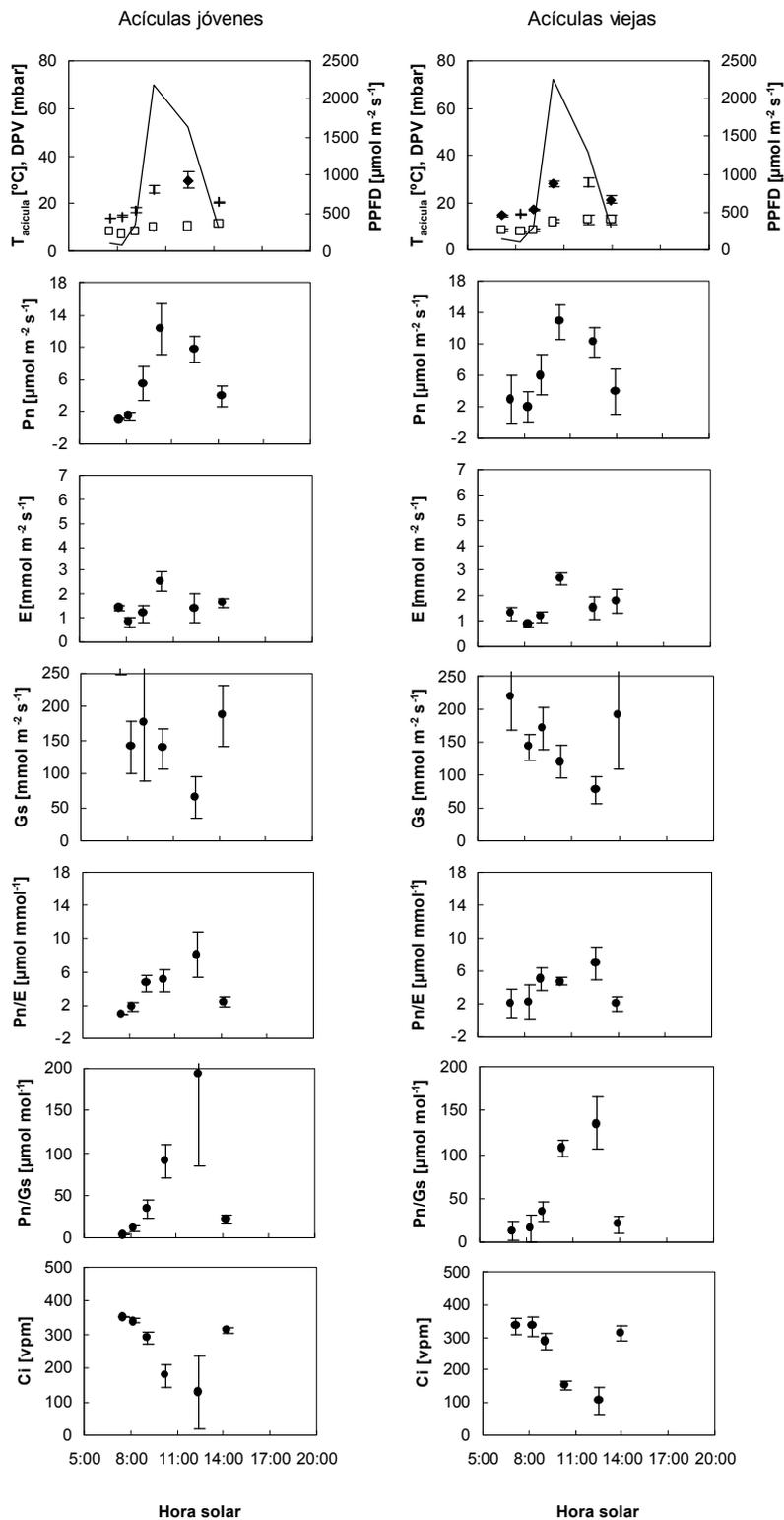


Figura 5.18. Curso diario de intercambio gaseoso del día 27 de septiembre de 1999. T_{acicula} = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético ($--$); Pn = fotosíntesis neta; E = transpiración; Gs = conductancia estomática; Pn/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; Pn/Gs = EUA intrínseca; Ci = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

12 de octubre de 1999

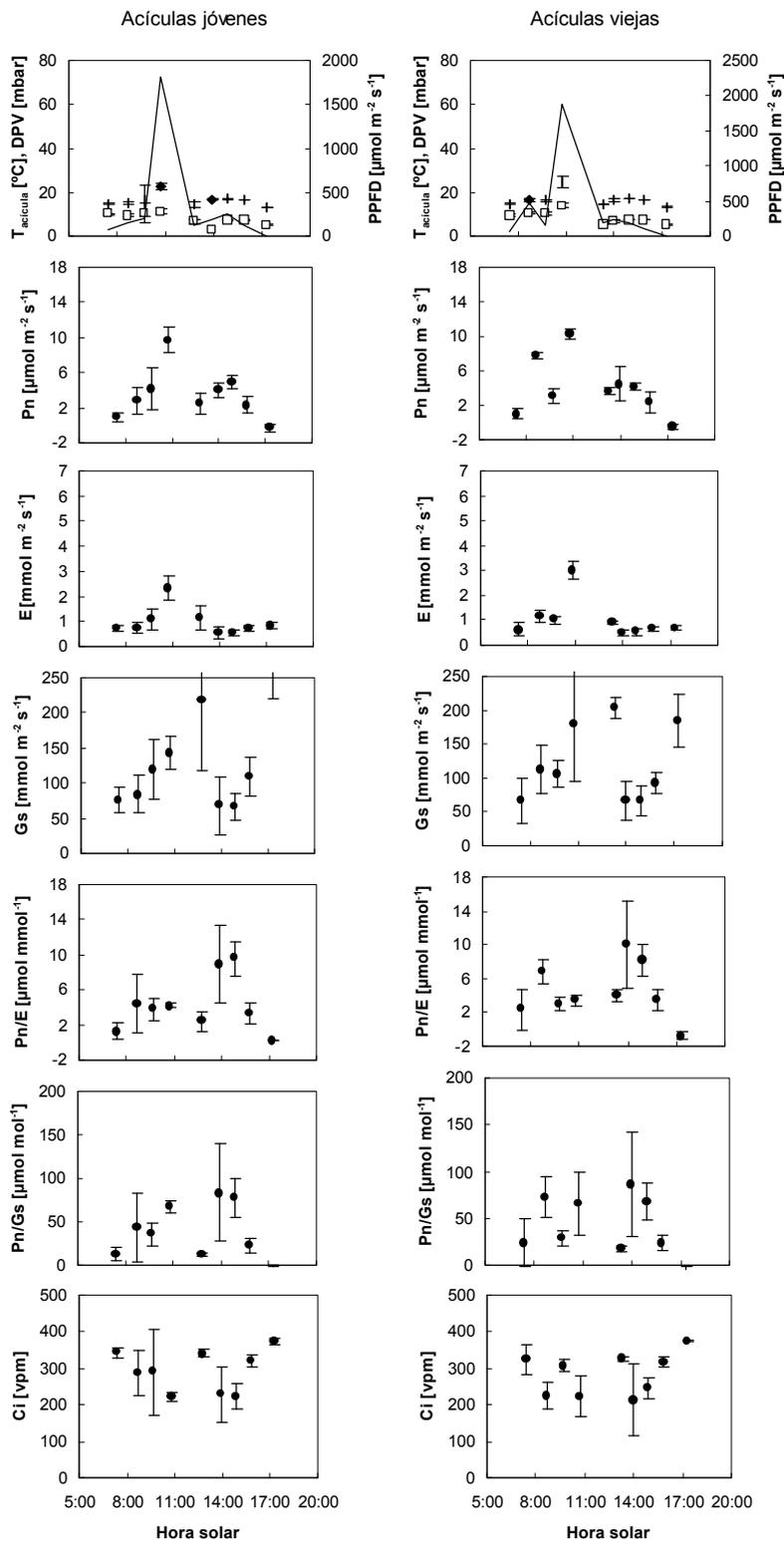


Figura 5.19. Curso diario de intercambio gaseoso del día 12 de octubre de 1999. T_{acicula} = temperatura de las acículas (•); DPV = déficit de presión de vapor aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético (---); P_n = fotosíntesis neta; E = transpiración; G_s = conductancia estomática; P_n/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; P_n/G_s = EUA intrínseca; C_i = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

30 de octubre de 1999

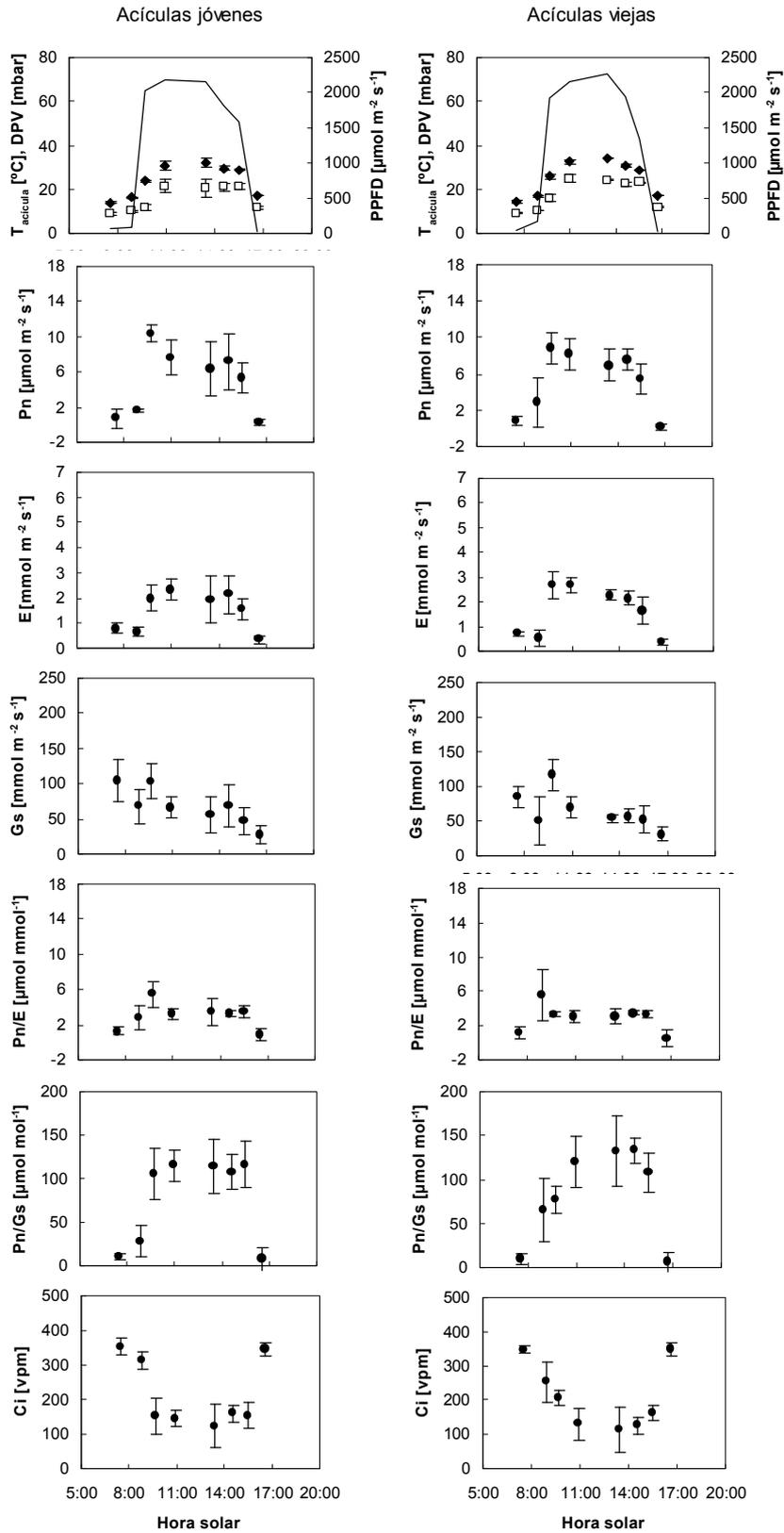


Figura 5.20. Curso diario de intercambio gaseoso del día 30 de octubre de 1999. T_{acicula} = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético ($-$); P_n = fotosíntesis neta; E = transpiración; G_s = conductancia estomática; P_n/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; P_n/G_s = EUA intrínseca; C_i = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

13 de noviembre de 1999

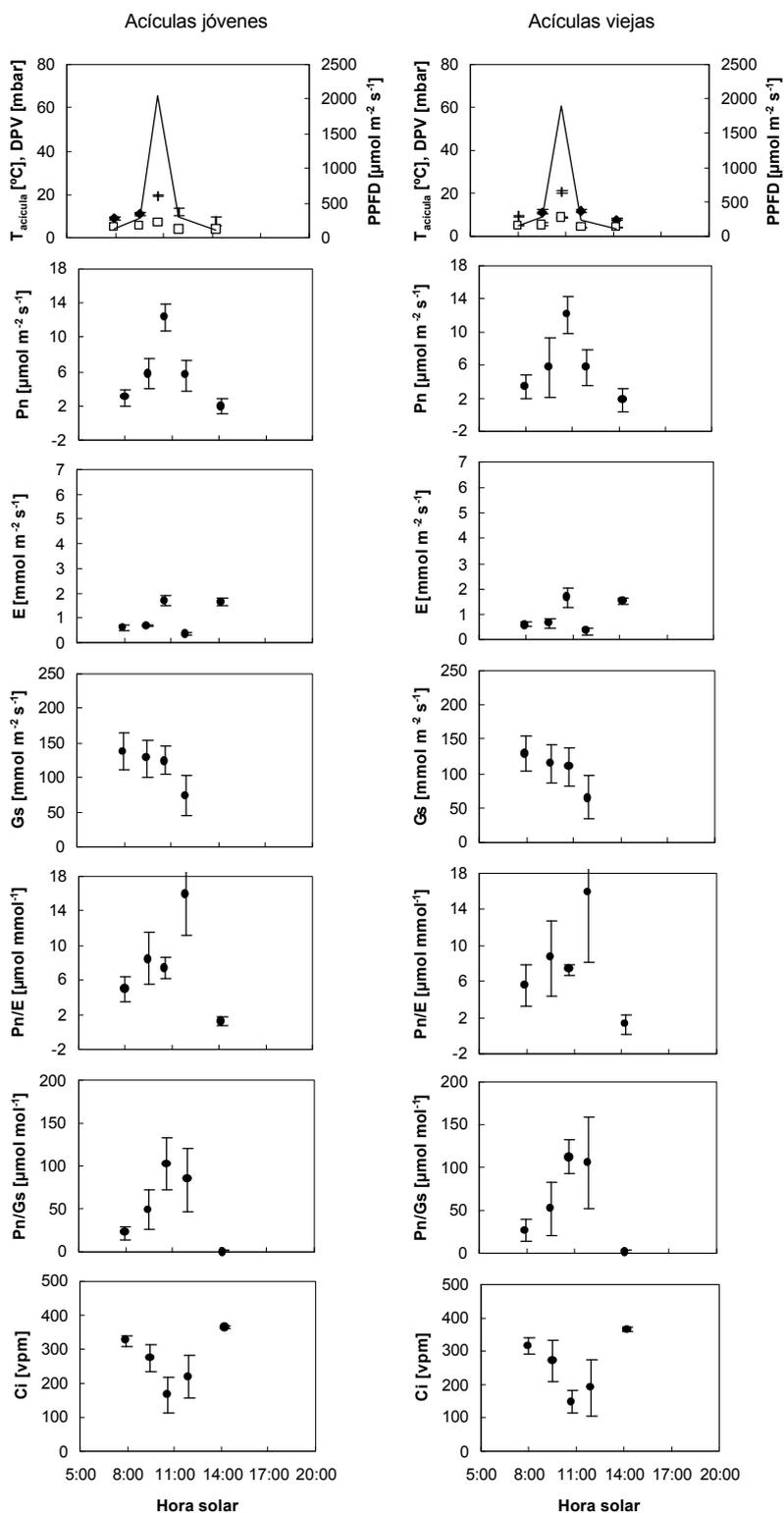


Figura 5.21. Curso diario de intercambio gaseoso del día 13 de noviembre de 1999. $T_{\text{acícula}}$ = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético (---); P_n = fotosíntesis neta; E = transpiración; G_s = conductancia estomática; P_n/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; P_n/G_s = EUA intrínseca; C_i = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

28 de noviembre de 1999

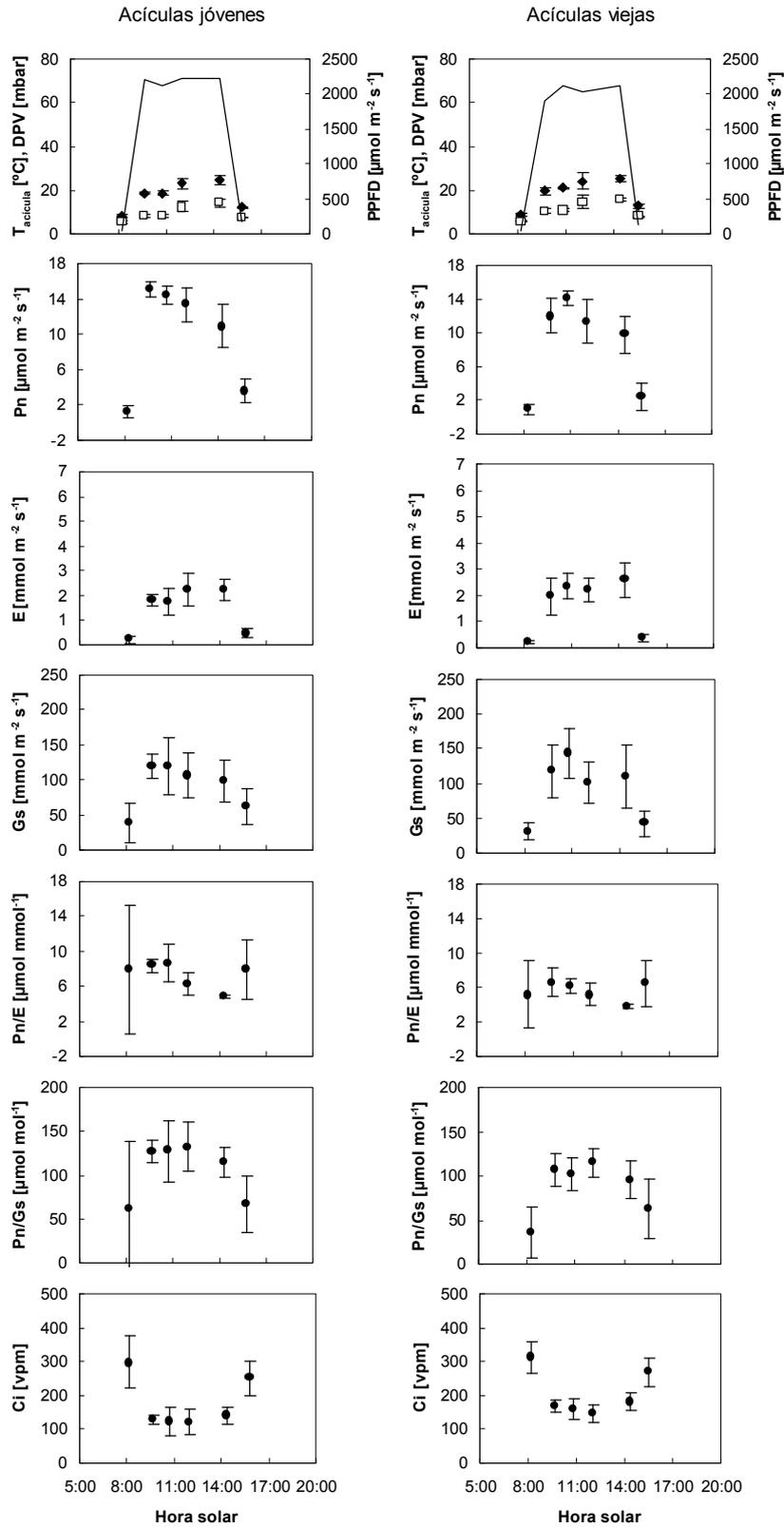


Figura 5.22. Curso diario de intercambio gaseoso del día 28 de noviembre de 1999. T_{acicula} = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético (---); Pn = fotosíntesis neta; E = transpiración; Gs = conductancia estomática; Pn/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; Pn/Gs = EUA intrínseca; Ci = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

19 de diciembre de 1999

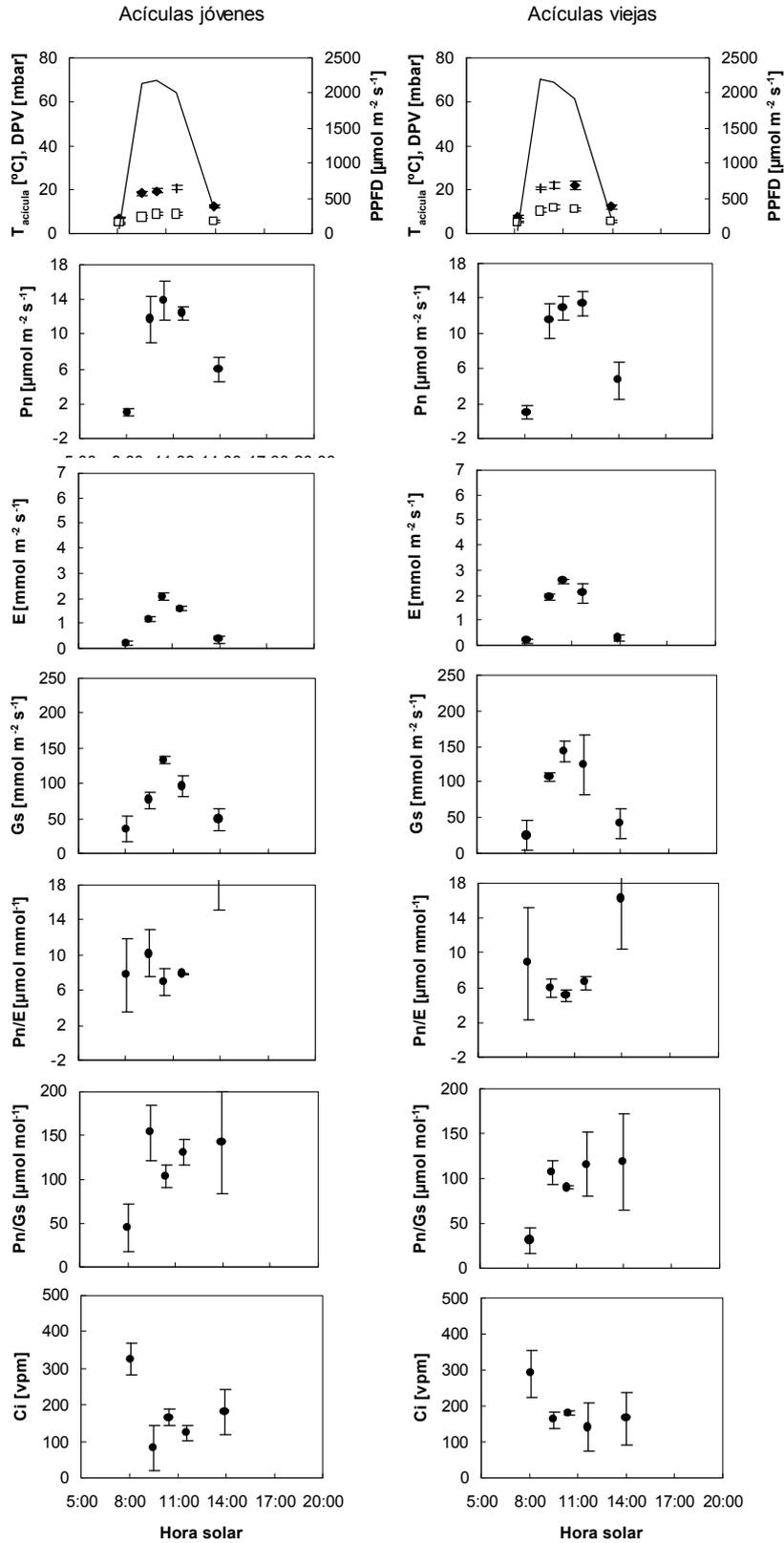


Figura 5.23. Curso diario de intercambio gaseoso del día 19 de diciembre de 1999. T_{acicula} = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético (---); P_n = fotosíntesis neta; E = transpiración; G_s = conductancia estomática; P_n/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; P_n/G_s = EUA intrínseca; C_i = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

29 de diciembre de 1999

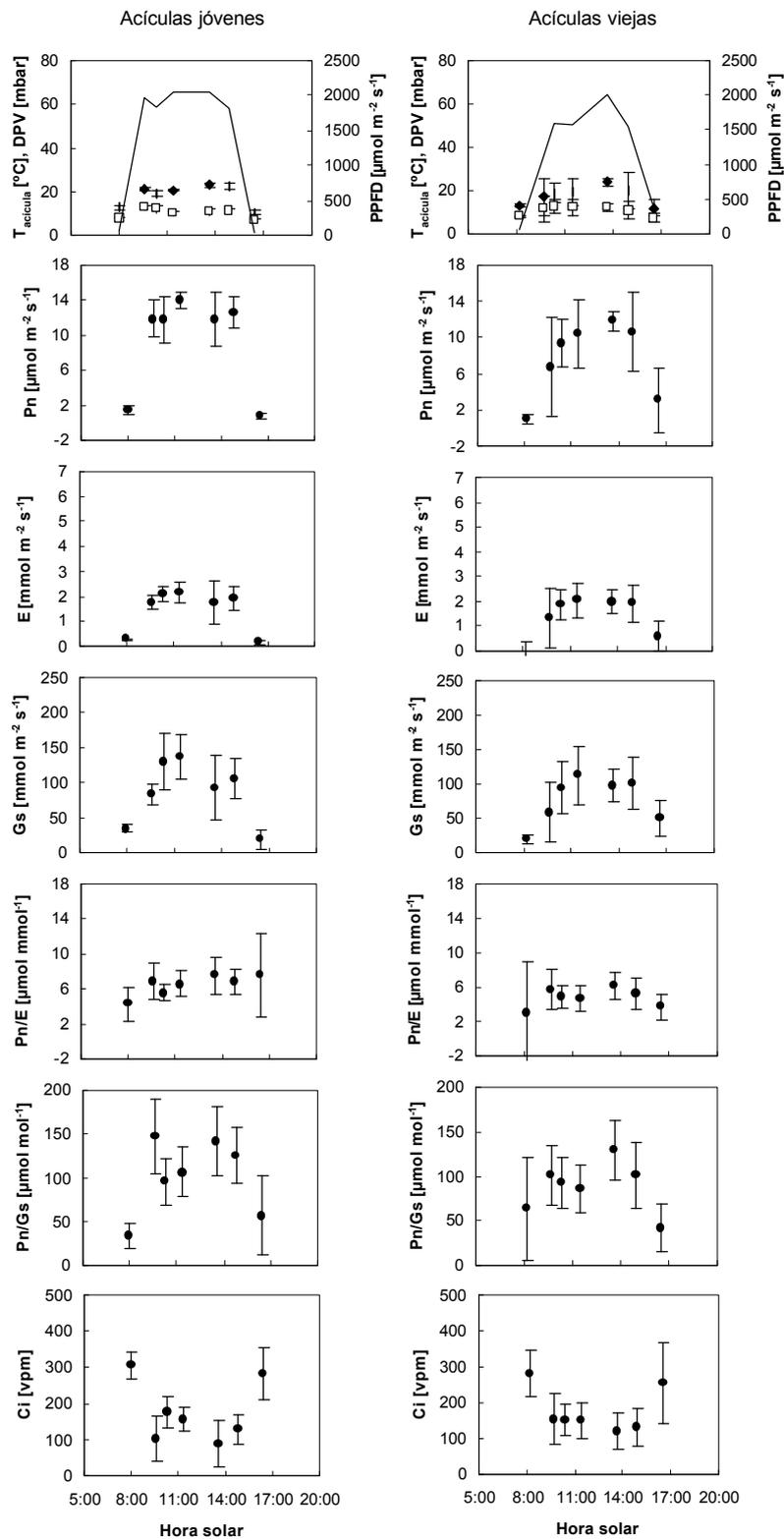


Figura 5.24. Curso diario de intercambio gaseoso del día 29 de diciembre de 1999. T_{acicula} = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPF = densidad de flujo fotónico fotosintético (---); P_n = fotosíntesis neta; E = transpiración; G_s = conductancia estomática; P_n/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; P_n/G_s = EUA intrínseca; C_i = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

10 enero de 2000

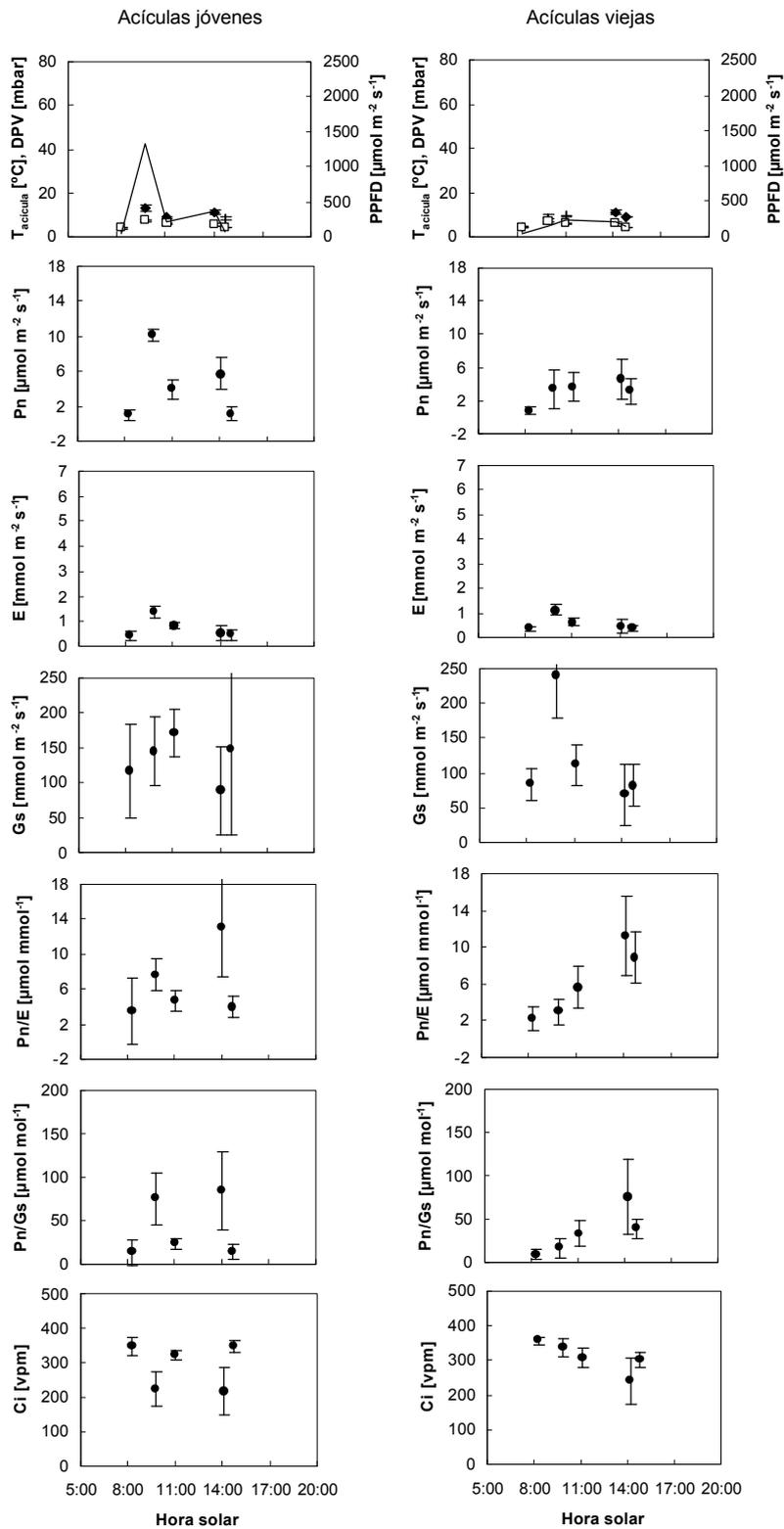


Figura 5.25. Curso diario de intercambio gaseoso del día 10 de enero de 2000. $T_{\text{acícula}}$ = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético ($-$); Pn = fotosíntesis neta; E = transpiración; Gs = conductancia estomática; Pn/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; Pn/Gs = EUA intrínseca; Ci = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

30 de enero de 2000

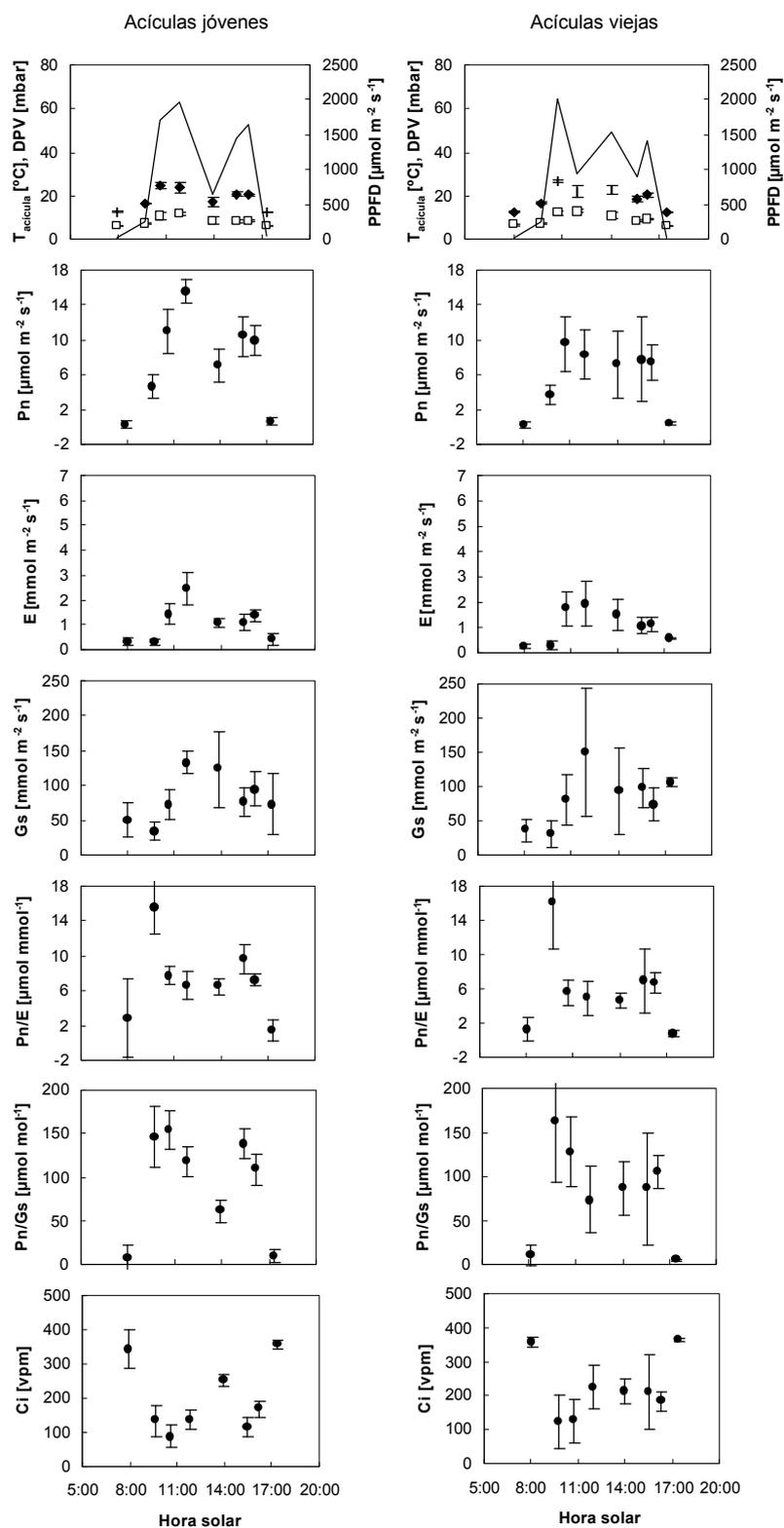


Figura 5.26. Curso diario de intercambio gaseoso del día 30 de enero de 2000. T_{acicula} = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético; (--) P_n = fotosíntesis neta; E = transpiración; G_s = conductancia estomática; P_n/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; P_n/G_s = EUA intrínseca; C_i = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

14 de febrero de 2000

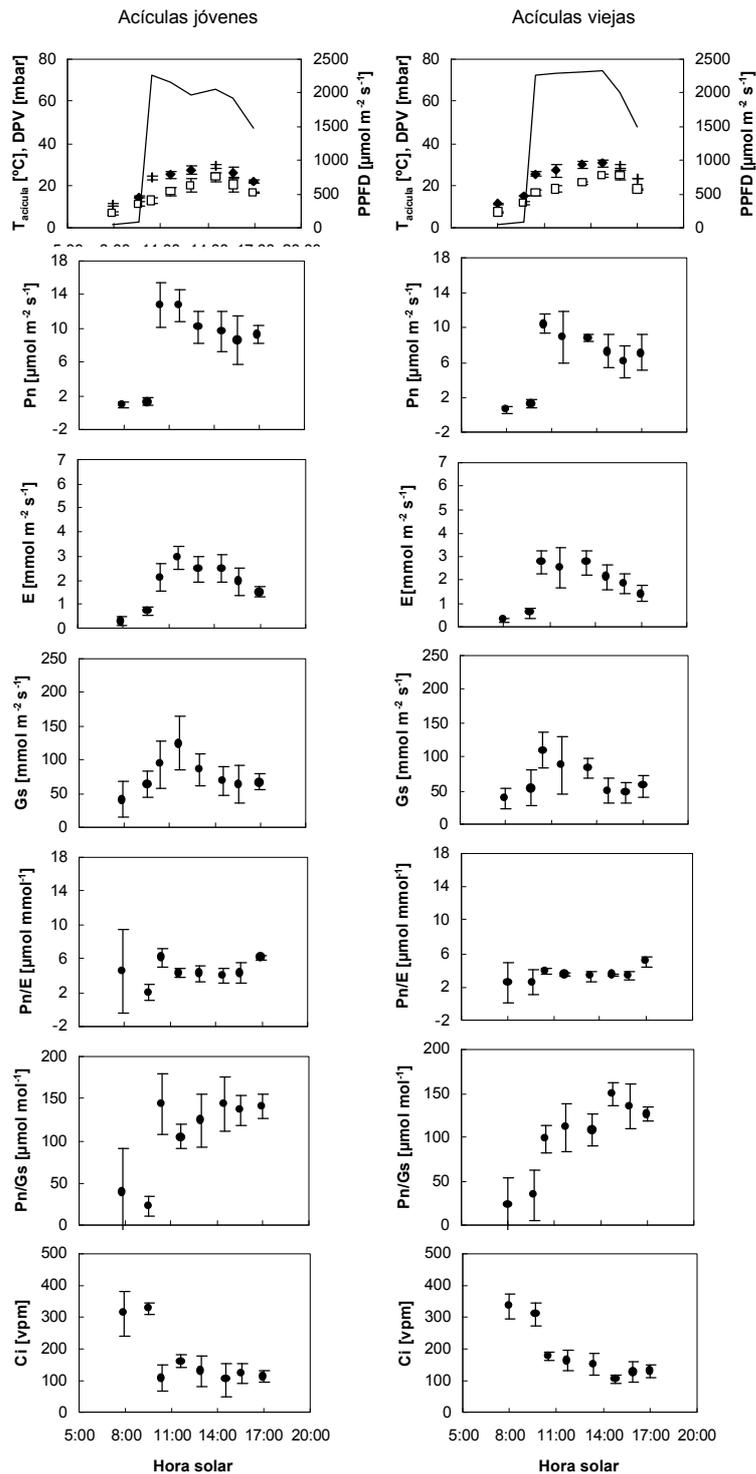


Figura 5.27. Curso diario de intercambio gaseoso del día 14 de febrero de 2000. T_{acicula} = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético (---); Pn = fotosíntesis neta; E = transpiración; Gs = conductancia estomática; Pn/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; Pn/Gs = EUA intrínseca; Ci = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

6 de marzo de 2000

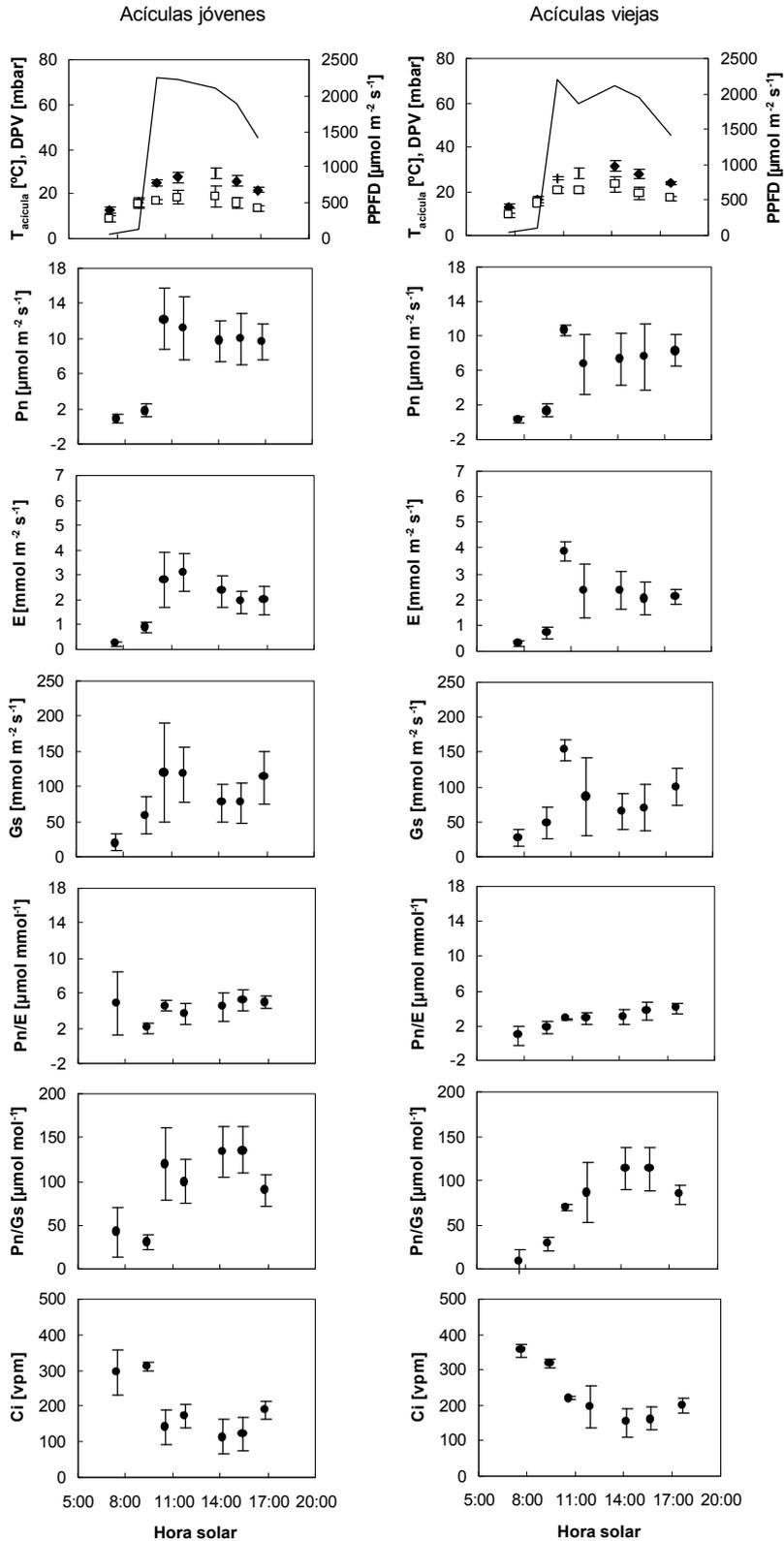


Figura 5.28. Curso diario de intercambio gaseoso del día 6 de marzo de 2000. T_{acicula} = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético ($--$); Pn = fotosíntesis neta; E = transpiración; Gs = conductancia estomática; Pn/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; Pn/Gs = EUA intrínseca; Ci = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

19 de marzo de 2000

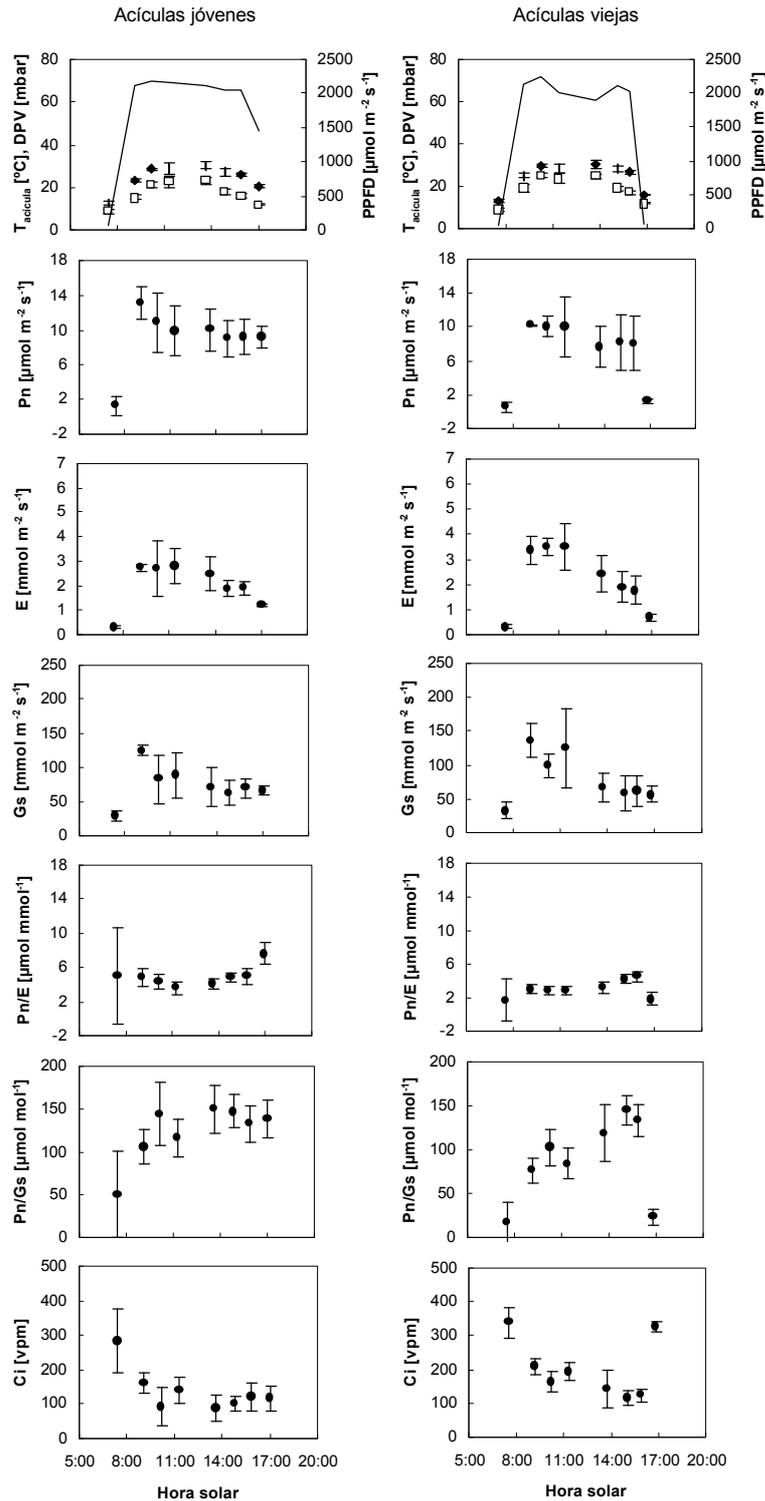


Figura 5.29. Curso diario de intercambio gaseoso del día 19 de marzo de 2000. T_{acicula} = temperatura de las acículas (\bullet); DPV = déficit de presión de vapor del aire (\square); PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético (-); Pn = fotosíntesis neta; E = transpiración; Gs = conductancia estomática; Pn/E = eficiencia en el uso del agua (EUA) instantánea; Pn/Gs = EUA intrínseca; Ci = concentración de CO_2 a nivel del mesófilo.

5.3.2.1. Análisis general de los cursos diarios

En general, podemos observar que en días en los que existe un déficit de presión de vapor del aire más alto y con temperaturas más altas (por ejemplo, los cursos diarios que van desde mayo hasta agosto y poseen un DPV por encima de los 20 mbar) (figuras 5.9-15), se produce una mayor limitación de la conductancia estomática, alcanzando entonces ésta sus menores tasas, y, como consecuencia de ello, se produce una reducción en la tasa fotosintética, aunque la reducción de la conductancia no consigue evitar un aumento de la transpiración en días con estas condiciones. Este tipo de comportamiento se observó, principalmente entre los meses de junio y septiembre de 1999, que se corresponde con la época de verano del periodo de medida.

Durante los días en los que el déficit de presión de vapor era más bajo, reflejando condiciones de mayor humedad ambiental y menor temperatura de las acículas, las tasas de conductancia estomática y de fotosíntesis neta fueron, por regla general, más altas. Así, como ejemplo, en los días 26 de abril y 28 de noviembre de 1999 y el 30 de enero de 2000, las condiciones ambientales favorecieron el intercambio gaseoso, permitiendo el mantenimiento de tasas de conductancia estomática relativamente altas, alcanzándose en estas fechas las tasas fotosintéticas más elevadas y minimizándose las tasas de transpiración de las acículas gracias a las condiciones de los días de medida (figuras 5.8, 5.22, 5.25).

La forma de las curvas diarias de P_n siguieron un comportamiento paralelo al de la PPF, es decir con un pico alrededor del mediodía, o bien mostraron un solo pico en la mañana y una posterior disminución de la tasa fotosintética durante el resto del día. Esto último ocurrió en los días 11 y 24 de mayo, 14 de junio, 1 y 11 de julio, 2 y 17 de septiembre y 28 de noviembre de 1999, que se corresponden con días de DPV más alto (figuras 5.8, 5.9, 5.11, 5.13, 5.14, 5.16, 5.17 y 5.22).

Las mayores tasas de fotosíntesis neta se alcanzaron a primeras horas de la mañana en días luminosos en los que la conductancia estomática no supuso ninguna limitación para el intercambio gaseoso de las acículas. Los valores más altos de fotosíntesis neta estuvieron alrededor de los $17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, alcanzados

los días 26 de abril, 28 de noviembre de 1999 y el 30 de enero de 2000 en acículas jóvenes, que generalmente presentaron valores algo más altos que las viejas.

Las tasas máximas de transpiración estuvieron alrededor de los 5-6 mmol m⁻² s⁻¹, y se alcanzaron en días de primavera, pero ya con alto déficit de presión de vapor y alta temperatura de las acículas, como lo son los días 26 de abril y 11 de mayo de 1999 (figuras 5.8 y 5.9).

Por su parte, la conductancia estomática alcanzó sus valores más altos, de alrededor de 150-200 mmol m⁻² s⁻¹, en días con un déficit de presión de vapor especialmente bajo (27 de septiembre y 12 de octubre de 1999 y 10 de enero de 2000).

La tendencia de la eficiencia del uso del agua instantánea (Pn/E) fue de alcanzar los valores más bajos al mediodía (con valores medios mínimos cercanos a los 2 μmol mmol⁻¹ en verano), mientras que la eficiencia del uso del agua intrínseca (Pn/Gs) mostró una tendencia opuesta (con valores medios máximos al mediodía alrededor de los 170 μmol mol⁻¹ los días 24 de mayo y 14 y 24 de junio).

Los valores de la concentración interna de CO₂ en el mesófilo (Ci) de las acículas llegaron a valores bastante bajos, incluso por debajo de los 50 vpm. Los valores de Ci tomaron los valores más bajos en días donde existió una mayor limitación de la conductancia estomática para el intercambio gaseoso, y se mantuvieron en valores más cercanos a la concentración externa de CO₂ en días con más alta conductancia estomática.

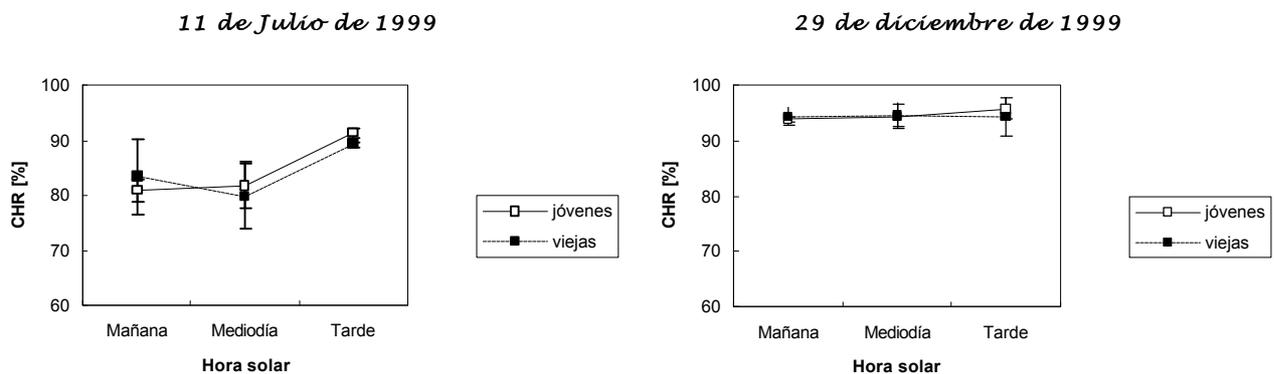


Figura 5.30. Contenido hídrico relativo en acículas jóvenes y viejas en los pinos que rodean la torre, en dos días representativos de las dos épocas marcadas del curso de medida: la época de verano (se presenta como ejemplo el 11 de julio de 1999) y la época de invierno (tomando como ejemplo el día 29 de diciembre de 1999).

Para analizar los resultados obtenidos en cuanto a la variación del contenido hídrico relativo y la fluorescencia de la clorofila a lo largo de los días de medida, hemos optado por presentar los datos recogidos en dos días representativos de las dos estaciones marcadas: el 11 de julio, correspondiente al verano, y el 29 de diciembre, correspondiente al invierno. Este tipo de determinaciones se hicieron sólo para el nivel superior de la torre.

En verano, el CHR disminuyó levemente a las horas del mediodía, sin embargo, la media de sus valores no bajó nunca a menos del 80%. En invierno el CHR se mantuvo en todos los casos por encima del 90% y no se observaron los cambios diurnos que se observaron en verano (figura 5.30).

En la figura 5.31 se representan los datos del parámetro F_v/F_m de la fluorescencia de la clorofila de los dos cursos diarios representativos de las dos épocas. Podemos ver como en verano hubo un descenso en el parámetro F_v/F_m después de que las acículas de los pinos recibieran varias horas de luz. También en invierno, representado por el día 29 de diciembre de 1999, puede observarse una ligera disminución del parámetro F_v/F_m , pero en ninguna de las dos épocas esta disminución es significativa. A lo largo del periodo de medida los valores de este parámetro de fluorescencia sólo quedaron por debajo de 0.75 durante las horas de mayor radiación y, en cualquier caso, siempre se recuperaron sus valores normales por la tarde.

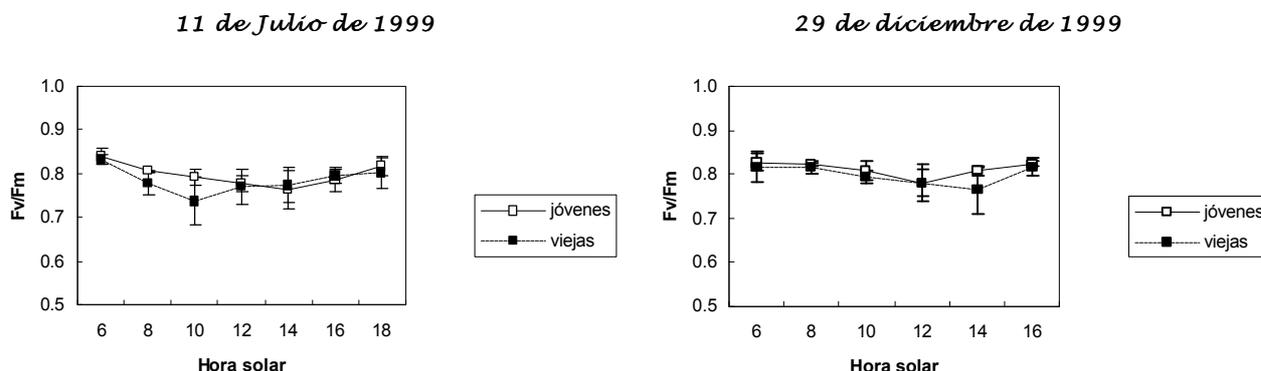


Figura 5.31. Variación diaria del parámetro F_v/F_m de la fluorescencia de la clorofila los dos días representativos de las dos épocas marcadas del curso de medida: la época de verano (se presenta como ejemplo el 11 de julio de 1999) y la época de invierno (tomando como ejemplo el día 29 de diciembre de 1999).

5.3.2.2. *Influencia de la edad de las acículas en los cursos diarios*

En general, el comportamiento de las acículas jóvenes y viejas fue similar cada día de medida, aunque los valores de fotosíntesis neta, transpiración y conductancia estomática fueron, generalmente, más bajos en las acículas de mayor edad, particularmente en las medidas realizadas en verano, entre los meses de abril y septiembre de 1999.

En cuanto a los cursos diarios de contenido hídrico relativo y fluorescencia de la clorofila, en general se observa que las acículas jóvenes mantienen valores ligeramente más altos de estos parámetros que las acículas viejas, pero estas diferencias en ningún momento llegan a ser estadísticamente significativas.

5.3.3. *Análisis global de los datos de intercambio gaseoso*

En condiciones naturales en el bosque la variabilidad de los datos tiende a ser mucho mayor que en condiciones controladas. Con frecuencia la estrategia de análisis de estos datos consiste, entonces, en representar todos los puntos obtenidos tratando de detectar tendencias, relaciones y correlaciones que puedan arrojar luz a la hora de interpretar los resultados obtenidos.

En el caso de las medidas de intercambio gaseoso en condiciones de campo en la torre del pinar, realizadas para este trabajo, tan sólo para acículas jóvenes de la parte superior de la torre ya contamos con casi 2000 series de datos medidos a lo largo de los cursos diarios durante todo el año, y si sumamos todos los datos medidos en acículas tanto jóvenes como viejas en ambos niveles de la torre contamos con cerca de 5000. Sin duda parecen datos suficientes como para estudiar las tendencias de los diversos parámetros tratando de generalizar las respuestas de *Pinus canariensis* respecto a los diferentes parámetros ambientales, y esto es lo que hemos tratado de hacer con las representaciones gráficas de las figuras 5.32-40. Para una primera aproximación al análisis global se siguió el procedimiento de trazar la envolvente de los datos, por la parte externa de la nube de puntos obtenida, suponiendo que este sería el comportamiento de los parámetros estudiados en condiciones totalmente óptimas de todos los demás factores, es decir una aproximación a la *capacidad fotosintética* de esta especie.

5.3.3.1. Variación de la fotosíntesis neta con los parámetros ambientales y fisiológicos

La respuesta de la fotosíntesis neta a la densidad de flujo fotónico (figura 5.32) siguió un comportamiento similar considerando las diferentes edades de las acículas, pero mostró una clara diferencia entre los dos niveles de la torre, alcanzando las acículas del nivel superior puntos de saturación luminosos más altos que las acículas del nivel inferior, estando el de las primeras cerca de los 500 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el de las últimas alrededor de los 250 μmol de fotones m^{-2}

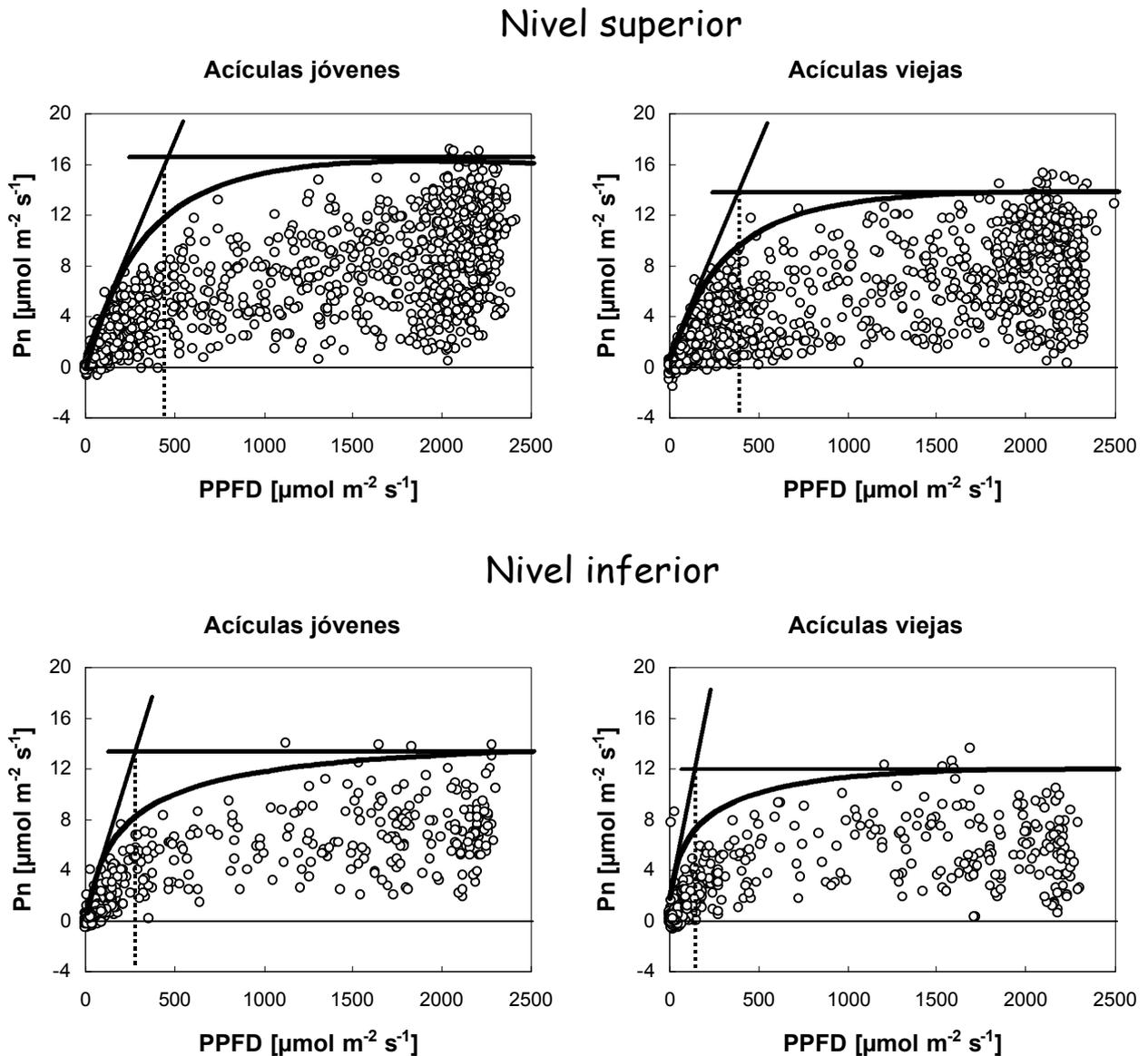


Figura 5.32. Nube de puntos obtenida representando todos los datos obtenidos durante los días de medida en acículas jóvenes y viejas en la parte superior y en la parte inferior de la torre, con su ajuste mediante la línea envolvente y la explicación de la estimación del punto de saturación luminoso. Pn = fotosíntesis neta; PPFD = densidad de flujo fotónico fotosintético.

s⁻¹. Las tasas máximas de fotosíntesis neta (sobre los 17 μmol m⁻² s⁻¹) se alcanzaron en acículas jóvenes del nivel superior, mientras que las viejas de este nivel no pasaron de 15 μmol m⁻² s⁻¹ y las del nivel inferior, tanto jóvenes como viejas, alcanzaron fotosíntesis netas máximas próximas a 12 μmol m⁻² s⁻¹.

Para estudiar la respuesta óptima de la fotosíntesis respecto a la densidad de flujo fotónico, se tomaron los datos en los que la conductancia estomática no suponía ninguna limitación para el intercambio gaseoso (por encima de los 75 mmol m⁻² s⁻¹) (véase la figura 5.35) y la temperatura de las acículas estuviera dentro del rango óptimo en el que aun se mantiene un 90% de la fotosíntesis neta máxima (entre los 20 y los 30 °C) (ver figura 5.33). Las curvas resultantes (figura 5.33) se ajustaron a una ecuación de una hipérbola no rectangular de las siguientes características:

$$P_n = ((\phi * PPF\!D + P_{n\!m\!á\!x} - ((\phi * PPF\!D + P_{n\!m\!á\!x})^2 - 4 * \phi * PPF\!D * K * P_{n\!m\!á\!x})^{1/2}) / 2 * K) - R_d$$

donde P_n es la fotosíntesis neta, φ es el rendimiento cuántico aparente, PPF_D la densidad de flujo fotónico fotosintético, P_{n_{máx}} la fotosíntesis neta a luz saturante, K es el factor de curvatura (que varía entre 0 y 1) y R_d es la respiración de oscuridad. Esta ecuación fue descrita por Prioul y Chartier (1977).

Para las acículas jóvenes del nivel superior de la torre la fotosíntesis neta máxima (P_{n_{máx}}) fue de 17.4 μmol m⁻² s⁻¹, el punto de compensación luminoso (PCL) de 52.7 μmol m⁻² s⁻¹, el punto de saturación luminoso (PSL) por encima de 522 μmol m⁻² s⁻¹ y la respiración de oscuridad (R_d) fue de -1.96 μmol m⁻² s⁻¹. Las acículas jóvenes del nivel inferior mostraron P_{n_{máx}} de 12.8 μmol m⁻² s⁻¹, PCL muy cercano a 0 μmol m⁻² s⁻¹, PSL de 475 μmol m⁻² s⁻¹ y la R_d alrededor de 0 μmol m⁻² s⁻¹. Por su parte, las acículas viejas del nivel superior y del nivel inferior mostraron P_{n_{máx}} de 15.9 y 12.2 μmol m⁻² s⁻¹, PCL de 42.9 y 19 μmol m⁻² s⁻¹, PSL de 547 y 388 μmol m⁻² s⁻¹ y R_d de -1.36 y -0.628 μmol m⁻² s⁻¹, respectivamente (Tabla 5.I).

Tabla 5.I. Valores de los diversos parámetros, estimados mediante el programa de ajuste de la nube de puntos en condiciones óptimas para las curvas de respuesta de la fotosíntesis neta a la densidad de flujo fotónico fotosintético.

	<u>Estimación</u>			
	<u>Nivel superior</u>		<u>Nivel inferior</u>	
	Jóvenes	Viejas	Jóvenes	Viejas
<u>R_d</u>	-1.96	-1.36	~0	-0.628
<u>P_{n_{máx}}</u>	17.4	15.9	12.8	12.2
<u>PCL</u>	52.7	42.9	~0	19
<u>PSL estimado</u>	522	547	475	388

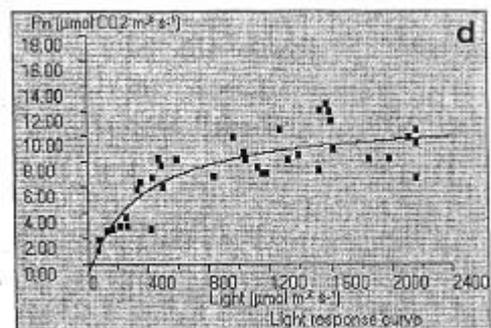
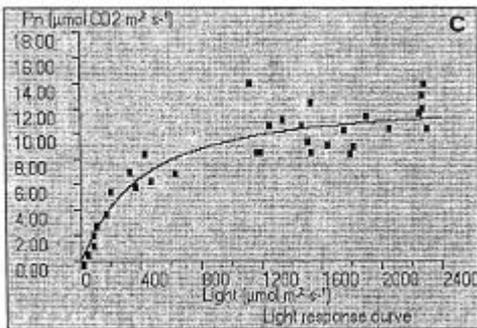
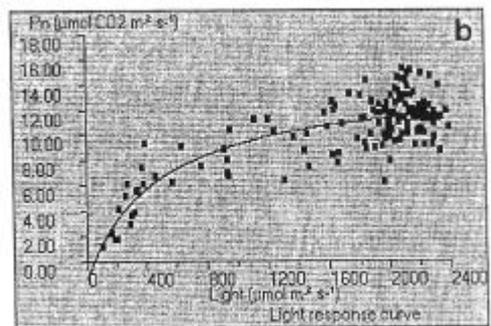
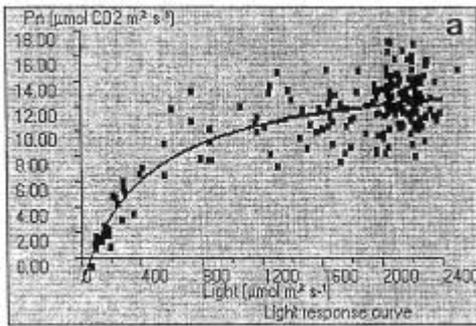


Figura 5.33. Ajuste de los valores óptimos de la relación Pn frente a PPFD en acículas de *Pinus canariensis*. a) Acículas jóvenes del nivel superior de la torre. b) Acículas viejas del nivel superior. c) Acículas jóvenes del nivel inferior. d) Acículas viejas del nivel inferior.

En cuanto a la respuesta de la fotosíntesis neta a la temperatura de las acículas (figura 5.34), la temperatura óptima en todos los casos ronda los 25 °C. Sin embargo, la tasa de fotosíntesis neta se mantuvo por encima del 50% de la tasa máxima entre aproximadamente los 11 y los 42 °C, excepto en las acículas del nivel más inferior, que mantuvieron un 50% de su fotosíntesis máxima en un rango de temperatura más estrecho, aproximadamente entre los 13 y los 40 °C.

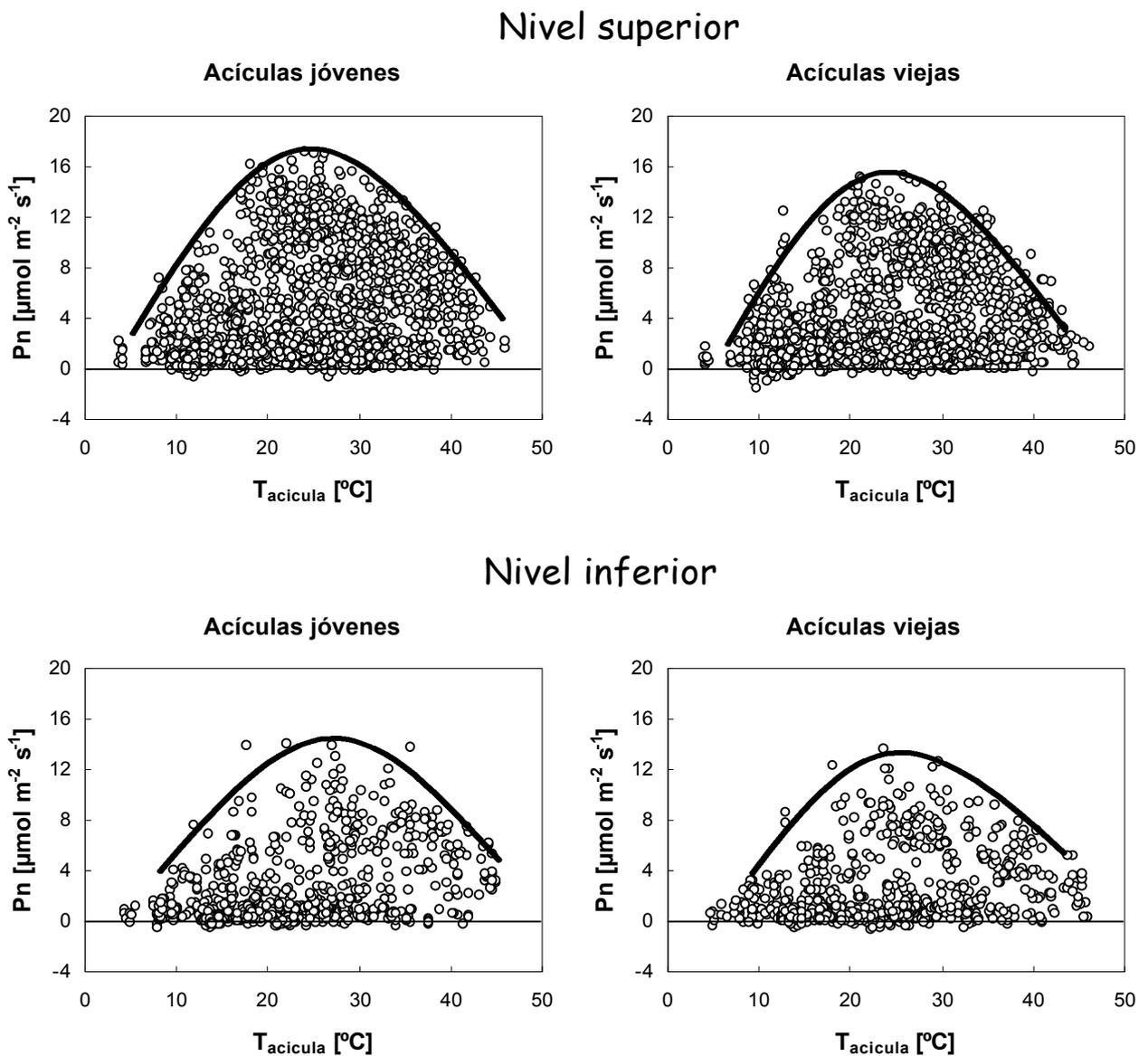


Figura 5.34. Nube de puntos obtenida representando todos los datos obtenidos durante los días de medida en acículas jóvenes y viejas en la parte superior y en la parte inferior de la torre, con su ajuste mediante la línea envolvente. Pn = fotosíntesis neta; T_{acicula} = temperatura de la acícula.

La respuesta de la fotosíntesis neta al déficit de presión de vapor del aire (figura 5.35) sigue una tendencia característica en la que a medida que los valores de DPV se hacen más bajos, la fotosíntesis neta alcanza tasas mayores debido a que desaparece la limitación estomática, dado que los estomas tienden a cerrarse cuando el DPV es más alto. Los resultados muestran valores óptimos de fotosíntesis hasta un DPV de 20 mbar y una disminución progresiva por encima de este valor, manteniéndose una fotosíntesis neta del 50% hasta un valor aproximado de DPV de 50 mbar. En este caso no se observaron diferencia claras en el comportamiento de acículas de edad o nivel diferente sobre la torre.

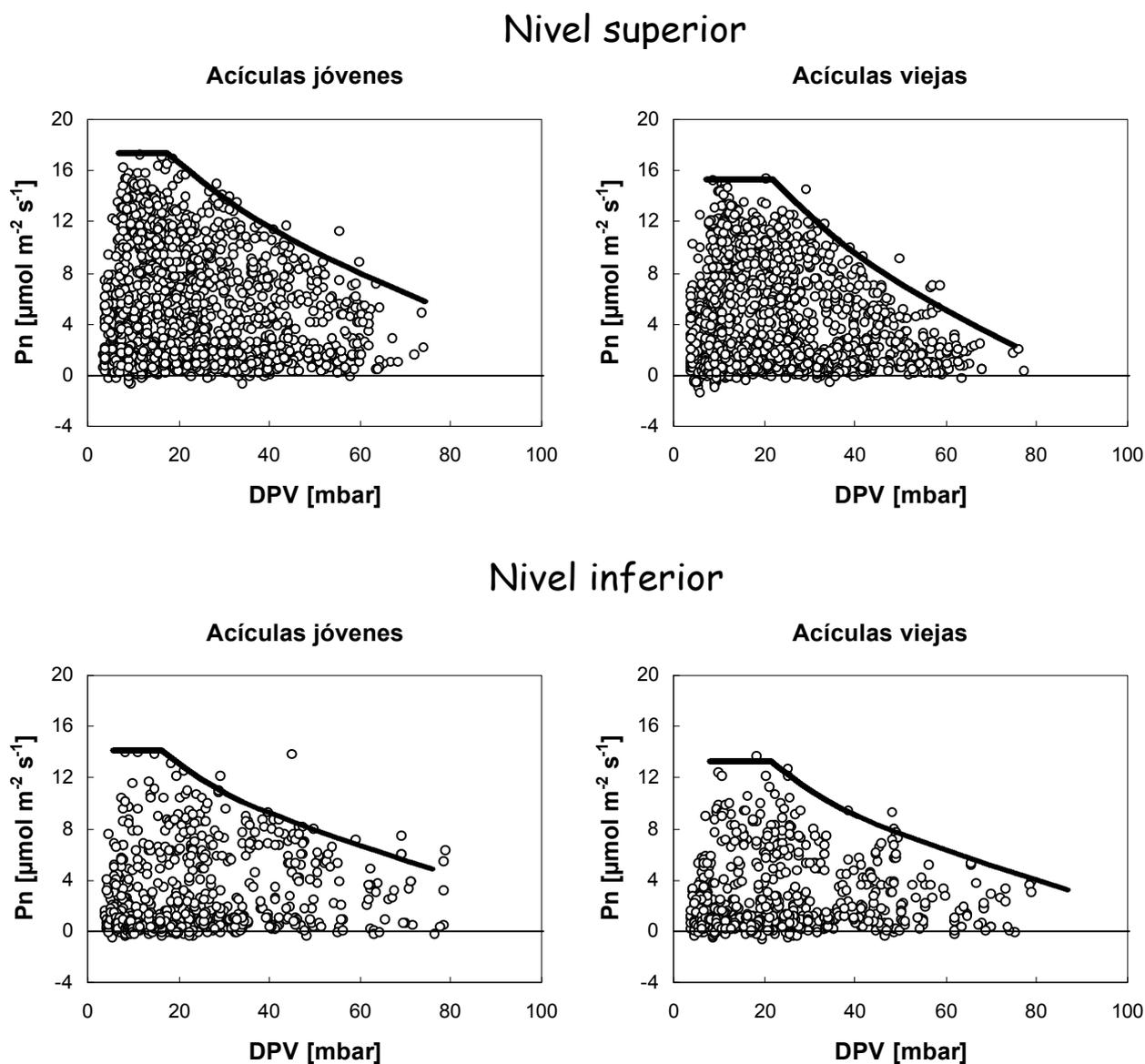


Figura 5.35. Nube de puntos obtenida representando todos los datos obtenidos durante los días de medida en acículas jóvenes y viejas en la parte superior y en la parte inferior de la torre, con su ajuste mediante la línea envolvente. Pn = fotosíntesis neta; DPV = déficit de presión de vapor.

Representando los valores de fotosíntesis neta respecto a la conductancia estomática (figura 5.36), obtenemos una típica curva que en todos los casos se satura por encima de los $75 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de conductancia. En este caso sí podemos ver diferencias bastante claras en el punto de saturación de las acículas de diferente nivel sobre la torre, teniendo las acículas del nivel superior puntos de saturación de la fotosíntesis neta sobre los $75 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de Gs y las del nivel inferior puntos de saturación alrededor de los $60 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

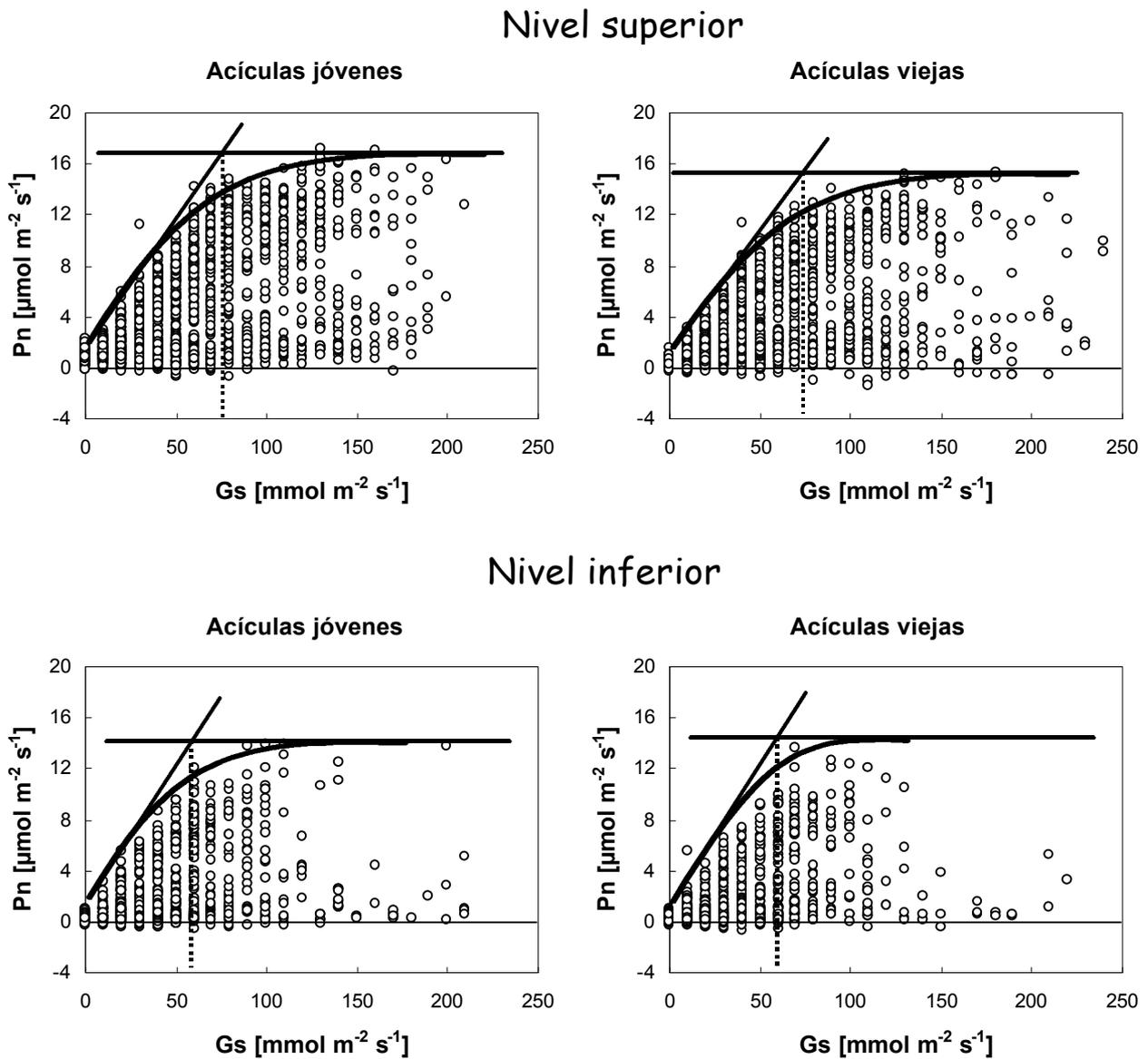


Figura 5.36. Nube de puntos obtenida representando todos los datos obtenidos durante los días de medida en acículas jóvenes y viejas en la parte superior y en la parte inferior de la torre, con su ajuste mediante la línea envolvente. Pn = fotosíntesis neta; Gs = conductancia estomática.

Las relaciones de Pn frente a Ci (figura 5.37), en condiciones naturales con concentración ambiente de CO₂, siguen respuestas típicas siendo el Ci más bajo cuando los valores de fotosíntesis neta son mayores. De nuevo observamos marcadas diferencias entre acículas de ambos niveles de la torre. Las acículas del nivel superior mantienen una fotosíntesis máxima con concentraciones de CO₂ en el mesófilo de 150-175 vpm y las del nivel inferior con concentraciones de Ci más bajas, alrededor de los 125 vpm.

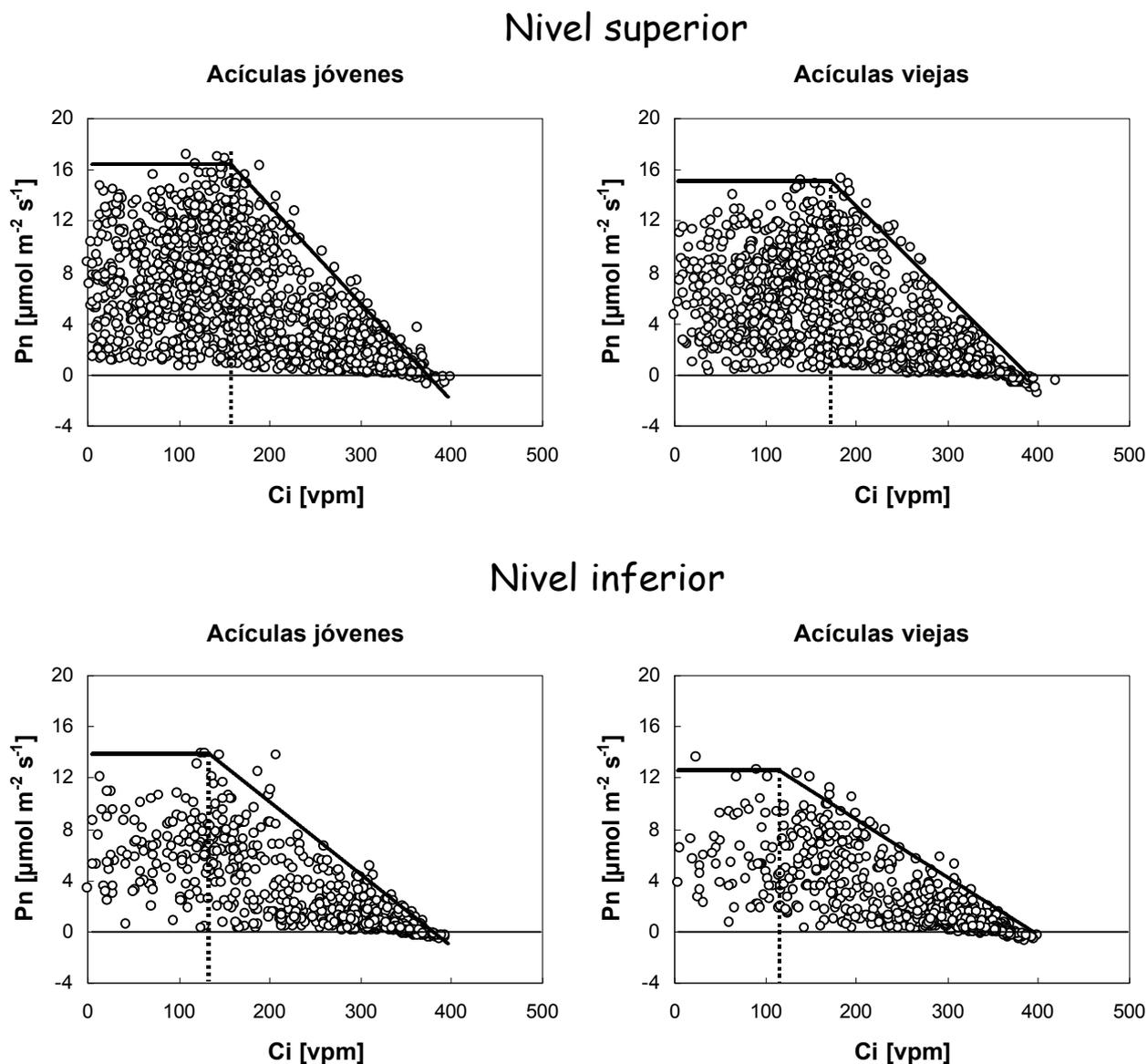


Figura 5.37. Nube de puntos obtenida representando todos los datos obtenidos durante los días de medida en acículas jóvenes y viejas en la parte superior y en la parte inferior de la torre. Pn = fotosíntesis neta; Ci = concentración de CO₂ en el mesófilo de las acículas.

5.3.3.2. Variación de la transpiración y la conductancia frente a algunos parámetros ambientales

Las tasas de transpiración máximas estuvieron alrededor de los 6 mmol m⁻² s⁻¹, y se alcanzaron en acículas jóvenes del nivel superior de la torre.

La respuesta de la transpiración a la temperatura de las acículas (figura 5.38) muestra un óptimo cercano a los 35 °C para acículas del nivel superior y sobre los 40 °C para acículas del nivel inferior.

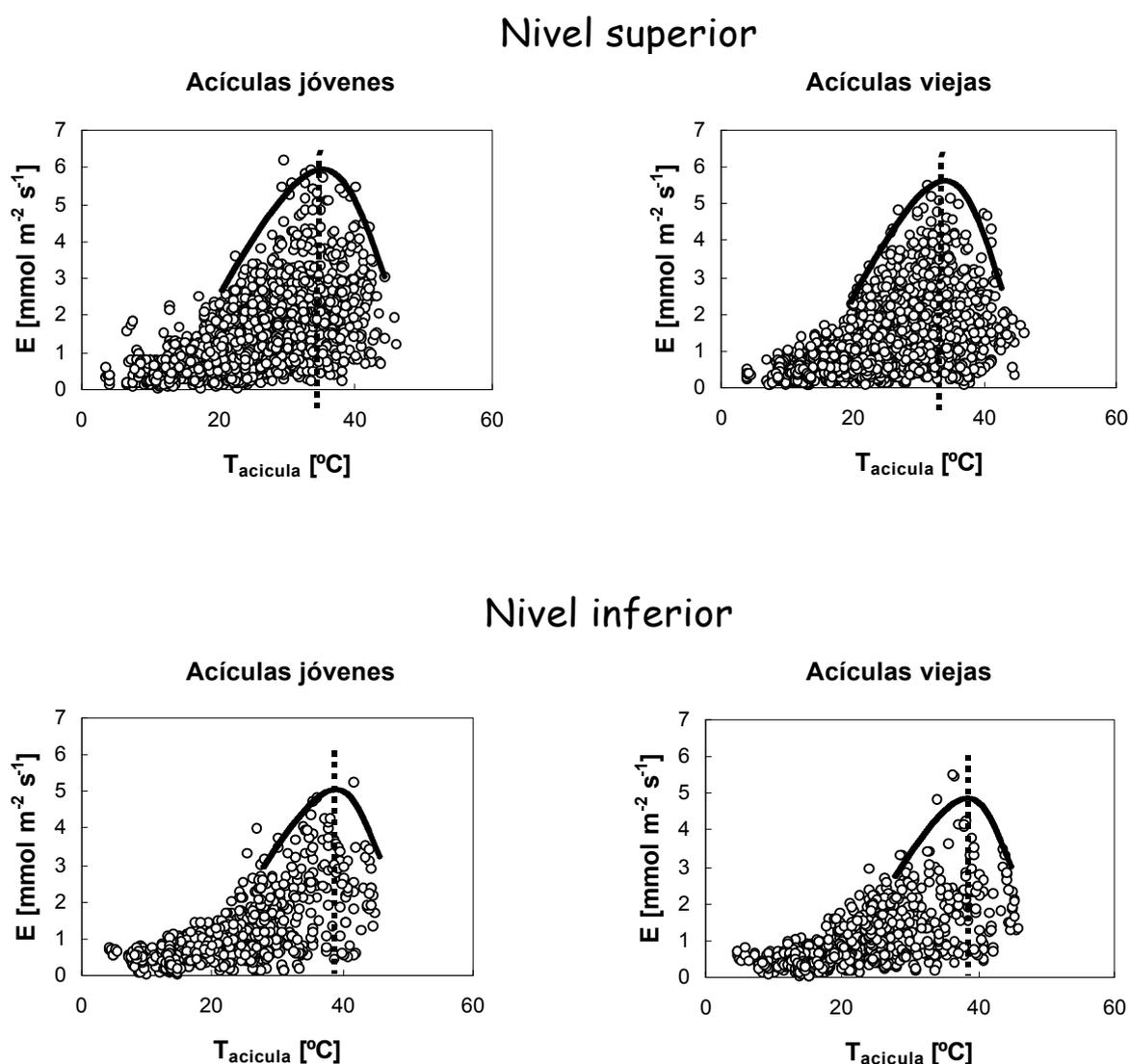


Figura 5.38. Nube de puntos obtenida representando todos los datos obtenidos durante los días de medida en acículas jóvenes y viejas en la parte superior y en la parte inferior de la torre. E = transpiración; T_{acicula} = temperatura de la acícula.

Con el DPV la transpiración muestra un óptimo cerca de las 50 mbar en las del nivel superior y de unos 60 mbar en las acículas del nivel inferior (figura 5.39).

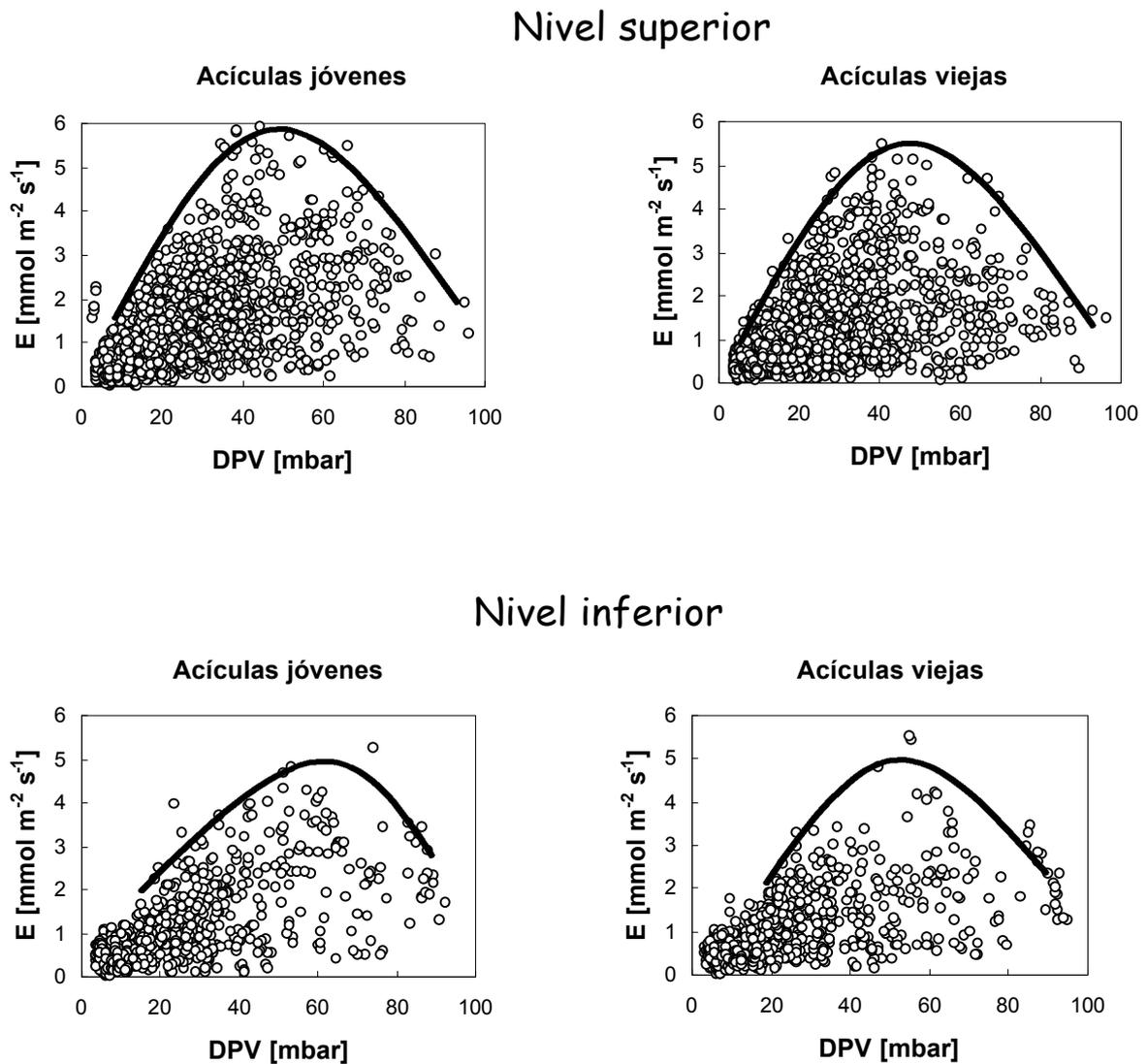


Figura 5.39. Nube de puntos obtenida representando todos los datos obtenidos durante los días de medida en acículas jóvenes y viejas en la parte superior y en la parte inferior de la torre. E = transpiración; DPV = déficit de presión de vapor.

Por su parte, la conductancia estomática prácticamente no se ve limitada por la temperatura de las acículas que, excepto a temperaturas muy altas, que sin duda suponen también un alto DPV, no produce un descenso en los valores de conductancia (figura 5.40). Las acículas del nivel superior mantienen conductancias máximas hasta los 30 °C, aproximadamente, mientras que en el nivel inferior se mantienen tasas máximas sólo hasta los 20-25 °C.

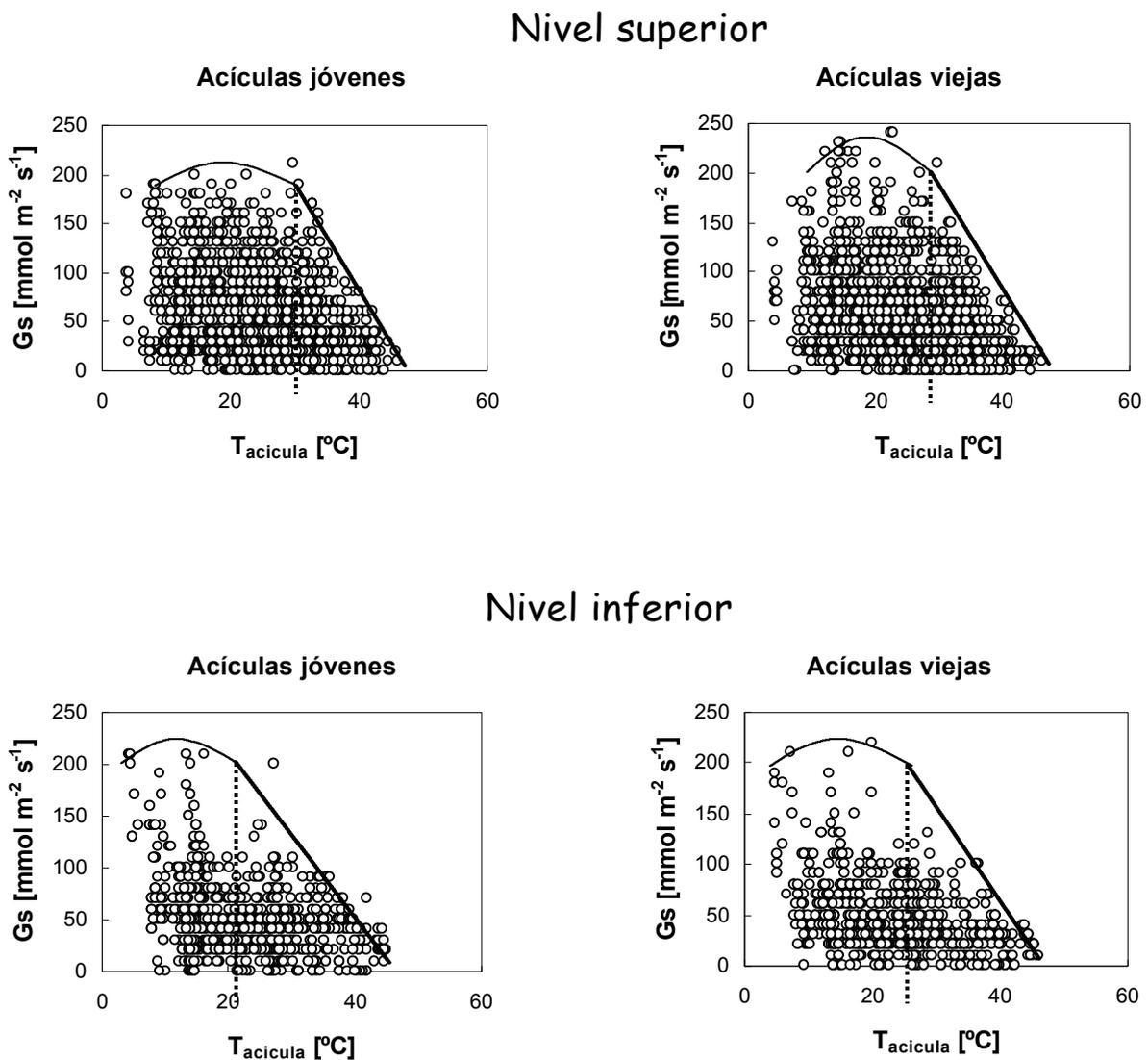


Figura 5.40. Nube de puntos obtenida representando todos los datos obtenidos durante los días de medida en acículas jóvenes y viejas en la parte superior y en la parte inferior de la torre. G_s = conductancia estomática; T_{acicula} = temperatura de la acícula.

Sin embargo, al contrario que la temperatura de las acículas o la luz (datos no mostrados) el DPV sí supone, claramente, una limitación para la conductancia estomática, respondiendo ésta con una bajada muy acusada a medida que los valores de DPV se hacen cada vez más grandes (figura 5.41). De nuevo las acículas del nivel superior consiguen mantener tasas de conductancia a valores de DPV más altos que las acículas del nivel inferior (sobre 20 y 10 mbar, respectivamente).

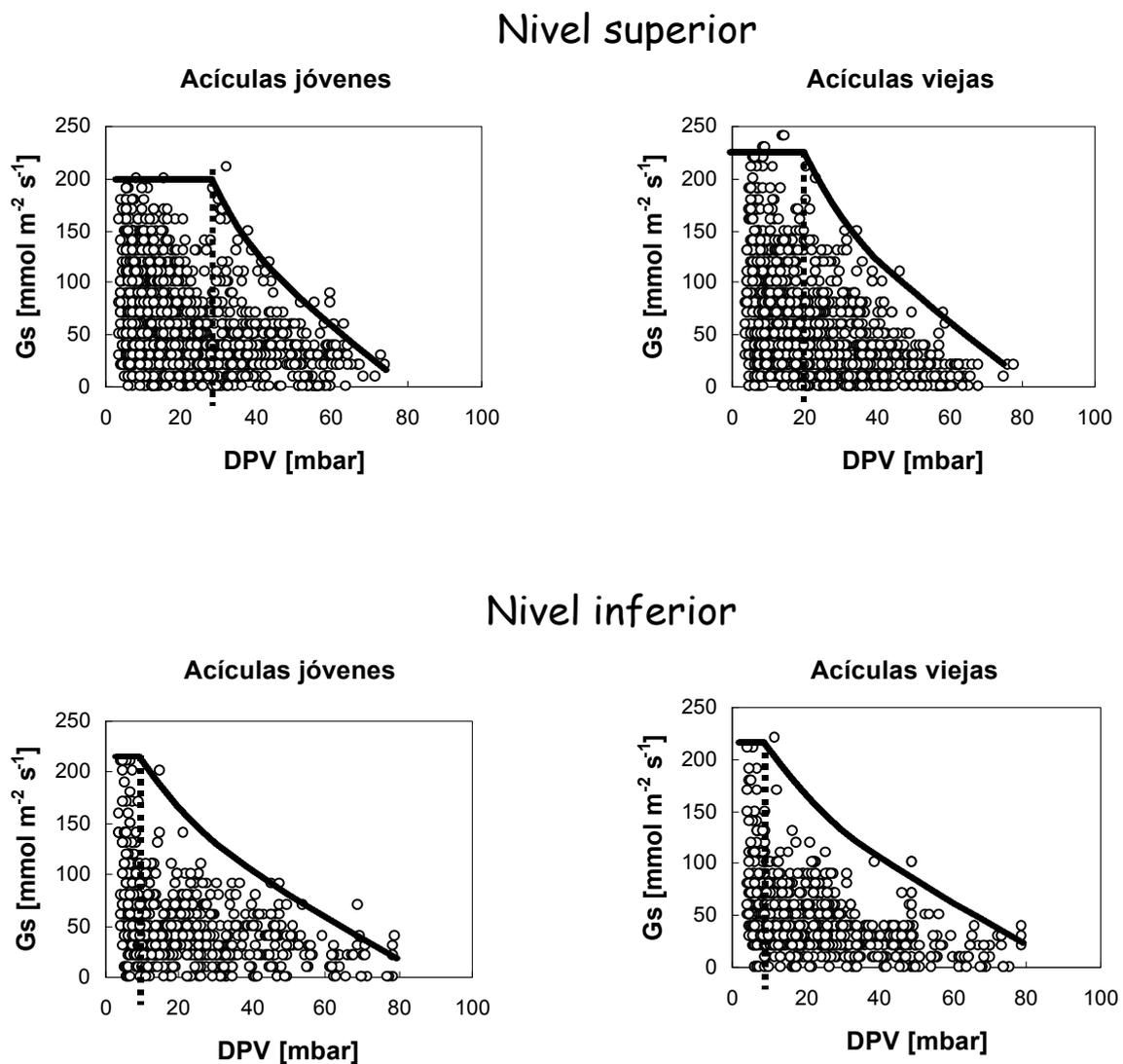


Figura 5.41. Nube de puntos obtenida representando todos los datos obtenidos durante los días de medida en acículas jóvenes y viejas en la parte superior y en la parte inferior de la torre. Gs = conductancia estomática; DPV = déficit de presión de vapor.

5.3.4. *Variabilidad estacional de la fotosíntesis neta*

A continuación veremos la variación de la fotosíntesis neta máxima del pino canario a lo largo del periodo estudiado, tratando de dilucidar una estacionalidad de los valores en relación con la climatología del sitio de estudio, en el que, según los datos meteorológicos, existen dos estaciones claramente diferenciadas: una más húmeda y fría entre los meses de octubre a marzo, que hemos denominado invierno, y otra más seca y cálida desde abril hasta septiembre, que hemos llamado verano.

En las figuras 5.42 y 5.43 podemos observar las tendencias estacionales de la Pn media máxima de cada día de medida, con sus correspondientes valores de tasas de transpiración, conductancia estomática y eficiencias en el uso del agua (instantánea e intrínseca) para acículas jóvenes y acículas viejas de ambos niveles de la torre, y además con su correspondiente densidad de flujo fotónico, temperatura de las acículas y déficit de presión de vapor.

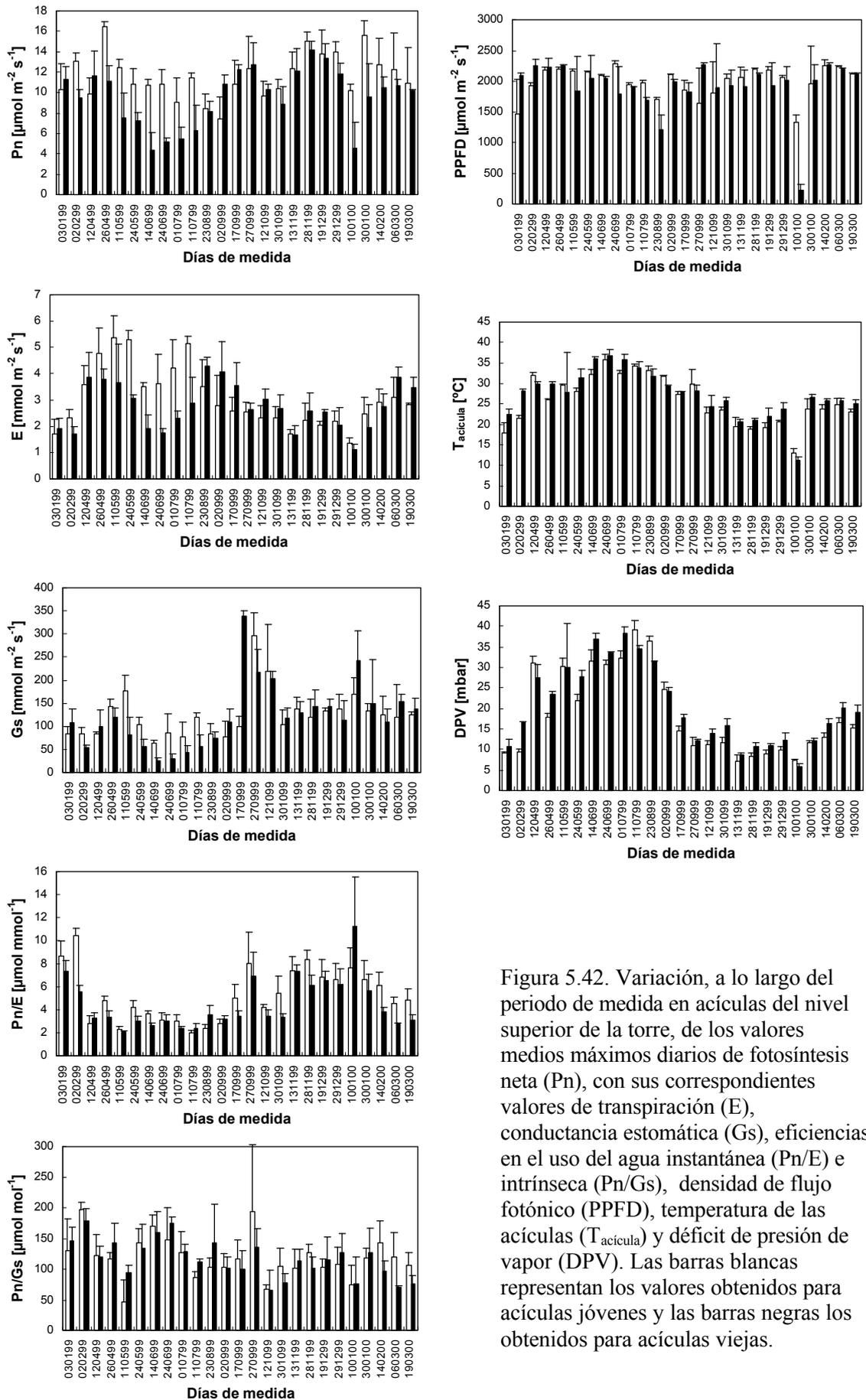


Figura 5.42. Variación, a lo largo del periodo de medida en acúculas del nivel superior de la torre, de los valores medios máximos diarios de fotosíntesis neta (P_n), con sus correspondientes valores de transpiración (E), conductancia estomática (G_s), eficiencias en el uso del agua instantánea (P_n/E) e intrínseca (P_n/G_s), densidad de flujo fotónico (PPFD), temperatura de las acúculas (T_{acicula}) y déficit de presión de vapor (DPV). Las barras blancas representan los valores obtenidos para acúculas jóvenes y las barras negras los obtenidos para acúculas viejas.

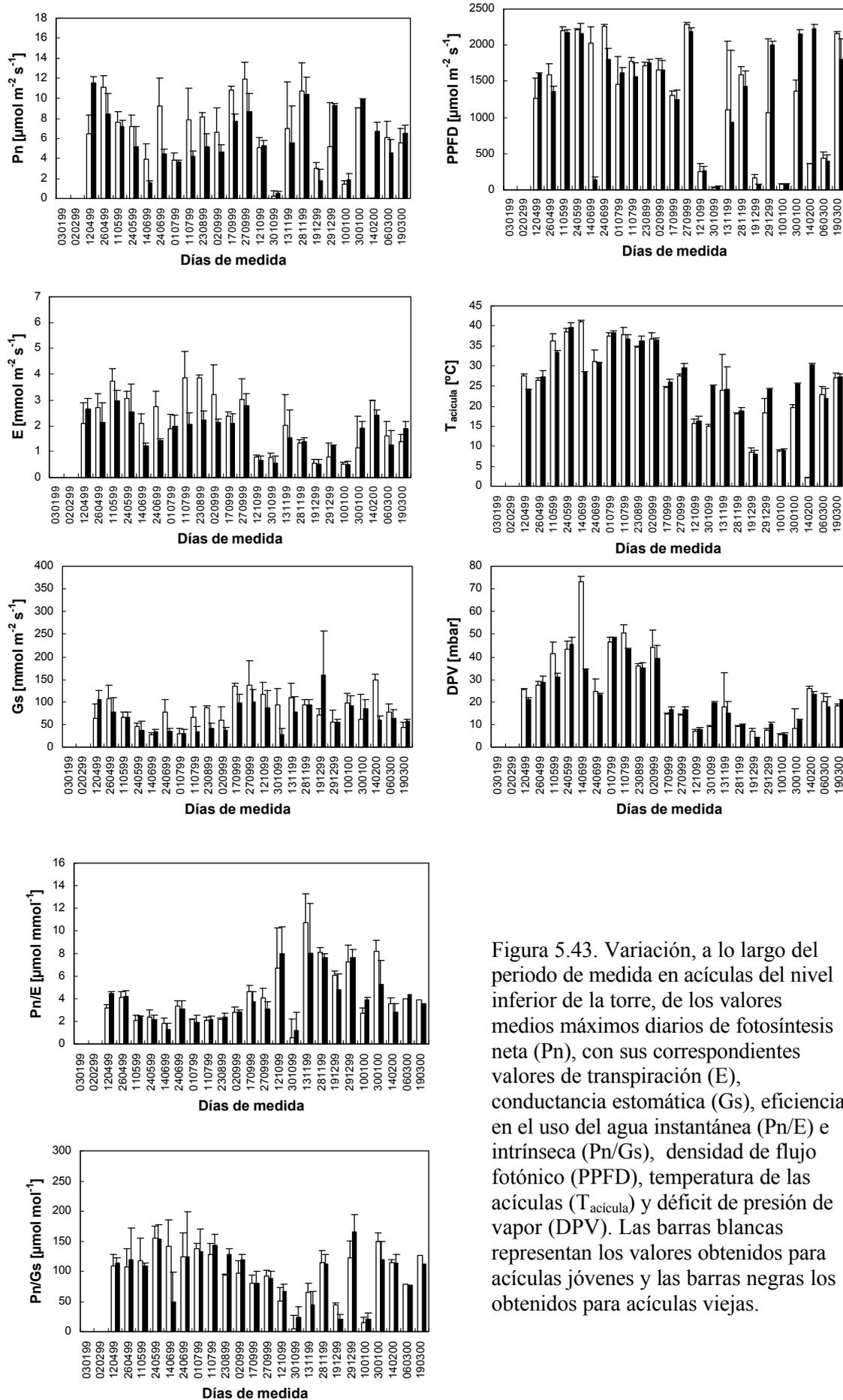


Figura 5.43. Variación, a lo largo del periodo de medida en acúlas del nivel inferior de la torre, de los valores medios máximos diarios de fotosíntesis neta (P_n), con sus correspondientes valores de transpiración (E), conductancia estomática (G_s), eficiencias en el uso del agua instantánea (P_n/E) e intrínseca (P_n/G_s), densidad de flujo fotónico (PPFD), temperatura de las acúlas (T_{acicula}) y déficit de presión de vapor (DPV). Las barras blancas representan los valores obtenidos para acúlas jóvenes y las barras negras los obtenidos para acúlas viejas.

Como es lógico, debido a la variabilidad de los parámetros ambientales en los diferentes días de medida, los parámetros fisiológicos presentan también gran variabilidad. Un análisis estadístico de los datos de un día en relación con el resto muestra agrupaciones difíciles de evaluar, por lo tanto, optamos por hacer comparación de medias agrupando los datos según las dos estaciones claramente diferenciadas. Los resultados de las ANOVAS para los diferentes parámetros de estudio se reflejan en la tabla 5.II.

Tabla 5.II. Resultados del análisis estadístico aplicado a los datos representados en las figuras 5.45 y 5.46. Se realizaron ANOVAS con el fin de comparar las medias de los diversos parámetros en las dos épocas marcadas del curso de medida.

	Estación	Nivel Superior		Nivel Inferior	
		Acículas Jóvenes	Acículas Viejas	Acículas Jóvenes	Acículas Viejas
Pn	Invierno	12.26	10.33	5.47	5.13
	Verano	10.62 <i>p</i> <0.001	8.5 <i>p</i> <0.001	7.38 <i>p</i> <0.001	5.76 n.s.
E	Invierno	1.94	2.00	1.12	1.21
	Verano	3.50 <i>p</i> <0.001	2.91 <i>p</i> <0.001	2.99 <i>p</i> <0.001	2.22 <i>p</i> <0.001
Gs	Invierno	110.9	101.8	86.8	78.0
	Verano	96.6 n.s.	76.2 <i>p</i> <0.001	63.8 <i>p</i> <0.001	51.8 <i>p</i> <0.001
Pn/E	Invierno	6.88	6.17	5.11	4.83
	Verano	3.25 <i>p</i> <0.001	2.95 <i>p</i> <0.001	2.53 <i>p</i> <0.001	2.62 <i>p</i> <0.001
Pn/Gs	Invierno	125.2	111.2	69.6	75.5
	Verano	121.3 n.s.	125.9 <i>p</i> <0.05	125.6 <i>p</i> <0.001	122.1 <i>p</i> <0.001
PPFD	Invierno	1962.2	1804.9	817.0	950.1
	Verano	2082.2 <i>p</i> <0.05	1954.3 n.s.	1936.4 <i>p</i> <0.001	1673.4 <i>p</i> <0.001
T_{acícula}	Invierno	22.12	22.89	18.19	20.16
	Verano	31.54 <i>p</i> <0.001	32.92 <i>p</i> <0.001	35.11 <i>p</i> <0.001	33.70 <i>p</i> <0.001
DPV	Invierno	10.81	12.50	10.63	13.05
	Verano	28.56 <i>p</i> <0.001	30.58 <i>p</i> <0.001	41.60 <i>p</i> <0.001	34.83 <i>p</i> <0.001

Podemos ver cómo, la mayor parte de las veces, se observa una clara estacionalidad en los datos, siendo los valores de fotosíntesis neta, conductancia estomática y eficiencia en el uso del agua instantánea significativamente mayores en invierno y la transpiración, eficiencia en el uso del agua intrínseca, densidad de flujo fotónico, temperatura de las acículas y déficit de presión de vapor significativamente mayores en verano.

Analizando el óptimo de temperatura para la fotosíntesis neta en las dos épocas diferenciadas del periodo de medida nos dimos cuenta, además, de que existían una diferencia entre este punto en verano e invierno (figuras 5.44 y 5.45). En verano presentan un óptimo de temperatura que ronda los 30 °C y en invierno está sobre los 25 °C, tanto para el nivel superior como para el nivel inferior.

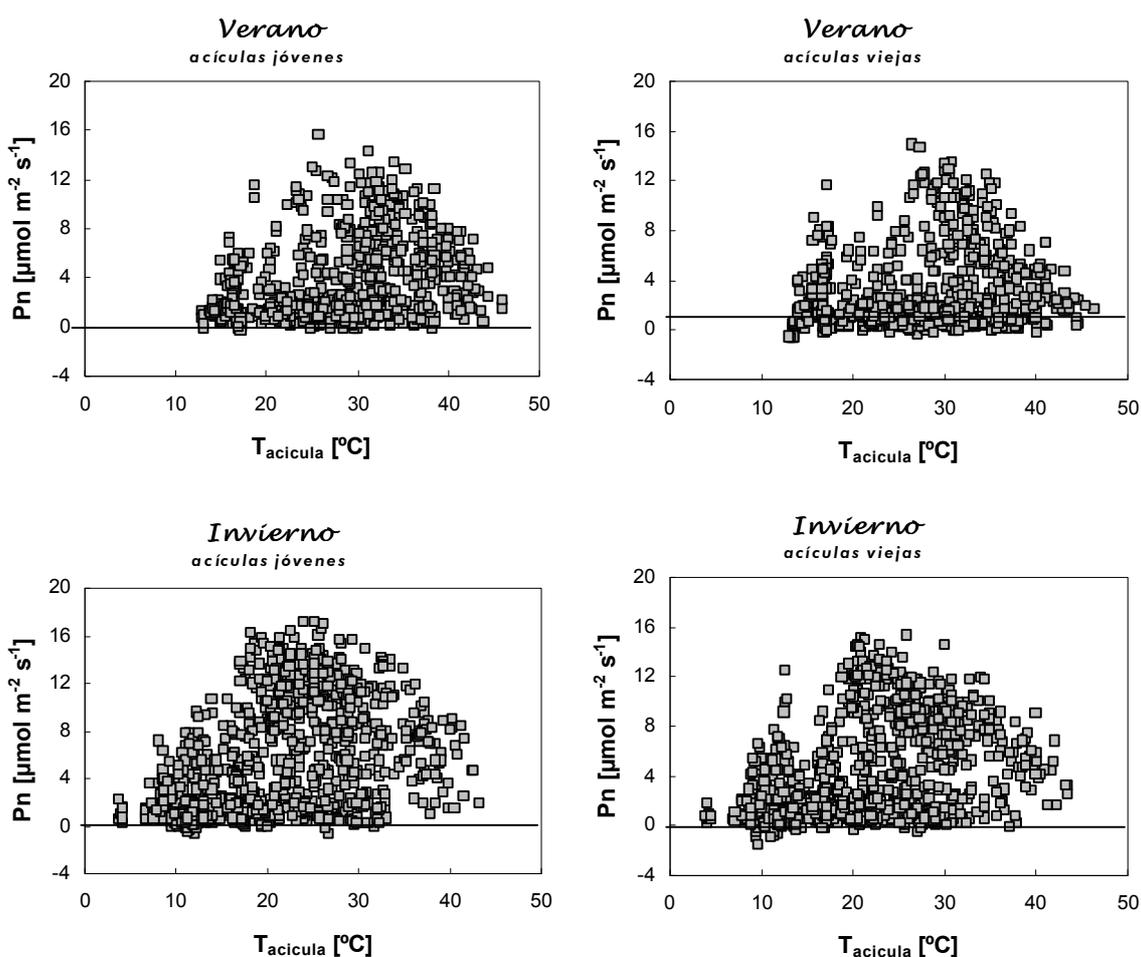


Figura 5.44. Desplazamiento del óptimo de temperatura para la fotosíntesis neta según la estación en acículas jóvenes y viejas en el nivel superior de la torre.

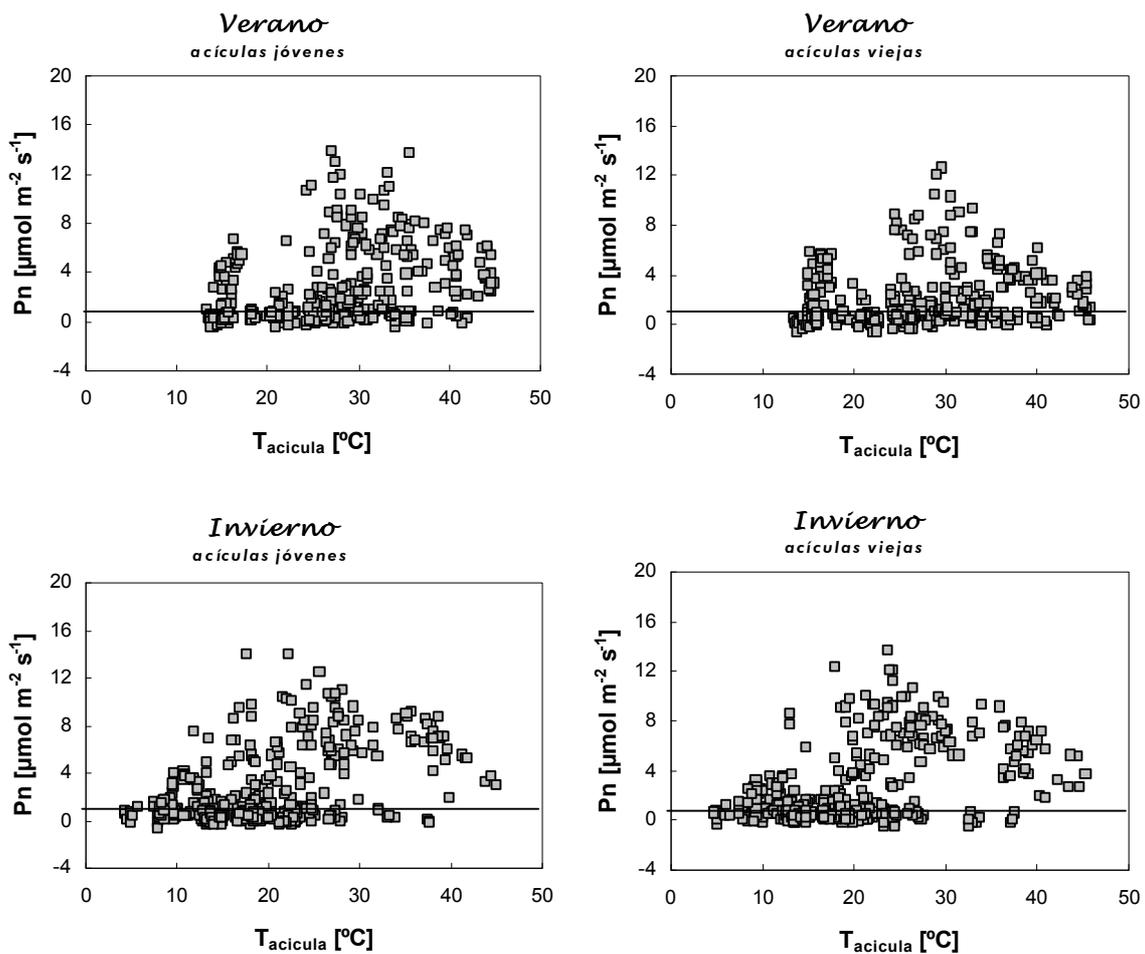


Figura 5.45. Desplazamiento del óptimo de temperatura para la fotosíntesis neta según la estación en las acículas jóvenes y viejas del nivel inferior de la torre.

En las figuras 5.46 y 5.47 podemos observar las tendencias de las concentraciones de clorofilas totales (clorofila a + clorofila b) y de la relación clorofila a/b, respectivamente, en acículas jóvenes y viejas del nivel superior de la torre (ni estas determinaciones ni las posteriores de fluorescencia de la clorofila se realizaron para las acículas del nivel inferior). Podemos observar como, en lo que se refiere a las clorofilas totales, la concentración es ligeramente superior en invierno, tanto en acículas jóvenes como en acículas viejas, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas, de modo que podemos decir que la tendencia real es a permanecer constante a lo largo del año. Lo mismo sucede con la concentración de clorofila a/b en ambos tipos de acículas, que experimenta un ligero descenso también en verano, pero que, no siendo estadísticamente significativa, podemos considerar que se mantiene a lo largo del periodo de

medida. Además, los valores obtenidos para acículas jóvenes y viejas son muy similares en ambos casos, aunque las acículas viejas poseen un contenido mayor en clorofilas totales y, en invierno una mayor relación clorofila a/b que las acículas jóvenes.

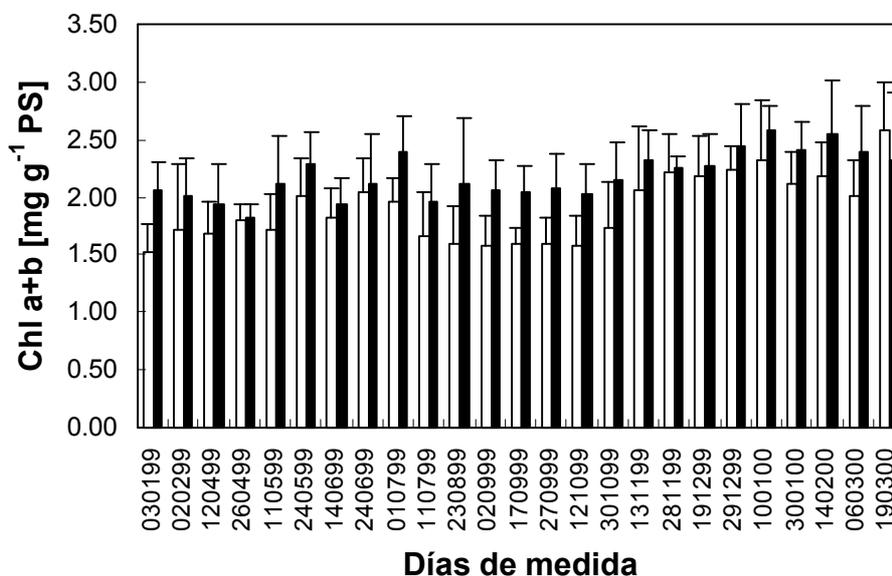


Figura 5.46. Variación de la concentración de clorofilas totales a lo largo del periodo de media en acículas jóvenes (barras blancas) y acículas viejas (barras negras) del nivel superior de la torre.

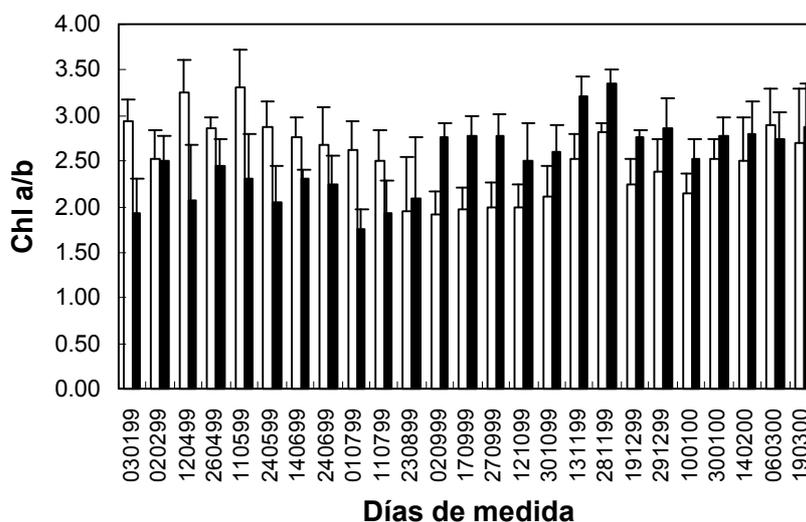


Figura 5.47. Variación de la relación clorofila a/b a lo largo del periodo de media en acículas jóvenes (barras blancas) y acículas viejas (barras negras) del nivel superior de la torre.

En la figura 5.48 podemos ver la tendencia del parámetro F_v/F_m de la fluorescencia de la clorofila antes del amanecer a lo largo del periodo de medida en las acículas jóvenes y viejas de la parte superior de la torre. Sobre todo en acículas viejas, los valores son ligeramente menos estables en invierno, aunque de nuevo no se detectaron diferencias estadísticamente significativas a lo largo del periodo de medida.

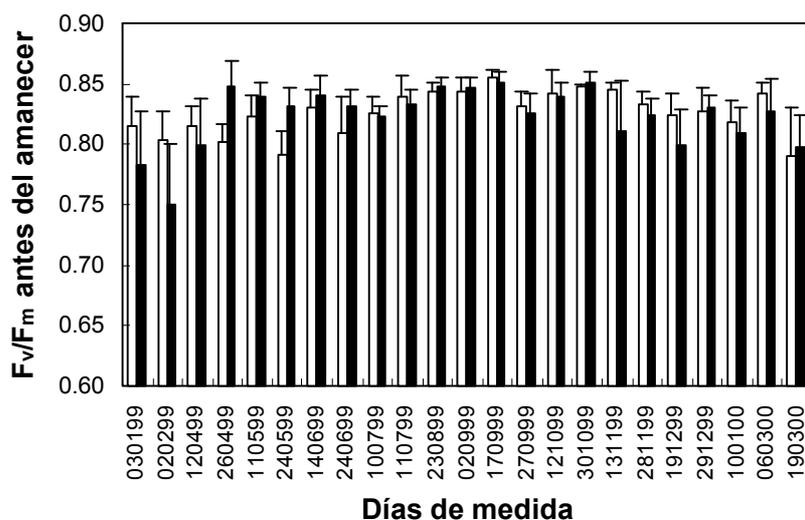


Figura 5.48. Variación de los valores de antes del amanecer del parámetro F_v/F_m de la fluorescencia de la clorofila durante el periodo de medida en las acículas jóvenes (barras blancas) y viejas (barras negras) del nivel superior de la torre.

5.4. DISCUSIÓN

5.4.1. Climatología del periodo de estudio

Gracias a los datos climáticos de la estación meteorológica (figura 5.2), podemos clasificar el periodo de medida en una estación más seca y cálida (verano) entre los meses de abril y septiembre de 1999, y una estación más húmeda y fría (invierno) que abarca desde enero hasta marzo de 1999 y desde octubre de 1999 hasta abril de 2000. Esta clasificación del periodo de medida ha sido clave para el análisis del resto de los resultados obtenidos en este capítulo.

Al analizar los cursos diarios hay que tener en cuenta que los datos de temperatura, DPV y PPF_D obtenidos en la estación meteorológica y los obtenidos por medio del IRGA no coincidieron plenamente, por ejemplo, la temperatura máxima obtenida durante el periodo de medida en la estación meteorológica fue de 28.75 °C el día 11 de julio de 1999, y la temperatura alcanzada a mediodía de este mismo día, medida gracias al IRGA, fue de 36.9 °C. Esto es lógico si tenemos en cuenta que los sensores de la estación meteorológica están siempre a la sombra y que los sensores del IRGA se encuentran acoplados a la cámara, generalmente, expuesta a la luz solar cuando medimos el intercambio gaseoso de las acículas.

Las diferencias observadas en el contenido hídrico del suelo entre las dos capas estudiadas (en superficie y a 10 centímetros de profundidad) (figura 5.3), se deben a que, dependiendo de las condiciones climatológicas, la capa de suelo más superficial se seca y se humedece más rápidamente que las capas más profundas. Por esta misma razón, las variaciones a lo largo del año son mucho menos acusadas a mayor profundidad que en la zona más superficial.

5.4.2. *Cursos diarios*

Las tendencias diarias de los parámetros de intercambio gaseoso, reflejadas en las figuras 5.5-29, son variadas según las condiciones de cada día. En general la P_n sigue la misma pauta que la PPF_D con un pico a mediodía, pero en condiciones extremas de alto DPV se observa como, después de un máximo en las primeras horas de la mañana, comienza a disminuir, pudiéndose considerar la existencia de la llamada depresión de mediodía. Este fenómeno se descubrió a principios del siglo XX y se han propuesto muchas hipótesis para explicarlo, como un mecanismo feedback producido por la acumulación de asimilados, el cierre estomático a las horas del mediodía, la inactivación enzimática o la disminución reversible de la actividad fotoquímica (fenómeno conocido como fotoinhibición) (Xu y Shen 1996).

La depresión de mediodía de la fotosíntesis se ha encontrado en plantas de zonas templadas (Hodges 1967; Dougherty y Hinckley 1981), en plantas de clima mediterráneo (Tenhunen y col. 1981; Pereira y col. 1986) y en árboles

tropicales (Medina y col. 1978; Zotz y col. 1995; Pathre y col. 1998; Ishida y col. 1999).

En condiciones naturales existen dos patrones típicos de curso diario fotosintético: uno en el que la tasa fotosintética alcanza un solo pico alrededor del mediodía y otro en el que la tasa fotosintética alcanza dos picos, uno por la mañana y otro por la tarde. En plantas que presentan una depresión de mediodía esta no ocurre necesariamente en todas las situaciones, de hecho, existen plantas que tienen cursos diurnos de dos picos en verano y de un pico en invierno (Schulze y Hall 1982). Cuando la depresión de mediodía es severa, puede que no aparezca el segundo pico de la tarde (Xu y Shen 1996).

El pino canario parece ajustarse al último patrón, mostrando una depresión severa en verano (los días 11 y 24 de mayo, 14 de junio, 1 y 11 de julio, 2 y 17 de septiembre y 28 de noviembre de 1999), puesto que los valores más altos de fotosíntesis neta se alcanzan siempre a primeras horas de la mañana y, después de una disminución al mediodía, estos no vuelven a recuperarse por la tarde.

Este efecto de depresión severa en verano parece deberse, principalmente, a una limitación estomática, presumiblemente por el alto DPV y la alta temperatura de las acículas en esta época del año. Los datos de fluorescencia de la clorofila, evaluados a través del parámetro F_v/F_m , corroboran esta hipótesis, puesto que si este parámetro llegara a ser muy bajo al mediodía podría estar indicando una posible fotoinhibición del fotosistema II debido a la alta radiación. Sin embargo, este parámetro varía sólo ligeramente a lo largo de los días de medida en verano. Demmig-Adams y col. (1989) observaron que la depresión de mediodía de la tasa fotosintética y de la conductancia estomática iban acompañadas por una disminución de F_v/F_m en *Arbutus unedo*, pero tampoco pudieron concluir de sus resultados que dicha reducción de la eficiencia fotoquímica fuera lo suficientemente severa como para limitar la fijación de CO_2 a alta luz. Exactamente lo mismo ocurre en el caso que nos ocupa.

Según Farquhar y Sharkey (1982) el cierre estomático se puede considerar una causa importante de la disminución de la tasa fotosintética de mediodía sólo cuando también decrece la concentración de CO_2 a nivel del mesófilo, esto se ha visto en trigo, soja, bambú y *Ginkgo biloba* (Xu y Shen 1996). En *Pinus canariensis* también hemos observado una disminución de los valores de C_i al mediodía, lo

cual nos hace suponer que realmente el cierre estomático es la causa principal de la depresión de mediodía que hemos podido observar en nuestro estudio.

Por lo general, la fotosíntesis en árboles es muy variable, oscilando su valor en condiciones naturales entre 3 y 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Ceulemans y Saugier 1991). Los valores de P_n máxima, cercanos a los 17 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtenidos para las acículas de *Pinus canariensis* estuvieron dentro del rango dado para especies arbóreas y fueron bastante altos comparados con la mayoría de las especies de coníferas, incluidas especies de *Pinus*, aunque estuvieron próximos a los valores alcanzados por algunas especies de pinos adaptadas a zonas de latitud similar como *Pinus densiflora* de Japón y *Pinus ponderosa* de California (tabla 5.III). Esto sugiere que las tasas fotosintéticas alcanzadas por las especies de pinos adaptadas a vivir en regiones subtropicales generalmente son más altas que las de las especies que viven en las regiones templadas del planeta. Este tipo de dependencia latitudinal de las máximas tasas fotosintéticas ya fue puesto de manifiesto por Luoma (1997), en sus investigaciones sobre *Pinus sylvestris* a lo largo de un gradiente latitudinal en Europa.

Tabla 5.III. Datos de fotosíntesis neta máxima en especies de pino estudiadas por diversos autores. La última columna de la tabla representa la manera de expresar la fotosíntesis en cada caso. Aunque varios autores afirman que para pasar la superficie total a área proyectada sólo es necesario dividir entre π (ver Raghavendra1991), debido a la variabilidad de los valores nosotros los hemos puesto tal y como están citados en su fuente original.

Especie	Pn [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	Investigadores	Método
<i>Pinus contorta</i>	2	Schoettle y Smith 1999	Área proyectada
	2-3	Higginbotham y col. 1985	Área proyectada
<i>Pinus taeda</i>	4	Will y Teskey 1997	Superficie total
	4-6	Fites y Teskey 1988	Área proyectada
	6	Teskey 1997	Superficie total
	6	Hymus y col. 1999	Superficie total
	6-7	Tissue y col. 1997	Superficie total
	7	Ellsworth y col. 1995	Superficie total
	7-8	Ellsworth 1999	Superficie total
<i>Pinus radiata</i>	5	Sheriff 1995	Área proyectada
	5-6	Laing y col. 2000	Superficie total
	6	Benett y Roock 1978	Área proyectada
	6-7	Hogan y col. 1996	Superficie total
	6-7	Mena-Petite y col. 2000	Área proyectada
	10	Küppers y col. 1987	---
	10	Walcroft y col. 1997	Área proyectada
	12	Hollinger 1987	Área proyectada
16	Benecke 1980		
<i>Pinus nigra</i>	6	Lebourgeois y col. 1998	Superficie total
<i>Pinus banksiana</i>	5-6	Sullivan y col. 1997	Área proyectada
	5-6	Tjoelker y col. 1998	Área proyectada
	6	Tan y Hogan 1995	Área proyectada
	6	Reich y col. 1998	Área proyectada
	13	Mohammed y col. 1998	Área proyectada
<i>Pinus strobus</i>	6	Reich y col. 1998	Área proyectada
	6-7	Elliott y Vose 1993	---
<i>Pinus halepensis</i>	6-8	El Aouni 1980	Área proyectada
<i>Pinus sylvestris</i>	8	Luoma 1997	---
	8	Kellomäki y Wang 1998	Área proyectada
	8	Vogg y col. 1998	Área proyectada
	12.5	Beadle y col. 1985	Área proyectada
	17	Troeng y Linder 1982	Área proyectada
<i>Pinus heldreichii</i>	11	Oleksyn y col. 1997	---
<i>Pinus pinaster</i>	12	Porté y Loustau 1998	Superficie total
<i>Pinus elliotii</i>	15	Byres y col. 1992	Área proyectada
<i>Pinus densiflora</i>	16-17	Kume y col. 2000	Área proyectada
<i>Pinus ponderosa</i>	15	Zhang y col. 1997	Área proyectada
	18	Hubbard y col. 1999	---

Los valores de transpiración para *Pinus canariensis* fueron muy altos (entre 5-6 mmol m⁻² s⁻¹) comparados con los observados para otras especies de coníferas siempreverdes (de 1-2 mmol m⁻² s⁻¹) (Larcher 1995).

Por su parte las tasas de conductancia estomática permanecieron dentro del rango normal dado por Körner (1994) y Larcher (1995) para especies de coníferas. Se han encontrado tasas de conductancia estomática muy similares en otras especies de pinos como: *Pinus sylvestris* (Kellomäki y Wang 1997 a, b y c), *Pinus banksiana* (Tan y Hogan 1995), *Pinus ponderosa* (Hubbard y col. 1999). También se han descrito tasas de conductancia estomática en pinos que alcanzaron valores más altos como las obtenidas para *Pinus banksiana* (Mohammed y col. 1998), de hasta 310 mmol m⁻² s⁻¹, o las dadas para *Pinus elliotii* (Byres y col. 1992), que rondaron los 500 mmol m⁻² s⁻¹.

El parámetro de eficiencia en el uso del agua intrínseca (Pn/Gs) fue mayor durante las horas del mediodía. Esto nos indica que las acículas son capaces de mantener una buena asimilación en los momentos de mayor demanda evaporativa, mediante modulaciones en la conductancia estomática.

Los valores de CHR mostraron una disminución de los valores medios al mediodía en verano, cuando los valores son, ya de por sí, más bajos que en invierno. En cualquier caso la media al mediodía no baja del 80% en ningún momento del periodo de medida (puesto que hemos representado los días extremos), manteniendo las acículas en todo momento un CHR relativamente alto, puesto que se ha visto que hasta el 70% de CHR la planta no muestra síntomas de estrés hídrico severo (Kaiser 1987; Chaves 1991; Cornic y Massacci 1996; Jiménez y col. 1999).

Los datos de fluorescencia de la clorofila, evaluados por medio del parámetro F_v/F_m, que está relacionado con la eficiencia fotoquímica del proceso fotosintético (Butler y Kitajama 1975), muestran que no existe evidencia de fotoinhibición debida a la radiación en ninguna de las dos épocas marcadas del periodo de medida. Los valores se mantienen por encima de 0.75 durante todo el día, excepto en las acículas viejas en el periodo seco, probablemente debido a que a estas acículas les afecta más un estrés añadido, como la alta radiación

acompañada de las altas temperaturas y el alto DPV, propios de esta época, puesto que están ya en fase de senescencia. De todas formas, se observa una recuperación de los valores de F_v/F_m por la tarde en todos los casos, lo que demuestra que no ha habido ningún daño permanente a nivel del aparato fotosintético.

Hemos de tener en cuenta, no obstante, que dada la posición de las acículas medidas, éstas no recibieron luz solar directa durante todo el día, por lo que no se excluye la posibilidad de que las acículas que sí la reciben puedan presentar valores más bajos de este parámetro, como se ha puesto de manifiesto en otros experimentos que están en curso de evaluación y no se incluyen en esta tesis.

5.4.3. Análisis global de los datos de intercambio gaseoso

5.4.3.1. Variación de la fotosíntesis neta con los parámetros ambientales y fisiológicos

Al comparar las envolventes de los datos globales de fotosíntesis neta frente a la PPFD de acículas jóvenes y viejas vemos que la tasa de Pn máxima es mayor en las primeras no variando notablemente el punto de saturación luminoso. Además, comparando los dos niveles de la torre observamos que las acículas del nivel superior poseen tasas de Pn más altas así como mayores PSL. La misma tendencia se observa al analizar estos datos por medio de las curvas optimizadas, con las que, además, se tiene una aproximación a los valores de PCL y respiración de oscuridad (Rd), siendo también notablemente más altos los del nivel superior y, en ambos niveles, los de las acículas jóvenes.

Está bien documentado que la respuesta a la luz de hojas desarrolladas a distintas intensidades luminosas es diferente (Givnish 1988; Larcher 1995). Evidentemente las acículas del nivel superior de la torre recibieron más luz durante su desarrollo y, consecuentemente, sus tasas de Pn, PSL, PCL y Rd son mayores que las de las acículas del nivel inferior.

Generalmente, las hojas adaptadas al sol con una respiración más intensa, necesitan más luz para alcanzar el punto de compensación luminoso (Larcher 1995) y son más efectivas usando la luz intensa debido a una mayor capacidad

del sistema de transporte de electrones y a una mayor actividad carboxilasa, alcanzando así tasas de fotosíntesis neta considerablemente mayores (Larcher 1995).

Los PCL de las acículas del nivel superior están próximos al límite superior de valores normales para ramas de sol de coníferas y los PSL entran dentro del rango normal de 150 a 1100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Larcher 1995).

En hojas de sol, generalmente, la curvatura de la respuesta de la fotosíntesis a la luz es más gradual, mientras que en hojas de sombra la curvatura es más aguda (Lambers y col. 2000). Esto se traduce en una mayor convexidad de la curva para las hojas de sombra que para las de sol, hecho que se cumple en nuestro caso.

Es conocido que las tasas de fotosíntesis cambian en relación con el desarrollo y el tipo de planta, dependiendo del ritmo individual y de la longevidad de las hojas (Larcher 1995). Las tendencias en cuanto a la edad de las acículas muestran que las acículas jóvenes poseen tasas fotosintéticas más altas que las viejas. Esto está de acuerdo con el hecho de que en las acículas de pino las tasas de fotosíntesis generalmente aumentan hasta que se alcanza la expansión total de las acículas, decreciendo posteriormente (Kozłowski y Pallardy 1996). Las acículas jóvenes habían alcanzado esta expansión, por lo que en las llamadas acículas viejas, con un año más, ya comienza a experimentarse un pequeño descenso. Lo mismo podríamos decir para la respiración de oscuridad, que se ve favorecida en las acículas jóvenes.

La tasa máxima de captura de CO_2 bajo condiciones óptimas de los factores ambientales se denomina capacidad fotosintética y es característica de grupos y especies de plantas (Larcher 1995). En condiciones naturales es muy difícil que una planta se encuentre bajo óptimas condiciones y no esté sometida a ningún tipo de estrés (Lambers y col. 2000). En el caso del pino canario el valor de la P_n máxima obtenida durante el periodo de estudio para acículas jóvenes de ambiente de sol fue de 17.4 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, de 15.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para acículas viejas de sol, de 12.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para acícula jóvenes menos expuestas y de 12.2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para acículas viejas menos expuestas. Sin embargo, no podemos decir que esta sea la capacidad fotosintética, ya que es posible que no hayan confluído todas las condiciones óptimas para la fotosíntesis en los días de

medida. En cualquier caso, dada la cantidad de medidas realizadas con diversas condiciones ambientales, los valores obtenidos estarán bastante próximos a dicha capacidad.

La fotosíntesis de plantas arbóreas puede tener lugar en un amplio rango de temperaturas, desde cerca del punto de congelación hasta por encima de los 40 °C. El rango específico depende de la especie, el genotipo, la edad y el origen de la planta y la estación (Kozlowski y Pallardy 1996). Por debajo del rango óptimo las tasas de las reacciones enzimáticas, asociadas principalmente con las reacciones de oscuridad, están limitadas por la temperatura. A altas temperaturas la reacción de oxigenación de la Rubisco es superior a la de carboxilación, de forma que la fotorrespiración se vuelve proporcionalmente más importante (Lambers y col. 2000).

Los datos globales de fotosíntesis neta frente a la temperatura de las acículas mostraron valores de óptimo de temperatura para la fotosíntesis sobre los 25 °C. Este valor se encuentra en el límite superior encontrado para coníferas siempre-verdes (10-25 °C) y en el inferior para árboles tropicales y subtropicales de hoja ancha y perenne (25-30 °C). Esto es lógico dado que la mayoría de las coníferas habitan en regiones de mayor latitud.

Se puede observar, en la respuesta de la fotosíntesis neta frente a la variación en el déficit de presión de vapor, que a partir de aproximadamente 20 mbar de DPV la fotosíntesis neta comienza a decrecer (figura 5.34). Esta respuesta es muy similar a la que ejerce el DPV sobre la G_s (figura 5.40), por lo que la influencia del DPV sobre la fotosíntesis neta está mediatizada por la G_s (figura 5.35). En esta última curva podemos ver que a valores de G_s por encima de 75 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en las acículas del nivel superior y de 60 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en las del nivel inferior, la fotosíntesis está saturada. Lo que significa que las acículas del nivel superior necesitan mayores tasas de conductancia para alcanzar la fotosíntesis máxima.

Un dato sorprendente ha sido el de los valores de concentración de CO_2 en el mesófilo de las acículas. Los valores por debajo de los 200 vpm suelen encontrarse en plantas con metabolismo C_4 , en las que existe una concentración de CO_2 en el ambiente en el que trabaja la Rubisco, propiciando mayores tasas

fotosintéticas y un gasto más acelerado del CO₂ que, de esta forma, ve mermada su concentración en el mesófilo más rápidamente. Sin embargo, en plantas C₃ no es usual observar valores tan bajos de C_i, debido a que la difusión del CO₂ no depende de restricciones de tipo enzimático como en las plantas C₄. Aun así, en especies en las que los estomas están especialmente adaptados a la escasez de agua, como en las coníferas, se han observado valores por debajo de los 100 vpm (Hällgren y col. 1990; Maier y Teskey 1992; Schwarz y col. 1997), que coinciden con los valores obtenidos para el pino canario en este trabajo.

Los momentos en los que se alcanzan las tasas fotosintéticas más altas, coinciden con los momentos en los que se obtienen los valores más bajos de concentración de CO₂ a nivel del mesófilo. Esto se debe a que, cuando las condiciones propician las mayores tasas de P_n, el CO₂ se incorpora más rápidamente al ciclo de Calvin. El CO₂, debido a las múltiples resistencias a su paso desde el aire circundante al interior del mesófilo, principalmente a causa de la particular anatomía estomática de esta especie, no se repone lo suficientemente rápido y su concentración dentro del mesófilo se reduce enormemente.

5.4.3.2. Variación de la transpiración y la conductancia frente a algunos parámetros ambientales

La transpiración muestra un aumento progresivo paralelo al aumento de la temperatura de las acículas, haciéndose máxima a una cierta temperatura disminuyendo a partir de este punto, como consecuencia del balance entre el cierre estomático y el aumento del DPV, alcanzándose los valores máximos en puntos similares para acículas jóvenes y viejas, estando un poco más retrasados los del nivel inferior, reflejando la modulación ejercida por el ambiente en el que se desarrollan las acículas. Similar tendencia se puede observar en relación con el DPV.

La conductancia no se ve limitada por la temperatura hasta que ésta alcanza valores por encima de los 30 °C en acículas del nivel superior y por encima de los 20-25 °C en las del nivel inferior, y por el DPV hasta valores por encima de los 25 mbar en acículas del nivel superior y de 10 mbar en el inferior, mostrando, nuevamente, la influencia del ambiente en el que se han desarrollado las acículas.

Porté y Loustau (1998) no encontraron un efecto significativo del régimen de luz sobre las características fotosintéticas en *Pinus pinaster*, al contrario que Leverenz y Jarvis (1979) que sí lo encontraron para *Picea sitchensis*. En el caso de *Pinus canariensis*, hemos encontrado diferencias claras entre las características de intercambio gaseoso de las acículas en los dos niveles diferentes que hemos estudiado en la torre. Aunque para hacer una comparación más correcta deberíamos comparar el régimen de luz de las acículas en los diferentes experimentos, que estará correlacionado con la estructura y el LAI (índice de área foliar), que en nuestra parcela es de 3.5 (Aboal y col. 2000; Luis 2000).

5.4.4. Variabilidad estacional

Del presente estudio se deduce que el pino canario, viviendo en su hábitat natural, es activo durante todo el año. Sus tasa fotosintéticas se mantuvieron relativamente altas a lo largo de todo el periodo de estudio, variando en relación con las condiciones meteorológicas de cada día de medida. Así, la tasa máxima para las acículas jóvenes del nivel superior se alcanzó el día 26 de abril de 1999 ($17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con luz saturante, temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (óptima), valores de DPV menores de 25 mbar, lo que se tradujo en una conductancia de $150 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El resto de los días no se alcanzó este valor de fotosíntesis neta, estando limitada por valores bajos de G_s , como resultado de altos valores de VPD (por encima de los 25 mbar), no siendo, en ningún caso, la luz la causa de esta disminución puesto que todos los días se registraron valores de PPFDF por encima del punto de saturación (figura 5.42). Las acículas viejas alcanzaron su máxima fotosíntesis el día 28 de noviembre de 1999 ($15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con similares condiciones ambientales. Para el nivel inferior las tasas máximas de fotosíntesis neta se alcanzaron en diferentes días, pero siempre bajo condiciones similares (figura 5.43).

A pesar de la alta variabilidad entre los diferentes días de medida, la estadística puso de manifiesto una diferencia según las estaciones. La media de las tasas máximas de P_n ($12.26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para acículas jóvenes y $10.33 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para viejas del nivel superior) en invierno fue superior a valores medios ($10.62 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $8.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en verano (tabla 5.II).

Sin embargo, es en invierno cuando otras coníferas de altas latitudes, como por ejemplo *Pinus sylvestris* (Ottander y Öquist 1991), *Pinus cembra* (Wieser 1997) o *Picea rubens* (Schaberg y col. 1998), presentan tasas de fotosíntesis neta muy bajas, de casi cero, desde el otoño hasta la primavera, debido al efecto combinado de las bajas temperaturas y la alta radiación. La luz produce fotoinhibición del fotosistema II y las heladas producen una inhibición de las etapas enzimáticas de la fotosíntesis. Esto no sucede en nuestro caso por razones evidentes, puesto que las temperaturas en el sitio de estudio nunca son tan bajas a lo largo del día como lo pueden llegar a ser en otras latitudes del planeta. De hecho, es en invierno cuando el pino canario alcanza sus mayores tasas de fotosíntesis neta, dado que en esta época desaparecen los efectos de la alta temperaturas de las acículas y el alto DPV que limita la conductancia estomática en verano.

A pesar de que los valores de P_n máxima para cada día se alcanzaron con tasas de transpiración elevadas (si las comparamos con las encontradas en otras coníferas, Larcher 1995), la P_n/E correspondiente, fue también alta debido a valores de P_n muy elevados.

Este parámetro P_n/E , que fue más bajo en verano, alcanzó valores más altos que los encontrados para otras especies de pino como *Pinus radiata* (Sheriff y Mattay 1995), *Pinus ponderosa* (Zhang y col. 1997), *Pinus banksiana* (Sullivan y col. 1997), *Pinus taeda* (Ellsworth 1999), árboles de la laurisilva como *Laurus azorica* (González-Rodríguez y col. 2001) o para plantas capaces de soportar bien un estrés de sequía moderado como el tagasaste (Martín-Olivera 2000). La eficiencia en el uso del agua intrínseca (expresada como P_n/G_s) tomó valores más altos durante el verano, muy superiores a los encontrados por Mohammed y col. (1998) para *Pinus banksiana*, Ellsworth y col. (1995) y Tissue y col. (1997) y Will y Teskey (1997) para *Pinus taeda*, Kellomäki y Wang (1997 a, b y c) para *Pinus sylvestris*, Tjoelker y col. (1998) para *Pinus banksiana*, Lebourgeois y col. (1998) para dos subespecies de *Pinus nigra* (ssp. Corsicana y ssp. Laricio), Ellsworth (1999) para *Pinus taeda*, Kume y col. (2000) para *Pinus densiflora*, Sheriff (1995); Sheriff y Mattay (1995) y Mena-Petite y col. (2000) para *Pinus radiata*, Kolb y Stone (2000) para *Pinus ponderosa*, Eastman y Camm (1995) para *Picea glauca*, Falge y col. (1996) y Kronfuss y col. (1998) para *Picea abies*, Major y Johnsen (1996) y Lamontagne y col. (2000) para *Picea mariana*, Day (2000) para

Picea rubens, González-Rodríguez (2001) para *Laurus azorica* y por Marín-Olivera (2000) para *Chamaecytisus proliferus*. Algunos árboles y arbustos mediterráneos, también muestran un aumento notable de esta relación durante el verano (Peñuelas y col. 1998; Flexas y col. 2001), aunque, por otra parte, Huc y col. (1994) encontraron en especies del bosque tropical lluvioso valores bajos de este parámetro, que se mantuvo más o menos constante o varió sólo ligeramente a lo largo del año. Las tendencias estacionales de P_n/G_s sugieren que el pino canario es capaz de aclimatarse a los periodos más secos, manteniendo tasas altas de fotosíntesis bajo periodos de presumible restricción hídrica.

Según los datos obtenidos, tanto para acículas jóvenes como para acículas viejas, existe un desfase en la respuesta de la fotosíntesis neta a la temperatura en las épocas de invierno y de verano del periodo de medida (figuras 5.44 y 5.45), esto ya fue descrito por Neilson y col. (1972) para *Sitka spruce* y por Taylor y Rowley (1971) para *Pinus taeda*, así como para diversas especies de árboles forestales (Pisek 1973). En estos casos, el óptimo de temperatura fue menor en invierno que en verano, igual que en el caso del pino canario. La respuesta de la fotosíntesis a la temperatura se ve influenciada por la temperatura de crecimiento, la edad de la hoja, la luz, el agua, el régimen de nutrientes... todos estos factores afectan a la tasa fotosintética bien directamente, o bien indirectamente debido a su efecto sobre la conductancia estomática.

Los datos de concentración de clorofilas totales no mostraron diferencias significativas a lo largo del año ni entre acículas jóvenes y viejas, oscilando los valores alrededor de los 2 mg de clorofilas totales por gramos de peso seco de la muestra vegetal. Tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la relación de clorofila a/b a lo largo del año en las acículas jóvenes y en las acículas viejas. Estos resultados nos muestran que las acículas no sufrieron un estrés oxidativo significativo a lo largo del periodo de medida, corroborado por el mantenimiento de altos valores de F_v/F_m de antes del amanecer. Estos valores, a lo largo del año, mostraron ser algo más bajos en invierno (próximos a 0.75), especialmente en acículas viejas. Esto se debe, posiblemente a un efecto de las bajas temperaturas, puesto que desde hace tiempo se ha comprobado su efecto sobre la fluorescencia de la clorofila

(Sutcliffe 1979). Este fenómeno se ve incrementado en acículas de mayor edad debido a que son acículas más sensibles a cualquier tipo de estrés añadido.

5.5. CONCLUSIONES

Los cursos diarios de P_n siguen la pauta marcada por la luz la mayoría de los días, sólo cuando el DPV es alto (correspondiendo, generalmente, con los días de verano), se produce una depresión severa de mediodía originada por una disminución de la conductancia estomática y no por causas metabólicas o de funcionamiento del aparato fotosintético.

Las acículas de *Pinus canariensis* son capaces de mantener una buena asimilación en los momentos de mayor demanda evaporativa, mediante modulaciones en la conductancia estomática. Esto se pone de manifiesto por valores mayores de eficiencia en el uso del agua intrínseca (P_n/G_s) al mediodía y, en general, en la época de verano.

Las tasas máximas de fotosíntesis neta ($17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se registraron en acículas de un año desarrolladas al sol. Este valor se encuentran en el límite superior de los encontradas para pinos en general, siendo similar a los de otros pinos de zonas subtropicales. El óptimo de temperatura para la fotosíntesis neta estuvo alrededor de los $25 \text{ }^\circ\text{C}$, con un ligero desplazamiento entre las dos épocas estudiadas. Este valor se encuentra en el límite superior encontrado para coníferas siempre-verdes y en el inferior para árboles tropicales y subtropicales de hoja ancha y perenne.

Las acículas del nivel superior presentaron tasas de fotosíntesis neta, respiración de oscuridad, PSL y PCL mayores que las del nivel inferior, lo que indica una aclimatación al diferente régimen lumínico al que han estado sometidas las acículas durante su desarrollo.

La fotosíntesis del pino canario permanece activa durante todo el año, variando en relación con las condiciones meteorológicas de cada día particular. No obstante, se pudo observar una clara estacionalidad, siendo mayores las tasas de fotosíntesis neta máxima en invierno que en verano y alcanzándose siempre bajo condiciones de luz saturante, temperatura dentro del 90% del rango óptimo (entre 20 y $30 \text{ }^\circ\text{C}$) y DPV por debajo de los 25 mbar.

Los valores de CHR (siempre superiores al 80%, incluso a mediodía) indican que las acículas no estuvieron sometidas a un estrés hídrico severo en ningún momento. Los datos de concentración de clorofilas y del parámetro F_v/F_m de antes del amanecer corroboran este hecho.

5.6. BIBLIOGRAFÍA

- ABOAL, J.R., M.S. JIMÉNEZ, D. MORALES y P. GIL (2000). Effects of thinning on throughfall in Canary Islands pine forest – the role of fog. *Journal of Hydrology*. 238: 218-230.
- ARNETH, A., F.M. KELLIHER, T.M. MCSEVENY y J.N. BYERS (1998). Fluxes of carbon and water in a *Pinus radiata* forest subject to soil water deficit. *Australian Journal of Plant Physiology*. 25: 557-570.
- ARNON, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*. 24: 1-15.
- ATTIWILL, P.M. y R.N. CROMER (1982). Photosynthesis and transpiration of *Pinus radiata* D. Don under plantation conditions in southern Australia. I. Response to irrigation with waste water. *Australian Journal of Plant Physiology*. 9: 749-760.
- BEADLE, C.L., R.E. TALBOT, R.E. NEILSON y P.G. JARVIS (1985). Stomatal conductance and photosynthesis in a mature Scots pine forest. III. Variation in canopy conductance and canopy photosynthesis. *Journal of Applied Ecology*. 22: 587-595.
- BENECKE, U. (1980). Photosynthesis and transpiration of *Pinus radiata* D. Don under natural conditions in a forest stand. *Oecologia (Berlin)*. 44: 192-198.
- BENNETT, K.J. y D.A. ROOK (1978). Stomatal and mesophyll resistances in two clones of *Pinus radiata* D. Don known to differ in transpiration and survival rate. *Australian Journal of Plant Physiology*. 5: 231-238.
- BUTLER, W.L. y M. KITAJAMA (1975). A tripartite model for chloroplast fluorescence. En: *Proceedings of the 3rd International Congress on Photosynthesis*. M. Avron, editor. Elsevier. Amsterdam. Pp. 13-24.
- BYRES, D.P., J.D. JONSON y T.J. DEAN (1992). Seasonal response of slash pine (*Pinus elliotii* var. *elliotti* Engelm.) photosynthesis to long-term exposure to ozone and acidic precipitation. *New Phytologist*. 122: 91-96.

- CHAVES, M.M. (1991). Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*. 42: 1-16.
- CEULEMANS, P.J. y B. SAUGIER (1991). Photosynthesis. En: *Physiology of trees*. A.S. Raghavendra, editor. Wiley-Interscience. Nueva York. Pp 21-50.
- CHEESEMAN, J.M., B.F. Clough, D.R. Carter, C.E. Lovelock, O.J. Eong y R.G. Sim (1991). The analysis of photosynthetic performance in leaves under field conditions-a case study using *Bruguiera mangroves*. *Photosynthesis Research*. 29: 11-22.
- CHEESEMAN, J.M., y M. LEXA (1996). Gas exchange: models and measurements. *Advances in Photosynthesis*. En: *Photosynthesis and the Environment*. Volumen 5. N.R. Baker, editor. Publicaciones: Kluwer Academic Publishers. Pp 223-240.
- CORNIC, G. y A. MASSACCI (1996). Leaf photosynthesis under drought stress. En: *Photosynthesis and the Environment*. Volumen 5. N.R. Baker, editor. Publicaciones: Kluwer Academic Publishers. Pp 347-366.
- DAY, M.E. (2000). Influence of temperature and leaf-to-air pressure deficit on net photosynthesis and stomatal conductance in red spruce (*Picea rubens*). *Plant Physiology*. 20: 57-63.
- DEMMIG-ADAMS, B., W.W. ADAMS III, K. WINTER, A. MEYER, U. SCHREIBER, J.S. PEREIRA, A. KRÜGER, F.-C. CZYGAN y O.L. LANGE (1989). Photochemical efficiency of photosystem II, photon yield of O₂ evolution, photosynthetic capacity, and carotenoid composition during the midday depression of net CO₂ uptake in *Arbutus unedo* growing in Portugal. *Planta*. 177: 377-387.
- DOUGHERTY, W.J.S. y T.M. HINCKLEY (1981). The influence of severe drought on net photosynthesis of white oak (*Quercus alba*). *Canadian Journal of Botany*. 59: 335-341.
- EASTMAN, P.A.K. y E.L. CAMM (1995). Regulation of photosynthesis in interior spruce during water stress: changes in gas exchange and chlorophyll fluorescence. *Tree Physiology*. 15: 229-235.
- EL AOUNI, (1980). Preactus determinant la production du pin d'Alep (*Pinus halepensis*): Photosynthèse, croissance et repartition des assimilats. Tesis doctoral de la Universidad de París.
- ELLIOTT, K.J. y J.M. VOSE (1993). Site preparation burning to improve southern Appalachian pine-hardwood stands: photosynthesis, water relations, and

- growth of planted *Pinus strobus* during establishment. Canadian Journal of Forest Research. 23: 2278-2285.
- ELLSWORTH, D.S. (1999). CO₂ enrichment in a maturing pine forest: are CO₂ exchange and water status in the canopy affected?. Plant, Cell and Environment. 22: 461-472.
- ELLSWORTH, D.S., R. OREM, C. HUANG, N. PHILLIPS y G.R. HENDREY (1995). Leaf and canopy responses to elevated CO₂ in a pine forest under free-air CO₂ enrichment. Oecologia. 104: 139-146.
- FALGE, E., W. GRABER, R. SIEGWOLF y J.D. TENHUNEN (1996). A model of gas exchange response of *Picea abies* to habitat conditions. Trees. 10: 277-287.
- FARQUHAR, G.D. y T.D. SHARKEY (1982). Stomatal conductance and photosynthesis. Annual Review of Plant Physiology. 33: 317-345.
- FITES, J.A. y R.O. TESKEY (1988). CO₂ and water vapour exchange of *Pinus taeda* in relation to stomatal behaviour: Test of an optimisation hypothesis. Canadian Journal of Forest Research. 18: 150-157.
- FLEXAS, J., J. GULÍAS, S. JONASSON, M. MUS y H. MEDRANO (2001). Seasonal patterns and control of gas exchange in local populations of the Mediterranean evergreen shrub *Pistacia lentiscus* L. Acta Oecologica. (enviado).
- GAVAZZI, M., J. SEILER, W. AUST y S. ZEDAKER (2000). The influence of elevated CO₂ and water availability on herbaceous weed development and growth of transplanted loblolly pine (*Pinus taeda*). Environmental and Experimental Botany. 44 (3): 185-194.
- GIVNISH, T.J. (1988). Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective. Australian Journal of Plant Physiology. 15: 63-92.
- GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A.M., D. MORALES y M.S. JIMÉNEZ (2001). Gas exchange characteristics of a Canarian laurel forest tree species (*Laurus azorica*) in relation to environmental conditions and leaf canopy position. Tree Physiology (en prensa).
- HÄLLGREN, J.-E., T. LUNDMARK y M. STRAND (1990). Photosynthesis of Scots pine in the field after night frost during summer. Plant Physiol. Biochem. 28 (4): 437-445.
- HIGGINBOTHAM, K.O., J.M. MAYO, S. L'HIRONDELLE y D.K. KRYSIOFIK (1985). Physiological ecology of lodgepole pine (*Pinus contorta*) in an

- enriched CO₂ environment. Canadian Journal of Forest Research. 15: 417-421.
- HODGES, J.D. (1967). Patterns of photosynthesis under natural environmental conditions. Ecology. 48: 234-242.
- HOGAN, K.P., D. WHITEHEAD, J. KALLARACKAL, J.G. BUWALDA, J. MEEKINGS y G.N.D. ROGERS (1996). Photosynthetic activity of leaves of *Pinus radiata* and *Nothofagus fusca* after 1 year of growth at elevated CO₂. Australian Journal of Plant Physiology. 23: 623-630.
- HOLLINGER, D.Y. (1987). Gas exchange and dry matter allocation responses to elevation of atmospheric CO₂ concentration in seedlings of three species. Tree Physiology. 3: 193-202.
- HYMUS, G.J., D.S. ELLSWORTH, N.R. BAKER y S.P. LONG (1999). Does free-air carbon dioxide enrichment affect photochemical energy use by evergreen trees in different seasons? A chlorophyll fluorescence study of mature loblolly pine. Plant Physiology. 120: 1183-1191.
- HUBBARD, R.M., B.J. BOND y M.G. RYAN (1999). Evidence that hydraulic conductance limits photosynthesis in old *Pinus ponderosa* trees. Tree Physiology. 19: 165-172.
- HUC, R., A. FERHI y J.M. GUEHL (1994). Pioneer and late stage tropical rainforest tree species (French Guiana) growing under common conditions differ in leaf gas exchange regulation, carbon isotope discrimination and leaf water potential. Oecologia. 99: 297-305.
- ISHIDA, A., T. TOMA y MARJENAH (1999). Limitation of leaf carbon gain by stomatal and photochemical processes in the top canopy of *Macaranga conifera*, a tropical pioneer tree. Tree Physiology. 19: 467-473.
- JARVIS, P.G. y A.P. SANDFORD (1986). Temperate forests. En: Photosynthesis in contrasting Environments. N.R. Baker y S.P. Long, editores. Elsevier Science Publishers B.V. Países Bajos. Pp 199-236.
- JIMÉNEZ, M.S. (1996). Fotosíntesis en árboles. En: Tendencias en Ecofisiología Vegetal. D. Morales Méndez, editor. Universidad de La Laguna. Vicerrectorado de Investigación. Pp 31-51.
- JIMÉNEZ, M.S., A.M. González-Rodríguez y D. Morales (1999). Effect of dehydration on photosynthetic apparatus of sun and shade leaves of laurel forest trees. Zeitschrift für Naturforschung. 54c: 704-710.

- KAIPIAINEN, L.K., G.I. SOFRONOVA, P. HARI y E.E. YALYNSKAYA (1998). The role of xylem in CO₂ exchange in *Pinus sylvestris* woody stems. Russian Journal of Plant Physiology. 45: 500-505.
- KAISER, W.M. (1987). Effect of water deficit on photosynthetic capacity. Physiologia Plantarum. 71: 142-149.
- KELLOMÄKI, S. y K.-Y. WANG (1997a). Photosynthetic responses of Scots pine to elevated CO₂ and nitrogen supply: results of a branch-in-bag experiment. Tree Physiology. 17: 231-240.
- KELLOMÄKI, S. y K.-Y. WANG (1997b). Effects of elevated O₃ and CO₂ concentrations on photosynthesis and stomatal conductance in Scots pine. Plant, Cell and Environment. 20: 995-1006.
- KELLOMÄKI, S. y K.-Y. WANG (1997c). Effects of elevated O₃ and CO₂ on chlorophyll fluorescence and gas exchange in Scots pine during the third growing season. Environmental pollution. 97 (1-2): 17-27.
- KELLOMÄKI, S. y K.-Y. WANG (1998). Daily and seasonal CO₂ exchange in Scots pine grown under elevated O₃ and CO₂: experiment and simulation. Plant Ecology. 136: 229-248.
- KOLB, T.E. y J.E. STONE (2000). Differences in leaf gas exchange and water relations among species and tree sizes in an Arizona pine-oak forest. Tree Physiology. 20: 1-12.
- KÖRNER, Ch. (1994). Leaf diffusive conductances in the major vegetation types of the globe. En: Ecophysiology of Photosynthesis. E.-D. Schulze y M. M. Caldwell, editores. Springer- Verlag. Pp 463-490.
- KOZLOWSKI, T.T. y S.G. PALLARDY (1996). Photosynthesis. En: Physiology of Woody Plants. Segunda edición. Academic Press. San Diego. Londres. Boston. Nueva York. Sidney. Tokio. Toronto. Pp 87-132.
- KRONFUSS, G., A. Polle, M. Tausz, W.M. Havranek, G. Wieser (1998). Effect of ozone and mild drought stress on gas exchange, antioxidants and chloroplast pigments in current-year needles of young Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst]. Trees. 12: 482-489.
- KUME, A.N. TSUBOI, T. SATOMURA, M. SUZUKI, M. CHIWA, K. NAKANE, N. SAKURAI, T. HORIKOSHI y H. SAKUGAWA (2000). Physiological characteristics of Japanese red pine, *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc., in declined forests at Mt. Gokurakuli in Hiroshima Prefecture, Japan. Tress. 14: 305-311.

- KÜPPERS, M., A.G. SWAN, D. TOMPKINS, W.C.L. GABRIEL, B.I.L. KÜPPERS, y S. LINDER (1987). A field portable system for measurement of gas exchange of leaves under natural and controlled conditions: Examples with field-grown *Eucalyptus pauciflora* Sieb. ex Spreng. Ssp. *pauciflora*, *E. behriana* F. Muell. and *Pinus radiata* D. Don. *Plant, Cell and Environment*. 10: 425-435.
- LAING, W., D. GREER, O. SUN, P. BEETS, A. LOWE y T. PAYN (2000). Physiological impacts of Mg deficiency in *Pinus radiata*: growth and Photosynthesis. *New Phytologist*. 146(1): 47-57.
- LAMBERS, H., F.S. CHAPIN III y T.L. PONS (2000). Photosynthesis, Respiration and Long-Distance Transport. En: *Plant Physiological Ecology*. Springer-Verlag. Nueva York. Berlin. Heidelberg. Barcelona. Hong Kong. London. Milan. Paris. Singapore. Tokyo. Pp. 10-152.
- LAMONTAGNE, M., F.J. BIGRAS III y H.A. MARGOLIS (2000). Chlorophyll fluorescence and CO₂ assimilation of black spruce seedlings following frost in different temperature and light conditions. *Tree Physiology*. 20: 249-255.
- LARCHER, W. (1969). The effect of environmental and physiological variables on the carbon dioxide gas exchange of trees. *Photosynthetica*. 3: 167-198.
- LARCHER, W. (1992). Basi ecofisiologiche della produttività dei boschi. *Italia forestale e Montana*. 4: 173-190.
- LARCHER, W. (1995). *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. Nueva York. Quinta edición. 506 pp.
- LEBOURGEOIS, F., G. LÉVY, G. AUSSENAC, B. CLERC y F. WILLM (1998). Influence of soil drying on leaf water potential, photosynthesis, stomatal conductance and growth in two black pine varieties. *Annales des Sciences Forestiere*. 55: 287-299.
- LEVERENZ, J.W. y P.G. JARVIS (1979). Photosynthesis in Sitka spruce. VIII. The effect of light flux density and direction on rate of net photosynthesis and the stomatal conductance of needles. *Journal of Applied Ecology*. 16: 919-932.
- LU, P., P. BIRON, N. BRÉDA y A. GRANIER (1995). Water relations of adult Norway spruce (*Picea abies* (L) Karst) under soil drought in the Vosges mountains: water potential, stomatal conductance and transpiration. *Annales des Sciences Forestiere*. 52: 117-129.

- LUIS, V.C. (2000). Influencia de la luz en el crecimiento y supervivencia de las plántulas de *Pinus canariensis*. Tesis de licenciatura de la Universidad de La Laguna. 93 pp.
- LUOMA, S. (1997). Geographical pattern in photosynthesis light response of *Pinus sylvestris* in Europe. *Functional Ecology*. 11: 273-281.
- MAIER, C.A. y R.O. TESKEY (1992). Internal and external control of net photosynthesis and stomatal conductance of mature eastern white pine (*Pinus strobus*). *Canadian Journal of Forest Research*. 22: 1387-1394.
- MAJOR, J.E. y K.H. JOHNSEN (1995). Family variation in photosynthesis of 22-year-old black spruce: a test of two models of physiological response to water stress. *Canadian Journal of Forest Research*. 26: 1922-1933.
- MARTIN, T.A., K.J. BROWN, J. CERMÁK, R. CEULEMENS, J. KUCERA, F.C. MEINZER, J.S. ROMBOLD, D.G. SRUGEL y T.M. HINCKLEY (1996). Crown conductance and tree and stand transpiration in a second-growth *Abies amabilis* forest. *Canadian Journal of Forest Research*. 27: 797-808.
- MARTÍN-OLIVERA, A. (2000). Caracterización fotosintética del tagasaste (*Chamaecytisus proliferus* (L. fil.) Link ssp. *proliferus* var. *palmensis* (Christ)) en condiciones naturales. Tesis de licenciatura de la Universidad de La Laguna. 82 pp.
- MASAROVICOVÁ, E. y P. ELIAS (1986). Photosynthetic rate and water relations in some forest herbs in spring and summer. *Photosynthetica*. 20 (2): 187-195.
- MEDINA, E., M. SOBRADO y R. HERRERA (1978). Significance of leaf orientation for leaf temperature in an Amazonian sclerophyll vegetation. *Radiation and Environmental Biophysics*. 15: 131-140.
- MENA-PETITE, A., B. GONZÁLEZ-MORO, C. GONZÁLEZ-MURIA, M. LACUESTA y A. MUÑOZ-RUEDA (2000). Sequential effects of acid precipitation and drought on photosynthesis and chlorophyll fluorescence parameters of *Pinus radiata* D. Don seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 156: 84-92.
- MOHAMMED, G.H., T.L. NOLAND y R.G. WAGNER (1998). Physiological perturbation in jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) in the presence of competing herbaceous vegetation. *Forest Ecology and Management*. 103: 77-85.
- MURTHY, R., S.J. ZARNOCH y P.M. DOUGHERTY (1997). Seasonal trends of light-saturated net photosynthesis and stomatal conductance of loblolly pine

- trees grown in contrasting environments of nutrition, water and carbon dioxide. *Plant, Cell and Environment*. 20: 558-568.
- NEILSON, R.E., M.M LUDLOW y P.G. JARVIS (1972). Photosynthesis in Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) II. Response to temperature. *Journal of Applied Ecology*. 9: 721-745.
- OLEKSYN, J., M.G. TJOELKER, G. LORENC-PLUCINSKA, A. KONWINSKA, R. ZYTKOWIAK, P. KAROLEWSKI y P.B. REICH (1997). Needle CO₂ exchange, structure and defense traits in relation to needle age in *Pinus heldreichii* Christ- a relict of Tertiary flora. *Trees*. 12: 82-89.
- OTTANDER, C. y G. ÖQUIST (1991). Recovery of photosynthesis in winter-stressed Scots pine. *Plant Cell and Environment*. 14: 345-349.
- PATHRE, U., A.K. SINHA, P.A.. SHIRKE, y P.V. SANE (1998). Factors determining the midday depression of photosynthesis in trees under monsoon climate. *Trees*. 12: 472-481.
- PEÑUELAS, J., I. FILELLA, J. LLUSIÁ, D. SISCART y J. PIÑOL (1998). Comparative field study of spring and summer leaf gas exchange and photobiology of the Mediterranean trees *Quercus ilex* and *Phillyrea latifolia*. *Journal of Experimental Botany*. 49: 229-238.
- PEREIRA, J.S., J.D. TENHUNEN, O.L. LANGE, W. BEYSCHLAG, A. MEYER, y M.M. DAVID (1986). Seasonal and diurnal patterns in leaf gas exchange of *Eucalyptus globulus* trees growing in Portugal. *Canadian Journal of Forest Research*. 16: 177-184.
- PISEK, A. (1973). Photosynthesis. En: *Temperature and life*. H.Precht, J. Christophersen, H. Hensel, W. Larcher, editores. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. Nueva York. Pp. 102-127.
- PORTÉ, A. y D. LOUSTAU (1998). Variability of the photosynthetic characteristics of mature needles within the crown of a 25-year-old *Pinus pinaster*. *Tree Physiology*. 18: 223-232.
- PRIOUL, J.L. y P. CHARTIER (1977). Partitioning of transfer and carboxylation components of intercellular resistance to photosynthetic CO₂ fixation: A critical analysis of the methods used. *Annals of Botany*. 41: 789-800.
- RADOGLOU, K. y R.O. TESKEY (1997). Changes in rates of photosynthesis and respiration during needle development of loblolly pine. *Tree Physiology*. 17: 485-488.

- RAGHAVENDRA, A.S. (1991). Photosynthesis. En: Physiology of trees. A.S. Raghavendra, editor. Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, Inc. Pp 21-50.
- REICH, P.B., J. OLEKSYN y M.G. TJOELKER (1996). Needle respiration and nitrogen concentration in Scots pine populations from a broad latitudinal range: a common garden test with field-grown trees. *Functional Ecology*. 10: 768-776.
- REICH, P.B., M.B. WALTERS, M.G. TJOELKER, D. VANDERKLEN y C. BUSCHENA (1998). Photosynthesis and respiration rates depend on leaf and root morphology and nitrogen concentration in nine boreal tree species differing in relative growth rate. *Functional Ecology*. 12: 395-405.
- ROBERNTZ, P. y J. STOCKFORS (1998). Effects of elevated CO₂ concentration and nutrition on net photosynthesis, stomatal conductance and needle respiration of field-grown Norway spruce trees. *Tree Physiology*. 18: 233-241.
- SCHABERG, P.G., J.B. SHANE, P.F. CALI, J.R. DONNELLY y G.R. STRIMBECK (1998). Photosynthetic capacity of red spruce during winter. *Tree Physiology*. 18: 271-276.
- SCHOETTLE, A.W. y W. K. Smith (1999). Interrelationships among light, photosynthesis and nitrogen in the crown of mature *Pinus contorta* ssp. *latifolia*. *Tree Physiology*. 19: 13-22.
- SCHULZE, E.D. (1982). Plant life form and their carbon, water and nutrient relations. En: *Physiological Plant Ecology. Encyclopedia of Plant Physiology*. O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond y H. Ziegler, editores. New Series. Volumen 12/B. Segunda edición. Springer-Verlag. Berlin. Nueva York. Pp: 615-676.
- SCHULZE, E.D. y A.E. HALL (1982). Stomatal responses, water loss and CO₂ assimilation rates of plants in contrasting environments. En: *Encyclopedia of Plant Physiology. Physiological Plant Ecology II. Water relations and carbon assimilation*. O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond y H. Ziegler, editores. New Series. Volumen 12/B. Segunda edición. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. Nueva York. Pp: 118-230.
- SCHWARTZ, P.A., T.J. FAHEY y T.E. DAWSON (1997). Seasonal air and soil temperature effects on photosynthesis in red spruce (*Picea rubens*) saplings. *Tree Physiology*. 17: 187-194.

- SELLIN, A. (1996). Base water potential of *Picea abies* as a characteristic of the soil status. *Plant and Soil*. 184: 273-280.
- SELLIN, A. (1997). Variation in shoot status of *Picea abies* (L.) trees with different life histories. *Forest Ecology and Management*. 97: 53-62.
- SHERIFF, D.W. (1995). Gas exchange of field-grown *Pinus radiata*-Relationships with foliar nutrition and water potential and with climatic variables. *Australian Journal of Plant Physiology*. 22: 1015-1026.
- SHERIFF, D.W. y J.P. MATTAY (1995). Simultaneous effects of foliar nitrogen, temperature and humidity on gas exchange in *Pinus radiata*. *Australian Journal of Plant Physiology*. 22: 615-626.
- SHERIFF, D.W. y D.A. ROOK (1990). Wood density and above-ground growth in high and low density clones of *Pinus radiata* D. Don. *Australian Journal of Plant Physiology*. 17: 615-628.
- SQUIRE, R.O., T.F. NEALES, B.R. LOVEYS y P.M. ATTIWILL (1988). The influence of water deficits on needle conductance, assimilation rate and abscisic acid concentration of seedlings of *Pinus radiata* D. Don. *Plant, Cell and Environment*. 11: 13-19.
- STEWART, J.D. y P.Y. BERNIER (1995). Gas exchange and water relations of 3 sizes of containerised *Picea mariana* seedlings subjected to atmospheric and edaphic water stresses under controlled conditions. *Annales des Science Forestiere*. 52: 1-9.
- STRAND, M. (1995). Persistent effects of low concentrations of SO₂ and NO₂ on photosynthesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*) needles. *Physiologia Plantarum*. 95: 581-590.
- SULLIVAN, J.H., B.D. BOVARD y E.M. MIDDLETON (1997). Variability in leaf-level CO₂ and water fluxes in *Pinus banksiana* and *Picea mariana* in Saskatchewan. *Tree Physiology*. 17: 553-561.
- SUTCLIFFE, J. (1979). *Las plantas y la temperatura*. Cuadernos de biología. Ediciones Omega. 63 pp.
- TAN, W. y T.J. BLAKE (1997). Gas exchange and water relations responses to drought of fast- and slow-growing black spruce families. *Canadian Journal of Botany*. 75: 1700-1706.
- TAN, W. y G.D. HOGAN (1995). Limitations to net photosynthesis as affected by nitrogen status in jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) seedlings. *Journal of Experimental Botany*. 46 (285): 407-413.

- TAYLOR, A.O. y J.A. ROWLEY (1971). Plants under climatic stress. I. Low temperature, high light effects on photosynthesis. *Plant Physiology*. 47: 713-718.
- TENHUNEN, J.D., O.L. LANGE y M. BRAUN (1981). Midday stomatal closure in Mediterranean type sclerophylls under stimulated habitat conditions in an environmental chamber. II Effect on the complex of leaf temperature and air humidity on gas exchange of *Arbutus unedo* and *Quercus ilex*. *Oecologia*. 50: 5-11.
- TESKEY, R.O., C.C. GRIER y T.M. HINCKLEY (1994). Changes in photosynthesis and water relations with age and season in *Abies amabilis*. *Canadian Journal of Forest Research*. 14: 77-84.
- TESKEY, R.O. (1997). Combined effects of elevating CO₂ and air temperature on carbon assimilation of *Pinus taeda* trees. *Plant, Cell and Environment*. 20: 373-380.
- THOMPSON, W.A. y A.M. WHEELER (1992). Photosynthesis by mature needles of field-grown *Pinus radiata*. *Forest Ecology and Management*. 52: 225-242.
- TISSUE, D.T., R.B. THOMAS y B.R. STRAIN (1997). Atmospheric CO₂ enrichment increases growth and photosynthesis of *Pinus taeda*: a 4 year experiment in the field. *Plant, Cell and Environment*. 20: 1123-1134.
- TJOELKER, M.G. (1997). Acclimation in plant growth and its determinants to elevated carbon dioxide and temperature: Interspecific variation among five boreal tree species. Tesis doctoral de la Universidad de Minnesota, Minneapolis. 178 pp.
- TJOELKER, M.G., J. OLEKSYN y P.B. REICH (1998). Seedlings of five boreal tree species differ in acclimation of net photosynthesis to elevated CO₂ and temperature. *Tree Physiology*. 18: 715-726.
- TROENG, E. y S. LINDER (1982). Gas-exchange in a 20-years old stand of Scots pine. *Physiologia Plantarum* 54: 7-14.
- TSELNIKER, Y.L. y I.S. MALKINA y M.D. KORZUKHIN (1998). Application of generalized Rabinowitch model to analysis of *Picea abies* photosynthesis as a function of light, temperature, and humidity. *Russian Journal of Plant Physiology*. 45 (4): 601-613.
- VOGG, G., R. HEIM, J. HANSEN, C. SCHÄFER y E. BECK (1998). Frost hardening and photosynthetic performance of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles.

- I. Seasonal changes in the photosynthetic apparatus and its function. *Planta*. 204: 193-200.
- WALCROFT, A.S., D. WHITEHEAD, W.B. SILVESTER y F.M. KELLIHER (1997). The response of photosynthetic model parameters to temperature and nitrogen concentration in *Pinus radiata* D. Don. *Plant, Cell and Environment*. 20: 1338-1348.
- WIESER, G. (1997). Carbon dioxide gas exchange of cembra pine (*Pinus cembra*) at the alpine timberline during winter. *Tree Physiology*. 17: 473-477.
- WIESER, G., W.M. HAVRANEK, M. LOIDOLDT-NAGELE, G. KRONFUSS y A. POLLE (1998). Responses of photosynthesis, carbohydrates and antioxidants in needles of Norway spruce to slow and rapid changes in ozone. *Botanica Acta*. 111: 35-41.
- WILL, R.E. y R.O. TESKEY (1997). Effect of elevated carbon dioxide concentration and root restriction on net photosynthesis, water relations and foliar carbohydrate status of loblolly pine seedlings. *Tree Physiology*. 17: 655-661.
- XU, D.-Q. y Y.-K. SHEN (1996). Midday depression of photosynthesis. En: *Handbook of photosynthesis*. Mohammed Pessaraki, editor. Universidad de Arizona. Tucson. Arizona. Marcel Dekker. Inc. Nueva York. Basel. Hong kong.
- ZHANG, J.W., Z. FENG, B.M. CREGG y C.M. SCHUMANN (1997). Carbon isotopic composition, gas exchange, and growth of three populations of ponderosa pine differing in drought tolerance. *Tree Physiology*. 17: 461-466.
- ZOTZ, G., G. HARRIS, M. KÖNIGER y K. WINTER (1995). High rates of photosynthesis in the tropical pioneer tree, *Ficus insipida* Willd. *Flora*. 190: 265-272.

6. RESPUESTA A UN ESTRÉS HÍDRICO SUAVE

“Era imposible decir lo que podría ocurrir, pues con las cosas vivientes, en general, no hay regla posible” Jack London.

6.1. INTRODUCCIÓN

El abastecimiento de agua es un factor muy importante que limita el crecimiento vegetal en la mayoría de los suelos. Comúnmente se han observado inhibiciones en la tasa de crecimiento, la conductancia estomática y la fotosíntesis de las hojas como resultado de la sequía del suelo (Bradford y Hsiao 1982; Kaiser 1987; Davies y Zhang 1991).

La regulación de la apertura estomática para restringir el daño a los tejidos como consecuencia de la deshidratación del suelo es de una importancia trascendental en las plantas. El cierre estomático es una de las primeras líneas de defensa contra la desecación ya que es un proceso más rápido y flexible que otros alternativos que son más adecuados para una adaptación a largo plazo (Chaves 1991).

El pino canario puede crecer en lugares bastante húmedos con un gran abastecimiento de agua, y también en zonas muy secas y pedregosas donde la cantidad de agua es bastante baja. Desde los años 50 se han venido realizando grandes campañas de repoblación con este pino en los montes de Tenerife, de modo que sería de gran interés conocer el mecanismo de control del estrés hídrico utilizado por las plántulas de esta especie.

Asimismo, puesto que la alta radiación solar en las regiones que habita *Pinus canariensis* puede favorecer la sobreexcitación del aparato fotosintético, la interacción de los efectos de la sequía con los cambios fisiológicos a corto plazo en el curso diario son también potencialmente importantes.

El objetivo de este estudio es conocer la respuesta al estrés hídrico suave de plantas de *Pinus canariensis* midiendo intercambio gaseoso, fluorescencia de la clorofila y el estado hídrico de esta especie, así como caracterizar la respuesta antioxidativa y fotoprotectora a la privación de agua de los pinos canarios.

6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en plántulas de *Pinus canariensis* crecidas en maceta en el jardín experimental del Departamento de Fisiología Vegetal en la Universidad de La Laguna.

Se escogieron dos grupos de 10 pinos, de cinco años de edad y características similares y se regaron diariamente hasta el momento de llevar a cabo el experimento. Entonces uno de los grupos se dejó sin regar mientras que el otro se siguió regando igual que antes.

Después de una semana de tratamiento en dos días consecutivos se hicieron medidas de intercambio gaseoso con el analizador de gases por infrarrojo, de fluorescencia de la clorofila con el fluorímetro portátil, de contenido en pigmentos y antioxidantes y de contenido hídrico relativo mediante el método de pesada:

$$\text{CHR} = (\text{PF}-\text{PS})/(\text{PFS}-\text{PS}) * 100$$

donde CHR es el contenido hídrico relativo; PF es el peso fresco; PS es el peso seco y PFS es el peso fresco a saturación de las acículas.

Para las medidas de intercambio gaseoso con el IRGA se introdujeron en la cámara 10 acículas, considerando para las medidas, el área proyectada de las acículas como un rectángulo de longitud, la longitud de la cámara y de ancho de las acículas 1.2 mm (ver material y métodos del capítulo 5). Las tasas de intercambio gaseoso se calcularon usando las ecuaciones de von Caemmerer y Farquhar (1981). Las medidas se tomaron a lo largo del día en diferentes acículas de cada planta, alternando de plantas regadas a no-regadas.

Para los análisis de pigmentos y antioxidantes se recolectaron las acículas y se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido. El material fue liofilizado y colocado en bolsas plásticas herméticas hasta su homogeneizado para convertir las muestras en polvo, tras lo cual éstas se guardaron en viales herméticos en un congelador a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su preparación y análisis mediante HPLC (ver el apartado de material y métodos generales).

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa Statistica (Statsoft, USA). Las diferencias entre variantes experimentales y momento de muestreo se evaluaron mediante una ANOVA de dos vías con la sequía como factor independiente (plantas regadas frente a no regadas) y los diferentes momentos de muestreo como factores de repetición. La posibilidad de aplicar una ANOVA se comprobó con el test de Levene de homogeneidad de varianzas. Puesto que esta prueba dio un resultado significativo ($P < 0.05$) se aplicó un logaritmo a los datos para homogenizar varianzas. Sólo se produjeron pequeñas desviaciones de la distribución normal que generalmente no interfirieron en el test F de ANOVA, puesto que las medidas de las varianzas no estuvieron correlacionadas. Las comparaciones post-hoc para efectos significativos ($P < 0.05$) se realizaron mediante un test de Scheffé.

6.3. RESULTADOS

Tabla 6.I. Contenido hídrico relativo al mediodía en acículas de plántulas regadas y no-regadas. Los valores que se dan son las medias de diez valores junto con su desviación estándar.

	CHR (%)
Irigadas	93 ± 1.8
No-irrigadas	84 ± 3.0

Después de una semana de tratamiento el contenido hídrico relativo varió ligeramente del 93% en plantas regadas al 84% en no-regadas (Tabla 6.I).

Bajo estas condiciones se midió el intercambio gaseoso en dos días consecutivos, el primero de ellos despejado y el segundo día con alternancia de nubes y claros. Esto, y el hecho de que para cada medida se usaran acículas y plantas diferentes, condujo a la obtención de valores altamente variables.

Para la evaluación representamos todos los datos de cada parámetro frente a cada variable y se trazó la línea envolvente sobre la superficie superior de la nube de puntos (igual que hicimos para los datos globales del capítulo de intercambio gaseoso en condiciones naturales), los puntos que caen en esta superficie reflejan los valores óptimos para esos parámetros cuando no existen otras variables limitantes.

La conductancia estomática (G_s) de plantas bien regadas presentó una curva típica de respuesta a la luz, alcanzando un valor máximo de $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a saturación. La respuesta de las plantas no-regadas mostró valores máximos de alrededor de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (figura 6.1), y no mantuvo esta saturación a altos niveles de luz, puesto que a estos niveles el déficit de presión de vapor fue también alto y esto produjo una gran disminución de la conductancia

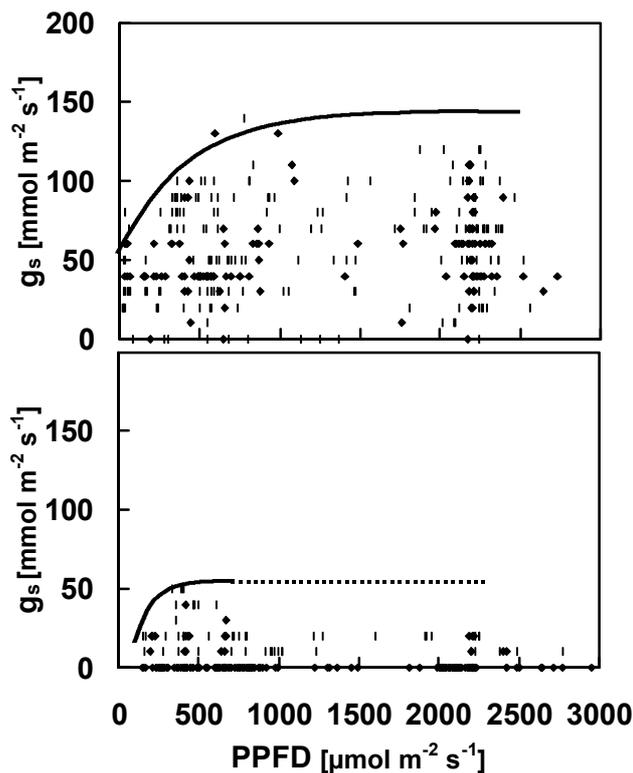


Figura 6.1. Comparación entre las medidas globales de conductancia estomática (G_s), en plantas regadas (gráfica superior) y no-regadas (gráfica inferior) en respuesta a la densidad de flujo fotónico (PPFD).

estomática como puede verse en la figura 6.2. En plantas bien regadas la conductancia estomática también disminuyó a valores altos de déficit de presión de vapor pero la disminución fue más suave.

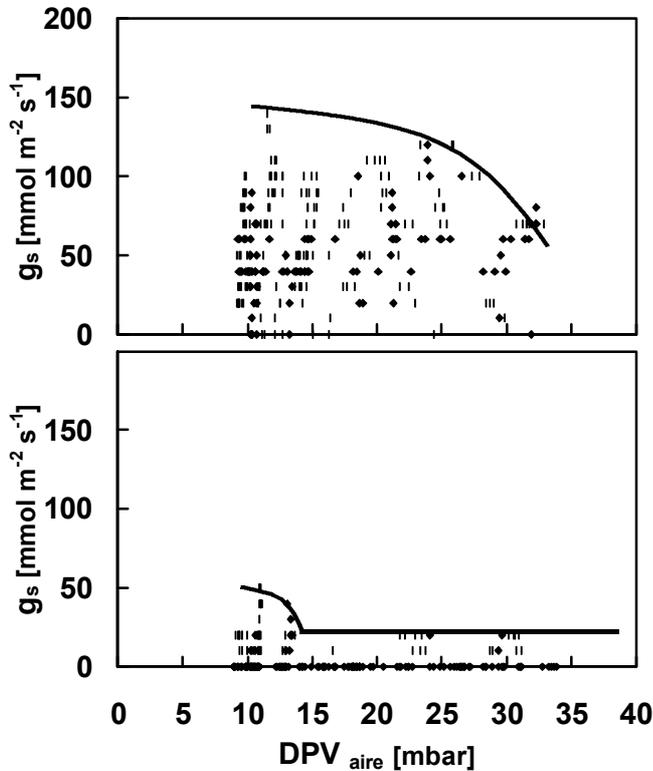


Figura 6.2. Comparación entre las medidas globales de conductancia estomática (G_s), en plantas regadas (gráfica superior) y no-regadas (gráfica inferior) en respuesta al déficit de presión de vapor del aire en la cámara (DPV_{aire}).

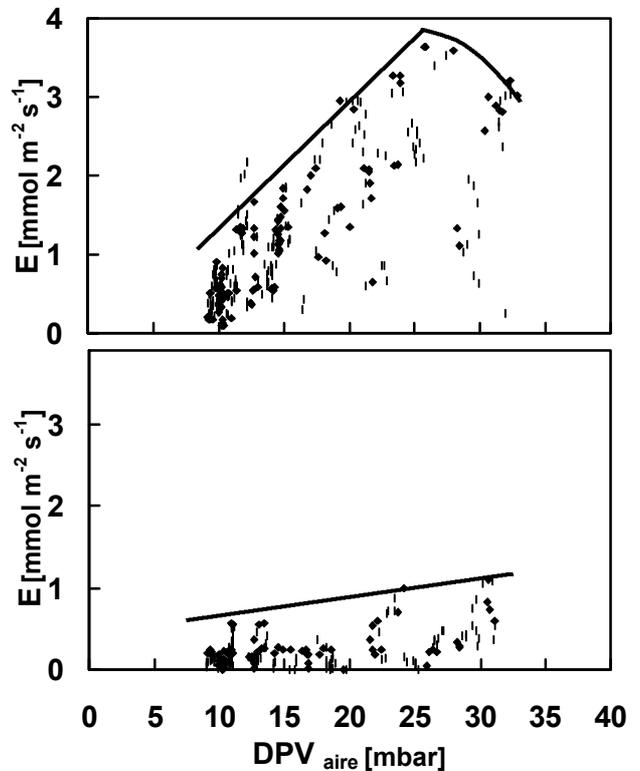


Figura 6.3. Comparación entre las medidas globales de transpiración (E), en plantas regadas (gráfica superior) y no-regadas (gráfica inferior) en respuesta al déficit de presión de vapor del aire en la cámara (DPV_{aire}).

Con estas diferencias en conductancia estomática los valores de transpiración fueron también muy diferentes en plantas bien regadas y no-regadas. Las primeras, con los estomas abiertos, mostraron valores de transpiración de hasta $3.7 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ dependiendo de la demanda evaporativa, sólo cuando los valores del déficit de presión de vapor fueron lo suficientemente altos como para producir algún cierre estomático, los valores de transpiración disminuyeron ligeramente. Como los estomas estaban parcialmente cerrados en las plantas no-regadas, éstas regularon su transpiración alcanzando valores máximos de $1 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (figura 6.3).

La curva de respuesta a la luz de la fotosíntesis neta (P_n) fue muy similar en plantas control y en no-regadas, aunque como resultado de los bajos valores de conductancia estomática en las últimas, los valores de fotosíntesis fueron también menores. Así, en plantas control, la fotosíntesis neta máxima fue de $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que las plantas no-regadas alcanzaron los $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (figura 6.4).

En ambos tratamientos la curva de respuesta de la fotosíntesis neta a la temperatura presentó sus valores óptimos entre 20 y $35 \text{ }^\circ\text{C}$ aunque, por supuesto, con valores menores en plantas no-regadas (Figura 6.5).

Se observó una pequeña disminución de la relación fluorescencia variable a fluorescencia máxima (F_v/F_m) al mediodía tanto en plantas regadas como no-regadas. Esta reducción fue mayor en plantas no-regadas, aunque no fue significativa en ningún caso y la recuperación se pudo ver en los valores de la tarde (Figura 6.6).

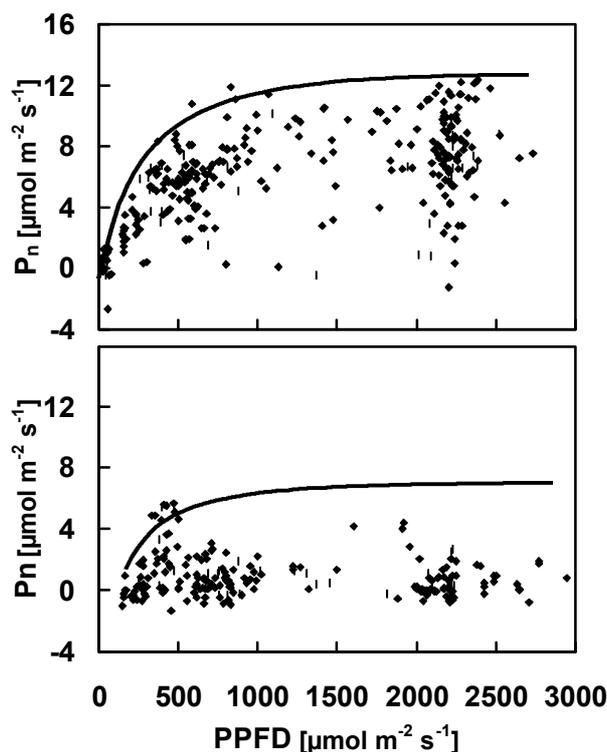


Figura 6.4. Comparación entre las medidas globales de fotosíntesis neta (P_n), en plantas regadas (gráfica superior) y no-regadas (gráfica inferior) en respuesta a la densidad de flujo fotónico fotosintético (PPFD).

Figura 6.5. Comparación entre las medidas globales de fotosíntesis neta (P_n), en plantas regadas (gráfica superior) y no-regadas (gráfica inferior) en respuesta a la temperatura de las acículas ($T_{acículas}$).

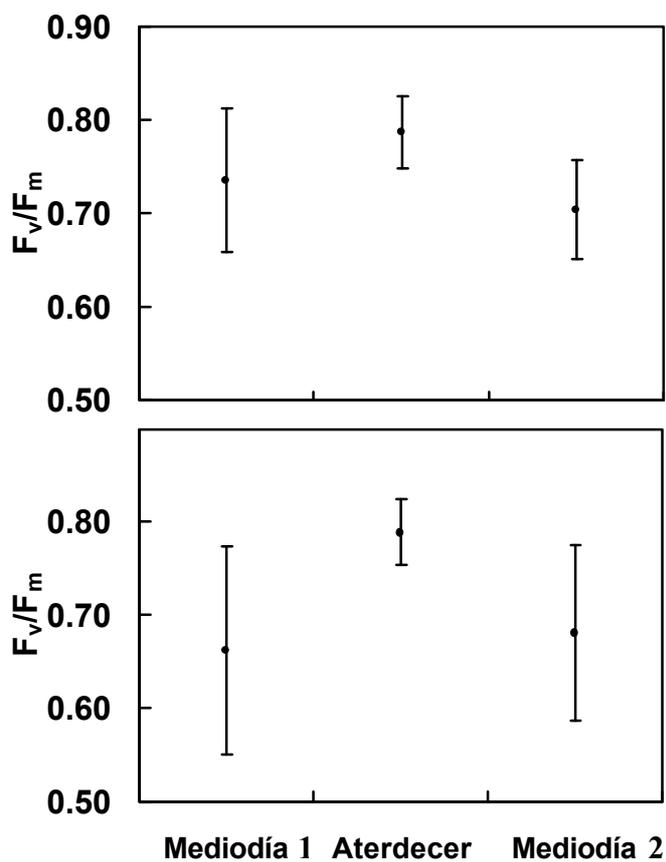
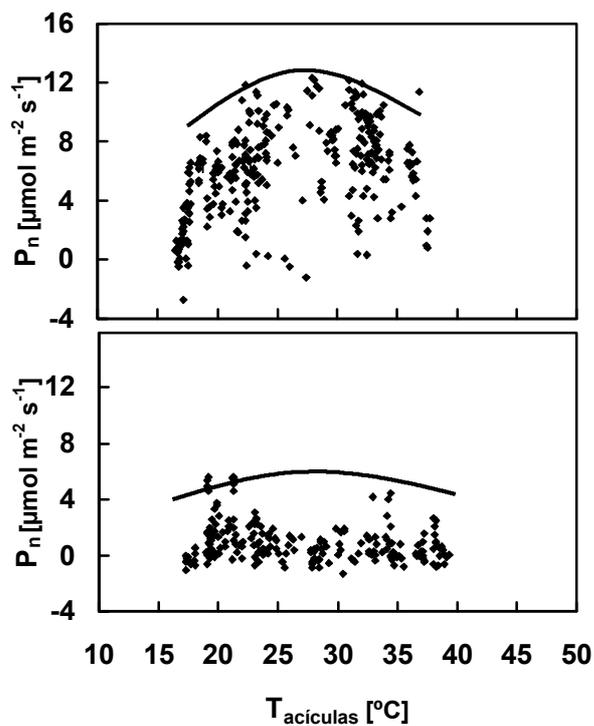


Figura 6.6. Cambios en el parámetro F_v/F_m , entre el mediodía y el atardecer en acículas de plantas regadas (gráfica superior) y no-regadas (gráfica inferior).

Tabla 6.II. Condiciones ambientales durante los momentos de muestreo. La presión atmosférica se mantuvo constante en 955 mbar. El momento de muestreo se representa en hora solar.

Momento de muestreo	Intensidad de la luz [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR]	Momento de muestreo [hora solar]	Temperatura del aire [°C]	Déficit de presión de vapor de agua del aire [mbar]
Mediodía 1	2177	12:20 – 13:05	25.0	17.8
Atardecer	30	16:30 – 17:10	17.0	9.5
Mañana	325	7:30 – 8:00	16.3	8.7
Mediodía 2	2159	12:40 – 13:15	23.4	13.8

El tratamiento de sequía, como efecto general, no tuvo un efecto significativo sobre la concentración de pigmentos, aunque las concentraciones de algunos pigmentos del cloroplasto cambiaron significativamente dependiendo del momento de muestreo (tablas 6.II, 6.III y 6.IV).

La concentración de clorofilas totales fue ligeramente más baja al atardecer, mientras que las concentraciones de α -caroteno bajaron más al mediodía y fueron más altas en las muestras tomadas al atardecer.

Sin embargo, este no fue el caso de las concentraciones de β -carotenono, neoxantina y luteína, que no cambiaron significativamente según el momento de muestreo.

Tabla 6.III. Test F de ANOVA en relación a los pigmentos del cloroplasto y los detoxificadores de radicales libres en plántulas de *Pinus canariensis* sometidas a estrés hídrico suave. 20 individuos (10 plantas control bien regadas y 10 no regadas) y cuatro momentos de muestreo. ns = diferencias no significativas, indican $P > 0.05$. (Z+0.5A)/VAZ = estado de desepoxidación del ciclo de las xantofilas. VAZ = violaxantina + anteraxantina + zeaxantina.

Variable	Sequía	Momento de muestreo	Interacción sequía x momento de muestreo
Clorofila total	ns	P=0.002	ns
α -caroteno	ns	P=0.017	ns
β -caroteno	ns	ns	ns
Neoxantina	ns	ns	P=0.021
Luteína	ns	ns	ns
(Z+0.5A)/VAZ	ns	P<0.001	P=0.032
α -tocoferol	ns	ns	ns
Ascorbato total	ns	P<0.001	ns
Ascorbato/Dehidroascorbato	ns	ns	ns
Glutation total	ns	P<0.001	ns
GSSG/GSH	P< 0.001	ns	ns

Tabla 6.IV. Concentración de los pigmentos del cloroplasto y de tocoferol y ascorbato en acículas de *Pinus canariensis*. Se presentan las medias y las desviaciones estándar de las medias. Las comparaciones Post-hoc sobre los efectos significativos de la ANOVA se indican por letras. Las mayúsculas indican diferencias entre la fila entera de datos dentro de la tabla. Las filas que no tienen ninguna letra en común son significativamente diferentes con un nivel de significación de $P < 0.05$ de acuerdo con el test LSD. Las minúsculas indican diferencias entre celdas individuales dentro de la tabla. Las celdas que no tienen ninguna letra en común son significativamente diferentes con un nivel de significación de $P < 0.05$ de acuerdo con el test LSD.

	regadas		non-regadas		
Clorofilas totales [$\mu\text{mol g}^{-1}$ PS]					
Mediodía 1	2318	\pm 229	2304	\pm 115	A
Tarde	2065	\pm 190	1844	\pm 217	B
Mañana	2420	\pm 266	2367	\pm 229	A
Mediodía 2	2144	\pm 112	2420	\pm 122	A
α -Caroteno [$\mu\text{mol g}^{-1}$ PS]					
Mediodía 1	26	\pm 2	28	\pm 4	A
Tarde	35	\pm 2	38	\pm 3	A
Mañana	30	\pm 3	37	\pm 5	AB
Mediodía 2	27	\pm 2	39	\pm 3	B
β -Caroteno [$\mu\text{mol g}^{-1}$ PS]					
Mediodía 1	115	\pm 6	104	\pm 4	
Tarde	109	\pm 10	112	\pm 4	
Mañana	118	\pm 5	115	\pm 8	
Mediodía 2	109	\pm 9	113	\pm 6	
Neoxantina [$\mu\text{mol g}^{-1}$ PS]					
Mediodía 1	62	\pm 3ab	60	\pm 3ab	
Tarde	57	\pm 5a	65	\pm 5bc	
Mañana	57	\pm 4a	68	\pm 7c	
Mediodía 2	60	\pm 5ab	61	\pm 6ab	
Luteína [$\mu\text{mol g}^{-1}$ PS]					
Mediodía 1	209	\pm 11	182	\pm 9	
Tarde	199	\pm 14	201	\pm 11	
Mañana	214	\pm 11	202	\pm 15	
Mediodía 2	205	\pm 14	202	\pm 12	
α -Tocoferol [$\mu\text{g g}^{-1}$ PS]					
Mediodía 1	101	\pm 9	84	\pm 10	
Tarde	79	\pm 7	86	\pm 10	
Mañana	96	\pm 8	86	\pm 12	
Mediodía 2	81	\pm 5	83	\pm 10	
Ascorbato total [mg g^{-1} PS]					
Mediodía 1	3.24	\pm 0.22	2.82	\pm 0.42	A
Tarde	1.79	\pm 0.23	1.98	\pm 0.27	B
Mañana	2.94	\pm 0.36	2.85	\pm 0.27	A
Mediodía 2	3.11	\pm 0.47	2.57	\pm 0.32	A
Dehidroascorbato [% del ascorbato total]					
Mediodía 1	24	\pm 2	21	\pm 2	
Tarde	23	\pm 3	21	\pm 4	
Mañana	19	\pm 3	19	\pm 3	
Mediodía 2	17	\pm 3	27	\pm 7	

El estado de desepoxidación del ciclo de las xantofilas se muestra en la figura 6.7. Podemos ver que alcanzó un máximo de más del 70% de los grupos epoxi totales durante el mediodía 2, pero esta variación en el momento de muestreo se vio modificada por el tratamiento de sequía (lo que se demuestra en el efecto de interacción significativo de la tabla 6.IV). Las plantas expuestas a la sequía exhibieron un estado de desepoxidación del ciclo de las xantofilas mayor que el correspondiente a las regadas en el mediodía 1. Como control se midió el estado de desepoxidación de acículas puestas en oscuridad 12 horas y tanto las plantas regadas como las no regadas mantuvieron un grado de desepoxidación del 30%.

La concentración del antioxidante lipofílico α -tocoferol no se vio afectada ni por el momento de muestreo ni por la exposición a la sequía.

Ambos antioxidantes solubles en agua: ascorbato y glutatión, mostraron variaciones dependiendo del momento de muestreo con concentraciones menores al atardecer. El tratamiento de sequía no afectó las concentraciones de estos compuestos.

El estado redox del ascorbato no varió entre tratamientos y permaneció entre el 17 y el 24% de dehidroascorbato en el "pool" total.

A pesar de que el estado redox del glutatión no se vio afectado por el momento de muestreo, el tratamiento de sequía aumentó significativamente la proporción de glutatión oxidado (GSSG), en el "pool" total de glutatión, después del primer momento de muestreo (tabla 6.III, figura 6.8).

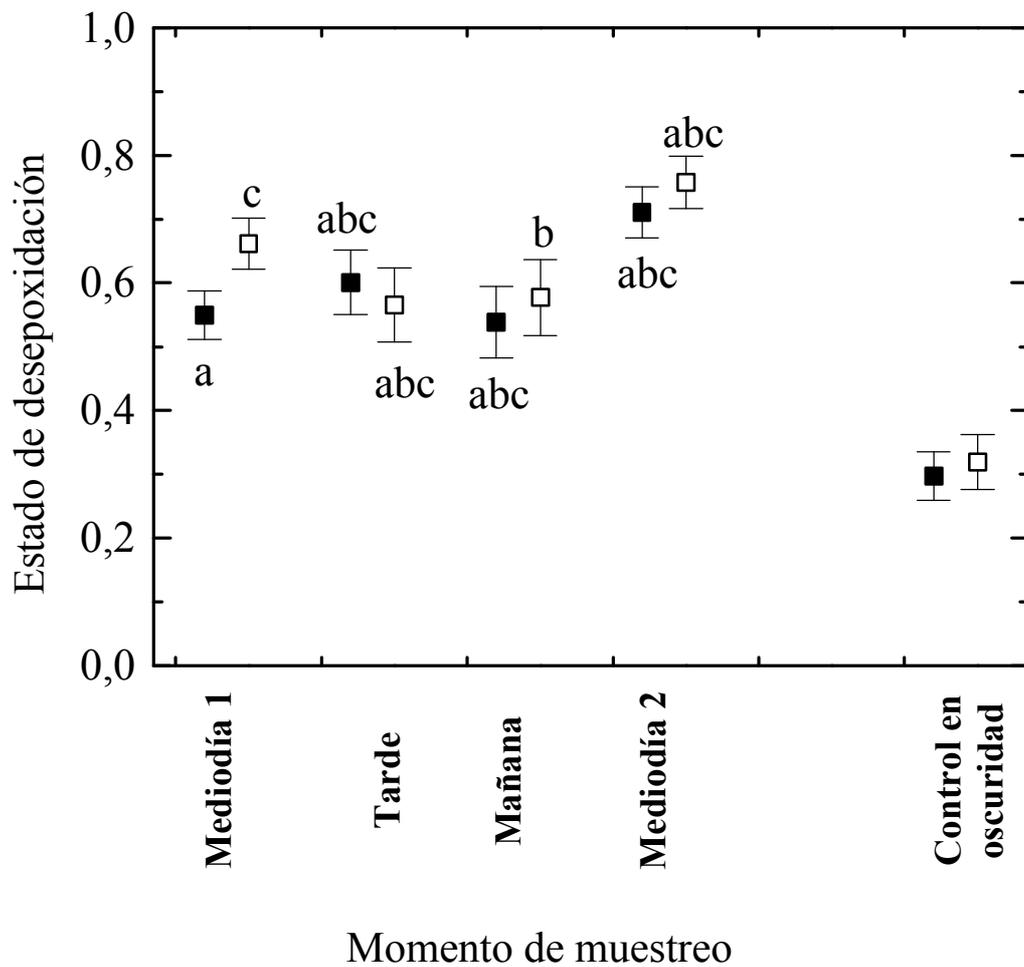


Figura 6.7. Estado de desepoxidación del ciclo de las xantofilas en acículas de *Pinus canariensis*. Los símbolos negros representan las plántulas regadas y los símbolos blancos las no-regadas. Se representan las medias y las desviaciones estándar de las medias. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los momentos de muestreo y los tratamientos ($p < 0.05$, test LSD tras interacción significativa y efecto general en el test ANOVA, Tabla 6.III). El control en oscuridad representa acículas puestas en condiciones de oscuridad 24 horas antes del muestreo.

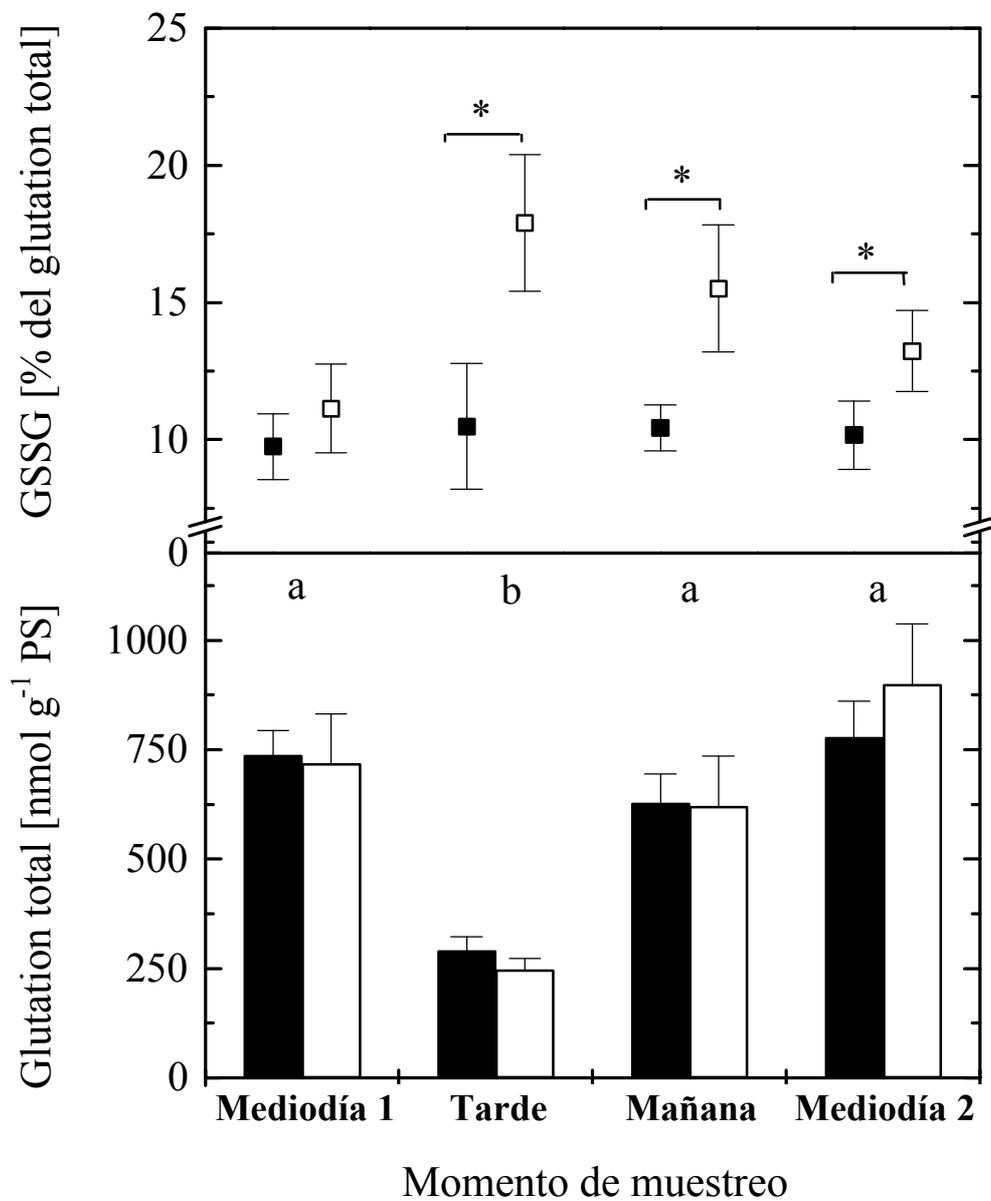


Figura 6.8. El sistema del glutathion en acículas de *Pinus canariensis*. Las barras negras y los símbolos negros representan plantas regadas y las barras y los símbolos blancos representan las plántulas no-regadas. Se representan las medias y las desviaciones estándar de las medias. Las letras diferentes indican diferencias significativas del glutathion total entre los momentos de muestreo ($p < 0.05$, test LSD). Los asteriscos indican diferencias significativas entre plantas regadas y no-regadas ($p < 0.05$, test LSD). PS = Peso seco de las acículas.

6.4. DISCUSIÓN

Cuando *Pinus canariensis* se sometió a estrés hídrico suave en el suelo el contenido hídrico relativo de las acículas al mediodía se vio ligeramente alterado, encontrándose tan sólo una pequeña disminución, sin llegar a bajar en ningún caso del 70%, umbral que marca el paso a un estrés de agua más severo (Kaiser 1987; Chaves 1991; Cornic y Massacci 1996).

Por el contrario, la conductancia estomática disminuyó hasta un 60% en plantas de pino no-regadas y, como consecuencia, la tasa de asimilación de CO₂ disminuyó un 50% y la tasa de transpiración se redujo en mayor proporción (70%). Como demostraron Zhang y Davies (1989), cuando la sequía es moderada las respuestas estomáticas pueden relacionarse más directamente a la desecación del suelo que al estado hídrico de las hojas. Si ocurre esto, el cierre estomático o incluso una alteración en el crecimiento pueden ser indicadores más sensibles de la sequía que una pérdida de turgor (Chaves 1991). También se han encontrado evidencias sobre los efectos directos de la desecación del suelo sobre la conductancia, no mediados por ningún cambio en el estado hídrico de las hojas (Davies y Sharp 1981; Blackman y Davies 1985; Gollan y col. 1986).

Las plantas estudiadas poseen un balance de agua hidroestable debido a la gran sensibilidad de los estomas a la escasez de agua en el suelo, al contrario que otras plantas, como muchas hierbas de hábitats soleados y también árboles, que pueden arriesgarse a sufrir pérdidas bastante grandes de agua y se clasifican como plantas hidrolábiles en cuanto al balance hídrico (Larcher 1995).

Algunos autores (Sharkey y Seemann 1989; Vasey y Sharkey 1989; Lal y col. 1996) han encontrado que el mecanismo primario para la inhibición de la fotosíntesis bajo estrés hídrico, tanto suave como severo, es la reducción del abastecimiento de CO₂ a la Rubisco, debido a una limitación estomática y no por daños a las reacciones del cloroplasto. Nuestras medidas con fluorescencia de la clorofila están de acuerdo con estos descubrimientos ya que la pequeña disminución de F_v/F_m al mediodía, indicativo de fotoinhibición (Björkman y Demming 1987; Osmond 1994), se recuperó durante la noche.

Muchas de las diferencias observadas entre el momento de muestreo en la concentración de pigmentos y antioxidantes (en particular las que tienen lugar entre el atardecer y los otros) se pueden explicar teniendo en cuenta las diferencias en la iluminación durante los diferentes momentos de muestreo.

La producción de clorofila puede estimularse por la luz, pero simultáneamente se verá incrementada la necesidad de una fotoprotección flexible proporcionada por el ciclo de las xantofilas. La degradación de α -caroteno con condiciones de alta luz, observada en el presente experimento, es compatible con observaciones anteriores. Se ha visto que el α -caroteno es sensible a la luz en algas verdes donde es oxidado a su correspondiente xantofila, luteína y en acículas de picea su contenido también depende del ambiente de luz (Siefermann-Harms 1994). Se han encontrado cambios en las relaciones α -/ β -caroteno que son indicadores de estrés en acículas de coníferas en condiciones de campo (Tausz y col. 1996). El estado de desepoxidación del ciclo de las xantofilas también corresponde a las variaciones en las condiciones de luz. El estado de conversión del ciclo depende de los gradientes de pH a través de los tilacoides, que a su vez dependen de la luz (Adams III y Demmig-Adams 1994). Ecofisiológicamente, el ciclo de las xantofilas en su estado desepoxidado (más zeaxantina y menos violoxantina) proporciona la fotoprotección necesaria particularmente bajo condiciones en las que existe un exceso de densidad de flujo fotónico fotosintético. Las condiciones de estrés, como el tratamiento de sequía aplicado, limitan la fijación fotosintética del carbono (figura 6.4). Las plantas estresadas deben evitar absorber el exceso de luz potencialmente destructivo. Esto se relaciona con pequeñas diferencias en el estado de desepoxidación del ciclo de las xantofilas durante el mediodía 1 (figura 6.8).

La variación en las concentraciones de ascorbato y glutatión entre los diferentes momentos de muestreo se corresponden sólo en parte con observaciones previas. Un aumento similar del tamaño del "pool" de glutatión dependiente de la luz fue observado en las acículas de picea por Schupp y Rennenberg (1988), pero no se observó en investigaciones sobre otras especies de pino en condiciones de campo (Tausz y col. 1999a). Aun no se sabe si estas variaciones son una consecuencia del metabolismo de las propias acículas o el resultado de procesos de transporte. La producción de ascorbato puede estar ligada directamente a la producción fotosintética de carbohidratos y así

estimularse por alta luz (Smirnoff 1996). Por otro lado, la capacidad de defensa antioxidativa también se necesita mayoritariamente bajo condiciones de alta luz.

El ascorbato es el detoxificador que elimina de forma más efectiva los radicales libres en la fase acuosa, y el glutathion es crucial para la regeneración del ascorbato. Así se asigna un significado ecofisiológico a los mayores niveles de ascorbato y glutathion con la luz.

Las plantas de pino respondieron al estrés hídrico suave mediante una disminución del intercambio gaseoso de las acículas durante las horas de máxima radiación, más que mediante un cambio en su estado hídrico (puesto que el contenido hídrico relativo no varió excesivamente). La consecuencia de ello es una situación de estrés oxidativo en los cloroplastos (Eltner y Osswald 1994).

Otras coníferas como píceas respondieron a condiciones similares de estrés hídrico suave con un aumento en los niveles de ascorbato y glutathion (Kronfuss y col. 1998). En la respuesta bioquímica de *Pinus canariensis* al tratamiento de sequía, se puso de manifiesto un aumento en la relación GSSG/GSH (figura 6.9). Esto podría parecer sorprendente, puesto que el α -tocoferol y el ascorbato se conocen como las sustancias que más directamente se encargan de eliminar las especies reactivas de oxígeno que se desarrollan bajo situaciones de estrés. Sin embargo, no se encontraron efectos en estos compuestos. El glutathion es necesario para la regeneración del ascorbato a partir de dehidroascorbato en el ciclo de Foyer-Halliwell (Foyer 1997), donde es reducido por la reacción catalizada por la glutathion-reductasa que consume NADPH. Los presentes resultados sugieren que el mantenimiento del estado reducido del glutathion es la parte más sensible en la cadena de reacción de defensa antioxidante en las acículas de *Pinus canariensis*. Estudios anteriores describieron la oxidación del "pool" de glutathion sólo bajo condiciones extremadamente oxidantes que siguen a una privación de agua externa (Smirnoff 1993) o en follaje ya visiblemente dañado en condiciones de campo (Schmieden y col. 1993). Pero, recientemente, se ha visto que los cambios en el estado redox del "pool" de glutathion son importantes indicadores de daño por altas concentraciones de ozono en las acículas de *Pinus ponderosa* en parcelas en el campo (Tausz y col. 1999a). Un estado de desepoxidación mayor del ciclo de

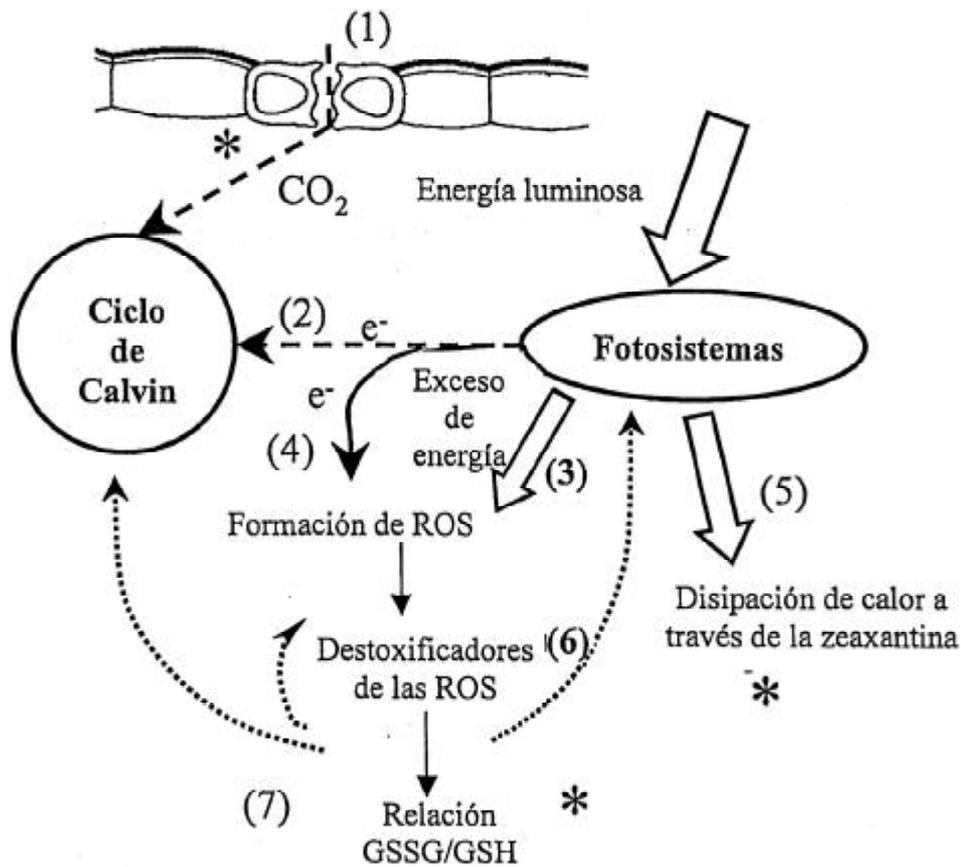


Figura 6.9. Esquema propuesto para las reacciones de *Pinus canariensis* bajo estrés hídrico suave. El cierre estomático (1) provoca una interrupción del transporte electrónico hacia el ciclo de Calvin (2, flechas discontinuas) y promueve la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por el exceso de energía lumínica (3) o pérdida de electrones (4). La formación de zeaxantina disipa el exceso de energía (5) y las respuestas antioxidativas eliminan las ROS (6). Estas reacciones conducen a un aumento en la relación GSSG/GSH (7) que puede producir efectos regulatorios de retroalimentación sobre varios sistemas (flechas punteadas, en gran medida hipotéticas). Los asteriscos indican los cambios significativos observados en el presente experimento.

las xantofilas bajo alta luz también se observó en coníferas bajo condiciones de baja temperatura (Adams III y Demmig-Adams 1994), en parcelas a gran altitud (Tausz y col. 1999c) y en plantas dañadas por el ozono (Tausz y col. 1999b). Estos resultados apoyan la idea de una interacción entre la alta luz y condiciones de estrés adicional como se muestra en la figura 6.9. Sin embargo, en el curso del presente experimento, el estrés de sequía produce cambios en el estado de desepoxidación del ciclo de las xantofilas sólo transitoriamente al principio del experimento (mediodía 1), que luego desaparecen. En cambio, los cambios en el estado redox del glutathion aparecen después de los cambios en el ciclo de las xantofilas y permanecen hasta el final del experimento (mediodía 2).

Los resultados de este estudio apuntan a que el ciclo redox del glutathion y el equilibrio redox entre GSH y GSSG son una parte sensible de las defensas antioxidantes en acículas de *Pinus canariensis*. Esto es de gran interés, puesto que la regulación de muchas actividades proteicas puede depender de la relación GSH/GSSG en el medio, y los cambios en esta relación pueden modular la respuesta vegetal a nivel enzimático (Foyer y Rennenberg 2000). Se podría especular que estos cambios conducen a una adaptación del aparato fotosintético con el resultado de que la fotoprotección por la desepoxidación de las xantofilas no es necesaria durante más tiempo. Además de las defensas antioxidantes, la fotoprotección por xantofilas y también la fotorrespiración (Asada 1999), así como una regulación a la baja del flujo de electrones fotosintético, permitirían una adaptación a las situaciones de estrés medioambientales.

Además, la respuesta del sistema de glutathion se observó antes que cualquier cambio en el estado hídrico y podía servir, por ello, como un indicador temprano del estrés bioquímico (Tausz y col. 1999c).

En la figura 6.9 se propone, de forma esquemática, la sucesión de las reacciones de amortiguación del exceso de energía luminosa y de destoxificación de las especies activas de oxígeno producidos por el efecto combinado de la alta radiación y el estrés hídrico suave en *Pinus canariensis*.

6.5. CONCLUSIONES

En respuesta a un estrés hídrico suave la fotosíntesis disminuyó como consecuencia de una reducción en la conductancia estomática sin que existiera una bajada sensible del contenido hídrico relativo de las acículas. Esto permite clasificar a esta especie como una planta hidroestable.

Los valores del parámetro de fluorescencia F_v/F_m disminuyeron ligeramente al mediodía, especialmente en acículas de plantas sometidas al estrés hídrico suave. Esto se correspondió, a su vez, con un aumento del estado de desepoxidación del ciclo de las xantofilas, mayor en las plantas no regadas.

Esta disminución de la eficiencia cuántica y la menor asimilación de CO_2 en las plantas no regadas, conducen a la formación de especies reactivas de oxígeno que, en *Pinus canariensis*, son detoxificadas mediante un aumento de la relación GSSG/GSH, y no mediatizadas por otros antioxidantes estudiados como el alfa-tocoferol y el ascorbato.

6.6. BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS III, W.W. AND B. DEMMIG-ADAMS (1994). Carotenoid composition and down regulation of photosystem II in three conifer species during the winter. *Physiologia Plantarum*. 92: 451-458.
- ASADA, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50: 601-639.
- BJÖRKMAN, O. y B. DEMMIG (1987). Photon yield of O_2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*. 170: 489-504.
- BLACKMAN, P.G. y W.J. DAVIES (1985). Root to shoot communication in maize plants of the effects of soil drying. *Journal of Experimental Botany*. 36: 39-48.
- BRADFORD, K.J. y T.C. HSIAO (1982). Physiological responses to moderate water stress. En: *Physiological Plant Ecology II. Water Relations and Carbon Assimilation*. O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond and H.

- Ziegler, editores. *Encyclopaedia of Plant Physiology*. Volumen 12B: 263-324. Springer-Verlag. Berlin.
- VON CAEMMERER, S. y G.D. FARQUHAR (1981). Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and gas exchange of leaves. *Planta*. 153: 376-387.
- CHAVES, M.M. (1991). Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*. Volumen 42 (234): 1-16.
- CORNIC, G., y A. MASSACCI (1996). Leaf photosynthesis under drought stress. En: *Photosynthesis and the environment*. N. Baker, editor.). Academic Press. Londres. Pp: 347-366.
- DAVIES, W.J. y R.E. SHARP (1981). The root: a sensitive detector of a reduction in water availability? En: *Mechanisms of assimilate distribution and plant growth regulators*. J. Kralovic, editor. Slovak Society of Agriculture. Prague. 53-67.
- DAVIES, W.J. y J. ZHANG (1991). Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soils. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42: 55-76.
- ELSTNER, E.F. y W. OSSWALD (1994). Mechanisms of oxygen activation during plant stress. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh B Biology*. 102: 131-154.
- FOYER, C. (1997). Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. En: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defence*. G. Scandalios, editor. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Pp: 687-621.
- FOYER, C.H. y H. RENNENBERG (2000). Regulation of glutathione synthesis and its role in abiotic and biotic stress defence. En: *Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants*. C. Brunold, H. Rennenberg, L.J. De Kok, I. Stulen, J.C. Davidian, editors. Paul Haupt. Berna. Pp: 127-153.
- GOLLAN, T., J.B. PASSIOURA y R. MUNNS (1986). Soil water status affects the stomatal conductance of fully turgid wheat and sunflower leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*. 13: 459-464.
- KAISER, W.M. (1987). Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum*. 71: 142-149.
- KRONFUSS, G., A. POLLE, M. TAUSZ, W.M. HAVRANEK y G. WIESER (1998). Effects of ozone and mild drought stress on gas exchange, antioxidants

- and chloroplast pigments in current-year needles of young Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Trees*. 12: 482-489.
- LARCHER, W. (1995). *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. Quinta edición. 506pp.
- LAL, A., M.S.B. KU y G.E. EDWARDS (1996). Analysis of inhibition of photosynthesis due to water stress in the C₃ species *Hordeum vulgare* and *Vicia faba*: Electron transport, CO₂ fixation and carboxylation capacity. *Photosynthesis Research*. 49: 57-69.
- OSMOND, C.B. (1994). What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. En: *Photoinhibition of Photosynthesis. From molecular mechanisms to the field*. N.R. Baker y J.R. Bowyer, editores. Bios Scientific Publishers Limited. Publicado en: *Environmental Plant Biology series*. 1-24.
- SHARKEY, T.D. y J.R. SEEMANN (1989). Mild water stress effects on carbon-reduction-cycle intermediates, ribulose biphosphate carboxylase activity, and spatial homogeneity of photosynthesis in intact leaves. *Plant Physiology*. 89: 1060-1065.
- SCHMIEDEN, U., S. SCHNEIDER y A. WILD (1993). Glutathione status and glutathione reductase activity in spruce needles of healthy and damaged spruce trees at two mountain sites. *Environment and Pollution*. 82: 239-244.
- SCHUPP, R. y H. RENNENBERG (1988). Diurnal changes in the glutathione content of spruce needles. *Plant Science*. 57: 113-117.
- SIEFERMANN-HARMS, D. (1994). Light and temperature control of season-dependent changes in the α - and β -carotene content of spruce needles. *Journal of Plant Physiology*. 143: 488-494.
- SMIRNOFF, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*. 125: 27-58.
- SMIRNOFF, N. (1996). The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*. 78: 661-669.
- TAUSZ, M., G. ZELLNIG, E. BERMADINGER-STABENTHEINER, D. GRILL, K. KATZENSTEINER y G. GLATZEL (1996). Physiological, structural, and nutritional parameters of norway spruce needles from different forest stands in Austria. *Canadian Journal of Forest Research*. 26: 1769-1780.

- TAUSZ, M., A. BYTNEROWICZ, W. WEIDNER, M.J. ARBAUGH, P. PADGETT y D. GRILL (1999a). Changes in free radical scavengers describe the susceptibility of *Pinus ponderosa* to ozone in Southern Californian forests. *Water Air and Soil Pollution*. 116: 249-254.
- TAUSZ, M., A. BYTNEROWICZ, W. WEIDNER, M.J. ARBAUGH, P. PADGETT y D. GRILL (1999b). Pigments and photoprotection in needles of *Pinus ponderosa* trees with and without symptoms of injury. *Phyton (Austria)*. 39: 219-224.
- TAUSZ, M., A. BYTNEROWICZ, W. WEIDNER, M.J. ARBAUGH y D. GRILL (1999c). Antioxidants and protective pigments of *Pinus ponderosa* needles at gradients of natural stresses and ozone in the San Bernardino Mountains in California. *Free Radical Research*. 31: S113-120.
- VASSEY, T.L. y T.D. SHARKEY (1989). Mild water stress in *Phaseolus vulgaris* plants leads to reduced starch synthesis and extractable sucrose phosphate synthase activity. *Plant Physiology*. 89: 1066-1070.
- ZHANG, J. y W.J. DAVIES (1989). Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. *Plant, Cell and Environment*. 12: 73-81.

7. RESISTENCIA DE LAS ACÍCULAS A LAS TEMPERATURAS EXTREMAS

“La naturaleza no se siente perturbada por las dificultades de análisis”

Augustin Jean Fresnel.

7.1. INTRODUCCIÓN

Debido a una producción de calor relativamente baja en relación con su masa y a que su superficie no está bien aislada contra la pérdida de calor, la temperatura de las plantas cambia marcadamente con los cambios en la temperatura ambiental.

Todas las especies presentan un rango específico de temperatura en el que realizan sus funciones vitales y el exceso de frío o de calor, dependiendo de su intensidad y duración, afecta la actividad metabólica, el crecimiento y la viabilidad, imponiendo límites a la distribución de las especies (Larcher 1995). Este rango óptimo de temperatura es característico, no sólo de cada especie, sino también de los diversos órganos y tejidos.

Las altas temperaturas influyen de manera particular en la tasa fotosintética y respiratoria y en la integridad estructural de las membranas (Björkman y col. 1980). De hecho, antes de que se puedan detectar otros síntomas de daño por las altas temperaturas, se produce el daño al aparato fotosintético (Krause y Weis 1984; Renger y Schreiber 1986; Bolhár-Nordenkampf y col. 1989; Larcher 1994; Anderson y col. 1997). Dentro del aparato fotosintético, se ha demostrado que el daño producido por el calor implica una alteración, tanto física como funcional, de los complejos colectores de luz del fotosistema II (Schreiber y Berry 1977; Armond y col. 1979; Gounaris y col. 1984, Sundby y col. 1986) y una desorganización del complejo de fotólisis

del agua (Berry y Björkman 1980; Nash y col. 1985; Santarius y Weis 1988; Enami y col. 1994).

El frío desorganiza toda la fisiología de las plantas sensibles. Las membranas celulares sufren un cambio de estado físico que produce una rigidez de los componentes de la membrana causando un aumento en la permeabilidad. Además, el cambio de estado puede aumentar la energía de activación de las enzimas de la membrana, lo cual interfiere en los procesos metabólicos, como la fotosíntesis y la respiración. Se produce una variación en el reparto de asimilados, alteración de las vías metabólicas y acumulación de productos tóxicos (Larcher 1980). La reducción del aporte de ATP y la progresiva rigidez de la membrana puede producir la desaparición de las corrientes protoplásmicas, uno de los síntomas más inmediatos del daño por frío.

Muchas plantas, excepto las sensibles al frío, pueden tolerar la congelación del agua en los espacios intercelulares sin efectos perjudiciales, pero ni siquiera las resistentes a las heladas pueden sobrevivir a la formación de cristales de hielo en sus células (Sutcliffe 1979; Sakai y Larcher 1987). Por eso, el punto clave para la resistencia a la congelación es evitar la formación de hielo intracelular, puesto que ninguna célula es capaz de sobrevivir a la formación de cristales de hielo en su interior.

Existen gran cantidad de trabajos basados en el estudio de la resistencia de diversos órganos vegetales a las temperaturas extremas, una de las últimas revisiones, acerca de la habilidad de supervivencia de plantas esclerófilas mediterráneas al estrés de temperatura, corre a cargo de Larcher (2000).

Frecuentemente, la resistencia a las temperaturas extremas varía a lo largo de la vida de la planta o según la edad de sus hojas, siendo, en ocasiones, esta resistencia el factor limitante para la supervivencia de las plantas en condiciones extremas.

Debido a la franja altitudinal que ocupa el pino canario sobre la isla de Tenerife, que va desde casi el nivel del mar hasta cerca de los 2200 m, se ve sometido a fuertes oscilaciones térmicas que pueden afectar gravemente la supervivencia de esta especie, especialmente durante los primeros estadios de su desarrollo. Asimismo, los límites térmicos que son capaces de soportar las

acículas de esta especie podrían arrojar luz sobre las causas de su confinamiento en el Archipiélago Canario tras los cambios climáticos ocurridos en el pasado.

Se diseñaron dos experimentos con el fin de estudiar la resitencia de las acículas a las temperaturas extremas dependiendo de su procedencia altitudinal sobre la isla de Tenerife (experimento 1) y de su estado de desarrollo (experimento 2).

7.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Los estudios se llevaron a cabo con diferentes tipos de material vegetal:

❖ Para el experimento 1 se emplearon acículas bien desarrolladas (de un año de edad) de pinos adultos crecidos en condiciones naturales en el bosque, recolectadas durante el otoño a diferente altitud en cinco parcelas experimentales sobre la isla de Tenerife (figura 7.1). Los sitios localizados en la vertiente sur se corresponden con los estudiados en el capítulo 4 y, además, se estudiaron acículas procedentes de un sitio adicional en el norte de Tenerife (sitio IV_N) a 1750 metros de altitud en el municipio de La Orotava.

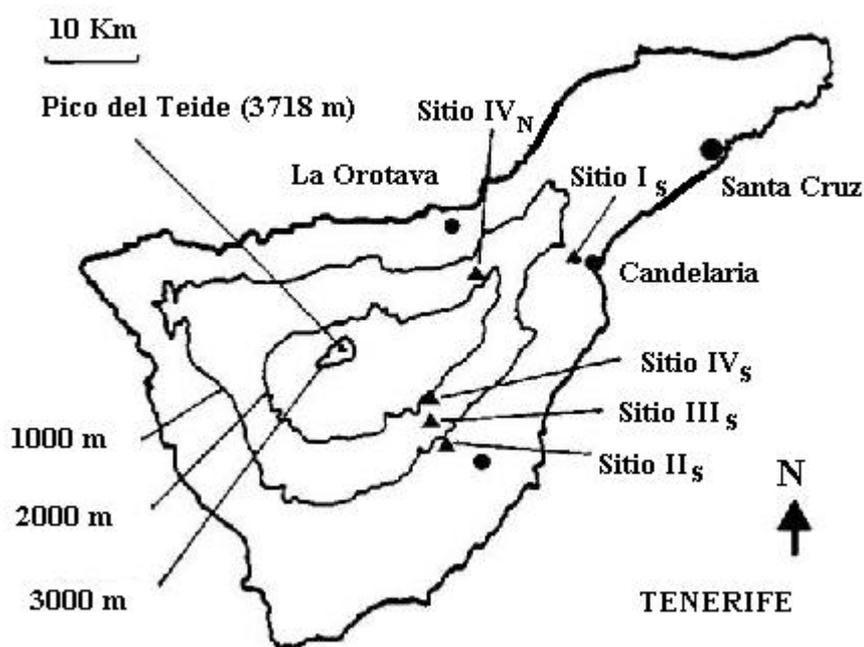


Figura 7.1. Situación de las parcelas sobre la isla de Tenerife.

❖ En cuanto al experimento 2, en él se utilizaron cotiledones de pinos recién germinados en el invernadero del Departamento de Fisiología Vegetal procedentes de semillas suministradas por el vivero de especies forestales del Cabildo Insular de Tenerife, acículas primarias de pinos crecidos en maceta en el campo experimental del Departamento, así como acículas de 6, 12 y 24 meses de pinos desarrollados en condiciones naturales procedentes de la parcela IV_N, a 1750 metros de altitud.

En todos los casos se recolectaron acículas de cinco pinos diferentes, excepto en el caso de los cotiledones, donde el material (debido a su escasez) correspondió a más de 100 plántulas de pinos recién germinados.

Una vez en el laboratorio, las acículas se mantuvieron en condiciones de saturación acuosa y temperatura ambiente toda la noche y al día siguiente se midieron los valores control de los parámetros de fluorescencia. Cada lote de acículas se sometió a un tratamiento, en bolsas plásticas, a una temperatura determinada. Esta temperatura fue, según cada tratamiento, de 56, 54, 52, y así sucesivamente hasta -24 °C, variando cada 2K, excepto en el rango de 35 a 0 °C, en el que los pasos fueron de 5K. Se tomaron tres muestras para cada tratamiento idéntico. Se estudiaron los efectos inmediatamente después del tratamiento y tras 24 horas de recuperación, manteniendo las acículas en oscuridad y a saturación acuosa. La duración de los tratamientos de temperatura fue de 30 minutos siguiendo el procedimiento utilizado en otros experimentos similares (Larcher 1973; Lösch 1980; González-Rodríguez 1998).

La fluorescencia de la clorofila se midió con el fluorímetro portátil PEA descrito con detalle en el capítulo de material y métodos generales, antes de los tratamientos, inmediatamente después de los 30 minutos a una determinada temperatura y después de 24 horas de recuperación. Asimismo, se midió la liberación de electrolitos, por el método descrito también en el apartado de material y métodos generales, después del periodo de recuperación.

Se trató de seguir también el daño producido a los tejidos aciculares, por los tratamientos de temperatura, mediante valoración visual, como lo hicieron otros autores, observando el grado de necrosis en los tejidos foliares de otras especies vegetales (Larcher 1980; Lösch 1980; Larcher y col. 1991; Clement y van Hasselt 1996; González-Rodríguez 1998; Boorse y col. 1998; Neuner y Buchner

1999). Las observaciones se realizaron tanto en el momento del tratamiento como 24 horas después.

Se consideró la extrapolación de los valores de temperatura cuando los valores de fluorescencia y conductividad se desviaban un 10% (LT₁₀) y un 50% (LT₅₀) de los valores normales en las respectivas gráficas. Consideramos daño incipiente al LT₁₀ (Manley y Hummel 1996), y daño irreversible al LT₅₀ (Piotrowska y Kacperska 1990; Kacperska y Szaniawski 1993). Esto facilitaba la comparación de los resultados con los de otros autores que evaluaron sus datos siguiendo el mismo criterio.

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Experimento 1: Acículas procedentes de pinos crecidos a diferente altitud sobre la isla de Tenerife

Las tendencias de los diversos parámetros con la disminución y el aumento de la temperatura de tratamiento, quedan claramente reflejados en las figuras 7.2-11. Así, mientras que los parámetros F_0 y F_s tienden a aumentar, los parámetros F_m , F_v/F_m y $Rfd ((F_m - F_s)/F_s)$, tienden a disminuir a medida que aumenta el daño al aparato fotosintético causado por las temperaturas extremas.

Para determinar las temperaturas a las que se producen los daños, elegimos el parámetro F_v/F_m , tanto para las bajas como para las altas temperaturas, por ser el que indica de forma más clara las desviaciones con respecto a los valores control y por ser el más utilizado, en general, por los diversos autores debido a su relación con la eficiencia cuántica del proceso fotosintético.

En las altas temperaturas podemos ver que, justo después del tratamiento, se detectan antes los daños, es decir a menor temperatura, que después del periodo de recuperación de 24 horas, por lo que tomamos estos últimos valores, que representan alteraciones más duraderas. Asimismo, en las bajas temperaturas, justo después del tratamiento resulta muy difícil evaluar los efectos del frío, pero estos se manifiestan claramente después del periodo de recuperación.

En cuanto a las bajas temperaturas, después de 24 horas de recuperación el parámetro F_v/F_m reveló un daño incipiente a -7 o -8 °C en los sitios de menor altitud y entre -8 y -10 °C en los sitios de mayor altitud, y un daño irreversible a -8 °C en el sitio más bajo y de -9 a -10 °C en los más elevados (tabla 7.I).

En el caso del calor, en la tabla 7.II, se resumen las temperaturas a las que los valores de F_v/F_m de recuperación se desvían un 10% y un 50% de los valores control. Después del periodo de recuperación este parámetro mostró daños incipientes a 44 °C en casi todos los sitios, excepto en el sitio V_S , en el que se produjo a 42 °C. Los daños irreversibles al aparato fotosintético se producen a 52 °C en el sitio de menor altitud y a 47 °C en el de mayor altitud.

Tabla 7.I. Valores de temperatura (en °C) a los que se produce el daño incipiente (10% de desviación; LT_{10}) y el daño irreversible (50% de desviación; LT_{50}) a las acículas en las bajas temperaturas, tanto para los estudios de fluorescencia tras 24 horas de recuperación (F_v/F_m), como para los de liberación de electrolitos (LE).

	<u>Bajas temperaturas</u>			
	LT_{10} F_v/F_m	LE	LT_{50} F_v/F_m	LE
<i>Sitio I_S</i>	-7	-5	-8	-9
<i>Sitio II_S</i>	-8	-6	-9	-9
<i>Sitio III_S</i>	-10	-10	-11	-14
<i>Sitio IV_N</i>	-9	-9	-10	-10
<i>Sitio V_S</i>	-8	-8	-9	-11

Tabla 7.II. Valores de temperatura (en °C) a los que se produce el daño incipiente (10% de desviación; LT_{10}) y el daño irreversible (50% de desviación; LT_{50}) a las acículas en las altas temperaturas, tanto para los estudios de fluorescencia tras 24 horas de recuperación (F_v/F_m), como para los de liberación de electrolitos (LE).

	<u>Altas temperaturas</u>			
	LT_{10} F_v/F_m	LE	LT_{50} F_v/F_m	LE
<i>Sitio I_S</i>	44	> 52	52	> 52
<i>Sitio II_S</i>	44	53	48	56
<i>Sitio III_S</i>	44	51	46	54
<i>Sitio IV_N</i>	44	53	50	54
<i>Sitio V_S</i>	42	50	47	53

En la figura 7.12 podemos ver los resultados obtenidos por medidas de liberación de electrolitos por conductividad para tratamientos a altas y bajas temperaturas en los diferentes sitios de estudio.

En la tabla 7.I se representan las bajas temperaturas a partir de las cuales se produce el 10% y el 50% de la liberación de electrolitos y asumimos con ello una pérdida progresiva de la integridad de la membrana celular. Vemos que en la mayoría de los casos coinciden, o son muy próximas, a los valores de temperatura a los que se produce también el daño en fluorescencia.

En la tabla 7.II se representan las temperaturas a partir de las cuales comienza la liberación de electrolitos en el calor (evaluadas también como LT_{10} y LT_{50}). Podemos observar que estos valores son más altos que las temperaturas a las que se observan los daños al aparato fotosintético por medio de la fluorescencia de la clorofila.

En ningún momento se observaron manifestaciones claras del daño de manera visual para las acículas procedentes de diferentes altitudes, ni para bajas ni para altas temperaturas, ni justo después del tratamiento ni tampoco después de 24 horas a temperatura ambiente, oscuridad y condiciones de saturación acuosa.

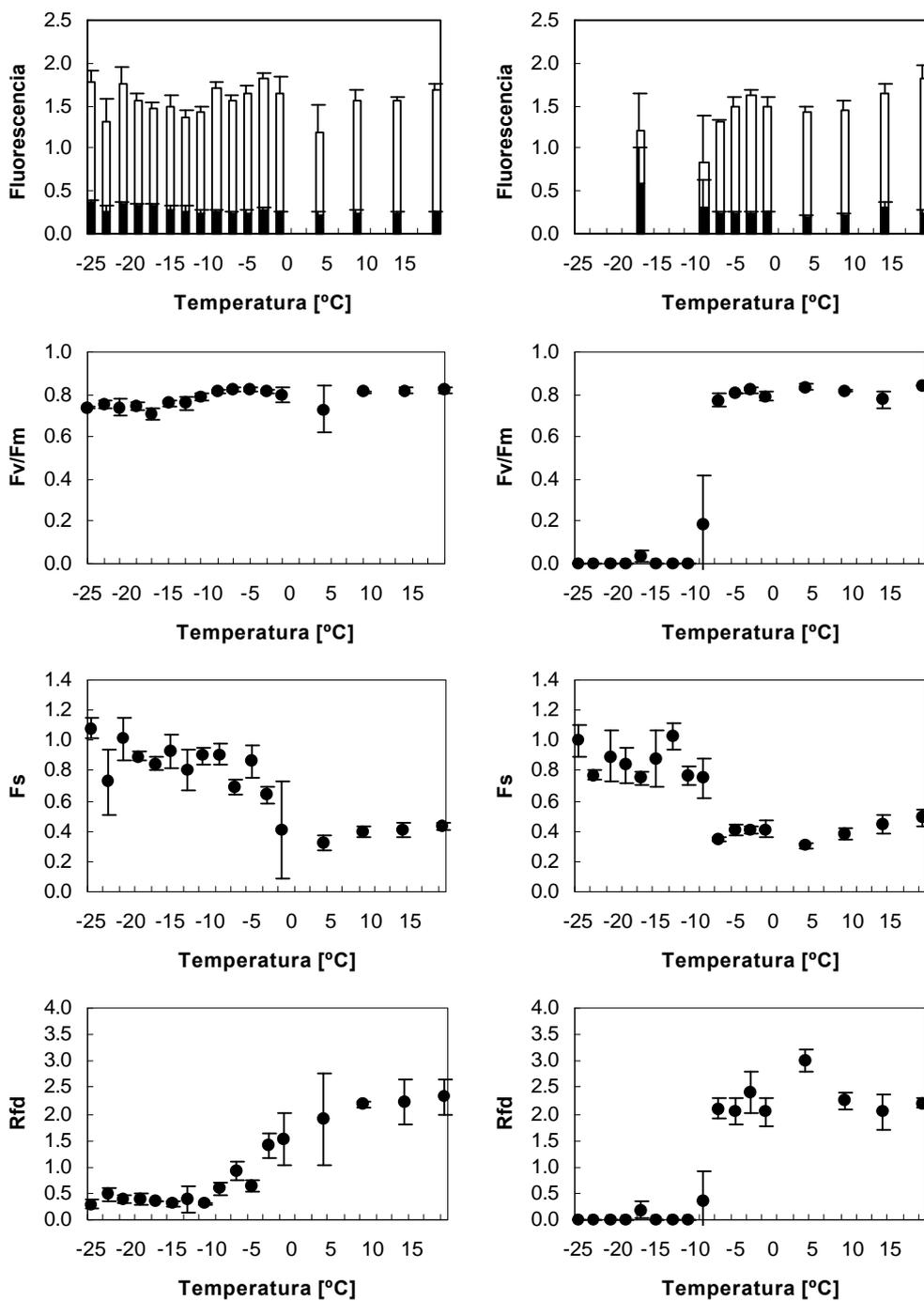


Figura 7.2. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de bajas temperaturas en el sitio I_s, a 550 metros de altitud sobre el nivel del mar, en el municipio de Candelaria. A la izquierda los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

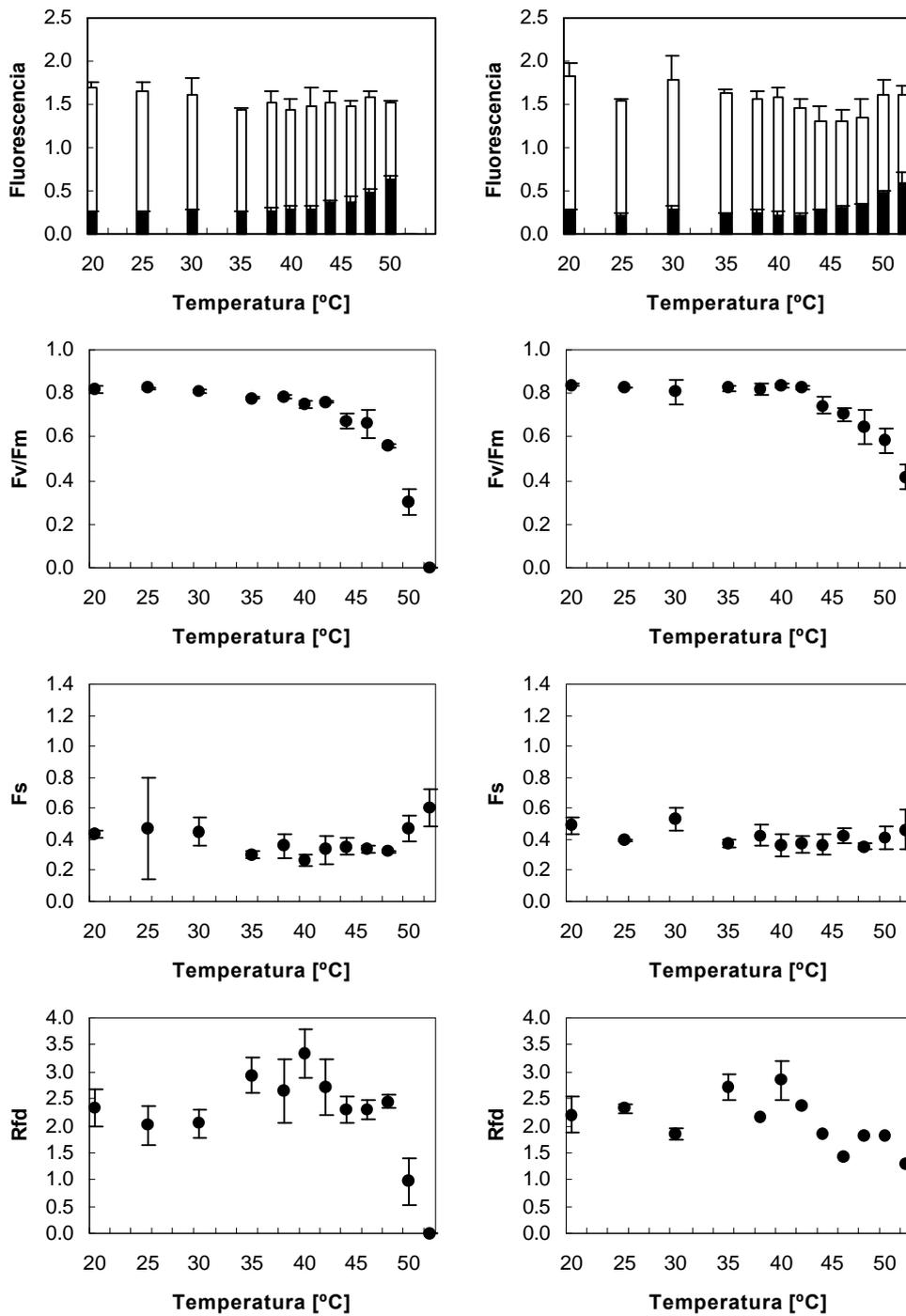


Figura 7.3. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de altas temperaturas en el sitio I_s, a 550 metros de altitud sobre el nivel del mar, en el municipio de Candelaria. A la izquierda los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

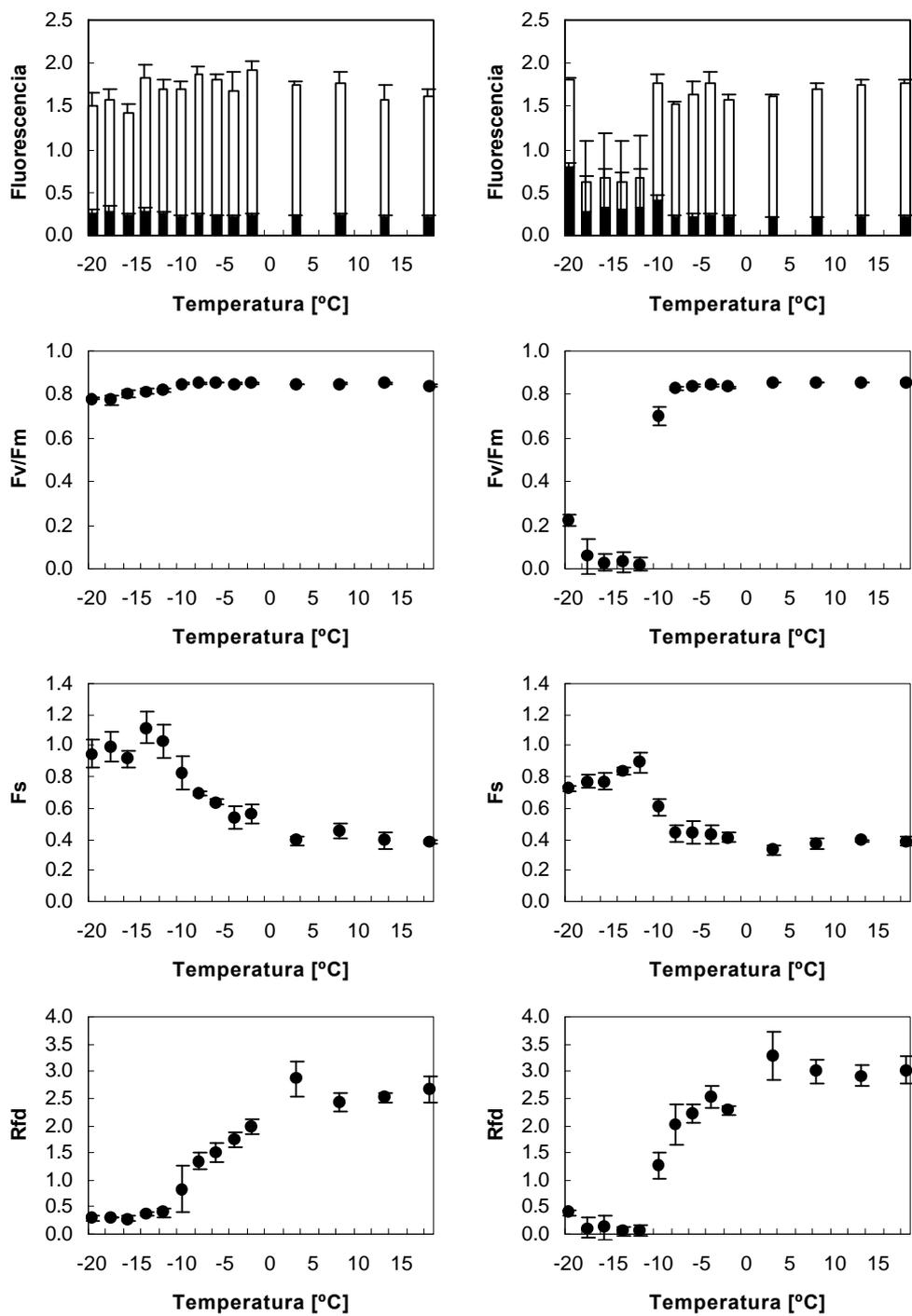


Figura 7.4. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de bajas temperaturas en el sitio II_S, a 850 metros de altitud sobre el nivel del mar, en el municipio de Arico. A la izquierda los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

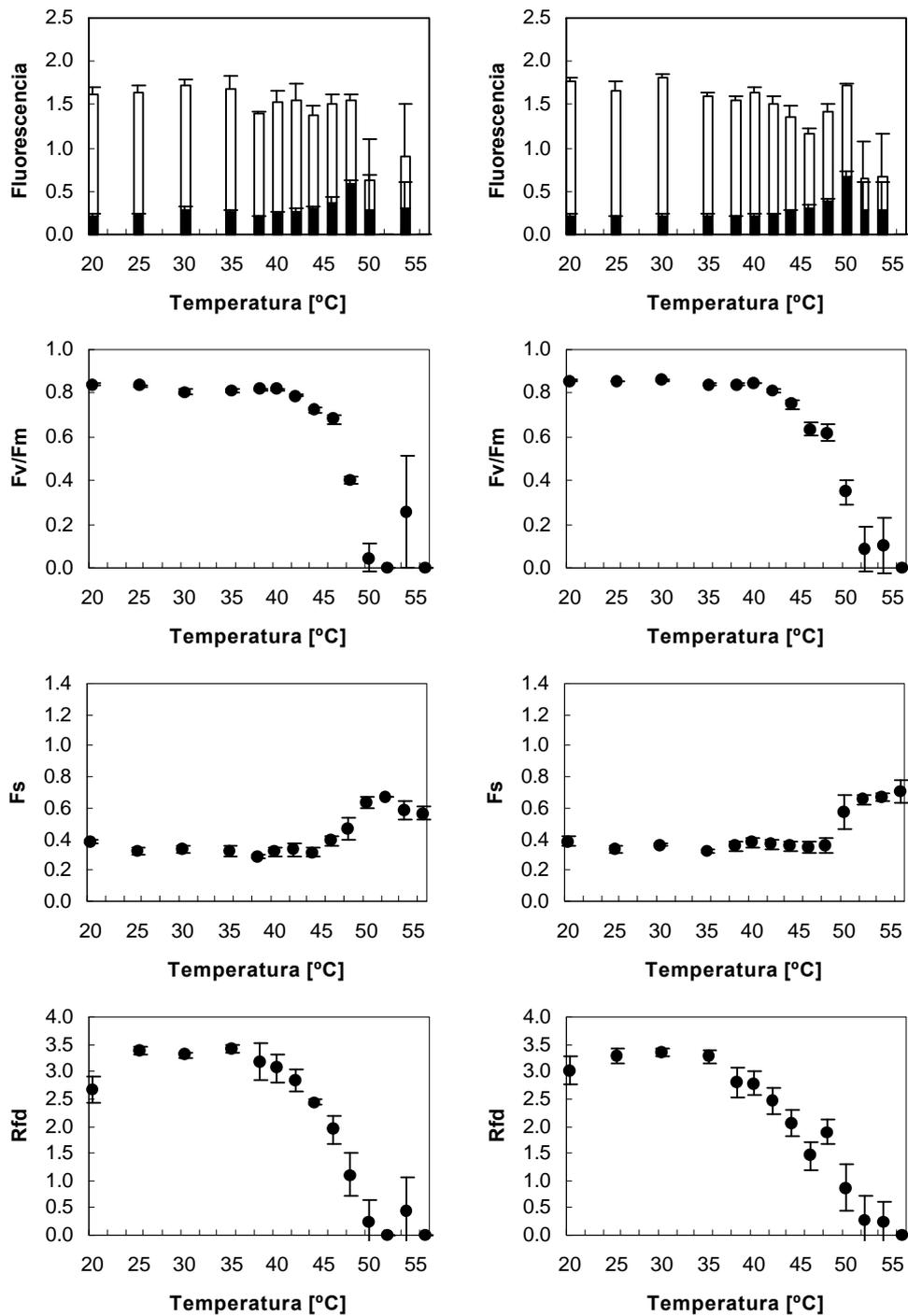


Figura 7.5. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de altas temperaturas en el sitio II_s, a 850 metros de altitud sobre el nivel del mar, en el municipio de Arico. A la izquierda los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

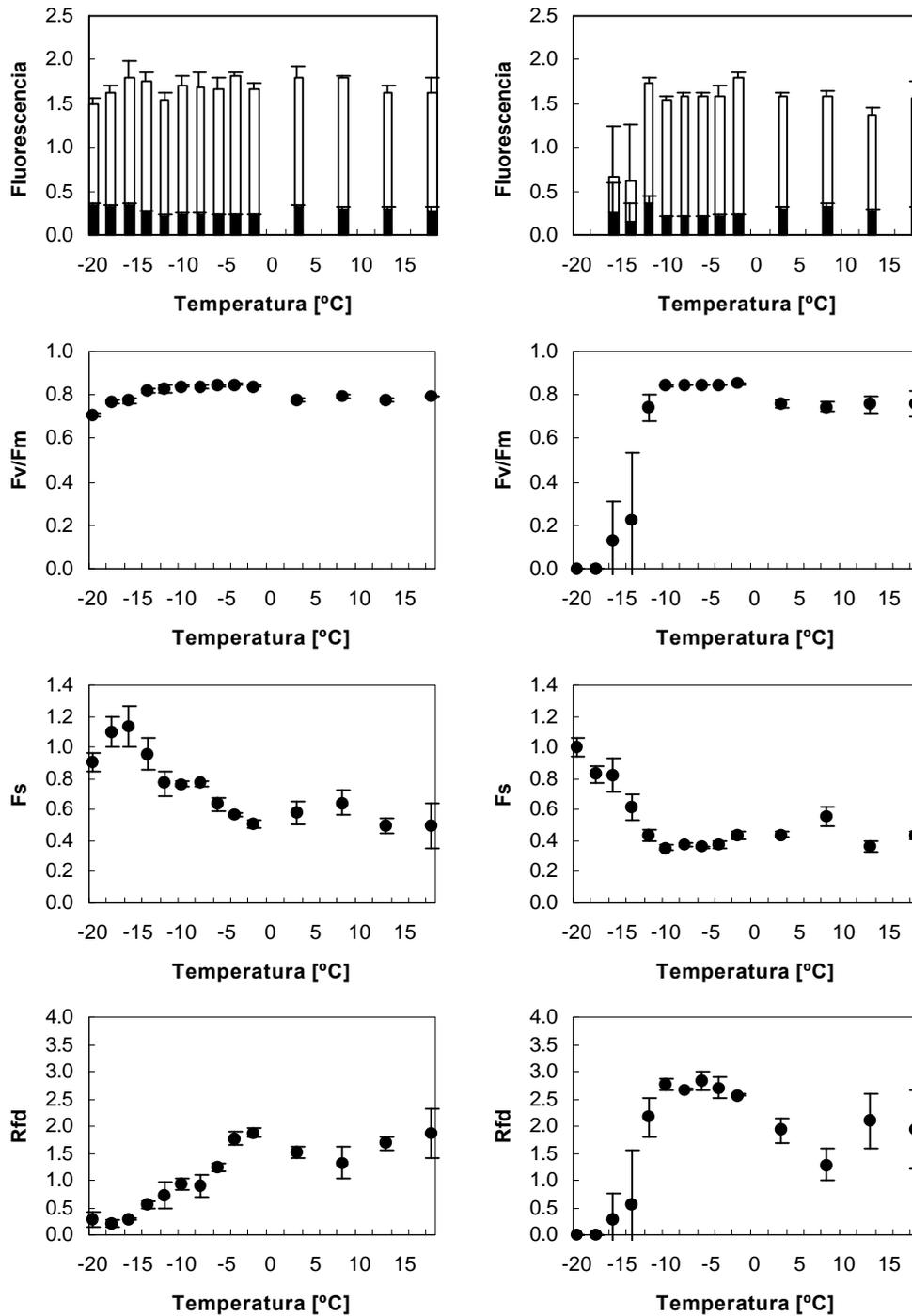


Figura 7.6. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de bajas temperaturas en el sitio III_s, a 1500 metros de altitud sobre el nivel del mar, en el municipio de Arico. A la izquierda los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

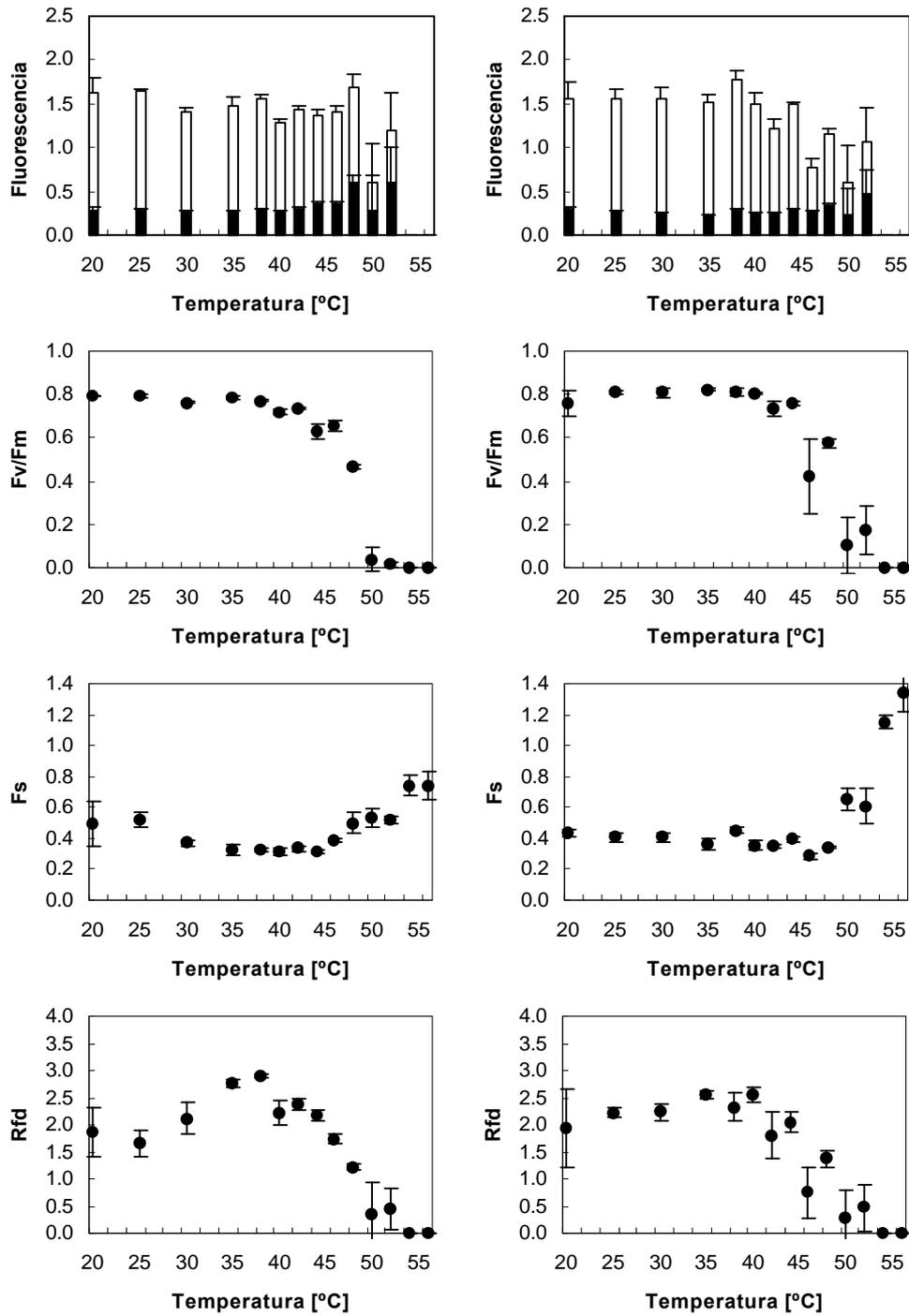


Figura 7.7. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de altas temperaturas en el sitio III_s, a 1500 metros de altitud sobre el nivel del mar, en el municipio de Arico. A la izquierda los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuoso y temperatura ambiente.

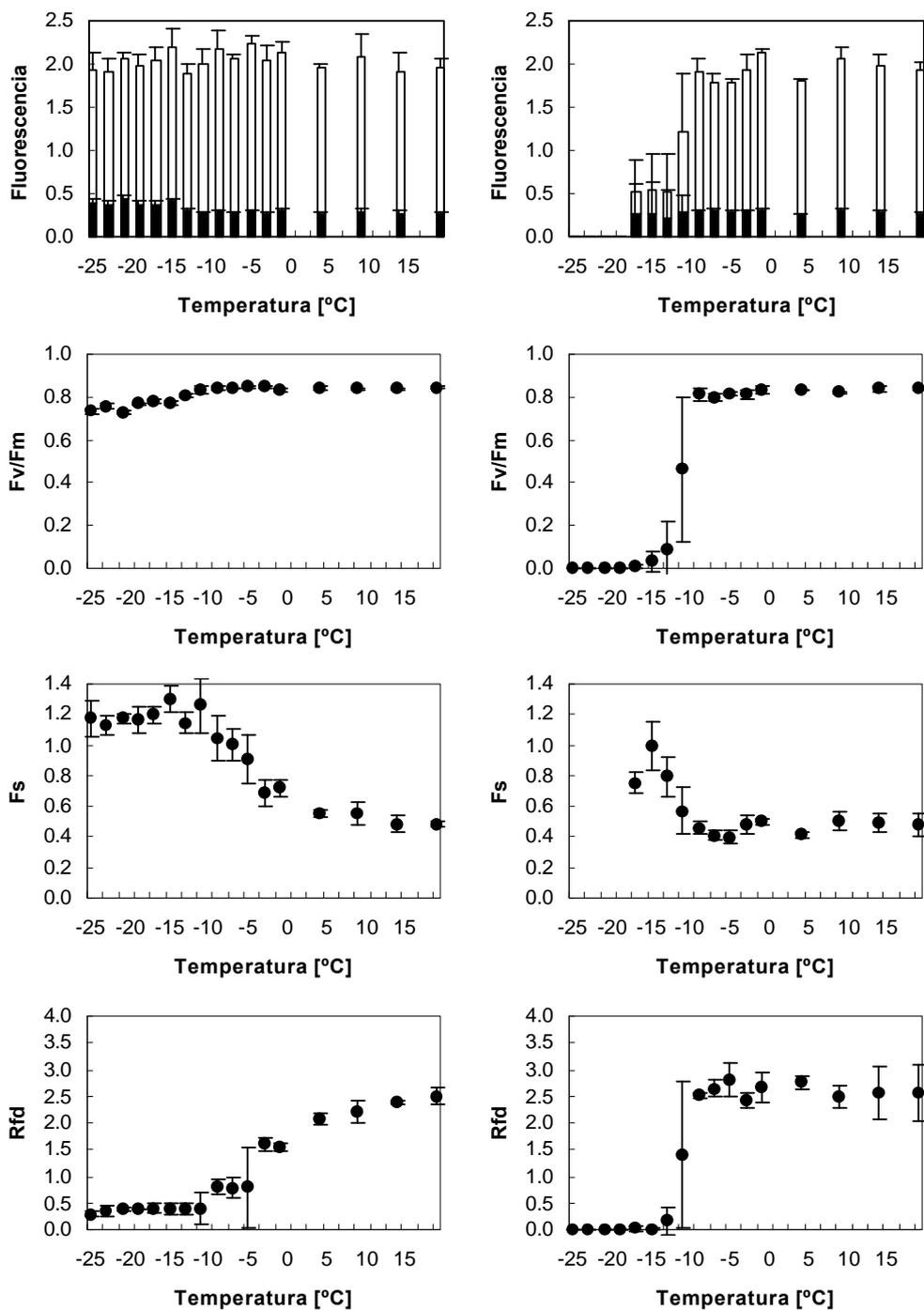


Figura 7.8. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de bajas temperaturas en el sitio IV_N, a 1750 metros de altitud sobre el nivel del mar, en el municipio de La Orotava. A la izquierda los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

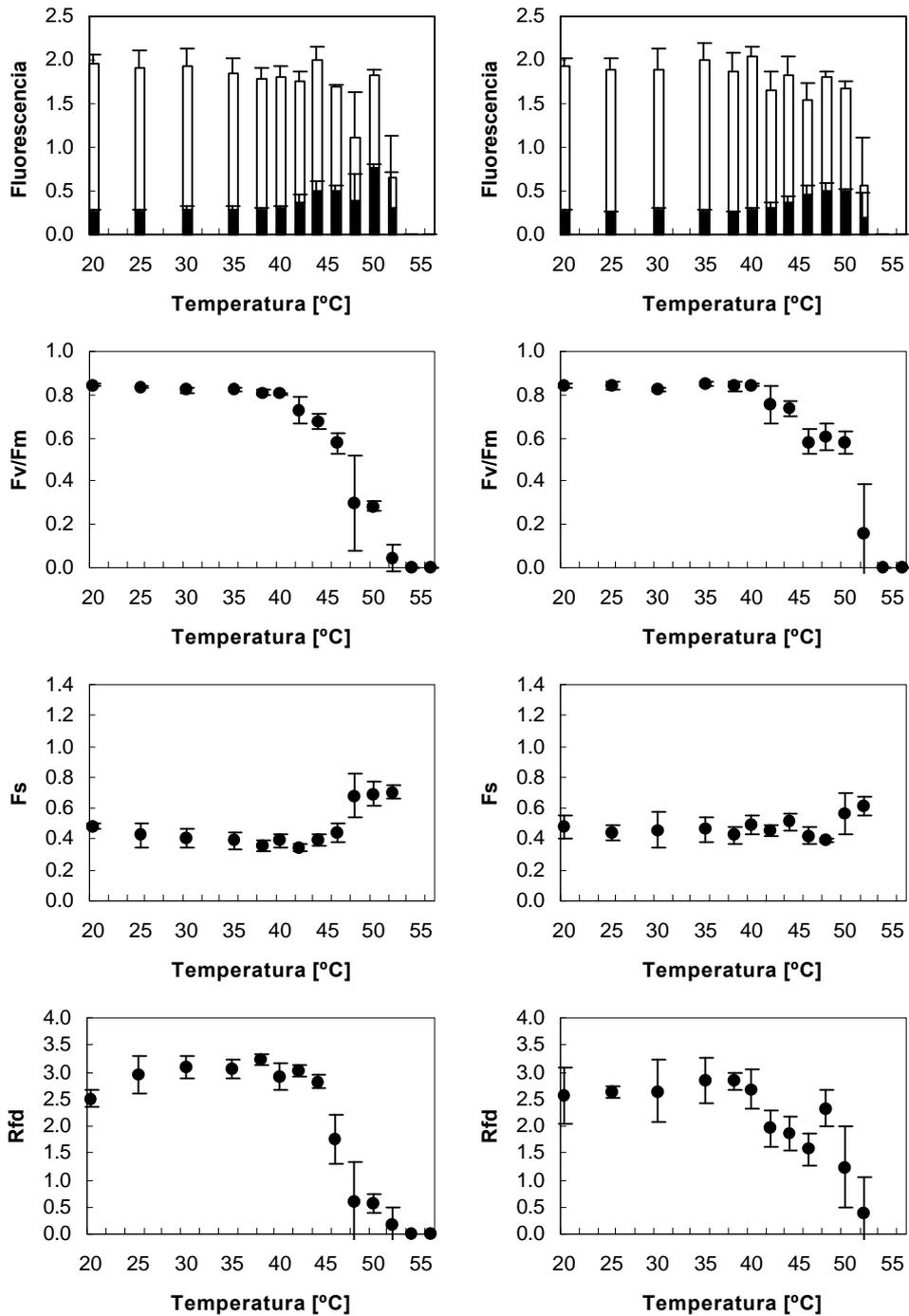


Figura 7.9. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de altas temperaturas en el sitio IV_N, a 1750 metros de altitud sobre el nivel del mar, en el municipio de La Orotava. A la izquierda los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

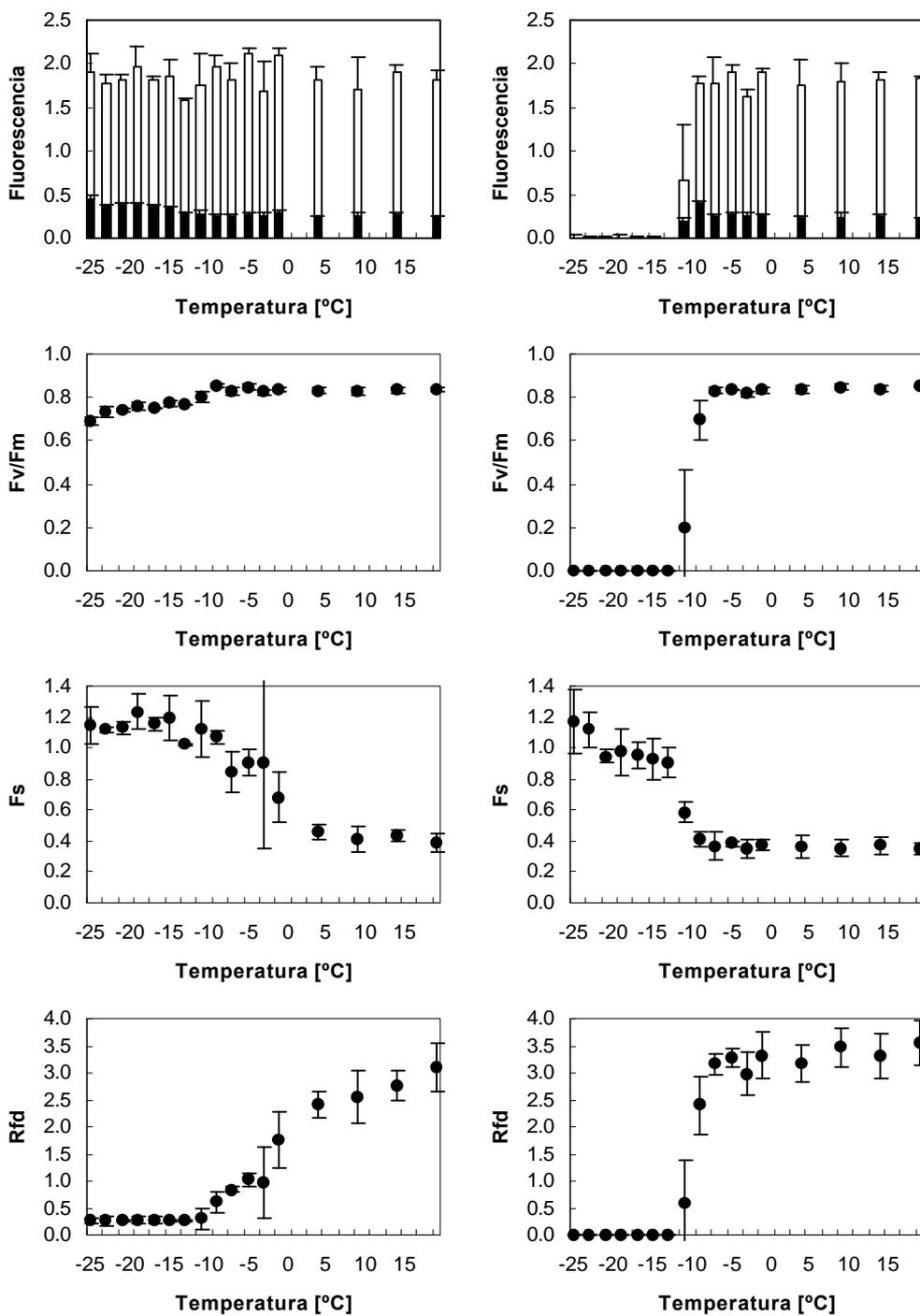


Figura 7.10. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de bajas temperaturas en el sitio V_s, a 1900 metros de altitud sobre el nivel del mar, en el municipio de Arico. A la izquierda los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

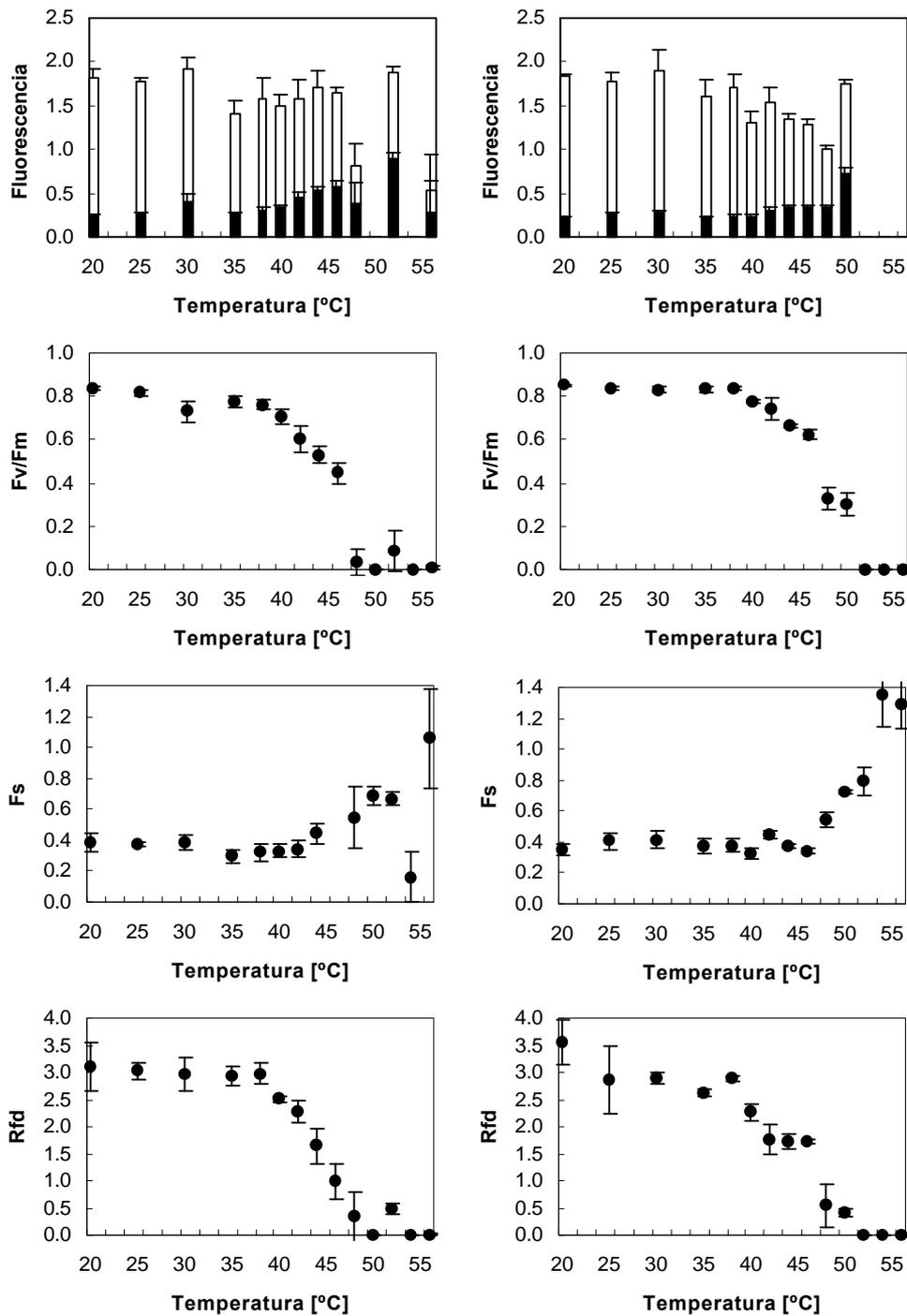


Figura 7.11. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de altas temperaturas en el sitio V_s, a 1950 metros de altitud sobre el nivel del mar, en el municipio de Arico. A la izquierda los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

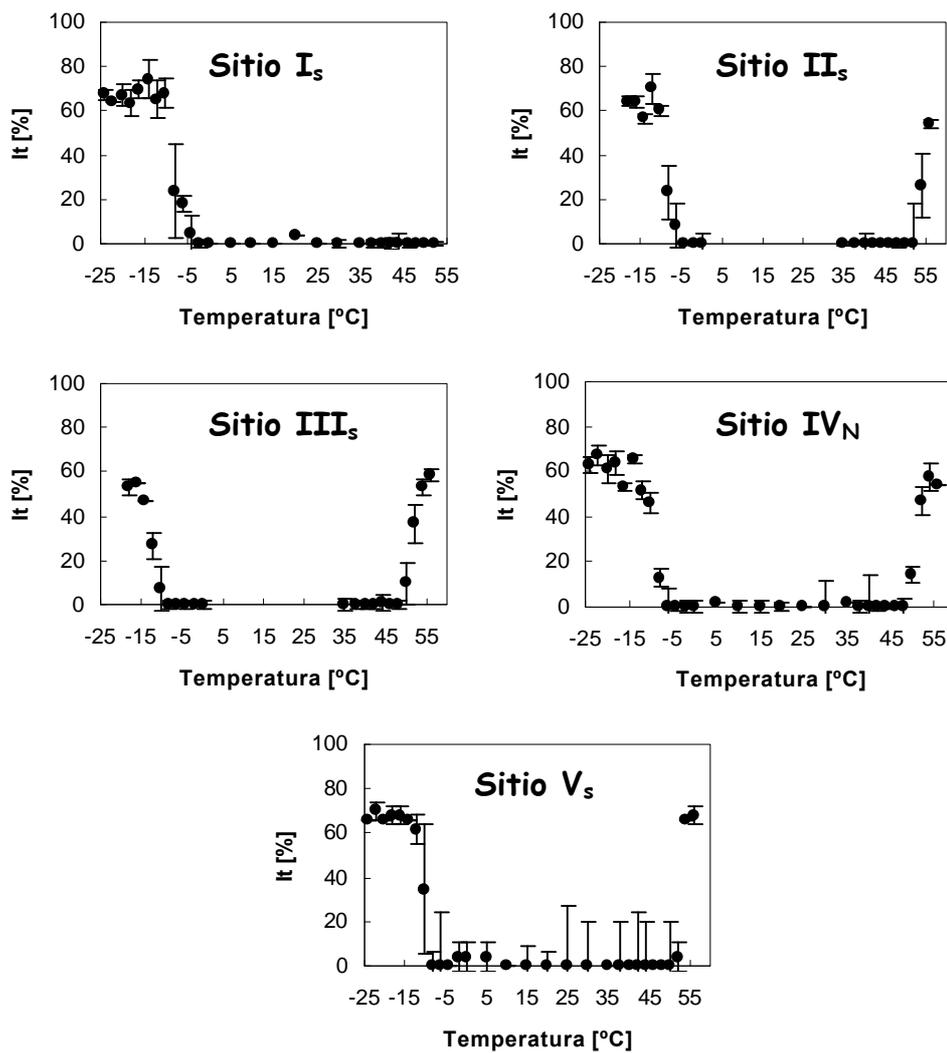


Figura 7.12. Respuesta de la liberación de electrolitos a las bajas y altas temperaturas en los cinco sitios estudiados, medida por conductividad y expresada como índice de daño en porcentaje (It %).

7.3.2. Experimento 2: Acículas de diferentes estados de desarrollo

Las tendencias generales de los diferentes parámetros de fluorescencia fueron las mismas que las observadas en el experimento 1, y que quedan reflejados en las figuras 7.13-22: F_0 y F_s experimentan un aumento, mientras que la tendencia del resto de los parámetros representados en las gráficas es a disminuir.

De nuevo se consideró el parámetro F_v/F_m para evaluar el daño al aparato fotosintético por las mismas razones que en el experimento anterior. Asimismo, también en este caso los valores obtenidos después del periodo de recuperación representan mejor las alteraciones realmente duraderas, por lo que se eligieron estos para reflejar los resultados.

El daño producido por las bajas temperaturas al aparato fotosintético se refleja en la tabla 7.III. En ella podemos observar como, para el parámetro de fluorescencia F_v/F_m , los daños incipientes se producen bastante antes en las acículas de 24 meses (LT_{10} de -2.5 °C), comparadas con el resto de las edades, tendencia que se confirma analizando las temperaturas a las que se producen daños permanentes en las acículas, siendo las más resistentes, en este caso, las acículas primarias con un LT_{50} de -12 °C.

En la tabla 7.IV podemos ver como, para las altas temperaturas, los valores de LT_{10} y LT_{50} del parámetro F_v/F_m reflejan una resistencia muy similar del aparato fotosintético en todos los tipos de edades aciculares. Ahora bien, parece existir una cierta tendencia a que las acículas de mayor edad resistan un poco más las altas temperaturas, observándose los valores más altos en acículas de un año de edad crecidas en condiciones naturales en el bosque con un LT_{10} de 44 °C y un LT_{50} de 50 °C.

Tabla 7.III. Valores de temperatura (en °C) a los que se produce el daño incipiente (desviación del 10% de los valores normales; LT_{10}) y el daño irreversible (desviación del 50% de los valores normales; LT_{50}) a las acículas a bajas temperaturas, tanto para los estudios de fluorescencia tras 24 horas del tratamiento (F_v/F_m), como para los de liberación de electrolitos (LE).

	<u>Bajas temperaturas</u>		<u>Bajas temperaturas</u>	
	<u>LT_{10}</u>	<u>LE</u>	<u>LT_{50}</u>	<u>LE</u>
	<u>F_v/F_m</u>		<u>F_v/F_m</u>	
<i>Cotiledones</i>	-7	-9	-9	-13
<i>Acículas primarias</i>	-8	-7	-12	-12
<i>Acículas de 6 meses</i>	-8.5	-8.5	-10	-10
<i>Acículas de 12 meses</i>	-9	-9	-10	-10
<i>Acículas de 24 meses</i>	-2.5	-4.5	-4.5	-5

Tabla 7.IV. Valores de temperatura (en °C) a los que se produce el daño incipiente (desviación del 10% de los valores normales; LT_{10}) y el daño irreversible (desviación del 50% de los valores normales; LT_{50}) a las acículas a altas temperaturas, tanto para los estudios de fluorescencia tras 24 horas del tratamiento (F_v/F_m), como para los de liberación de electrolitos (LE).

	<u>Altas temperaturas</u>		<u>Altas temperaturas</u>	
	<u>LT_{10}</u>	<u>LE</u>	<u>LT_{50}</u>	<u>LE</u>
	<u>F_v/F_m</u>		<u>F_v/F_m</u>	
<i>Cotiledones</i>	42	52	48	54
<i>Acículas primarias</i>	42	47	47	49
<i>Acículas de 6 meses</i>	42	50	50.5	51
<i>Acículas de 12 meses</i>	44	53	50	54
<i>Acículas de 24 meses</i>	42.5	52.5	48	53.5

Los daños incipientes en las bajas temperatura, tanto en el aparato fotosintético como en cuanto a la integridad de las membranas, rondan valores similares en las diferentes edades aciculares, siendo tan solo claramente más baja la temperatura a la que se produce el daño en las acículas de 24 meses.

Los daños irreversibles a la membrana plasmática se producen primero en las acículas de dos años de edad y las más resistentes fueron las acículas más jóvenes, con un LT_{50} de -13 °C para los cotiledones y de -12 °C para las acículas primarias. Para el parámetro F_v/F_m parece existir una tendencia a dañarse antes a medida que aumenta la edad de las acículas, con la única excepción de los cotiledones (tabla 7.III).

En el caso de las altas temperaturas el parámetro F_v/F_m comienza a sufrir alteraciones incipientes sobre los 42 °C, excepto en las acículas de 12 meses que fueron ligeramente más resistentes (44 °C), hecho que se ve confirmado al analizar el daño a las membranas plasmáticas, en las que también las acículas de 12 meses fueron las más resistentes (53 °C) y las acículas primarias las más sensibles (47 °C).

En cuanto a los daños irreversibles a las membranas debido a las altas temperaturas, las más resistentes fueron las acículas más jóvenes (cotiledones) y las más viejas (de 12 y 24 meses).

En lo que se refiere a la valoración visual, se encontraron cambios de coloración y de flaccidez de los cotiledones y las acículas primarias de los pinos de un año de edad sometidos a las temperaturas frías y calientes más extremas de (-24, -22 -20, 52, 54 y 56 °C), después del periodo de recuperación de 24 horas. En las acículas de 6, 12 y 24 meses, en ningún momento se observaron manifestaciones claras del daño de forma visual, ni en el frío ni en el calor, ni justo después del tratamiento ni tampoco después de 24 horas a temperatura ambiente, oscuridad y condiciones de saturación acuosa.

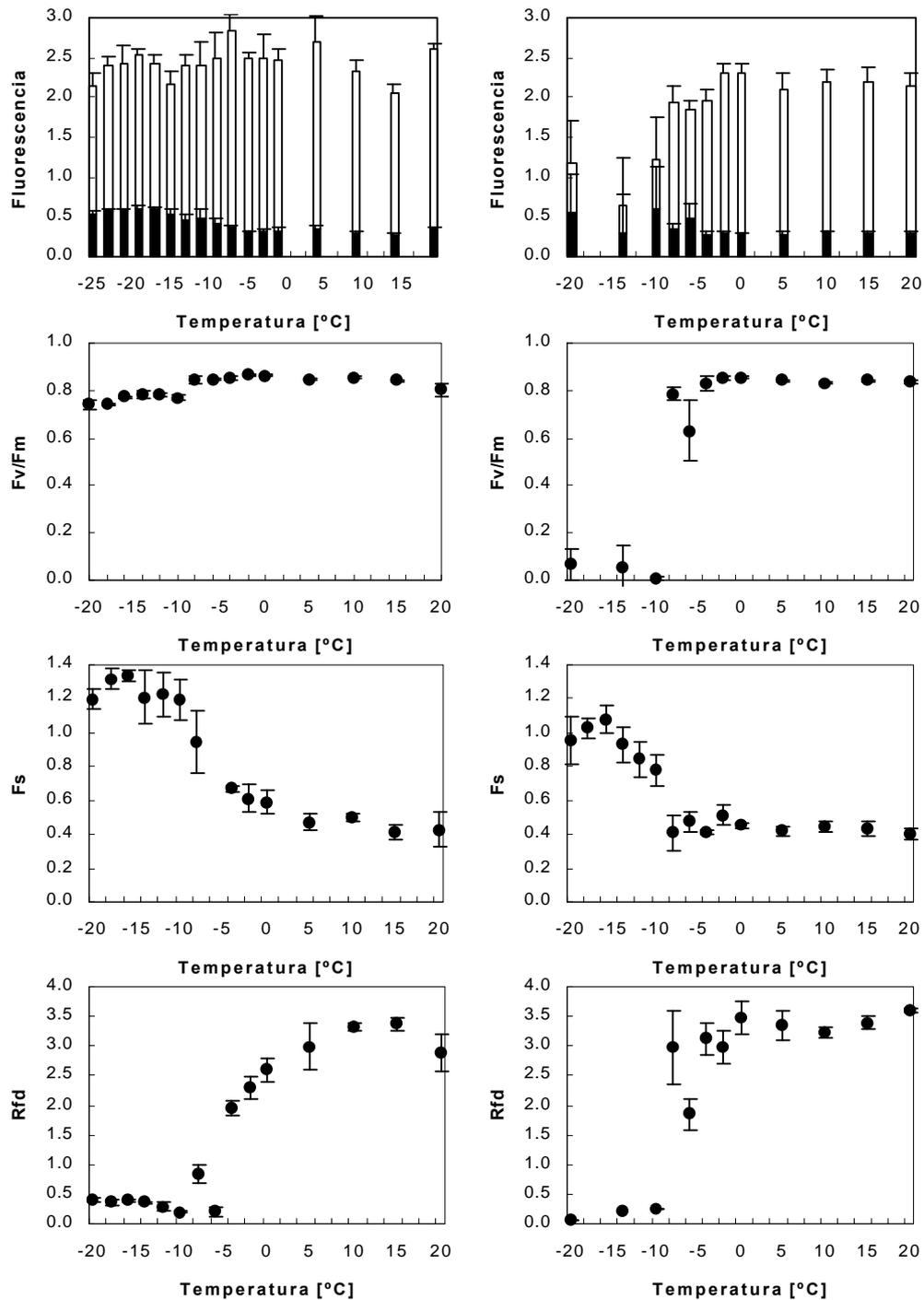


Figura 7.13. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de bajas temperaturas de cotiledones procedentes de pinos recién germinados en el invernadero del Departamento de Fisiología Vegetal. A la izquierda se representan los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

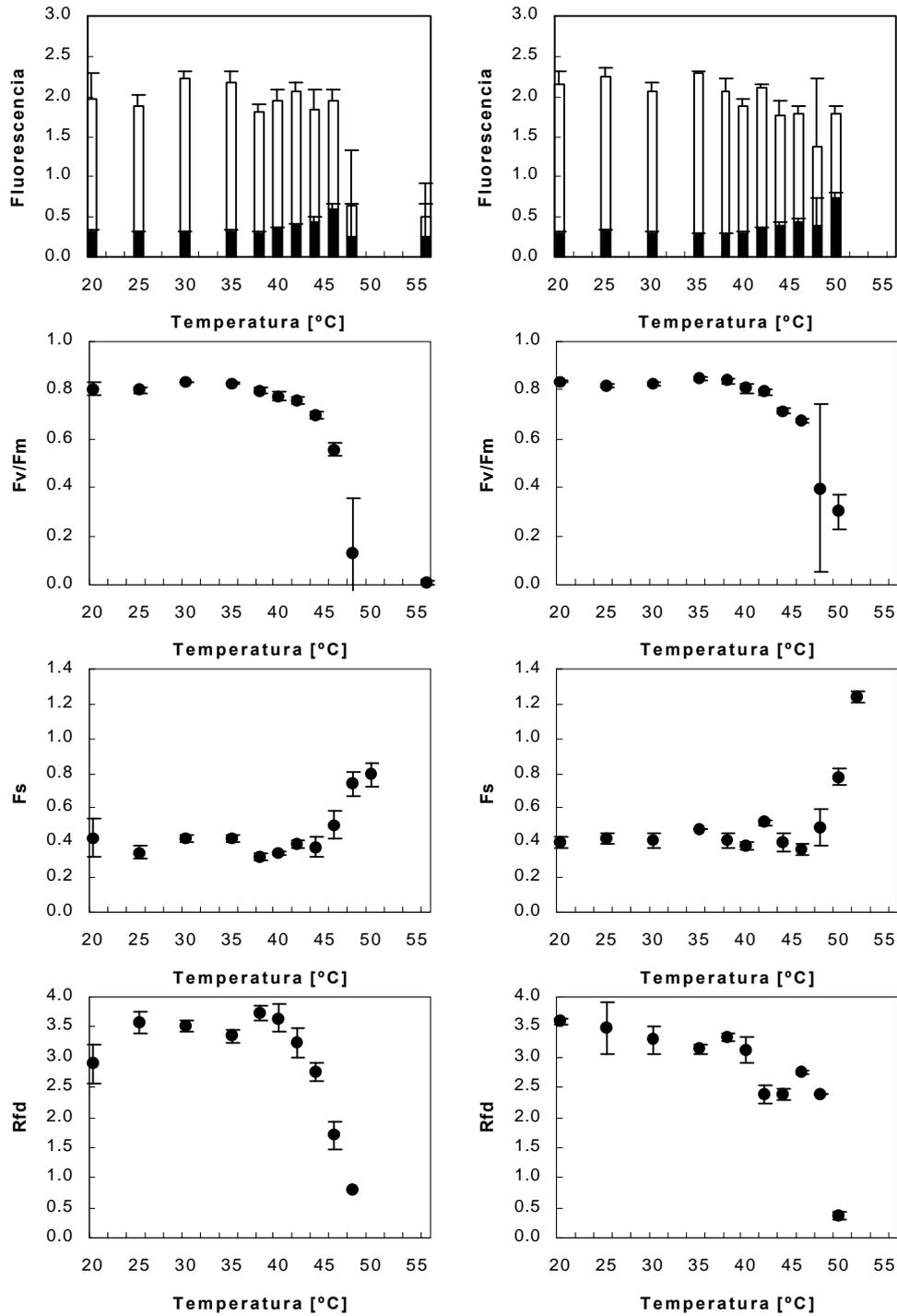


Figura 7.14. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de altas temperaturas de cotiledones procedentes de pinos recién germinados en el invernadero del Departamento de Fisiología Vegetal. A la izquierda se representan los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

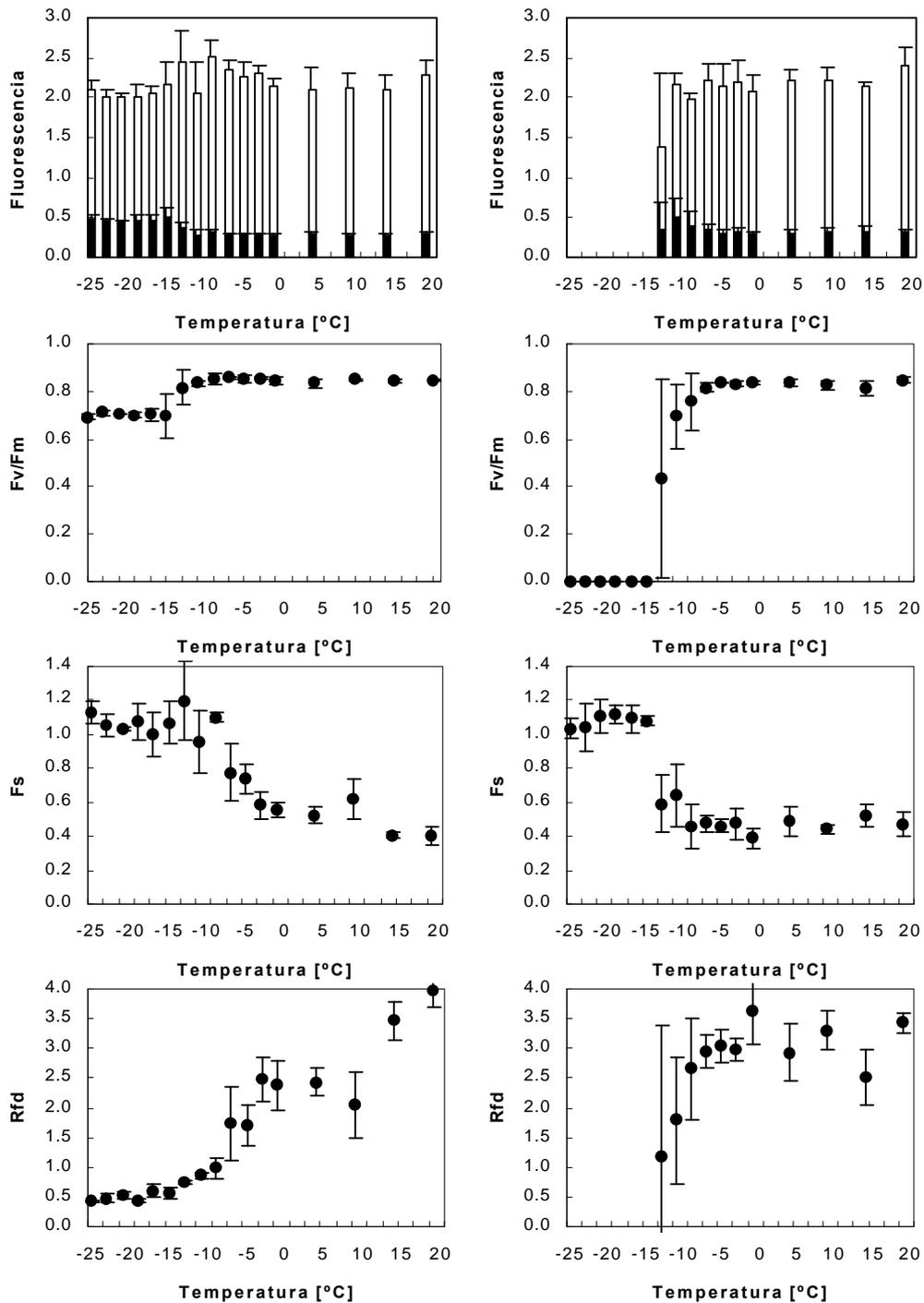


Figura 7.15. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de bajas temperaturas de **acículas primarias** procedentes de pinos de un año de edad en maceta en el jardín experimental del Departamento de Fisiología Vegetal. A la izquierda se representan los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

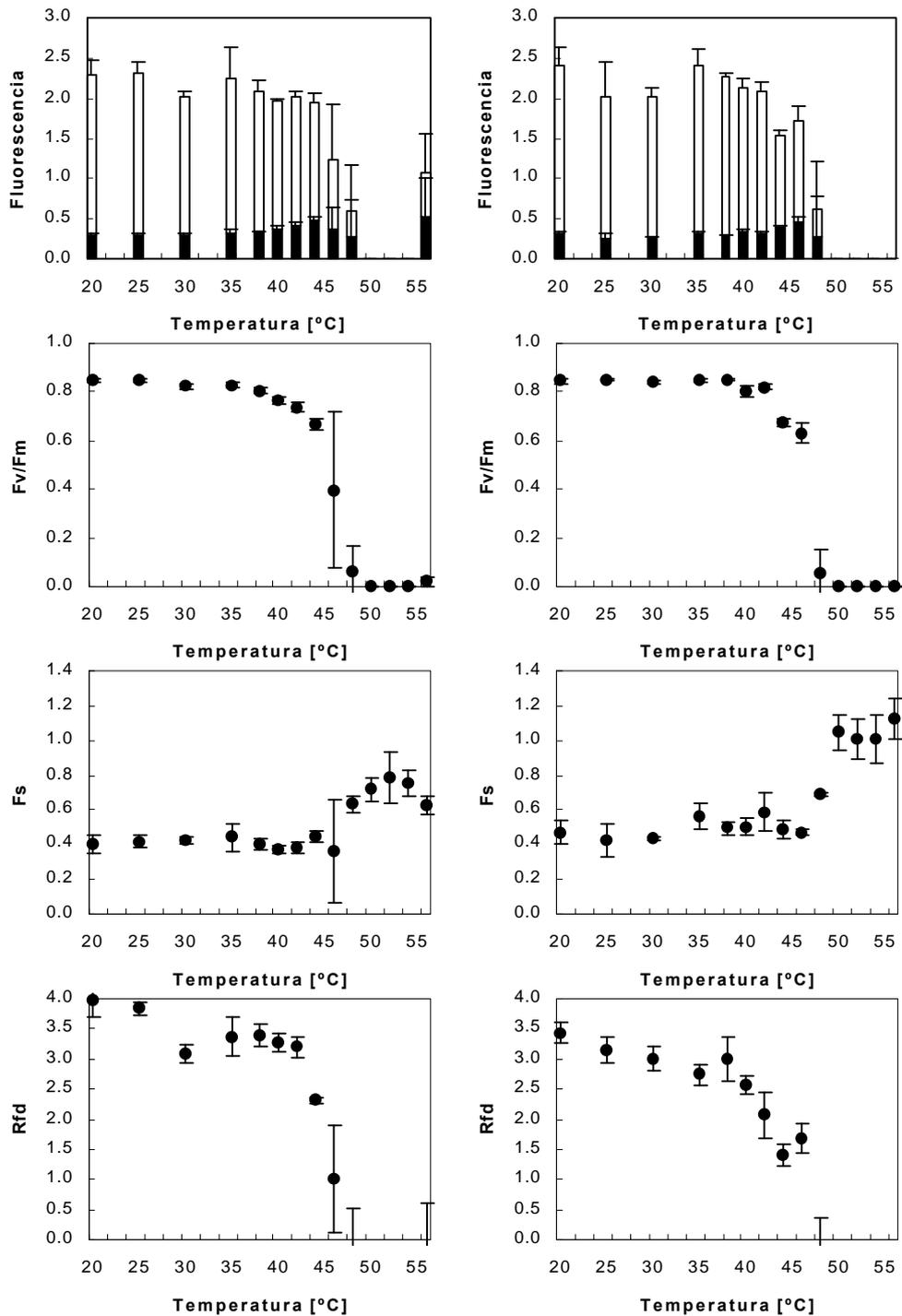


Figura 7.16. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de altas temperaturas de **acículas primarias** procedentes de pinos de un año de edad en maceta en el jardín experimental del Departamento de Fisiología Vegetal. A la izquierda se representan los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

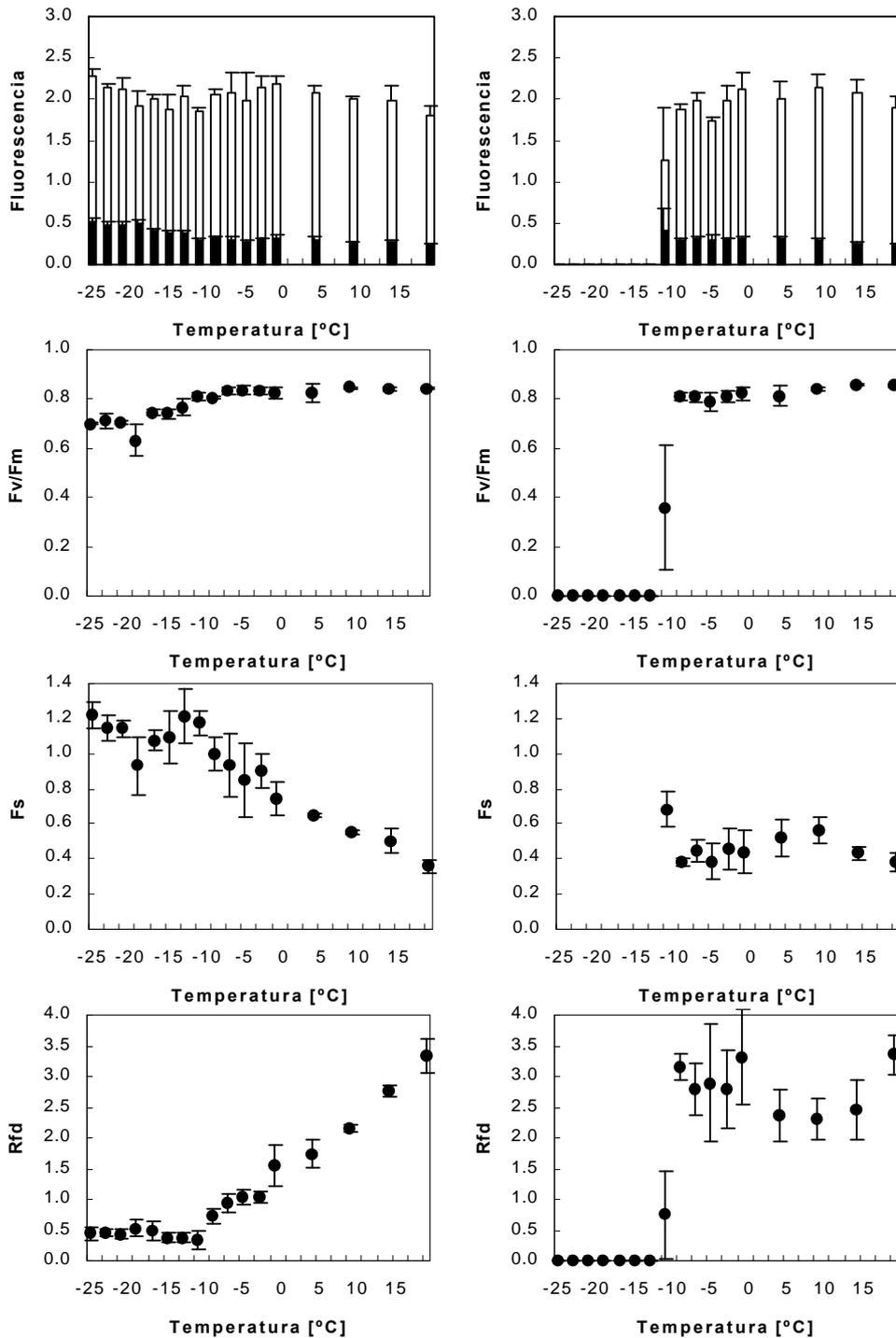


Figura 7.17. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de bajas temperaturas de **acículas de 6 meses** de edad procedentes de pinos adultos del bosque. A la izquierda se representan los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

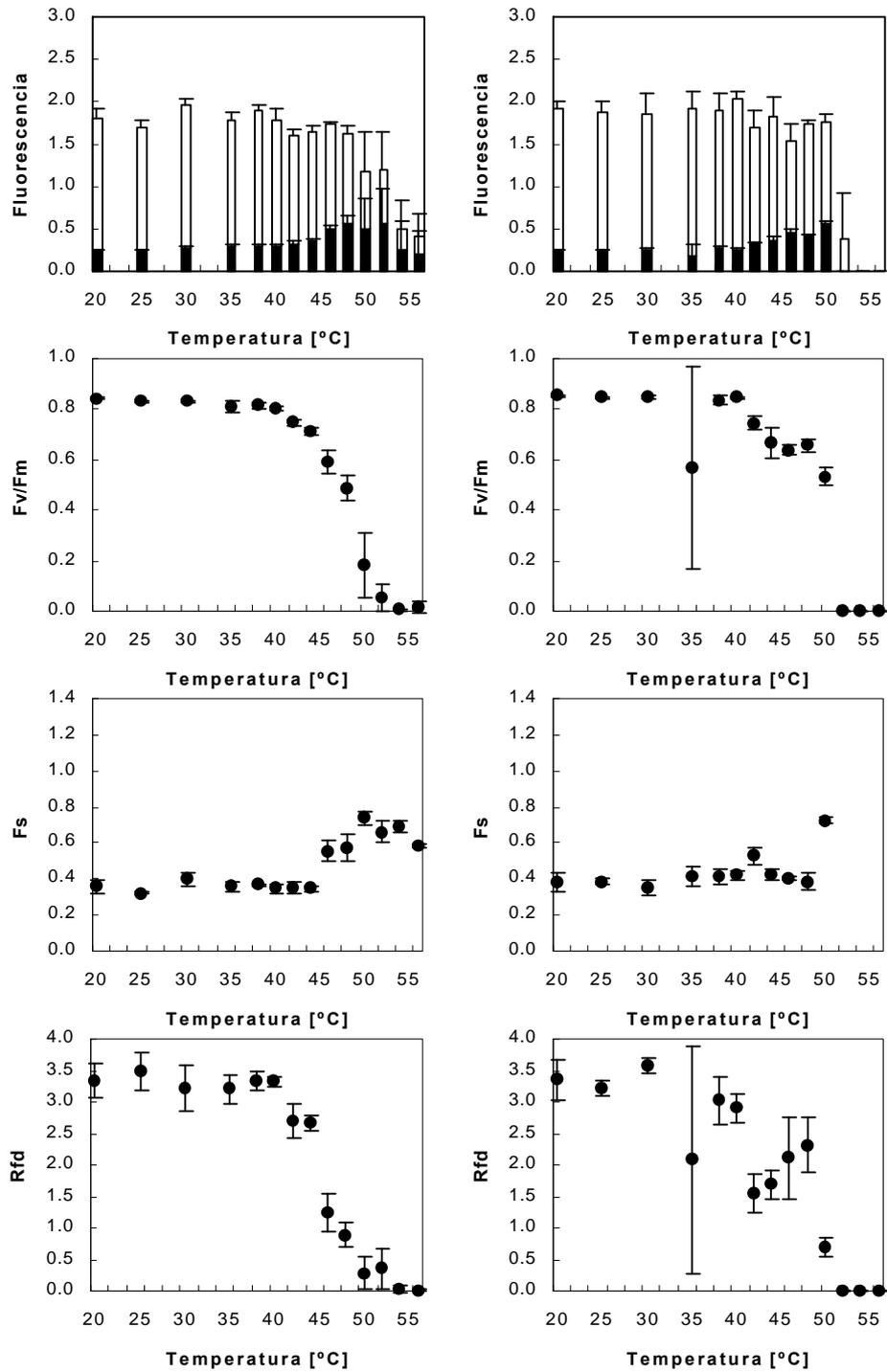


Figura 7.18. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de altas temperaturas de acículas de 6 meses de edad procedentes de pinos adultos del bosque. A la izquierda se representan los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

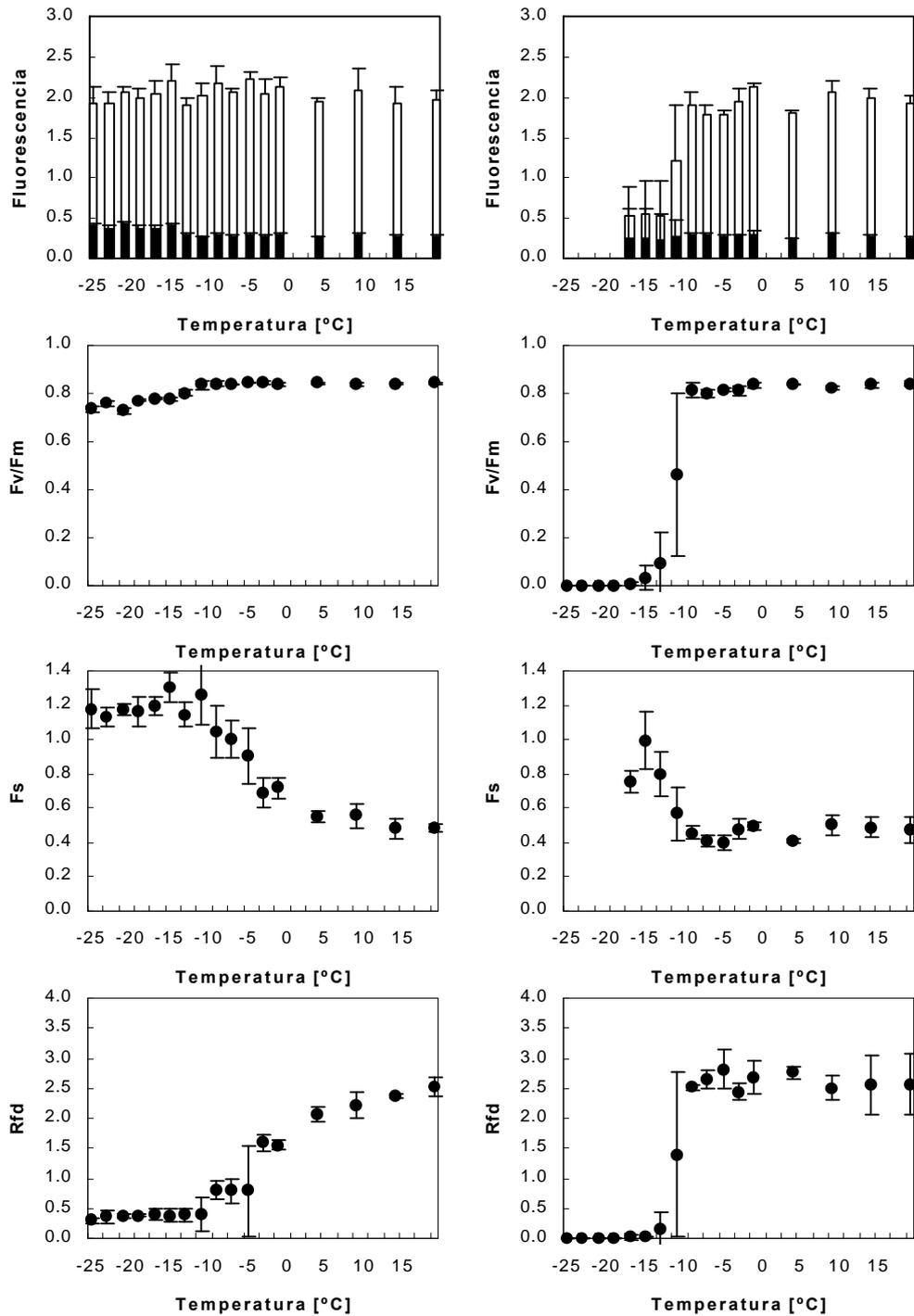


Figura 7.19. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de bajas temperaturas de acículas de 12 meses de edad procedentes de pinos adultos del bosque. A la izquierda se representan los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

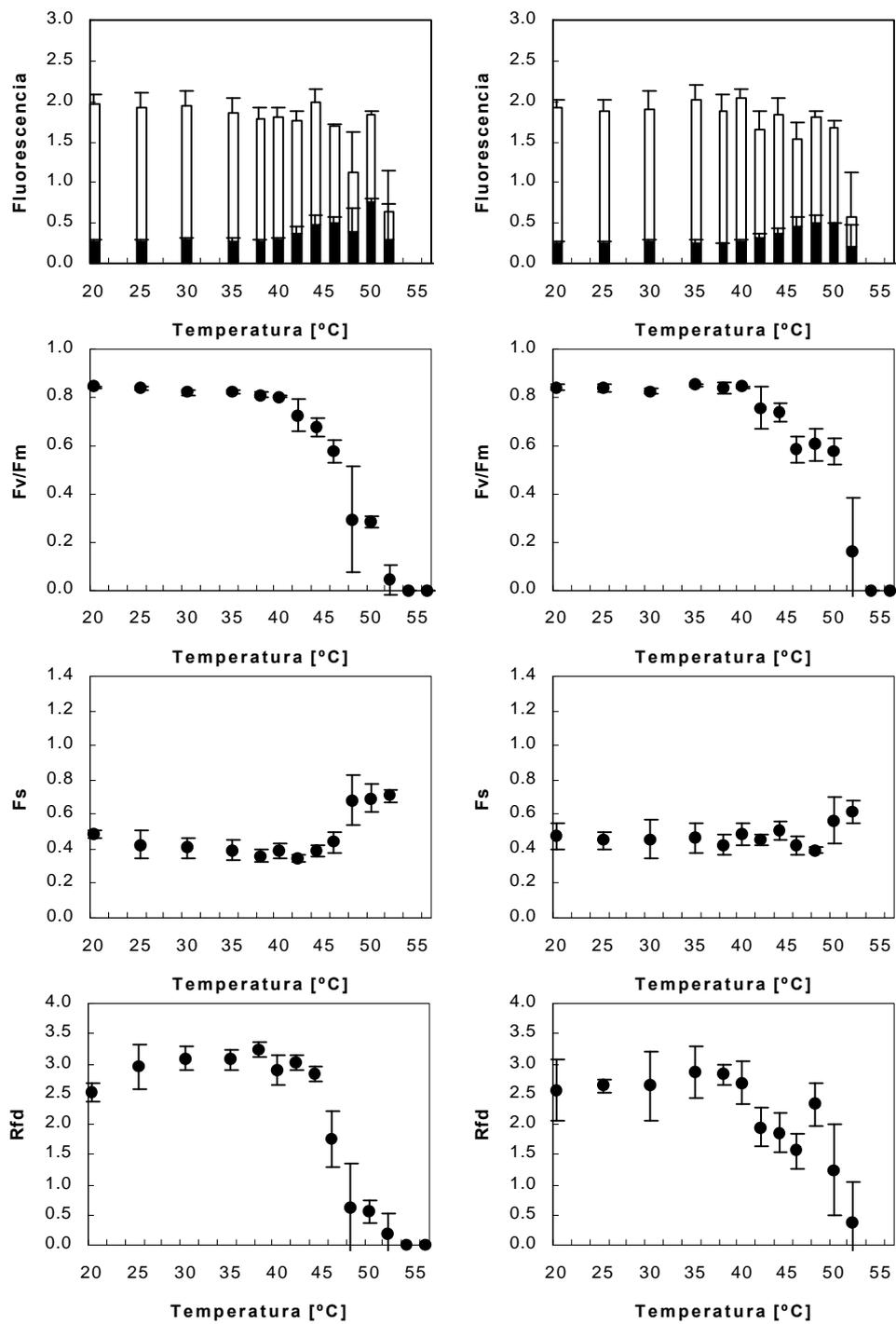


Figura 7.20. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de altas temperaturas de **acículas de 12 meses** de edad procedentes de pinos adultos del bosque. A la izquierda se representan los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

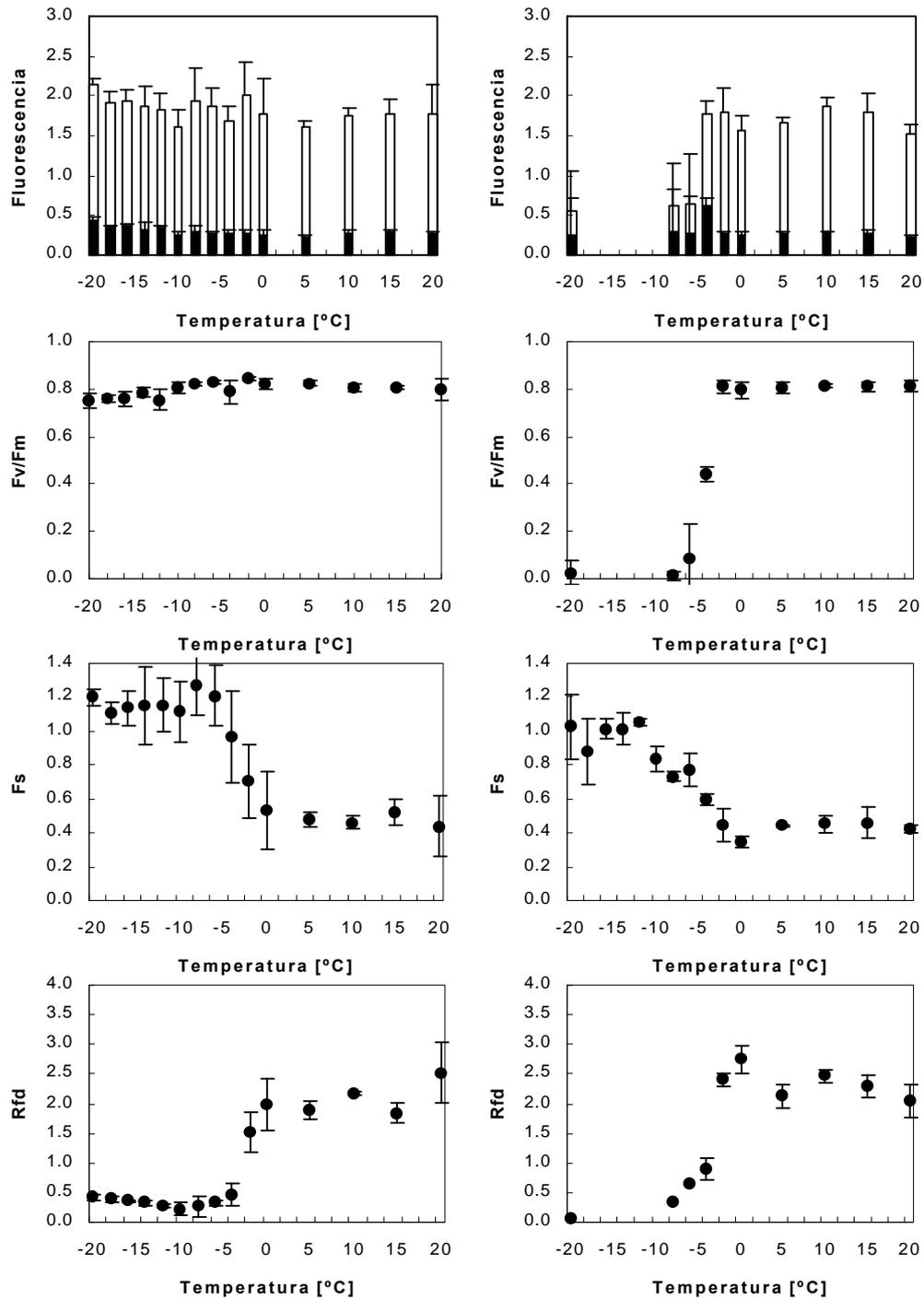


Figura 7.21. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de bajas temperaturas de acículas de 24 meses de edad procedentes de pinos adultos del bosque. A la izquierda se representan los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

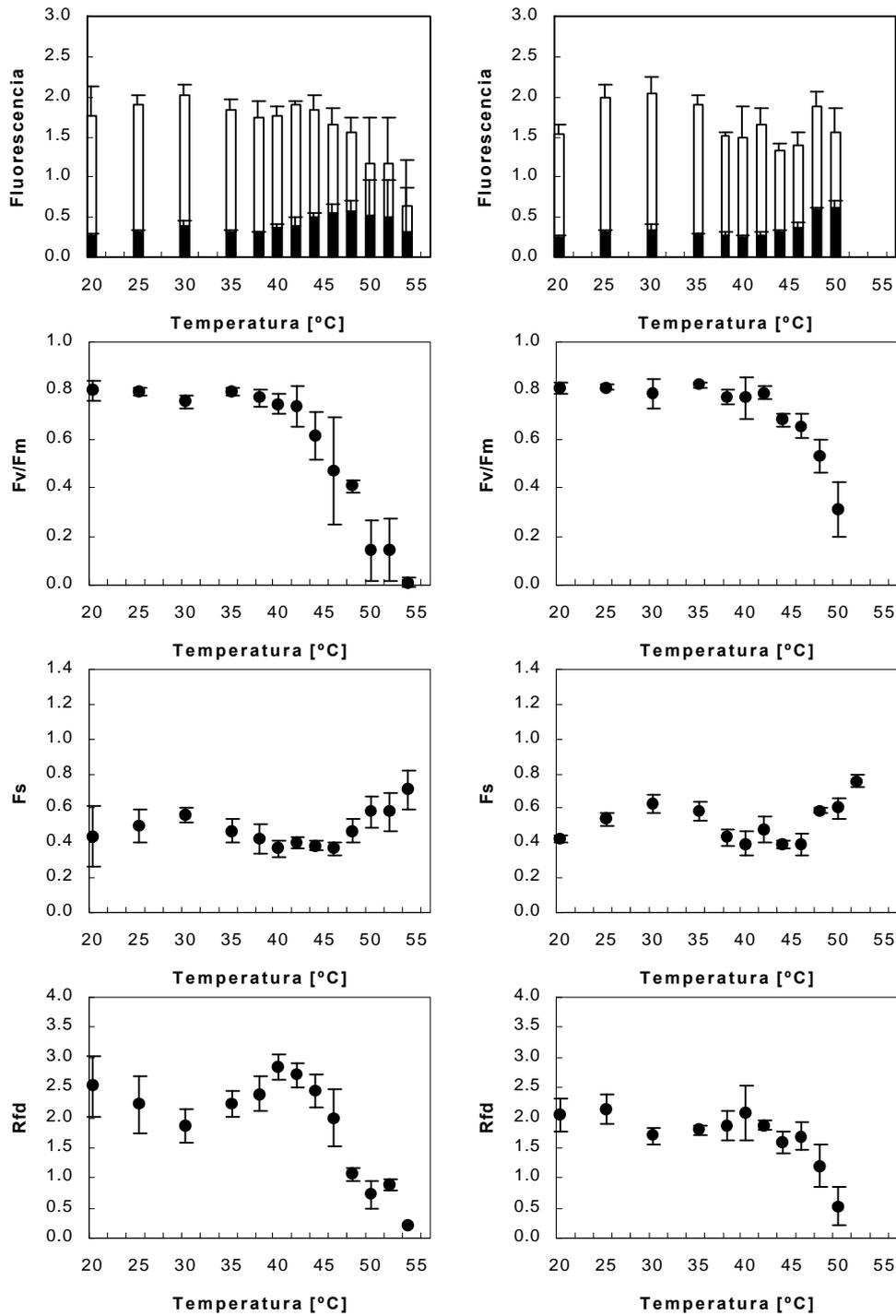


Figura 7.22. Variación de los diversos parámetros de fluorescencia con los tratamientos de altas temperaturas de acículas de 24 meses de edad procedentes de pinos adultos del bosque. A la izquierda se representan los valores obtenidos justo después del tratamiento de temperatura y a la derecha los valores obtenidos después de dejar las muestras 24 horas en oscuridad, a saturación acuosa y temperatura ambiente.

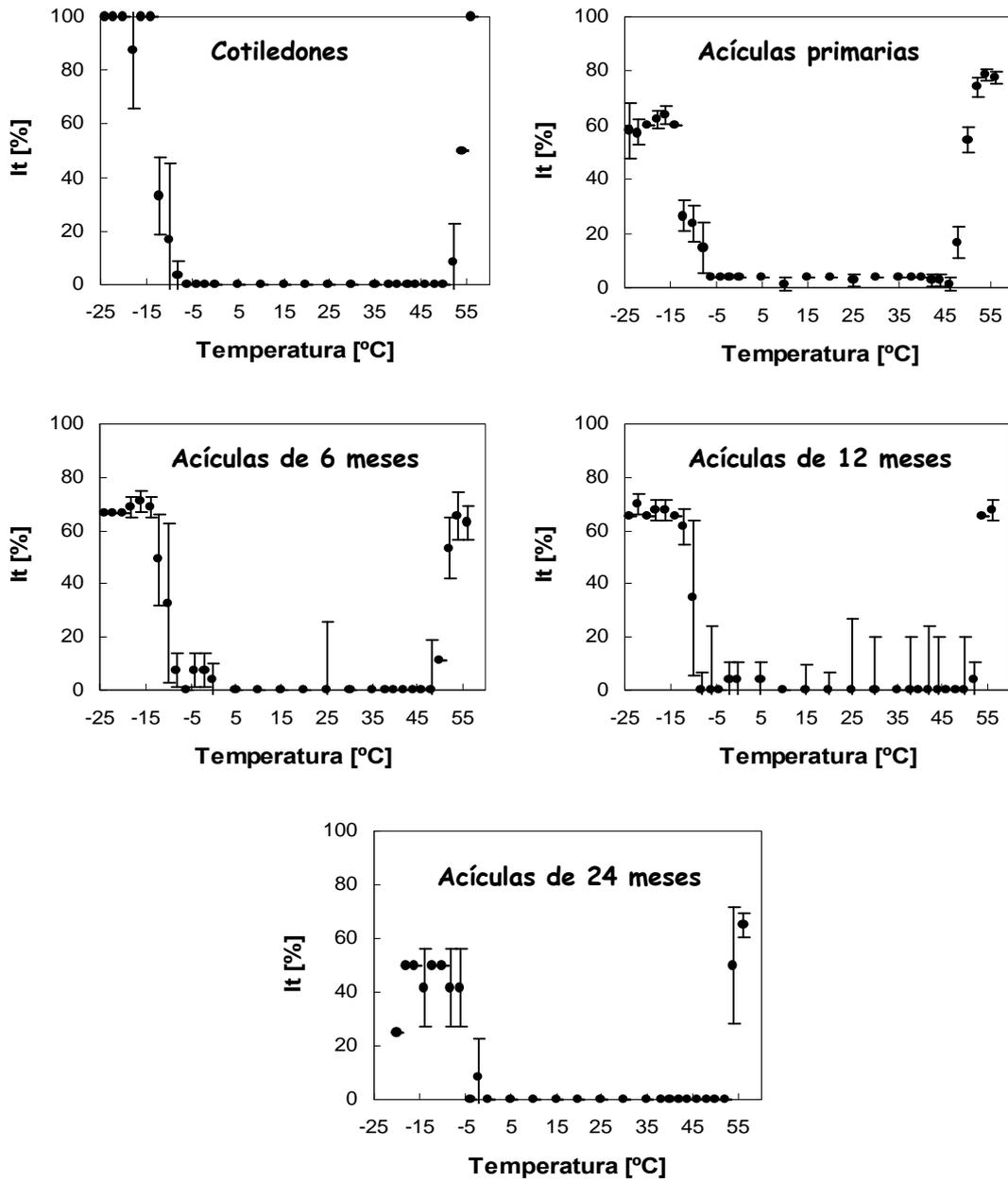


Figura 7.23. Respuesta de la liberación de electrolitos a las bajas y altas temperaturas en acículas de diferentes estados de desarrollo, medida por conductividad y expresada como índice de daño (It %)

7.4. DISCUSIÓN

Los valores control de los diversos parámetros de fluorescencia analizados fueron similares para acículas en diferente estado de desarrollo y para los distintos sitios de estudio, con la excepción del sitio IIIs, que presentó valores de F_v/F_m ligeramente más bajos. Esto, posiblemente, se deba a un ligero estrés de partida, seguramente de tipo hídrico debido a las características del terreno y al microclima particular del sitio. Esto confirma los resultados obtenidos en el capítulo 4. De cualquier forma, en todos los casos los valores de F_v/F_m se mantuvieron dentro del rango normal (de 0.75 a 0.85) dado por Björkman y Demmig (1987) para plantas vasculares.

7.4.1. *Bajas temperaturas*

En los tratamientos a bajas temperaturas podemos observar que existe una diferencia entre los valores, de los parámetros de cinética rápida, medidos justo después del tratamiento de temperatura, y los valores medidos después del periodo de recuperación. En este caso, los valores inmediatamente después del tratamiento se mantienen prácticamente alrededor de los valores normales o se observa el daño inicial a temperaturas muy por debajo de los valores de temperatura a los que se observa el daño en la recuperación. Esto se debe a que, con los tratamientos congelantes, las estructuras mantienen su integridad física hasta que, por un tratamiento de descongelación (como lo es la recuperación de 24 horas a temperatura ambiente), los componentes celulares se desorganizan y se ponen de manifiesto los daños producidos por el hielo formado de manera extracelular o intracelular.

De todas formas se puede observar una mayor sensibilidad a las bajas temperaturas de los parámetros de cinética lenta de la fluorescencia (F_s y Rfd), al menos justo después del tratamiento, ya que a estas temperaturas se afectan más las reacciones tardías del proceso fotosintético, como la incorporación del CO_2 absorbido al metabolismo celular de la planta por medio del ciclo de Calvin (Sivak y Walker 1985).

El punto en el que se produce el daño en las bajas temperaturas depende del sitio de estudio y del estado de desarrollo de las acículas. En la tabla 7.I

vemos que el aparato fotosintético de las acículas de un año de pino canario resiste hasta una temperatura de $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el sitio de menor altitud, que fue también el que mostró una menor resistencia, y hasta una temperatura de -9 a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ en los sitios de mayor resistencia, sin que se produzcan daños irreversibles. En cuanto al estado de desarrollo, las acículas más jóvenes son también las más resistentes, soportando temperaturas de hasta $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que las acículas de dos años soportan tan sólo unos $-4.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Como consecuencia del estudio de la temperatura a la que se produce el daño en el aparato fotosintético, en esta especie endémica canaria, se deduce que es una especie sensible a la congelación (Larcher 1980).

En estudios anteriores sobre la resistencia a las heladas de plantas mediterráneas esclerófilas y coníferas (Sakai y Larcher 1987) se distinguieron tres grupos de plantas:

☒ Un primer grupo incluye las especies más sensibles, en las que el 50% de daño se produce entre los -6 y los $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, como *Caratonia siliqua*, *Nerium oleander* y *Myrtus communis*.

☒ El segundo grupo incluye la mayoría de las plantas arbóreas mediterráneas como (*Laurus nobilis*, *Quercus coccifera*, *Quercus suber*, *Arbutus unedo*, *Olea europaea*, *Rhamnus alternus*, *Viburnum tinus* y *Pistacia lentiscus*) y las coníferas mediterráneas *Pinus pinea* y *Pinus halepensis*. En este grupo el 50% del daño se produce sobre los -10 a $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$.

☒ En el tercer grupo se encuentran especies particularmente resistentes (*Quercus ilex*, *Phillyrea latifolia* y *Cupressus sempervivens*) que no se dañan seriamente hasta los -15 a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pinus canariensis podría incluirse en el primer grupo junto con las especies más sensibles, aunque cuando está aclimatado podría incluso estar en el límite del segundo grupo junto con los dos pinos mediterráneos estudiados por estos autores.

La resistencia potencial a las heladas de acículas de coníferas ha sido estudiada en profundidad por Sakai y Larcher (1987), que encontraron un rango para la aclimatación al frío para distintas especies de *Pinus* que va desde $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, en *Pinus patula* de regiones costeras con inviernos suaves, a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en *Pinus banksiana* de regiones con inviernos muy fríos. Es evidente que, aunque la

mayor parte de las muestras de nuestro experimento se recolectaron en otoño, cuando aún no han podido tener lugar fuertes procesos de aclimatación, los valores de resistencia a las heladas de *Pinus canariensis* se encuentran en el límite inferior del rango encontrado en otras especies del género *Pinus*.

En nuestros estudios se observa una gradación de la resistencia dependiente de la altitud, mostrando los sitios más elevados una tendencia a resistir temperaturas más bajas. Sin embargo, en el sitio III se observa una mayor resistencia de la que cabría esperar por su altitud. Ya se discutió que los valores control de F_v/F_m (tabla 7.I) eran más bajos en este sitio, debido quizás a un estrés hídrico. Esto explicaría la mayor resistencia observada ya que es conocido que existe una interacción positiva entre ambos tipos de estrés (Pérez de Juan 1996).

La resistencia observada explica por qué estos pinos son capaces de desarrollarse en lugares donde la temperatura durante el invierno puede alcanzar valores por debajo de los 0 °C y, en ocasiones, la nieve hace acto de presencia. Esto nos demuestra un proceso de aclimatación que capacita a las acículas de pino canario a resistir temperaturas más bajas y, gracias a esto, esta especie es capaz de soportar las oscilaciones térmicas y cubrir, en su distribución, el rango de temperaturas presente en su hábitat natural.

Podemos observar una menor resistencia de las acículas más viejas, posiblemente debido a la implicación de fenómenos de senescencia que hacen a las acículas particularmente sensibles a un estrés añadido. Sin embargo, no se observó una gradación clara dependiendo del estado de desarrollo de las acículas, aunque, en general, en cuanto al daño a las membranas resisten mejor el frío los cotiledones y las acículas primarias debido, presumiblemente, a una adaptación para resistir épocas más difíciles y asegurar así la regeneración de la especie.

Prestando atención a los valores obtenidos tras el periodo de recuperación a temperatura ambiente después del tratamiento a bajas temperaturas (tablas 7.I y 7.III), vemos que los valores de daño incipiente (desviación del 10% de los valores control; LT_{10}) y los valores de daño irreversible del tejido (50% de desviación; LT_{50}) son muy similares. Esto se cumple para todos los sitios y edades aciculares de estudio. Esto significa un cambio muy brusco tanto en los valores de fluorescencia como en la

conductividad en los tratamientos de frío, produciéndose las desviaciones de los valores normales, prácticamente en el mismo punto.

Sin embargo, se ha visto que la disminución de la eficiencia fotoquímica, después de una congelación, no implica necesariamente una rotura de la membrana tilacoidal, puesto que esta membrana no es el primer sitio de daño por congelación (Sundbom y col. 1982; Barnes y Wilson 1984; Adams y Perkins 1993; Boudet y col. 1993). En muchas especies el primer síntoma producido por las bajas temperaturas es un daño en la membrana plasmática y, en consecuencia, un cambio en el ambiente celular que afecta a los diferentes orgánulos como las mitocondrias y los cloroplastos (Senser y Beck 1979; Krause y col. 1988; Steffen y col. 1989). Esto fue observado también por Clement y van Hasselt (1996) para otras especies, comparando la temperatura a la que el fotosistema II comienza a verse afectado (LT_{10}) con la temperatura a la que se produce el daño irreversible a las membranas (LT_{50}), y también en otros estudios, como en los experimentos de Szalai y col. (1996), y en el trabajo de tesis doctoral de González-Rodríguez (1998). Los resultados obtenidos en acículas de pino canario, midiendo la liberación de electrolitos y la fluorescencia de la clorofila fueron similares, indicando que los orgánulos se ven afectados inmediatamente después de la formación de hielo que provoca también la rotura de la membrana celular.

Para el frío, por lo tanto, los métodos de fluorescencia de la clorofila y de conductividad, midiendo la integridad de las membranas celulares, resultaron ser ambos indicadores similares del daño.

En las bajas temperaturas, sólo se detectaron alteraciones visibles en las acículas más jóvenes, esto es en cotiledones y acículas primarias, a temperaturas muy por debajo de las que mostraron el daño por fluorescencia o conductividad. En las acículas desarrolladas en árboles adultos en el bosque no se vieron alteraciones en el rango de temperaturas estudiadas. Esto concuerda con las observaciones de Strand y Öquist (1988) que no detectaron alteraciones visuales hasta un estado muy avanzado del daño en sus estudios con plántulas de *Pinus sylvestris*.

7.4.2. *Altas temperaturas*

Los resultados muestran que, justo después del tratamiento, los parámetros de cinética rápida de la fluorescencia son mejores indicadores, del daño por las altas temperaturas que los parámetros de cinética lenta. De acuerdo con esto, se produce antes un cambio en los valores de F_0 , F_m y F_v/F_m que en los valores de F_s y Rfd . Esto hace suponer que el daño ocurre primero en las fases más tempranas de la activación de la maquinaria fotosintética, ya sea en el paso de energía desde la clorofila a a los centros de reacción del fotosistema II (Briantais y col. 1986), por un cambio en el estado redox de la Q_a (Ducruet y Lemoine 1985; Bukhov y col. 1990), o por un problema en el flujo de electrones desde la quinona Q_a al pool de plastoquinonas (Bradbury y col. 1985).

En las gráficas presentadas podemos ver que existe diferencia entre los valores obtenidos justo después de los tratamientos y después de 24 horas de recuperación. Esto nos indica que el daño justo después del tratamiento es reversible e implica tan solo alteraciones transitorias al aparato fotosintético, que tienden a desaparecer después de un día a temperatura ambiente.

En las tablas 7.II y 7.IV podemos ver que los daños que implican pérdida de la función fotosintética (desviación de un 50% de los valores control) se producen por encima de los 46 °C para el parámetro F_v/F_m en todos los sitios y para todos los estados de desarrollo. En su trabajo de tesis doctoral, González-Rodríguez (1998) encontró resultados similares para tres especies de la laurisilva canaria: *Laurus azorica*, *Persea indica* y *Myrica faya*, analizadas de la misma manera, y que a su vez coincidieron con los resultados obtenidos por Lösch (1980) para estas mismas especies, estudiando la resistencia a la temperatura mediante daño visual. En estos trabajos, las tres especies mostraron daños debido al tratamiento por las altas temperaturas por encima de los 44 °C después del periodo de recuperación, y no se encontraron diferencias claras entre especies.

El límite superior de temperatura para el aparato fotosintético de las acículas de pino canario (LT_{50}) es de 52 °C, temperatura que ronda el límite inferior del rango dado por Larcher (1995) para plantas leñosas siempre-verdes

tropicales (de 50 a 60 °C). Dentro de la clasificación dada por Larcher en 1995 *Pinus canariensis* se contaría como una especie vegetal sensible al calor.

Con la altitud, la resistencia del aparato fotosintético de las acículas de pino canario a las altas temperaturas, mostró una tendencia a disminuir, alcanzándose antes el daño en sitios más elevados y siendo más resistente en sitios de menor altitud donde, sin duda, deben soportar una temperatura media anual más elevada. De ello se deduce un cierto grado de aclimatación en la resistencia a las altas temperaturas dependiendo de los sitios estudiados. Estos resultados están de acuerdo con los de Lange y Lange (1963), que demostraron que la resistencia al calor de las plantas mediterráneas puede cambiar en 4K debido a la altitud.

Con respecto al estado de desarrollo de las acículas no se observó una tendencia clara de los resultados obtenidos, aunque según la tabla 7.IV podríamos deducir una cierta gradación en cuanto al daño irreversible a las membranas, siendo las acículas más jóvenes más sensibles al calor, con la excepción de los cotiledones. Y, en cuanto al aparato fotosintético existe una tendencia a resistir más las acículas de edades intermedias, como las de 6 y 12 meses. Esto, posiblemente se deba a que las acículas más sensibles son las más jóvenes que aún no han alcanzado su grado total de madurez y las acículas más viejas que entran ya en proceso de senescencia.

En general, para las altas temperaturas se observó antes el daño con los parámetros de fluorescencia que con la técnica de la conductividad, debido a que la membrana tilacoidal es muy sensible al daño por el calor, más que el resto de las membranas celulares, por la elevada fragilidad de las moléculas implicadas en el proceso fotosintético que se encuentran inmersas en esta membrana.

Aunque en especies de hoja ancha es frecuente observar daños visuales en respuesta a las altas temperaturas extremas (Lösch 1980; Bilger y col. 1985; Larcher 1990; Larcher y col. 1991; González-Rodríguez 1998), en acículas bien desarrolladas de *Pinus canariensis* no llegamos a detectar síntomas visibles del daño por el calor, en acículas de 6, 12 y 24 meses, en el rango de temperaturas estudiadas, resultando este método un indicador poco adecuado para evaluar el

daño a las acículas. Quizás la gruesa capa de ceras que protege la epidermis, así como la capa de tejido hipodérmico con gruesas paredes celulares (como hemos visto en los resultados del capítulo 3), impiden la visualización de infiltraciones en el parénquima. Los cambios de coloración de las venas principales, puestos de manifiesto en las especies de hoja ancha, son más difíciles de observar en este tipo de hojas aciculares, puesto que los haces vasculares no se hacen patentes al exterior. El hecho de que en acículas poco desarrolladas sí se observaran cambios en las características visuales podría estar relacionado con la mayor hidratación de sus tejidos, siendo más evidente el daño al producirse una deshidratación bien debido al calor o bien debido a la formación de hielo en los tejidos.

La medida de la fluorescencia de la clorofila resultó ser un buen indicador del daño por el calor al aparato fotosintético, detectándose éste antes que por cualquiera de los otros dos métodos utilizados. Y, dentro de los diversos parámetros de fluorescencia, la relación F_v/F_m fue el indicador más útil, tanto cuando se analizaron justo después del tratamiento como cuando se analizaron transcurridas 24 horas de recuperación.

7.4.3. Amplitud de los límites térmicos

Debemos tener en cuenta que todos los resultados que hemos obtenido en esta serie de experimentos pueden variar, si consideramos otros órganos vegetales o la planta entera, la época del año en que se realiza el experimento o el tiempo de exposición a una determinada temperatura, entre otras cosas, puesto que la resistencia a las temperaturas extremas puede ser diferente. Por ejemplo, Larcher (1973) encontró una variabilidad estacional de la resistencia al calor de las plantas de 5K y, puesto que en nuestro experimento las acículas se recolectaron en otoño, cabría esperar posibles procesos de aclimatación durante los meses de invierno, basados en ajustes fenotípicos a cambios temporales en la temperaturas (Sakai y Larcher 1987; Hällgren y Öquist 1990; Larcher 1995).

Por otro lado, González-Rodríguez (1998) vio que el efecto del tiempo de exposición hacía variar la resistencia hasta en 10K en tratamientos de frío y en unos 4K en los de calor. También tenemos que considerar que nuestro estudio

está hecho en condiciones de oscuridad y que un descenso en la eficiencia del fotosistema II se produce sólo cuando el daño por las bajas temperaturas es muy severo (Somersalo y Krause 1990), puesto que en condiciones naturales el estrés añadido de la luz causa una fuerte fotoinhibición, incluso a temperaturas bastante por encima de los 0 °C.

La amplitud de los límites térmicos para la disminución de la eficiencia cuántica potencial de las acículas de *Pinus canariensis* fue similar a la de algunos árboles de la laurisilva canaria, determinadas de la misma forma en nuestro laboratorio (González-Rodríguez 1998). El rango de temperaturas para el daño por frío evaluado por fluorescencia de la clorofila (LT₅₀ de -8 a -11 °C) estuvo dentro del rango encontrado en otras especies arbóreas siempre-verdes subtropicales, pero el daño por calor (LT₅₀ de 46 a 52 °C) se produjo a menor temperatura que en este tipo de especies y fue más similar al de plantas arbóreas siempre-verdes de regiones costeras con inviernos suaves en zonas templadas (rangos de -8 a -12 °C y 46 a 50 °C, respectivamente, en datos de diferentes autores, resumidos por Larcher 1995).

Así, la amplitud relativamente estrecha y similar a la de especies del bosque de laurisilva canaria (Larcher y col. 1991; González-Rodríguez 1998), también relictos de la flora mediterránea del Terciario y confinada actualmente también a esta región del globo, podría ser una de las causas de su pequeña área de distribución, aunque muchos otros aspectos de su fisiología podrían ser responsables de ello.

7.5. CONCLUSIONES

El estudio de la resistencia de las acículas de *Pinus canariensis* a las diferentes temperaturas mostró daños incipientes, por medio del parámetro de fluorescencia F_v/F_m , entre los 42 y los 44 °C y daños irreversibles entre los 46 y los 52 °C, según los diferentes sitios y edades aciculares estudiados. Las membranas celulares mostraron daños incipientes a partir de los 47 a 53 °C y daños irreversibles por encima de los 49 a 56 °C, dependiendo de los sitios. En

el frío ambas técnicas detectaron daños incipientes en el rango de -2.5 a -10 °C y daños irreversibles alrededor de los -4.5 a -14 °C, según los sitios y las edades.

Según los valores encontrados, las acículas de *Pinus canariensis* se pueden considerar sensibles al calor y a la congelación.

Se pone de manifiesto una ligera aclimatación de las acículas de *Pinus canariensis*, que muestran una tendencia a ser menos resistentes al calor y más resistentes al frío con la altitud. Respecto a la edad de las acículas esta tendencia no es tan clara, aunque parecen resistir mejor el frío las acículas más jóvenes y el calor las acículas de edades intermedias, siendo en todos los casos las acículas de 24 meses las más sensibles a las temperaturas extremas, como consecuencia de su incipiente senescencia.

El daño por altas temperaturas se detectó antes por fluorescencia de la clorofila que por los otros métodos de estudio utilizados. Esto revela que el aparato fotosintético se daña por el calor antes que la membrana plasmática de la células del tejido acicular. En el frío, sin embargo, los daños se detectaron simultáneamente con el método de la fluorescencia y con el de liberación de electrolitos debido a que la formación de hielo es el paso clave para el daño a temperaturas congelantes. La valoración visual del daño no resultó ser un buen método para detectar el daño a las acículas por los tratamientos de temperatura.

La relativamente estrecha amplitud de los límites térmicos de las acículas de *Pinus canariensis* podría ser una de las causas determinantes de su confinamiento a su hábitat actual por los cambios climáticos del pasado, aunque muchos otros aspectos de su fisiología pueden ser responsables de ello.

7.6. BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, G.T. y T.D. PERKINS (1993). Assessing cold tolerance in *Picea* using chlorophyll fluorescence. *Environmental and Experimental Botany*. 33: 377-382.

- ANDERSON, J.M., Y.I. PARK y W.S. CHOW (1997). Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature. *Physiologia Plantarum*. 100: 214-223.
- ARMOND, P.A., O. BJÖRKMAN y L. STAEHELIN (1979). Dissociation of supramolecular complexes in chloroplast membranes: A manifestation of heat damage to the photosynthetic apparatus. *Carnegie Institute Washington Year Book*. 78: 153-157.
- BARNES, J.D. y J.M. WILSON (1984). Assessment of the frost sensitivity of *Trifolium* species by chlorophyll fluorescence analysis. *Annals of Applied Biology*. 105: 107-116.
- BERRY, J.A. y O. BJÖRKMAN (1980). Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 31: 491-543.
- BILGER, W., U. SCHREIBER y O.L. LANGE (1985). Chlorophyll fluorescence as an indicator of heat induced limitation of photosynthesis in *Arbutus unedo*. NATO Advanced Research Workshop Sesimbra. Portugal.
- BJÖRKMAN, O., M.R. BADGER y P.A. ARMOND (1980). Response and adaptation of photosynthesis to high temperatures. En: *Adaptation of plants to water and high temperature stress*. N.C. Turner y P.J. Kramer, editores. Wiley. Nueva York. 233-249.
- BJÖRKMAN, O. y B. DEMMIG (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta*. 170: 489-504.
- BOLHÁR-NORDENKAMPF, H.R., S.P. LONG, N.R. BAKER, G. ÖQUIST, U. SCHREIBER y E.G. LECHNER (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.
- BOORSE, G.C., T.L. BOSMA, A.-C. MEYER, F.W. EWERS y D. DAVIS (1998). Comparative methods of estimating freezing temperature and freezing injury in leaves of chaparral shrubs. *International Journal of Plant Science*. 159: 513-521.
- BOUDET, A.M., M. CANABÉ, N. LEBORGNE y C. TEULIÈRES (1993). Aspects of the cellular and molecular basis of cold tolerance in plants. En: *Interacting stresses on plants in a changing climate*. M.B. Jackson y C.R. Black,

- editores. NATO ASI Series. Series I: Global environment change. Volumen 16. 15 pp.
- BRADBURY, M., C.R. IRELAND y N.R. BAKER (1985). An analysis of the chlorophyll fluorescence transients from pea leaves generated by changes in atmospheric concentrations of CO₂ and O₂. *Biochimica et Biophysica Acta*. 806: 357-365.
- BRIANTAIS, J., G. VERNOTTE, G. KRAUSE y E. WEIS (1986). Chlorophyll α fluorescence of higher plants: chloroplasts and leaves. En: Light emission by plants and bacteria. Govindjee, J. Amesz y D.C. Fork, editores. Academic Press. Nueva York. 539-583.
- BUKHOV, N.G., S. SABAT y P. MOHANTY (1990). Analysis of chlorophyll α fluorescence changes in weak light in heat treated *Amaranthus* chloroplasts. *Photosynthesis Research*. 23: 81-87.
- CLEMENT, J.M.A.M. y P.R. VAN HASSELT (1996). Chlorophyll fluorescence as a parameter for frost hardiness in winter wheat. A comparison with other hardiness parameters. *Phyton (Austria)*. 36 (1): 29-41.
- DUCRUET, J.M. y J. LEMOINE (1985). Increased heat sensitivity of the photosynthetic apparatus in triazine resistant biotypes from different plant species. *Plant and Cell Physiology*. 26: 419-429.
- ENAMI, Y. J.-M. BRIANTAIS, T. TOMO, Y. ISOKAWA, H. OHTA y S. KATOH (1994). Is the primary cause of thermal inactivation of oxygen evolution in spinach PSII membranes release of the extrinsic 33 kDa protein or of Mn?. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1186: 52-58.
- GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A.M. (1998). Caracterización fotosintética de árboles de la laurisilva canaria (*Laurus azorica*, *Persea indica* y *Myrica faya*). Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna.
- GOUNARIS, K., A.R.R. BRAIN, P.J. QUINN y W.P. WILLIAMS (1984). Structural reorganization of chloroplasts thylacoid membranes in response to heat-stress. *Biochimica et Biophysica Acta*. 766: 198-208.
- HÄLLGREN J.E. y G. ÖQUIST (1990). Stress response in plants: Adaptation and acclimation mechanisms. En: R.G. Alscher y J.R. Cummings, editores. Wiley-Liss. Nueva York. 265-293.
- KACPERSKA, A. y R.K. SZANIAWSKI (1993). Frost resistance and water status of winter rape leaves as affected by differential shoot/root temperature. *Physiologia Plantarum*. 89: 775-782.

- KRAUSE, G.H., S. GRAFFLAGE, S. RUMICH-BAYER y S. SOMERSALO (1988). Effects of freezing on plant mesophyll cells. En: *Plants and Temperature*. S.F. Long y F.I. Woodward, editores. Comp. Biol. Ltd. Cambridge. 311-327.
- KRAUSE, G.H. y E.M. WEIS (1984). Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynthesis Research*. 5: 139-157.
- LANGE, O.L. y R. LANGE (1963). Untersuchungen über Blattemperaturen, Transpiration und Hitzeresistenz an Pflanzen mediterraner Standorte (Costa Brava, Spanien). *Flora*. 153: 387-424.
- LARCHER, W. (1973). Limiting temperatures for life functions in plants. En: *Temperature and life*. H. Precht, J. Christophersen, H. Hensel y W. Larcher, editores. Segunda edición. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York.
- LARCHER, W. (1980). La posizione delle piante sempreverdi mediterranee nella evoluzione della resistenza al freddo. *Atti dell'Istituto Veneto di Scienze. Lettere ed Arti*. 138: 103-111.
- LARCHER, W. (1990). Vitalitätsbestimmung. En: *Methoden zur Pflanzenökologie*. Segunda edición. K.H. Kreeb, editor. Fischer. Jena.
- LARCHER, W. (1994). Photosynthesis as a tool for indicating temperature stress events. En: *Ecophysiology of photosynthesis*. E.D. Schulze y M.M. Caldwell, editores. Springer. Berlin. 261-277.
- LARCHER, W. (1995). *Physiological plant ecology*. 5rd ed. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. Nueva York.
- LARCHER, W. (2000). Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. *Plant Biosystems*. 134 (3): 279-295.
- LARCHER, W., J. WAGNER, G. NEUNER, M. MÉNDEZ, M.S. JIMÉNEZ y D. MORALES (1991). Thermal limits of photosynthetic function and viability of leaves of *Persea indica* and *Persea americana*. *Acta Oecologica*. 12: 529-541.
- LÖSCH, R. (1980). The heat resistance of the Canarian laurel forest plants. *Flora*. 170: 456-465.
- MANLEY, R.C. y R.L. HUMMEL (1996). Index of injury compared to tissue ionic conductance for calculating freeze damage of cabbage tissue. *Journal of American Society for Horticulture Science*. 121 (6): 1141-1146.

- NASH, D., M. MIYAO y N. MURATA (1985). Heat inactivation of oxygen evolution in photosystem II particles and its acceleration by chloride depletion and exogenous manganese. *Biochimica et Biophysica Acta*. 807: 127-133.
- NEUNER, G. y O. BUCHNER (1999). Assessment of foliar frost damage: a comparison of in vivo chlorophyll fluorescence with other viability tests. *Journal of Applied Botany*. 73: 50-54.
- PÉREZ DE JUAN, J. (1996). Interacción entre esters hídrico y tolerancia al frío en maiz. Tesis Doctoral de la Universidad de Pamplona.
- PIOTROWSKA, G. y A. KACPERSKA (1990). Utility of leaf disks cultured in vitro for studies on frost resistance. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 22: 21-26.
- RENGER, G. y U. SCHREIBER (1986). Practical applications of fluorometric methods to algae and higher plants research. En: *Light Emission by Plants and Bacteria*. Govindjee, J. Amesz, y D.C. Fork, editores. Academic Press. Orlando. San Diego. Nueva York. Austin. Boston. London. Sydney. Tokyo. Toronto. 587-619.
- SAKAI, A. y LARCHER, W. (1987). Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress. Springer-Verlag.
- SANTARIUS, K.A. y E. WEIS (1988). Heat stress and membranes. En: *Plant membranes – Structure, Assembly and Function*. J.L. Harwood y T.J. Walton, editores. Biochemical Society of London. Pp: 97-112.
- SCHREIBER, U. y J.A. BERRY (1977). Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in intact leaves correlated with damage of the photosynthetic apparatus. *Planta*. 136: 233-238.
- SENER, M. y E. BECK (1979). Frost hardiness in spruce. II. Influence of photoperiod and temperature on the structure and the photochemical reactions of spruce chloroplasts. *Bericht der Deutsche Botanische Gesellschaft*. 92: 243-259.
- SIVAK, M.N. y D.A. WALKER (1985). Chlorophyll a fluorescence and light-scattering displayed by leaves during induction of photosynthesis. *Planta*. 163: 419-423.
- SOMERSALO, S. y G.H. KRAUSE (1990). Effects of freezing and subsequent light stress on photosynthesis of spinach leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. 28: 467-475.

- STEFFEN, K.L., R. ARORA y J.P. PALTA (1989). Relative sensitivity of photosynthesis and respiration to freeze-thaw stress in herbaceous species. *Plant Physiology*. 89: 1372-1379.
- STRAND, M. y G. ÖQUIST (1988). Effects of frost hardening, dehardening and freezing stress on *in vivo* chlorophyll fluorescence of seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant, Cell and Environment*. 11: 231-238.
- SUNDBOM, E., M. STRAND y J.-E. HÄLLGREN (1982). Temperature-induced fluorescence changes - a screening method for frost tolerance of potato (*Solanum* sp.). *Plant Physiology*. 70: 1229-1302.
- SUNDBY C., A. MELIS, P. MÄENPÄÄ y B. ANDERSSON (1986). Temperature-dependent changes in the antenna size of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*. 851: 475-483.
- SUTCLIFFE, J. (1979). *Las plantas y la temperatura*. Cuadernos de biología. Ediciones Omega. 63 pp.
- SZALAI, G., T. JANDA, E. PALDI y Z. SZIGETI (1996). Role of light in the development of post-chilling symptoms in maize. *Journal of Plant Physiology*. 148: 378-383.

8. CONCLUSIONES GENERALES

“Hay momentos en los que para razonar desearía arrancarme los ojos.
Arranquémonos los ojos; Sinclair; cinco minutos, sólo cinco minutos...
¡y quizá veamos con claridad!” Gaston Leroux.

1.- El estudio de la estructura y la ultraestructura de las acículas de *Pinus canariensis* mostró características, tales como estomas profundamente hundidos, presencia de ceras, una estrecha cámara epiestomática y la existencia de un tejido mecánico que subyace a la epidermis, que constituyen una adaptación ideal para evitar la pérdida de agua, permitiendo a esta especie vivir en regiones con cierto grado de sequía.

2.- En los sitios de menor altitud las acículas mostraron mayores contenidos en cloro, sodio y azufre, siendo los primeros de procedencia marina y el último de origen antropogénico. A pesar de ello los pinos no presentaron síntomas claros de estrés por este tipo de sustancias.

3.- A lo largo del gradiente altitudinal se encontró una tendencia a la reducción en el contenido en clorofilas y al aumento del de carotenoides, con el consiguiente incremento del valor de la relación carotenoides/clorofilas. Además las relaciones alfa caroteno/beta caroteno fueron más bajas y los contenidos en ácido ascórbico fueron significativamente mayores, indicando un incremento de los procesos de oxidación en las membranas tilacoidales en los sitios más altos. Sin embargo, los valores de F_v/F_m se mantuvieron altos en todos los sitios, indicando que mediante cambios metabólicos, el pino canario se adapta totalmente a vivir en su área natural de distribución sin presentar síntomas severos de estrés.

4.- Los cursos diarios de P_n siguieron la pauta marcada por la luz la mayoría de los días, sólo cuando el DPV fue alto (generalmente, en los días de verano), se produjo una depresión severa de mediodía originada por una disminución de la conductancia estomática y no por causas metabólicas o de funcionamiento del aparato fotosintético.

5.- Las acículas de *Pinus canariensis* son capaces de mantener una buena asimilación en los momentos de mayor demanda evaporativa mediante modulaciones en la conductancia estomática. Esto se pone de manifiesto por valores mayores de eficiencia en el uso del agua intrínseca (P_n/G_s) al mediodía y en la época de verano.

6.- Las tasas máximas de fotosíntesis neta ($17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se registraron en acículas de un año desarrolladas al sol. Este valor se encuentra en el límite superior de los encontradas para pinos en general, siendo similar a los de otros pinos de zonas subtropicales. El óptimo de temperatura para la fotosíntesis neta estuvo alrededor de los $25 \text{ }^\circ\text{C}$, con un ligero desplazamiento entre las dos épocas estudiadas. Este valor se encuentra en el límite superior encontrado para coníferas siempre-verdes y en el inferior para árboles tropicales y subtropicales de hoja ancha y perenne.

7.- Las acículas del nivel superior de la torre presentaron tasas de fotosíntesis neta, respiración de oscuridad, PSL y PCL mayores que las del nivel inferior, lo que indica una aclimatación al diferente régimen lumínico al que han estado sometidas las acículas durante su desarrollo.

8.- La fotosíntesis del pino canario permaneció activa durante todo el año, variando en relación con las condiciones meteorológicas de cada día particular. No obstante, se pudo observar una clara estacionalidad, existiendo diferencias entre las épocas de verano e invierno y alcanzándose las máximas tasas de Pn siempre bajo condiciones de luz saturante, temperatura dentro del 90% del rango óptimo (entre 20 y $30 \text{ }^\circ\text{C}$) y DPV por debajo de los 25 mbar.

9.- Los valores de CHR (siempre superiores al 80%, incluso a mediodía) indican que las acículas no estuvieron sometidas a un estrés hídrico severo en ningún momento a lo largo del año. Los datos de concentración de clorofilas y del parámetro F_v/F_m de antes del amanecer corroboran este hecho.

10.- Cuando las plantas tuvieron restricción de agua (experimento en maceta con un estrés hídrico suave) la respuesta de la conductancia estomática al DPV fue la más rápida. Incluso con un DPV de 10 mbar la conductancia ya se vio reducida en un 60% respecto a la de plantas regadas, mientras que en condiciones naturales fueron necesarios valores de DPV alrededor de 40 mbar para producir una reducción equivalente. En ambos casos esta reducción se produjo sin que existiera una bajada sensible del contenido hídrico relativo de las acículas, indicando un buen control estomático y la clasificación de esta especie como una planta hidroestable.

11.- Los valores del parámetro de fluorescencia F_v/F_m disminuyeron ligeramente al mediodía, especialmente en acículas de plantas sometidas al estrés hídrico suave. Esto se correspondió, a su vez, con un aumento del estado de desepoxidación del ciclo de las xantofilas, mayor en las plantas no regadas. Esta disminución de la eficiencia cuántica y la menor asimilación de CO_2 en las plantas no regadas, conducen a la formación de especies reactivas de oxígeno que, en *Pinus canariensis*, son destoxificadas mediante un aumento de la relación GSSG/GSH, y no mediatizadas por otros antioxidantes estudiados como el alfa-tocoferol y el ascorbato.

12.- El estudio de la resistencia de las acículas de *Pinus canariensis* a las diferentes temperaturas mostró daños incipientes, por medio del parámetro de fluorescencia F_v/F_m , entre los 42 y los 44 °C y daños irreversible entre los 46 y los 52 °C, según los diferentes sitios y edades aciculares estudiados. Las membranas celulares mostraron daños incipientes a partir de los 47 a 53 °C y daños irreversibles por encima de los 49 a 56 °C, dependiendo de los sitios. En el frío ambas técnicas detectaron daños incipientes en el rango de -2.5 a -10 °C y daños irreversibles alrededor de los -4.5 a -14 °C, según los sitios y las edades. Según los valores encontrados, las acículas de *Pinus canariensis* se pueden considerar sensibles al calor y a la congelación.

13.- Se pone de manifiesto una ligera aclimatación de las acículas de *Pinus canariensis*, que muestran una tendencia a ser menos resistentes al calor y más resistentes al frío con la altitud. Respecto a la edad de las acículas esta tendencia no es tan clara, aunque parecen resistir mejor el frío las acículas más jóvenes y el calor las acículas de edades intermedias, siendo en todos los casos las acículas de 24 meses las más sensibles a las temperaturas extremas, como consecuencia de su incipiente senescencia.

14.- El daño por altas temperaturas se detectó antes por fluorescencia de la clorofila que por los otros métodos de estudio utilizados. Esto revela que el

aparato fotosintético se daña por el calor antes que la membrana plasmática de la células del tejido acicular. En el frío, sin embargo, los daños se detectaron simultáneamente con el método de la fluorescencia y con el de liberación de electrolitos debido a que la formación de hielo es el paso clave para el daño a temperaturas congelantes. La valoración visual del daño no resultó ser un buen método para detectar el daño a las acículas por los tratamientos de temperatura.

15.- La relativamente estrecha amplitud de los límites térmicos de las acículas de *Pinus canariensis* podría ser una de las causas determinantes de su confinamiento a su hábitat actual por los cambios climáticos del pasado, aunque muchos otros aspectos de su fisiología pueden ser responsables de ello.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO I

Fórmulas, conversiones y correcciones usadas por el analizador de gases

▲ Radiación fotosintéticamente activa incidente en la hoja (Q_{leaf} en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$):

$$Q_{\text{leaf}} = Q * Tr_w$$

donde Q es el PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); y Tr_w es el factor de transmisión del PAR para la ventana de la cámara (adimensional).

▲ Conversión del flujo molar a flujo volumétrico:

$$V = u * V_{m20} * (273+T_{\text{ch}})/293 * p * 60$$

donde u es el flujo de aire (mol s^{-1}); V_{m20} el volumen de 1 mol de aire a 20 °C y 1 bar de presión (m^3); T_{ch} la temperatura de la cámara (°C); y p la presión ambiente (bares).

▲ Flujo molar de aire por m^2 de superficie de hoja (u_s):

$$u_s = u/\text{area}$$

donde u es el flujo molar (mol s^{-1}); y area es el area proyectada de la hoja (m^2).

▲ Corrección para las lecturas de CO_2 (de referencia y de análisis) para la presencia de H_2O (C_{ref} o C_{an}) (vpm):

$$C_{\text{ref}} = [C_{\text{ref}}]^1 + b * W_{\text{ref}} * [C_{\text{ref}}]^1$$

donde $[C_{\text{ref}}]^1$ es la presión corregida de CO_2 de la lectura de referencia ($[C_{\text{an}}]^1$ cuando se trata de la de análisis) (vpm); b es un factor de compensación (cuyo valor es el mismo para la de análisis) (adimensional); y W_{ref} es la presión de vapor de agua de referencia (W_{an} cuando es la de análisis) (mol mol^{-1}).

▲ Corrección del análisis de CO₂ para la dilución por vapor de agua (C'_{an}) (vpm):

$$C'_{an} = C_{an} * (1 - W_{ref}) / (1 - W_{an})$$

donde C_{an} es el CO₂ que sale de la cámara (vpm); W_{ref} es la concentración del vapor de agua que entra en la cámara (mol mol⁻¹); y W_{an} es la concentración de vapor de agua que sale de la cámara (mol mol⁻¹).

▲ Diferencia en la concentración de CO₂ (vpm (mol mol⁻¹)):

$$\Delta C = C_{ref} - C'_{an}$$

donde C_{ref} es el CO₂ que fluye al interior de la cámara (μmol mol⁻¹); y C'_{an} es el CO₂ que fluye hacia fuera de la cámara (μmol mol⁻¹).

▲ Corrección del análisis de H₂O para la dilución por la transpiración (W'_{an}) (mol mol⁻¹):

$$W'_{an} = W_{an} * (1 - W_{ref}) / (1 - W_{an})$$

donde W_{an} es la concentración de vapor de agua de análisis (mol mol⁻¹); y W_{ref} es la concentración de vapor de agua de referencia (mol mol⁻¹).

▲ Compensación de las lecturas CO₂ y H₂O debido a la variación de la presión ([C_{an}]¹) (vpm):

$$[C_{an}]^1 = [C_{an}] * p_s / p$$

donde p_s es la presión de referencia (mbar); y p la presión ambiente (mbar).

▲ Constantes:

↳ Volumen de 1 mol de aire a 20 °C y 1 bar (V_{m20c})

Valor usado: $2.4387 * 10^{-2} \text{ m}^3$.

↳ Calor latente de la vaporización del agua (λ)

Valor usado: $45064.3 - (T_{\text{ch}} * 42.9) \text{ J mol}^{-1}$.

↳ Constante de Boltzmann (σ)

Valor usado: $5.7 * 10^{-8} \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-4}$.

↳ Peso molecular del aire (M_a)

Valor usado: 28.97.

↳ Calor específico a presión constante (C_p)

Valor usado: $1.012 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

▲ Tasa de transpiración (E) ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$):

$$E = u_s * \Delta W$$

donde ΔW es la concentración de vapor de agua diferencial (mol mol^{-1}); y u_s es el flujo de masa del aire dentro de la cámara por m^2 de área de la hoja ($\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$).

▲ Resistencia estomática al vapor de agua (r_s) ($\text{m}^2 \text{ s mol}^{-1}$):

$$r_s = ((W_{\text{hoja}} - W_{\text{an}}) / (\Delta W * u_s)) - r_b$$

donde W_{hoja} es la concentración de vapor saturada a temperatura ambiente (mol mol^{-1}) ($W_{\text{hoja}} = e_s / p$; siendo e_s la presión de vapor saturada a la temperatura de la hoja (mbar) y p la presión atmosférica (mbar)); ΔW el vapor de agua diferencial a través de la cámara (mol mol^{-1}); W_{an} la concentración de vapor de agua fuera de la cámara (mol mol^{-1}); r_s la resistencia de la capa límite al vapor de agua ($\text{m}^2 \text{ s mol}^{-1}$); y u_s el flujo de masa del aire por m^2 de hoja ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

▲ Conductancia estomática al vapor de agua (g_s) ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$):

$$g_s = 1 / r_s$$

donde r_s es la resistencia estomática al vapor de agua ($\text{m}^2 \text{s mol}^{-1}$).

▲ Temperatura calculada de la hoja (T_{hoja}) ($^{\circ}\text{C}$):

$$T_{\text{hoja}} = T_{\text{ch}} + (((Q * H_{\text{factor}}) - \lambda E) / (0.93 M_a C_p / r_b) + 4\sigma * (T_{\text{ch}} + 273.16)^3)$$

donde T_{ch} es la temperatura de la cámara ($^{\circ}\text{C}$); Q la intensidad de flujo fotónico sobre la ventana de la cámara ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); H_{factor} el factor de conversión de energía (adimensional); λ el calor latente de vaporización del agua (J mol^{-1}); M_a el peso molecular del aire (adimensional); C_p el calor específico a presión constante ($\text{J g}^{-1} \text{K}$); r_b la resistencia de la capa límite a la transferencia de vapor ($\text{m}^2 \text{s mol}^{-1}$); y σ la constante de Boltzmann ($\text{W m}^{-2} \text{K}^{-4}$).

▲ Tasa fotosintética (tasa de intercambio de CO_2 en la cámara) (P_n) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$):

$$P_n = u_s * \Delta C$$

donde ΔC es la diferencia en la concentración de CO_2 a través de la cámara ($\mu\text{mol mol}^{-1}$); y u_s el flujo de masa del aire por m^2 de área de la hoja ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

▲ Concentración de CO_2 en la cavidad subestomática (C_i) ($\mu\text{mol mol}^{-1}$):

$$C_i = (((g_c - (E/2)) * C'_{\text{an}}) / (g_c + (E/2)))$$

donde $g_c = 1 / (1.6 r_s + 1.37 r_b)$; C'_{an} el CO_2 que sale de la cámara ($\mu\text{mol mol}^{-1}$); E es la tasa de transpiración ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); r_b la resistencia de la capa límite al vapor de agua ($\text{m}^2 \text{s mol}^{-1}$); y r_s la resistencia estomática al vapor de agua ($\text{m}^2 \text{s mol}^{-1}$).

▲ Presión de vapor saturada de agua (e_s) (bar):

Para temperaturas sobre 0°C :

$$e_s = 6.13753 * 10^{-3} * e * ((T_{ch}(18.564 - (T_{ch}/254.4)))/(T_{ch} + 255.57))$$

Para temperaturas por debajo de 0 °C:

$$e_s = 6.13753 * 10^{-3} * e * ((17.966 * T_{ch})/(T_{ch} + 247.15))$$

donde T_{ch} es la temperatura de la cámara (°C).

▲ Presión de vapor de agua dentro y fuera de la cámara (e_{ref} y e_{an} , respectivamente) (mbar):

$$e_{ref} = W_{ref} * p; e_{an} = W_{an} * p$$

donde W_{ref} y W_{an} son concentraciones de vapor de agua (mol mol^{-1}); y p es la presión atmosférica (mbar).

▲ Cálculos para la humedad relativa dentro y fuera de la cámara (W_{ref} y W_{an} , respectivamente) (%):

$$W_{ref} = e_{ref} / e_{sat} * 100; W_{an} = e_{an} / e_{sat} * 100$$

donde e_{ref} es la presión de vapor de agua en la cámara (mbar); y e_{sat} es la presión de vapor de agua a la temperatura de la cámara (mbar).

▲ Diferencia de presión de vapor de agua (Δe) (mbar):

$$\Delta e = e'_{an} - e_{ref}$$

donde e_{ref} es la presión de vapor de agua dentro de la cámara (mbar); y e'_{an} la presión de vapor de agua fuera de la cámara (mbar).

9.2. ANEXO II

Protocolo para la preparación de muestras para el análisis de pigmentos y tocoferol

Es necesario trabajar sobre hielo para una mayor estabilidad de los componentes.

Se toman unos 40 miligramos de polvo molido de muestra y se ponen en eppendorf oscuros (para evitar la fotooxidación de los pigmentos) junto con un poco de carbonato cálcico.

Se rellenan los eppendorf con acetona pura y se mezcla todo en un vortex.

Se centrifuga durante 10 minutos a 14000 revoluciones por minuto y a 2 °C.

El sobrenadante se vierte en un vial de cristal de 5 mililitros, mientras que el eppendorf con el pelet se vuelve rellenar con acetona y se centrifuga de nuevo 10 minutos a 14000 revoluciones por minuto y 2 °C.

El segundo sobrenadante se añade al primero y se elimina el pelet.

Los viales de cristal se completan hasta 3 mililitros con acetona al 100%.

Se ponen 1.5 mililitros del líquido obtenido en eppendorf nuevos y se centrifugan a 14000 revoluciones por minuto y 2 °C durante 25 minutos. Con los 1.5 mililitros restantes de cada muestras se hace lo mismo (una tanda será para el análisis de pigmentos y otra tanda para el análisis del tocoferol).

Finalmente se toma cuidadosamente el sobrenadante, con una pipeta Pasteur, y se coloca en viales para su análisis por HPLC.

Para preparar las soluciones estándar para el Tocoferol, se toman 25 microlitros de las soluciones madre de alfa, gamma y delta tocoferol (cuya concentración es de 0.045, 0.04 y 0.005 gramos por mililitro, respectivamente) y se enrasan a 25 mililitros con acetona al 100% (trabajando sobre hielo y tapando bien las muestras, puesto que la acetona se evapora muy fácilmente).

Luego se toman:

- 100 µl α + 100 µl γ + 100 µl δ + 700 µl acetona
- 200 µl α + 200 µl γ + 200 µl δ + 400 µl acetona
- 300 µl α + 300 µl γ + 300 µl δ + 100 µl acetona

- 300 μl α + 700 μl acetona
- 300 μl γ + 700 μl acetona
- 300 μl δ + 700 μl acetona

- 200 μl α + 800 μl acetona
- 200 μl γ + 800 μl acetona
- 200 μl δ + 800 μl acetona

- 100 μl α + 900 μl acetona
- 100 μl γ + 900 μl acetona
- 100 μl δ + 900 μl acetona

Finalmente estos también se centrifugan 15 minutos a 2°C y 14000 revoluciones por minuto, se recoge con cuidado el sobrenadante y se coloca en viales para analizarlas cromatográficamente, junto con las muestras para el análisis de tocoferol.

Protocolo para la preparación de muestras para el análisis del glutatión

Se trabaja también sobre hielo.

100 miligramos de PVP (polivinilpirrolidona) se dejan en 2 mililitros de ácido clorhídrico 0.1 molar durante unas 12 horas (mínimo 2 horas), en la nevera.

Se añaden unos 40 miligramos de polvo de muestra y se mezcla en el ultraturrax, centrifugándose luego durante unos 2 minutos a no más de 4000 revoluciones por minuto (evitando que las muestras se calienten).

A partir de aquí el protocolo se divide en dos, para analizar los tioles reducidos y los oxidados:

<u>Tioles reducidos</u> (en eppendorf oscuros)	<u>Tioles oxidados</u> (en eppendorf claros)
280 µl extracto	400 µl extracto
420 µl tampón CHES	600 µl tampón CHES
70 µl DTT	30 µl NEM
Agitar e incubar 1 hora a temperatura ambiente	15 minutos a temperatura ambiente
~~~~~	~~~~~
50 µl monobromobimane	Lavar tres veces con 500 µl de toluol eliminando cada vez el sobrenadante.
15 minutos en oscuridad	~~~~~
~~~~~	500 µl de extracto
600 µl ácido metansulfónico	50 µl DTT
	1 hora a temperatura ambiente (en eppendorf oscuros)
	~~~~~
	30 µl monobromobimane
	15 minutos en oscuridad
	~~~~~
	430 µl ácido metansulfónico

Posteriormente, ambos grupos de muestras se centrifugan durante 45 minutos a 2 °C y 14000 revoluciones por minuto y se pipetea el sobrenadante en viales para su análisis por HPLC.

Protocolo para la preparación de muestras para el análisis del ascorbato

A unos 40 miligramos de polvo de muestra se añaden 2 mililitros de ácido metafosfórico y se mezcla. Luego se centrifuga unos minutos a no más de 4000 revoluciones por minuto para obtener un sobrenadante limpio.

Se toman 700 µl de extracto y se añaden 450 µl de 0.2 mol de tampón TRIS + 1 milimol de EDTA en tampón TRIS de pH 6.7.

Si se hacen estándares, a estos también se les añaden los 450 μ l de tampón y se sigue, a partir de aquí, el mismo protocolo que para las muestras.

Se añaden 10 μ l de ortofenilalanina y se agita.

Se deja 25 minutos a temperatura ambiente y luego se para la reacción con 10 μ l de ácido ortofosfórico al 85% y se agita.

Finalmente se centrifuga durante 25 minutos a 14000 revoluciones por minuto y 2 °C.