

VARIACIÓN EN LA ACTIVIDAD DEL FOTOSISTEMA II DE PLANTAS DE ALCORNOQUE (*Quercus suber* L.) SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO MODERADO Y BAJO DISTINTOS NIVELES DE RADIACIÓN

M.D. Jiménez¹, M. Pardos², I. Aranda², J. Puértolas³ & J.A. Pardos¹

¹ETSI Montes, UMP Madrid, 28040- Madrid, marilo@inia.es

²INIA, Ap. Correos 8.111, 28080-Madrid,

³Centro Nacional de Mejora Forestal "El Serranillo", Apdo 249 19004 Guadalajara

RESUMEN

Se estudió el efecto conjunto de la luz y la disponibilidad hídrica sobre la actividad del fotosistema II (PSII) en plantas de alcornoque (*Quercus suber* L.) cultivadas en vivero. Se consideraron cuatro niveles de luz (66-70% , 44-50%, 13.5-16% y 5-6%, con respecto a pleno sol) y dos de riego. La mitad de las plantas se regaron a capacidad de campo dos veces por semana (R+: 25-35% de humedad en el sustrato, medido con TDR) y la otra mitad se sometió a dos ciclos de sequía de 51 y 38 días, respectivamente (R-: hasta alcanzar una humedad en el sustrato del 7-10%). Las mediciones se realizaron al amanecer, mediodía y tarde, en cuatro fechas en hojas adaptadas a la oscuridad, empleándose un fluorómetro. Para todos los tratamientos, Fv/Fm presentó los valores más altos al amanecer, disminuyó al mediodía, y experimentó una ligera recuperación por la tarde en los tratamientos de máximo sombreo para la medición del 23 de Julio. Fv/Fm decreció a lo largo del ensayo (al mediodía y por la tarde) hasta alcanzar un mínimo tras finalizar el primer ciclo de sequía.. El riego afectó positivamente la relación Fv/Fm al amanecer solamente en la última medición del primer ciclo. Asimismo se detectó un efecto positivo en los niveles de luz intermedios (13.5% y 16%). Al mediodía y por la tarde, la eficiencia fotoquímica del PSII fue mayor con niveles de luz inferiores al 16%. La eficiencia cuántica del fotosistema II mostró dos repuestas a las altas radiaciones una caída diaria al mediodía, como un mecanismo de fotoprotección en las horas de mayor radiación y una disminución a lo largo del tiempo que duró el ensayo. El tratamiento de riego no provocó cambios en la eficiencia cuántica del PSII, salvo en una fecha, coincidiendo con la máxima demanda evaporativa. Los tratamientos mayores de luz (>44%) provocaron una pérdida de la eficiencia cuántica del PSII.

Palabras clave: eficiencia fotoquímica máxima del PSII (Fv/Fm), fluorescencia variable, fluorescencia máxima

INTRODUCCIÓN

En ambientes mediterráneos la luz y el agua son dos de los factores que muestran una mayor variabilidad temporal y espacial. Ante estas condiciones tan heterogéneas las especies mediterráneas han de desarrollar cierta plasticidad que les permita germinar, sobrevivir y crecer en diferentes condiciones de luz (Valladares *et al*, 2002) y de disponibilidad hídrica (Faria *et al* 1998). El alcornoque *Quercus suber* ocupa diferentes hábitats en la Península Ibérica, desde dehesas a formaciones boscosas densas (Costa *et al* 1998). Por ello, esta especie debe desarrollar diferentes estrategias encaminadas a optimizar el uso de los recursos disponible y minimizar el impacto de las altas radiaciones y la marcada sequía estival. Frecuentes en ambientes mediterráneos. En dichos ambientes mediterráneos donde coexisten altas intensidades de luz y escasa disponibilidad hídrica se puede producir una regulación fotosintética a la baja o fotoinhibición (Valladares y Pearcy, 1997). Dicho fenómeno puede darse como un mecanismo reversible de fotoprotección durante las horas de máxima radiación y altas temperaturas (fotoinhibición dinámica); o bien, si el estrés no remite, se pueden producir daños en las membranas del cloroplasto implicadas en la fotosíntesis que necesitarían varios días para revertir (fotoinhibición crónica) (Osmond ,1994). La medición de la fluorescencia de las clorofilas permite inferir la eficiencia cuántica del fotosistema II (PSII), y detectar posibles daños producidos en las plantas en situaciones de estrés por exceso de radiación o durante períodos de sequía prolongada (Demming-Adams y Adams, 1992). En concreto, una medida del rendimiento cuántico del fotosistema II es la relación entre la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima (Fv/Fm) en plantas previamente adaptadas a oscuridad (Björkman o & Deming-Adams, 1987).

El objetivo del trabajo es determinar la capacidad de aclimatación del alcornoque frente a un estrés hídrico moderado y a un ambiente lumínico variable. El alcornoque es una especie de luz, que sin embargo requiere de cierta sombra en las primeras edades. Por tanto, las jóvenes plantas pueden resultar especialmente vulnerables a las reducciones en la ganancia de carbono, asociadas a la fotoinhibición crónica, debida la falta de recursos acumulados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se diseñó un experimento factorial con dos factores, luz y riego. La luz se aplicó con cuatro niveles de radiación y el riego con dos niveles a lo largo de dos ciclos de sequía

Se emplearon bellotas de alcornoque de la región de procedencia “Valle del Tiétar” recogidas durante el año 2000 y conservadas en bolsas de plástico a 4 °C hasta su germinación a mediados de abril de 2001. Recién germinadas se sembraron en envases troncocónicos de 3-L rellenos con una mezcla de turba y arena fina (3:1, v/ v), a la que se incorporó cinco gramos por litro de un fertilizante de liberación lenta (Osmocote® N:P:K, 20:10:20 + micro). Las plántulas se mantuvieron en un invernadero con temperaturas medias de 30°C día y 10°C noche, fotoperíodo natural con una radiación media al mediodía de 750-850 mmolm⁻²s⁻¹, y riego a capacidad de campo, hasta los inicios de los tratamientos.

El 27 de mayo, se trasladaron las plantas a un túnel bajo plástico con los extremos y laterales abiertos, para facilitar la circulación del aire. Un total de 120 plantas se repartieron aleatoriamente en cuatro grupos, según los cuatro tratamientos de luz, cada uno repetido en tres bloques de 10 plantas. Los cuatro ambientes de luz se reprodujeron cubriendo unas estructuras metálicas con mallas de sombreo de distinta densidad (Polysack Plastic Industries Ltd., Israel) a modo de bastidor. Los porcentajes medios de la densidad de flujo fotónico (PPFD) en cada tratamiento respecto a pleno sol fueron 66-70% (34.7 mol m⁻² s⁻¹), 44-50% (23.2 mol m⁻² s⁻¹), 14-16% (7.9 mol m⁻² s⁻¹), 5-6% (2.6 mol m⁻² s⁻¹).

Las plantas dentro de cada tratamiento de luz se separaron en dos grupos: la mitad se mantuvo con riego a capacidad de campo (R+) y la otra mitad se sometió a dos ciclos de sequía de 51 y 38 días (R-), del 23 de julio al 15 de septiembre y del 17 Septiembre al 24 octubre, respectivamente. En el periodo transcurrido entre ambos ciclos, las plantas de R- se regaron a capacidad de campo. El contenido volumétrico de agua en el sustrato en las plantas bien regadas (R+) se mantuvo entre el 25%-35% y en las plantas sometidas a estrés moderado (R-) entre 7%-10% durante los dos ciclos. La cantidad de agua que se añadió a las plantas del tratamiento R- se calculaba teniendo en cuenta el agua evapotranspirada por las plantas del tratamiento de máximo sombreo, aquellas con menor demanda evaporativa. De esta manera no se detectaron diferencias significativas de humedad en el sustrato para los distintos tratamientos de luz (P>0.05).

Mediciones

Se tomaron al azar cinco plantas por cada combinación de luz x riego en tres fechas durante el primer ciclo de sequía (23-Jul, 13-Ago, 26-Ago) y otras tantas en una fecha durante el segundo ciclo (3-Oct). En una hoja de la parte central del tallo de cada planta (previamente preaclimatada a condiciones de oscuridad durante al menos 20-30 min.) se realizaron las mediciones *in vivo* de la fluorescencia de la clorofila en tres momentos del día: mañana (7:30), mediodía (12:00) y tarde (17:00). Para la medición de la fluorescencia de las clorofilas se empleó un fluorómetro Plant Stress Meter (Biomonitor AB, Sweden; PPFD=600 mmol m⁻²s⁻¹, durante 10 s). La eficiencia máxima del fotosistema II se determinó como la relación entre la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima (Fv/Fm), siendo Fv la diferencia entre la fluorescencia máxima (Fm) y la inicial (F₀).

Análisis estadístico

Para analizar la variación a lo largo del día del parámetro Fv/Fm en cada una de las fechas se aplicó un ANOVA de medidas repetidas, considerando la hora como factor de repetición y el riego y luz como factores fijos. Cuando las interacciones entre la horas y los otros factores resultaron significativas, se fijaron los niveles de dicho factor y se analizó solamente el efecto del tiempo (horas) mediante ANOVA de una vía. Asimismo, para analizar la variación del parámetro Fv/Fm a lo largo del periodo de estudio (cinco fechas) según los factores luz y riego, se aplicó un ANOVA de tres vías (fecha, luz y riego). Cuando las interacciones entre el factor fecha y los tratamientos no resultaron significativas los datos de todas las fechas se analizaron de manera conjunta. En cambio, cuando las interacciones fueron significativas se analizó el efecto del factor fijando la fecha mediante ANOVA de una vía, tal y como recomienda La posterior comparación entre medias se realizó mediante el test de Tukey HSD al 95% de probabilidad. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el programa estadístico STATISTICA 6.0.

RESULTADOS

La variación diaria de Fv/Fm fue diferente en cada tratamiento de luz para todas las fechas de medición (P_{interacciones H x R} <0.05, Tabla 1). El 23 de Julio (tabla 2) se registró una caída de Fv/Fm al mediodía seguida de una posterior recuperación por la tarde en los dos tratamientos de sombra (5-6% y 13-16%), mientras que en los dos tratamientos de mayor intensidad de luz (>44 %) no se produjo dicha recuperación, manteniéndose, Fv/Fm en valores próximos a los medidos al mediodía. A partir del 13 de Agosto, Fv/Fm no fue capaz de recuperarse tras la caída del mediodía para ninguna intensidad de luz.

La fecha de medición y la intensidad de luz afectaron significativamente los valores de Fv/Fm obtenidos en cada momento del día. El tratamiento de riego afectó a la relación Fv/Fm en la medición del 26 de agosto al

amanecer (tabla 3 y figura 1A). En cuanto al tratamiento de luz (Figura 2 A), se observó que tanto las plantas de los tratamientos de máxima sombra (5-6%) como las de máxima radiación (66-70%) mostraban valores significativamente menores. Los valores de Fv/Fm al mediodía y por la tarde fueron menores en las mediciones de agosto, al finalizar el primer ciclo de sequía, observándose una recuperación el 3 de octubre. Asimismo, al mediodía y por la tarde, se observaron los valores más bajos de Fv/Fm en los dos tratamientos de máxima radiación (Figura 2 B y C).

DISCUSIÓN

La eficiencia fotoquímica del PSII exhibió dos respuestas a las altas radiaciones y al estrés hídrico diferentes con el tiempo: una diaria, con valores máximos de Fv/Fm al amanecer y disminuciones al mediodía y primeras horas de la tarde; y otra disminución sostenida en el tiempo, hasta su posterior recuperación al final del periodo de ensayo. La reducción de la actividad del fotosistema detectada al mediodía y a primeras horas de la tarde es un proceso ampliamente estudiado en diferentes especies (Ögrem & Evans, 1992; Bolhár-Nordenkampf *et al*, 1991), incluso encontrada en árboles adultos de *Quercus suber* (Faria *et al* 1996). Dicho fenómeno se interpreta como un mecanismo dinámico de disipación de energía, que ocurre durante las horas de máxima radiación y temperatura y el cual es capaz de revertir en cortos periodos de tiempo.

La disminución sostenida en el tiempo de la eficiencia del PSII es de difícil interpretación, ya que la disminución en Fv/Fm puede deberse a un aumento del quenching no fotoquímico, al daño por exceso de luz de los centros de reacción del PSII, o a una combinación de ambos (Valladares y Pearcy, 1997). El prolongado descenso de la actividad del fotosistema se produce en pleno estío (23 de Julio a 26 de Agosto), con días de fotoperiodo todavía largo y alta radiación luminosa, lo que cabe interpretar como un mecanismo de fotoinhibición crónica (Osmond, 1994), por otra parte habitual en ambientes mediterráneos (Llorens *et al* 2003a). La atenuación y desaparición de dichas condiciones ambientales al final del ensayo (finales de octubre) propician una recuperación parcial, más evidente en las mediciones de por la mañana.

El tratamiento de estrés moderado (R-) afectó significativamente a la actividad del fotosistema II, con un descenso al amanecer el 26 de agosto, correspondiéndose dichas fechas con las condiciones de sequía más extremas. Por tanto, un estrés hídrico más acusado incrementó en mayor medida la fotoinhibición de las plantas cultivadas a pleno sol. Sin embargo, este efecto sinérgico de elevada intensidad lumínica junto con estrés hídrico sobre la fotoinhibición parece ser un fenómeno dependiente de la especie (Valladares y Pearcy, 1997, Gulía *et al* 2002). Dicha disminución es similar a la obtenida por Llorens *et al* (2002b) en *Globularia alypum* en condiciones de campo, y ha sido relacionada por dichos autores con la acumulación durante la noche de compuestos del ciclo de las xantofilas (zeaxantinas). Estos contribuyen a una rápida disipación de la energía al amanecer reflejándose en una caída en la emisión de la fluorescencia (Adams y Demming-Adams, 1994).

Las radiaciones más intensas (44-50% y 66-70%) provocaron un esperable descenso en la actividad del fotosistema II reflejado en la disminución de los valores de Fv/Fm al mediodía y primera hora de la tarde. Este comportamiento, propio de las especies en ambiente mediterráneo, ha sugerido la existencia de un sinergismo con fenómenos de cierre estomático que co-ocurren en respuesta a una mayor demanda evaporativa provocando pérdidas en la eficiencia fotosintética (Valladares & Pearcy, 1997, Valladares *et al* , 2002).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS W.W.III., DEMMING-ADAMS B., 1994. Carotenoid composition and down regulation of photosystem II in three conifer species during the winter, *Physiol. Plant.* 92: 451-458.
- BOLHÁRD-NORDENKAMPF H.R. HOFER, M.; LECHNER E. G. 1991. Analysis of light-induced field reduction of photochemical capacity in field-grown plants. Evidence for photoinhibition? *Photosynth. Res.*: 27:31-39.
- COSTA, M., MORLA, C. Y SAINZ, H (Eds.) 1997. *Los bosques ibéricos. Una interpretación geobotánica*. Planeta. Barcelona.
- DEMMIG-ADAMS B & WW ADAMS III. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 599-626.
- FARIA T, D SILVERIO, E BREIA, R CABRAL, A ABADIA, JS PEREIRA & MM CHAVES 1998: Differences in the response of Carbon assimilation to summer stress (Water deficit, high light and temperature) in four Mediterranean tree species. *Physiologia plantarum* 102:419-428.
- FARIA T. ; J. I. GARCÍA PLAZAOLA, A. ABADÍA; CERASOLY, S.; PEREIRA, J. S ANS M. M. CHAVES 1996 Diurnal changes in the photoprotective mechanism in leaves of Cork oak (*Quercus suber*) during summer. *Tree Physiology* 16, 115-123.
- GROOME, Q. J.; BAKER, N.R.; LONG S. 1990. Photoinhibition of photosynthesis in a winter wheat crop. In: *Current Research in photosynthesis*, Ed. M. Baltscheffsky, 2:463-466. Dordrecht: Kluwer.
- GULÍAS J, FLEXAS J, ABADIA A, MEDRANO H . 2002. Photosynthetic responses to water deficit in six Mediterranean sclerophyll species: possible factors explaining the declining distribution of *Rhamnus ludovici-salvatoris*, an endemic Balearic species. *Tree Physiol* 22: 687-697.

LLORENS L, PEÑUELAS J, ESTIARTE M 2003 a. Ecophysiological responses of two Mediterranean shrubs, *Erica multiflora* and *Globularia alypum*, to experimentally drier and warmer conditions. *Physiologia Plantarum* 119:231-243.

LLORENS L, PEÑUELAS J, FILELLA I 2003 b. Diurnal and seasonal variations in the photosynthetic performance and water relations of two co-occurring Mediterranean shrubs, *Erica multiflora* and *Globularia alypum*. *Physiologia Plantarum* 118:84-95

O. BJÖRKMAN, B. DEMMING, 1987. Photon yield of O₂ evolution and Chlorophyll Fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origin. *Planta* 170, p. 489-504

ÖGREM E.; EVANS, J. R. 1992. Photoinhibition of photosynthesis in situ in six species of *Eucalyptus*. *Aust. J. Plant Physiol.* 19:223-232.

OSMOND C.B. 1994 What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: *Photoinhibition of Photosynthesis from molecular mechanisms to the field* (eds N.R.Baker & J.R.Bowyer), pp. 1-24.

VALLADARES, F. & PEARCY, R.W. 1997. Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant, Cell and Environment* 20: 25-36.

VALLADARES, F., J. M. CHICO, I. ARANDA, L. BALAGUER, P. DIZENGREMEL, E. MANRIQUE, AND E. DREYER. 2002. Greater high light seedling tolerance of *Quercus robur* over *Fagus sylvatica* is linked to a greater physiological plasticity. *Trees, structure and function* 16: 395-403.

Tabla 1: Análisis de la variación diaria del parámetro Fv/Fm en las diferentes fechas de medición para los tratamientos de riego y luz. Se muestran los resultados de los análisis de varianza de medidas repetidas considerando las diferentes horas del día como factor de repetición. En negrita valores de P significativos.

Fechas		Factor			Interacción			
		Luz (L)	Riego (R)	Horas (H)	(L x R)	(H x L)	(H x R)	(H x L x R)
23-jul	F	13.587	2.275	25.893	0.200	3.381	0.406	0.887
	gl	3	1	2	3	2	2	6
	P	0.000	0.141	0.000	0.896	0.008	0.668	0.509
13-ago	F	3.533	2.621	101.771	1.519	2.405	0.961	1.359
	gl	3	1	2	3	2	2	6
	P	0.002	0.115	0.000	0.229	0.036	0.388	0.245
26-ago	F	7.119	4.272	44.936	1.699	4.539	3.424	0.596
	gl	3	1	2	3	2	2	6
	P	0.000	0.050	0.000	0.187	0.000	0.059	0.732
3-oct	F	5.630	1.227	46.850	1.880	4.069	0.407	0.743
	gl	3	1	2	3	2	2	6
	P	0.003	0.277	0.000	0.154	0.001	0.667	0.617

Tabla 2: Análisis de la variación de Fv/Fm a lo largo del día (7:00, 12:00, 17:00) mediante ANOVA fijando cada nivel del tratamiento de luz en cada fecha. Valores medios y error estándar del parámetro Fv/Fm a lo largo del día en cada tratamiento de luz para cada fecha de medición. Cuando los valores de P fueron significativos (valores en negrita) se realizó un test de Tukey de separación entre medias. Las letras diferentes indican medias diferentes para un $\alpha=0.05$.

Fecha	Luz	ANOVA	Horas		
			7:30	12:00	17:00
23-jul	5-6%	F(2, 16)=6.84 P=0.007	0.808±0.002 A	0.786±0.006 B	0.805±0.004 A
	13-15%	F(2, 16)=10.816 P=0.001	0.817±0.002 A	0.792±0.005 B	0.807±0.003A
	44-50%	F(2, 16)=15.393 P=0.000	0.811±0.004 A	0.761±0.008 B	0.772±0.01B
	66-77%	F(2, 16)=7.284 P=0.007	0.804±0.004 A	0.752±0.009 B	0.741±0.018B
13-ago	5-6%	F(2, 16)=61.61 P=0.000	0.821±0.006 A	0.753±0.009 B	0.751±0.007B
	13-15%	F(2, 16)=29.91 P=0.000	0.828±0.006 A	0.746±0.014 B	0.765±0.012B
	44-50%	F(2, 16)=18.75 P=0.000	0.823±0.006 A	0.691±0.029 B	0.702±0.022B

	66-77%	F(2, 16)=43.62 P=0.000	0.825±0.005 A	0.721±0.01 B	0.719±0.017B
	5-6%	F(2, 16)=2.205 P=0.145	0.791±0.011	0.773±0.005	0.762±0.01
26-ago	13-15%	F(2, 16)=15.84 P=0.000	0.801±0.007 A	0.771±0.005 B	0.777±0.007B
	44-50%	F(2, 16)=18.731 P=0.000	0.8±0.007 A	0.723±0.015 B	0.749±0.009B
	66-77%	F(2, 16)=20.59; P=0.000	0.797±0.006 A	0.712±0.014 B	0.735±0.01B
	5-6%	F(2, 16)=1.554 P=0.242	0.803±0.009	0.794±0.009	0.787±0.014
3-oct	13-15%	F(2, 16)=16.751 P=0.000	0.835±0.003 A	0.81±0.007 B	0.797±0.007B
	44-50%	F(2, 16)=18.831 P=0.000	0.829±0.002 A	0.771±0.008 B	0.753±0.015B
	66-77%	F(2, 16)=19.081 P=0.000	0.811±0.005 A	0.754±0.012 B	0.75±0.011B

Tabla 3: Efecto de la fecha de medición, el riego y la luz sobre el parámetro Fv/Fm en cada uno de los tres momentos de día (7:30, 12:00; 17:00) mediante ANOVA de tres vías (en negrita valores de P significativos). Para la interacción significativa (F x R) en la medición del amanecer se analizó el efecto del riego en cada una de las fechas de medición mediante ANOVA de una vía.

Horas	Factor	F	gl	P	
7:30	Fecha (F)	14.31	4	<0.001	
	Riego(R)	8.63	1	<0.005	
	Luz (L)	4.41	3	<0.005	
	Interacción F x R	3.61	4	<0.01	
	Riego	23 Julio	0.26	1	0.61
		13 Agosto	0.52	1	0.47
		26 Agosto	16.41	1	<0.005
		3 Octubre	0.26	1	0.26
	Interacción L x R	0.21	3	0.864	
	Interacción L x F	1.4	12	0.166	
12:00	Interacción L x R x F	0.5	12	0.884	
	Fecha (F)	19.42	3	<0.001	
	Riego(R)	2.23	1	0.137	
	Luz (L)	18.5	3	<0.001	
	Interacción L x R	1.33	3	0.267	
	Interacción F x R	1.5	3	0.217	
	Interacción L x F	0.93	9	0.497	
	Interacción L x R x F	1.69	9	0.099	
17:00	Fecha (F)	11.84	3	<0.001	
	Riego(R)	0.72	1	0.398	
	Luz (L)	16.55	3	<0.001	
	Interacción L x R	0.46	3	0.713	
	Interacción F x R	1.46	3	0.229	
	Interacción L x F	0.76	9	0.656	
	Interacción L x R x F	1.28	9	0.2522	

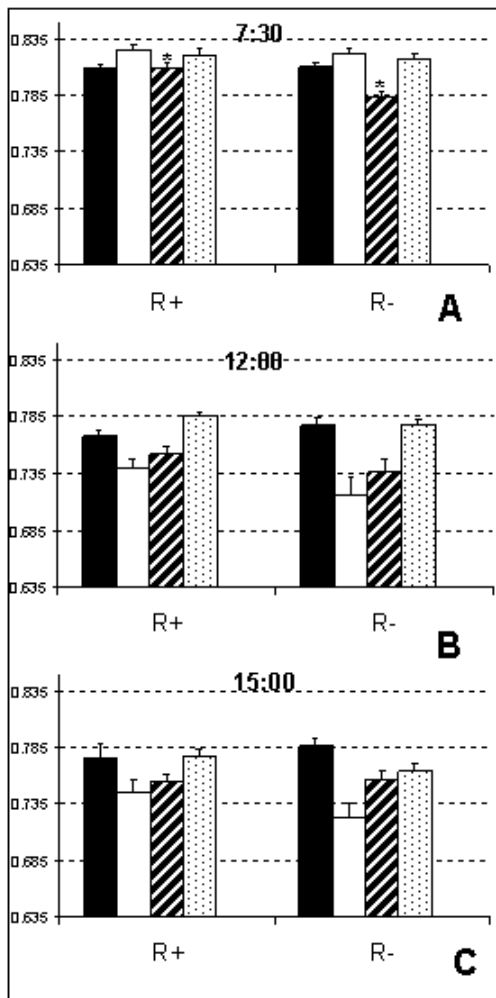


Figura 1: Valores medios de Fv/Fm (\pm error estándar) para el tratamiento de riego durante los tres momentos del día: al amanecer (A); al mediodía (B), y por la tarde (C), en cada fecha de medición (■ 23-jul-02; □ 13-ago-02; ▨ 26-ago-02; ▤ 3-oct-02). A las 7:30 se marca con un asterisco diferencias significativas en la medición del 26 agosto

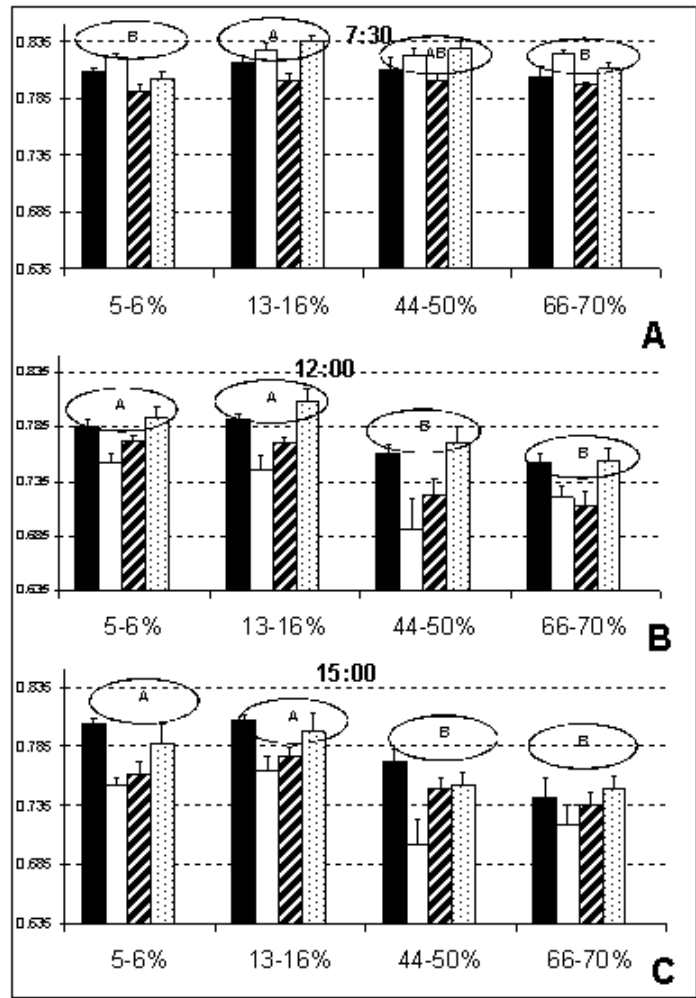


Figura 2: Valores medios de Fv/Fm (\pm error estándar) para cada tratamiento de luz durante los tres momentos del día: al amanecer (A); al mediodía (B), y por la tarde (C), en cada fecha de medición (■ 23-jul-02; □ 13-ago-02; ▨ 26-ago-02; ▤ 3-oct-02). Las letras diferentes muestran diferencias significativas (agregando todas las fechas) para los diferentes niveles de luz.