

5. EFECTOS DEL SO₂ Y DEL O₃ SOBRE LA CONCENTRACIÓN FOLIAR DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

5.1. INTRODUCCIÓN

La cuantificación de los pigmentos fotosintéticos es un método que se ha empleado tradicionalmente como complemento a las valoraciones de los daños visibles en bosques afectados por contaminantes atmosféricos en interacción con otros tipos de estrés (Tausz *et al.*, 1996). Comenzó a emplearse a raíz de los fenómenos de declive registrados en los bosques de Europa y Norteamérica desde los años 1980 que incluían, como síntoma más aparente, la decoloración de las acículas de las coníferas, particularmente en las acículas más viejas (Köstner *et al.*, 1990; Siefermann-Harms, 1992; Tausz *et al.*, 1996). La alteración en la composición de pigmentos se ha relacionado así clásicamente con los contaminantes atmosféricos (Wolfenden *et al.*, 1988) constituyendo una herramienta ampliamente extendida para la cuantificación de la decoloración y la valoración del daño producido por los contaminantes (Darrall y Jägger, 1984; Pandey y Agrawal, 1994)

No obstante, las alteraciones en la composición de los pigmentos del aparato fotosintético no son específicas del impacto de un determinado tipo de estrés por lo que su valor de diagnóstico es limitado si no se acompaña de otras determinaciones fisiológicas (Bermandinger *et al.*, 1990; Tausz *et al.*, 1996).

En los tejidos fotosintéticamente activos de las plantas superiores se encuentran, entre otros, los pigmentos clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides. Los pigmentos están asociados a proteínas específicas formando sistemas ligados a las estructuras de membrana de los cloroplastos. El pigmento mayoritario es la clorofila *a*. La clorofila *b* y los carotenoides funcionan como pigmentos accesorios en la captación y la absorción de luz, aunque parece que el papel fundamental de estos últimos sería actuar como pigmentos “fotoprotectores”. Moléculas especializadas de clorofila *a* son el único pigmento con capacidad de transducción de la energía luminosa en energía fotoquímica en los centros de reacción del fotosistema II (el P₆₈₀) y el fotosistema I (el P₇₀₀) en los organismos oxigénicos. Además de la clorofila *a*/proteína, en el centro de reacción existe β-caroteno, cuya misión parece ser la protección de la clorofila *a* de la fotooxidación (Lichtenthaler, 1987) y feofitinas. Los centros de reacción tienen estrechamente asociados a su vez complejos pigmento-proteína que contienen clorofila *a*, clorofila *b* y xantofilas (*light harvesting*

complex, LHC) que funcionan como antenas recolectoras de la energía luminosa procedente del sol. Los LHC contienen principalmente clorofila *b*, clorofila *a* (en menor proporción que la *b*) y xantofilas. Las xantofilas son carotenoides cuya función es triple: por una parte, atrapan la energía luminosa en bandas no accesibles a la clorofila en el rango del visible (Sieferman-Harms, 1985, 1987). Por otra, poseen una función de fotoprotección de los sistemas pigmento-proteína mediante la extinción (*quenching*) del estado de triplete de las moléculas de clorofila y la eliminación de especies de oxígeno tóxicas, radicales libres que se generan en los cloroplastos como consecuencia de las reacciones primarias de la fotosíntesis (Cogdell, 1988; Koyama, 1991). Más recientemente se ha propuesto un papel de las xantofilas en la disipación del exceso de energía que no se canaliza a través de procesos fotoquímicos u otros procesos. Esa capacidad fotoprotectora parece estar relacionada con la interconversión cíclica de las xantofilas violaxantina, antheraxantina y zeaxantina en lo que se ha dado en denominar ciclo VAZ (Demmig-Adams, 1990; Demmig-Adams y Adams, 1992b). En el ciclo VAZ o ciclo de la xantofila la zeaxantina (forma libre de grupos epoxi) se forma en condiciones de exceso de luz a través de la des-epoxidación de la violaxantina (con dos grupos epoxi) vía antheraxantina (con un grupo epoxi). El exceso de luz se alcanza no solamente debido a un incremento de la irradiación incidente, sino también cuando ante una determinada irradiación constante las plantas se exponen a otros factores de estrés que reducen sus tasas fotosintéticas y por tanto su capacidad de utilizar la luz solar absorbida (Demmig-Adams, 1990).

Además de los carotenoides, en el cloroplasto existen otros sistemas de eliminación de los radicales libres que se forman comúnmente en las células. Los radicales libres son moléculas con electrones desapareados muy agresivas, que reaccionan con los ácidos grasos insaturados de membrana y con las proteínas y pueden conducir a la destrucción de sistemas de membrana celulares. Así, pueden causar daño a membranas y moléculas asociadas, entre ellas los pigmentos fotosintéticos. Los radicales libres se forman comúnmente en el metabolismo de las células, por ejemplo en la cadena de transporte electrónico de los organismos que poseen sistemas fotosintéticos que utilizan el O₂ y el H₂O como aceptor y donador de electrones, respectivamente. En condiciones normales los radicales libres son eliminados por el sistema antioxidante de la célula, formado por enzimas como la superóxido dismutasa, la peroxidasa, la catalasa y otras sustancias como el ascorbato, el glutatión y los carotenoides.

Se ha demostrado que los contaminantes atmosféricos, entre ellos el SO₂ y el O₃, estimulan la formación de radicales libres en las células (Asada, 1980; Elstner, 1987). Ambos contaminantes tienen en común un mismo mecanismo de acción: la

destoxificación del SO₂ en las células, con formación de sulfatos, incluye su oxidación a través de mecanismos enzimáticos (a través de la sulfito oxidasa) o bien a través de mecanismos que incluyen la formación de radicales libres (Jäger, 1982). La molécula de O₃ es en sí una molécula altamente reactiva que puede reaccionar con ácidos insaturados de las membranas y otras moléculas, pero además su hidratación forma radicales libres (Tingey y Taylor, 1982; Elstner, 1987).

Numerosos autores han observado una alteración de los sistemas antioxidantes de las células en plantas por efecto de los contaminantes atmosféricos. En coníferas se han descrito cambios en esas sustancias por efecto del SO₂ y del O₃ en concentraciones realistas (Bermandinger *et al.*, 1990; De Kok, 1990; Smith *et al.*, 1990; Lucas *et al.*, 1993; Winsgle y Hallgren, 1993; Pandey y Agrawal, 1994; Tausz *et al.*, 1996; Elvira *et al.*, 1998). Ahora bien, cuando la acumulación de radicales libres excede la capacidad destoxicadora de la planta, puede existir un daño fotooxidativo en los sistemas pigmento-proteína y peroxidación de lípidos de membrana, entre otros tipos de daño (Asada y Takahashi, 1987; Beauregard, 1991; Elstner y Oßwald, 1991). Sin embargo, en experimentos *in vivo* e *in vitro*, se ha observado que son necesarias unas concentraciones de contaminante elevadas (típicamente del orden de 1000 ppb, que no ocurren en condiciones naturales en la troposfera) para encontrar efectos directos de destrucción de pigmentos, tanto en el caso del SO₂ (Grunwald, 1981; Sandman y Gonzales, 1989; Hegazy y El Hamid, 1998) como en el del O₃ (Senser *et al.*, 1987).

Teniendo en cuenta esta premisa y la metodología experimental utilizada en nuestra experimentación no son esperables efectos directos de daño fotooxidativo en el caso del SO₂ ni del O₃, debido a las bajas concentraciones empleadas. De hecho, los efectos que una gran mayoría de autores ha observado en el contenido de pigmentos en coníferas en experimentaciones controladas y en condiciones naturales con concentraciones realistas de contaminantes, han sido interpretados generalmente desde el punto de vista de efectos indirectos. Los efectos de los contaminantes sobre los pigmentos pueden estar mediados por deficiencias nutricionales o por la inducción de la senescencia acelerada, consecuencia de la inhibición o disminución de actividades enzimáticas.

Así, se han encontrado efectos del SO₂ a través de deficiencias nutricionales, fundamentalmente en Mg (Lange *et al.*, 1989; Oren y Schultze, 1989; Weikert *et al.*, 1989; Köstner *et al.*, 1990) y en N (Wedler *et al.*, 1995). El hecho de encontrar efectos del SO₂ y del O₃ solamente en las hojas más maduras, con ausencia de efectos e incluso estimulación de los pigmentos en las hojas más jóvenes (Bermandinger *et al.*, 1990; Senser *et al.*, 1990; Siefermann-Harms, 1990; Ballach *et*

al., 1992a; Wallin *et al.*, 1992; Lucas *et al.*, 1993; Elvira *et al.*, 1998) se ha interpretado por algunos autores como una manifestación de la aceleración de la senescencia inducida por los contaminantes (Ballach *et al.*, 1992a; Lucas *et al.*, 1993).

Otros autores no han observado en coníferas efectos destacables del SO₂ (Wolfenden *et al.*, 1991; Pfanzen y Beyschlag, 1993; Wingsle y Hällgren, 1993; Polle *et al.*, 1994; Tausz *et al.*, 1996; Müller *et al.*, 1997) ni del O₃ (Alscher *et al.*, 1989; Bermandinger *et al.*, 1990; Bytnerowicz *et al.*, 1990; Siefermann-Harms, 1990; Thornton *et al.*, 1990; Fincher y Alscher, 1992; Wedler *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 1997). En algunas ocasiones se ha sugerido que la ausencia de efectos puede deberse a que los productos dañinos no llegan al cloroplasto, o bien son destoxificados antes de que se pongan en contacto con los pigmentos (Wolfenden *et al.*, 1991).

No solamente el contenido de pigmentos en términos absolutos puede verse afectado por los contaminantes, sino también sus proporciones relativas. Por ejemplo, una disminución preferente de la clorofila *a* respecto a la clorofila *b* (con la consiguiente disminución de la relación *a/b*) puede ser indicativo de acículas dañadas por fotooxidación, y se ha encontrado disminución del cociente por efecto del SO₂ y del O₃ (Van Hove *et al.*, 1992; Lucas *et al.*, 1993; Takemoto *et al.*, 1997). Otros autores, sin embargo, no han encontrado efectos (Grunwald, 1981; Bermandinger *et al.*, 1990; Siefermann-Harms, 1990; Wallin *et al.*, 1992). Por otra parte, dada la función protectora del β-caroteno sobre la clorofila, una destrucción preferente de éste (con disminución de la relación β-caroteno/clorofila) indicaría una fotooxidación directa de los pigmentos (Senser *et al.*, 1990). Se han propuesto también otros índices de daño, como el índice de feofitinización ($A_{435/415}$); cuando la relación de absorbancias a esas longitudes de onda disminuye, implica que ha habido un proceso de degradación de clorofila a feofitinas. El índice de absorbancias $A_{430/665}$ nm tiene un significado similar. La clorofila *a* absorbe la radiación luminosa especialmente alrededor de dos máximos o picos situados a 430 y 665 nm de longitud de onda. Los carotenoides y los productos de degradación de las clorofilas tienen una relación de absorbancias a $A_{430/665}$ mayor que la de la clorofila *a*. Por tanto, el índice $A_{430/665}$ estima la proporción de los pigmentos totales con respecto a la clorofila *a*. Por otra parte, a medida que distintos factores del entorno limitan las posibilidades de crecimiento, la proporción de pigmentos diferentes a la clorofila *a* aumenta relativamente (aumentando el índice), por lo que dicho cociente ha sido sugerido por Margalef (1986) como indicador de la productividad de los ecosistemas.

Los factores que en el clima mediterráneo causan disminución de la actividad fotosintética, como en verano el exceso de luz, las altas temperaturas y la sequía,

pueden estimular asimismo la producción de especies reactivas de oxígeno (Faria *et al.*, 1996), incrementar por tanto el daño fotooxidativo potencial a los pigmentos e interactuar con los contaminantes atmosféricos en la producción de daños.

Los objetivos del capítulo que se presenta a continuación son: evaluar los efectos del SO₂, del O₃ y de la mezcla de SO₂+O₃ en la concentración de pigmentos fotosintéticos y sus proporciones relativas; sugerir los posibles mecanismos de acción implicados en esos efectos; evaluar las variaciones estacionales de los pigmentos y las posibles interacciones con los efectos de los contaminantes; establecer los efectos de la cámara, que se producen por aclimatación de las plantas a distintos regímenes de luz entre otros factores.

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

La concentración foliar de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales se midió en una muestra de dos acículas de cada clase de edad, plenamente desarrolladas, extraídas de 6 individuos tomados al azar en cada cámara y parcela ambiente (un total de 18 individuos por tratamiento). Se realizaron 8 muestreos de la concentración foliar de pigmentos a lo largo de la experimentación, coincidiendo con cada estación del año. En el momento de la recolección de las acículas, se desecharon en todos los tratamientos aquellas con síntomas visibles de daño. Una vez recolectadas, las acículas se conservaron inmediatamente en nieve carbónica y a continuación se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento. La duración del período de almacenamiento fue inferior a 6 meses.

Se seccionó la base y el ápice de las acículas, empleándose solamente fragmentos centrales para el análisis. Una vez pesados en fresco, los pigmentos se extrajeron mediante homogeneización con un equipo PotterS Braun utilizando una solución acuosa de acetona al 80 % (V/V) hasta obtener los fragmentos de acículas de color blanco. Los extractos, de volumen conocido, se clarificaron mediante centrifugación, midiéndose su absorbancia a las longitudes de onda que se indican a continuación con un espectrofotómetro Shimadzu UV240. El proceso se realizó a 4°C y en oscuridad. El cálculo del contenido en clorofilas y los carotenoides se basó en las ecuaciones de Lichtenthaler (1987):

$$C_a = 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}$$

$$C_b = 21.50 A_{646.8} - 5.10 A_{663.2}$$

$$C_{x+c} = (1000 A_{470} - 1.82 C_a - 85.02 C_b) / 198$$

siendo:

$$C_a = \text{clorofila } a \text{ (mg/l)}$$

$$C_b = \text{clorofila } b \text{ (mg/l)}$$

$$C_{x+c} = \text{carotenoides (mg/l)}$$

$$A_n = \text{absorbancia a la longitud de onda } n$$

Conocido el volumen del extracto acetónico y el peso fresco de la muestra foliar de la que procedía, se obtuvo la cantidad de pigmento por unidad de masa foliar en $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ peso fresco. Se midió también la relación entre el peso fresco y el peso seco de las acículas y su área específica (ver capítulo 8.2), calculándose la concentración foliar de pigmentos sobre la base del área foliar (en $\text{mg} \cdot \text{m}^{-2}$) y del peso

seco (en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{peso seco}}$). Se analizaron estadísticamente las concentraciones de pigmentos expresadas en las tres unidades, peso fresco, área foliar y peso seco, obteniéndose resultados similares. Los resultados que se presentan a continuación están calculados sobre la base del área foliar.

Para cada muestra se calcularon también las relaciones clorofila *a/b*, clorofila/carotenoides y la relación de absorbancias $A_{430/665}$. Los resultados de los 6 individuos de cada cámara o parcela ambiente se promediaron con lo que al existir tres cámaras por tratamiento, el tamaño de muestra fue $n=3$. El tratamiento estadístico consistió en un análisis de la varianza de dos factores (SO_2 y O_3) con interacción para determinar el efecto del SO_2 y del O_3 y su posible interacción. En el caso de observarse una interacción significativa entre ambos factores, se procedió a un análisis de la mínima diferencia significativa (LSD) calculada para el nivel del 5 %, con objeto de determinar las diferencias significativas entre los tratamientos. Cuando se compararon solamente dos muestras independientes (por ejemplo el SO_2 con el AF, el AA con el ANF, o dos clases de edad diferentes), se empleó el test de la *t*-Student. En los casos en que se estudió el comportamiento de las mismas unidades experimentales a lo largo del tiempo, se realizó un test ANOVA con medidas repetidas, con la finalidad de valorar posibles tendencias de variación. En los resultados que se presentan a continuación se señalan las diferencias significativas para $p<0.05$ y para $p<0.10$.

5.3. RESULTADOS

Variaciones estacionales

La concentración media de pigmentos en el tratamiento de control se presenta en la tabla 5.1 expresada en diversas unidades. Las variaciones de la concentración de pigmentos en el mismo tratamiento a lo largo del experimento se muestran en la figura 5.1. La concentración de pigmentos mostró variaciones en función de la época de muestreo en todos los parámetros estudiados.

Tabla 5.1. Concentración media de pigmentos a lo largo del experimento en el tratamiento de control (aire filtrado, AF). Cada parámetro medido se ha expresado en diversas unidades. En las gráficas que siguen se han expresado en $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$.

Pigmento	Unidades	Edad		
		1995	1996	1997
Clorofila a + b	$\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$	704	409	218
	$\text{mg}\cdot\text{g}_{\text{ps}}^{-1}$	2.68	1.98	1.15
	$\text{mg}\cdot\text{g}_{\text{pf}}^{-1}$	1.37	0.87	0.51
<i>lorof ila a</i>	$\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$	544	326	177
	$\text{mg}\cdot\text{g}_{\text{ps}}^{-1}$	2.05	1.57	0.93
	$\text{mg}\cdot\text{g}_{\text{pf}}^{-1}$	1.06	0.69	0.42
<i>lorof ila b</i>	$\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$	159	83	40
	$\text{mg}\cdot\text{g}_{\text{ps}}^{-1}$	0.62	0.41	0.22
	$\text{mg}\cdot\text{g}_{\text{pf}}^{-1}$	0.31	0.18	0.01
<i>arote noid es</i>	$\text{Mg}\cdot\text{m}^{-2}$	219	131	78
	$\text{mg}\cdot\text{g}_{\text{ps}}^{-1}$	0.83	0.64	0.42
	$\text{mg}\cdot\text{g}_{\text{pf}}^{-1}$	0.43	0.28	0.19

En las acículas de 1996 se observaron máximas concentraciones de clorofila *a*, *b*, clorofila *a+b* y carotenoides totales en otoño-invierno y mínimas concentraciones en verano (figura 5.1). Las acículas de 1997 mostraron el mismo patrón de comportamiento entre verano y otoño, con los mínimos valores registrados en verano. En las acículas más maduras (de 1995) la concentración de pigmentos también mostró una disminución en verano de 1996, pero a partir de ese muestreo los

valores no experimentaron aumento, como en las otras clases de edad, sino que sufrieron una disminución durante el resto del experimento, probablemente como consecuencia de un proceso de senescencia.

También se presenta la evolución de las relaciones entre pigmentos (clorofila a/b , clorofila/carotenoides), la relación de absorbancias $A_{430/665}$ y la proporción de clorofila con respecto a la concentración de nitrógeno foliar (figura 5.2). En esta última relación solamente se representan los promedios, debido a que la concentración de N y la de pigmentos se analizaron en muestras vegetales distintas (ver en el capítulo 5.2 una descripción detallada del protocolo seguido). En las acículas de 1995 la proporción clorofila a /clorofila b fue mínima en verano, mientras que en las acículas de 1996 permaneció aproximadamente constante a lo largo del experimento con una disminución en verano de 1997. En las acículas de 1997 la relación permaneció constante. La proporción clorofila/carotenoides se mantuvo constante en las acículas de 1996, reflejando que las variaciones en la clorofila fueron similares a los cambios en los carotenoides. Sin embargo en las acículas de 1995 la relación fue superior en verano que en el resto de los muestreos, indicando una disminución más acentuada de los carotenoides que de la clorofila en esa época. La relación de absorbancias $A_{430/665}$, que expresa la cantidad de pigmentos totales respecto a la clorofila a , se mantuvo constante en las acículas de 1995 a lo largo de 1996, aumentando en el año siguiente. En las acículas de 1996, tras una disminución en otoño de 1996, la proporción $A_{430/665}$ aumentó durante el año siguiente. En las acículas de 1997 la relación disminuyó entre verano y otoño. La proporción de clorofila con respecto a la concentración foliar de N mostró valores mínimos en verano en las tres clases de edad.

La importancia de las variaciones en función de la fecha de muestreo está reflejada en la elevada significación estadística del factor “muestreo” en los resultados de los ANOVA (tabla 5.2 y siguientes).

La concentración foliar de pigmentos fue significativamente superior en las acículas más maduras respecto a las más jóvenes ($p < 0.05$, tabla 5.2), tanto en el caso de la clorofila (a , b y $a+b$) como en el de los carotenoides totales (figura 5.1), aunque la magnitud de las diferencias varió en función de la fecha de muestreo, como muestra la interacción significativa entre el factor “edad” de las acículas y el factor “muestreo” (ver la misma tabla). La relación clorofila a/b fue significativamente inferior en las acículas más maduras, lo que indica una mayor disminución de la concentración de clorofila b que de clorofila a en esa clase de edad. El factor “edad” de las acículas no tuvo efectos significativos en la relación clorofila/carotenoides ni en la relación de absorbancias $A_{430/665}$.

Tabla 5.2. Resultados del análisis de la varianza con medidas repetidas a lo largo de los sucesivos muestreos (ANOVA-RM) del efecto de la edad de las acículas sobre la concentración foliar de pigmentos para el tratamiento de control (aire filtrado). El análisis se ha realizado sobre las acículas de 1995 y 1996. Se indican las probabilidades p. Las probabilidades menores de 0.05 se han señalado con negrita, las $p < 0.10$ con paréntesis. Las cuatro primeras columnas numéricas hacen referencia a la representación de la figura 5.1, las tres últimas a la figura 5.2.

Fuente de variación	Clorofila a + b (mg·m ⁻²)	Clorofila a (mg·m ⁻²)	Clorofila b (mg·m ⁻²)	Carotenoides (mg·m ⁻²)	Clorofila a/b	Clorofila/Carotenoides	A _{430/665}
Edad	0.027	0.035	0.014	0.015	0.000	0.268	0.252
Muestreo	0.001	0.000	0.003	0.001	0.001	0.000	0.001
Edad x muest.	0.016	0.017	0.015	0.046	(0.050)	0.001	0.126

Efectos del SO₂

Los efectos del tratamiento de SO₂ sobre la concentración foliar de pigmentos y las relaciones entre ellos se presentan en las figuras 5.1 y 5.2 para la totalidad del experimento, así como en las figuras 5.3 y 5.4 para la fase del experimento realizada en 1997. En dichas gráficas se indican las diferencias significativas debidas al tratamiento (calculadas mediante t-Student) para cada muestreo y clase de edad de las acículas. Los resultados del ANOVA con medidas repetidas (RM) a lo largo de los muestreos se presentan en la tabla 5.3.

señalada para las acículas de 1996, observándose en el tratamiento con SO₂ una disminución de la concentración de pigmentos. Aunque el ANOVA con medidas repetidas no indicó un efecto general estadísticamente significativo (tabla 5.3) y el análisis de la t-Student reveló solamente un efecto significativo del SO₂ sobre la disminución de la concentración de carotenoides en marzo de 1997 ($p < 0.10$, figura 5.1), el ANOVA de dos factores (SO₂ y O₃) con interacción sí indicó una disminución significativa de la concentración de clorofila *a* ($p < 0.10$), *b*, *a+b* y carotenoides ($p < 0.05$) por efecto del SO₂ (figura 5.3) en esa fecha de muestreo. La disminución de la concentración de pigmentos por efecto del SO₂ fue del 11 % (clorofila *a+b*), el 10 % (clorofila *a*), el 13 % (clorofila *b*) y el 10 % (carotenoides).

Tabla 5.3. Resultados del ANOVA-RM del efecto del SO₂ sobre la concentración foliar de pigmentos para cada clase edad. Se indican las probabilidades p. Las probabilidades menores de 0.05 se han señalado con negrita, las $p < 0.10$ con paréntesis. Las cuatro primeras columnas numéricas hacen referencia a la representación de la figura 5.1, las tres últimas a la figura 5.2.

Edad	Fuente de variación	Clorofila a + b (mg·m ⁻²)	Clorofila a (mg·m ⁻²)	Clorofila b (mg·m ⁻²)	Carotenoides (mg·m ⁻²)	Clorofila a/b	Clorofila/Carotenoides	A _{430/665}
------	---------------------	---------------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------	------------------------------------	---------------	------------------------	----------------------

1995	SO ₂	0.676	0.683	0.658	0.299	0.492	(0.083)	0.262
	Muestreo	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000
	SO ₂ x muestreo	0.927	0.916	0.954	0.976	0.850	0.023	0.851
1996	SO ₂	0.203	0.182	0.280	0.183	0.258	0.979	0.590
	Muestreo	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
	SO ₂ x muestreo	0.490	0.483	0.508	0.692	0.459	0.012	0.275
1997	SO ₂	0.743	0.629	0.833	0.531	0.625	0.758	0.700
	Muestreo	0.034	0.030	(0.093)	(0.084)	0.239	0.028	0.016
	SO ₂ x muestreo	0.965	0.851	0.559	0.773	0.302	0.324	0.784

En las acículas más jóvenes (de 1997) la tendencia fue similar a la observada en las acículas de 1996, con un aumento en julio de 1997 del 23 % de la concentración de clorofila *b* en el tratamiento de SO₂ respecto al AF ($p < 0.10$) y un aumento no significativo de la concentración de clorofila *a+b* y de clorofila *a* en un 13 % y un 12 %, respectivamente, en octubre de 1997 (figura 5.3).

La relación clorofila *a/b* no mostró efectos proporcionalmente más importantes del SO₂ sobre uno u otro tipo de clorofila salvo en muestreos puntuales (acículas de 1996 en agosto de 1996, figura 5.2a; acículas de 1995 en mayo de 1997, figura 5.4a). En ambos casos la disminución de la relación *a/b* por efecto del SO₂ indicó una alteración más importante de la clorofila *b* que de la *a* por efecto de ese tratamiento.

La relación clorofila/carotenoides no se vio influenciada por el tratamiento con SO₂ en las acículas de 1996 y 1997. No obstante, en las acículas de 1995 el SO₂ aumentó significativamente esa proporción en diversos muestreos y en general a lo largo del experimento (figura 5.2b). Tal aumento se debió a que el SO₂ disminuyó proporcionalmente más la concentración de carotenoides que la de clorofila respecto al AF. Ese efecto explicaría también la menor relación $A_{430/665}$ observada en algunos muestreos por efecto del SO₂ (figura 5.2c). Finalmente, se registró también una tendencia al aumento de la proporción clorofila/N por efecto del SO₂ en la mayor parte de los muestreos (figura 5.2d).

Efectos del O₃ y del SO₂+O₃

Los efectos del O₃ y del SO₂+O₃ sobre la concentración de pigmentos se muestran en las figuras 5.3 y 5.4, donde se indican también las diferencias significativas debidas a los tratamientos para cada muestreo y clase de edad de las

acículas. Los resultados del ANOVA con medidas repetidas (RM) a lo largo de los muestreos se presentan en la tabla 5.4.

El efecto del O₃ fue, como en el caso del SO₂, de distinta índole en función de la edad de las acículas. En las acículas de 1995 se registró un aumento de la concentración de clorofila *a*, *b* y *a+b* debido al O₃ en un 18, 23 19 % respectivamente en mayo de 1997 ($p < 0.10$); el ANOVA-RM mostró un aumento general de la clorofila *b* por efecto del contaminante ($p < 0.10$, tabla 5.3). La tendencia fue menos acusada para los carotenoides. Sin embargo, dicho aumento se debió sobretodo a la acción de la mezcla de SO₂+O₃. De hecho, los efectos del O₃ independientemente del SO₂ fueron más ligeros (aumentos de hasta un 10 %, y no estadísticamente significativos según el análisis t-Student). En las acículas de 1996 no se registraron efectos significativos del O₃ sobre la concentración de pigmentos, aunque la tendencia fue similar a la observada para las acículas de 1995.

Contrariamente a la tendencia señalada en las acículas más maduras, en las hojas de 1997 se observó una tendencia a la disminución de la concentración de pigmentos por efecto del O₃. El descenso fue más importante en el caso de la clorofila *b*, con disminuciones del 24 % ($p < 0.05$, t-Student) y del 29 % ($p < 0.05$, LSD) en julio y octubre de 1997, respectivamente. En la clorofila *a* la disminución fue de hasta el 17 % en julio de 1997 (no significativo). En la clorofila *a+b* la disminución fue de hasta un 19 % en octubre de 1997 ($p < 0.10$, t-Student). La disminución se vio enmascarada en algunos casos por los efectos de la mezcla, por lo que al aplicar el ANOVA de dos factores las diferencias debidas al tratamiento con O₃ no siempre fueron significativas.

Tabla 5.4. Resultados del ANOVA-RM del efecto del SO₂ y del O₃ sobre la concentración foliar de pigmentos para cada clase edad. Se indican las probabilidades *p*. Las probabilidades menores de 0.05 se han señalado con negrita, las $p < 0.10$ con paréntesis. Las cuatro primeras columnas numéricas hacen referencia a la representación de la figura 5.3, las tres últimas a la figura 5.4.

Edad	Fuente de variación	Clorofila a + b (mg·m ⁻²)	Clorofila a (mg·m ⁻²)	Clorofila b (mg·m ⁻²)	Carotenoides (mg·m ⁻²)	Clorofila a/b	Clorofila / Carotenoides	A _{430/665}
1995	SO ₂	0.952	0.978	0.871	0.947	(0.096)	0.907	0.482
	O ₃	0.153	0.200	(0.070)	0.268	0.016	0.034	(0.073)
	SO ₂ x O ₃	0.394	0.406	0.374	0.207	0.108	0.170	0.667
	Muestreo	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.023	0.001
	SO ₂ x muestreo	0.016	0.028	0.022	0.010	0.617	0.230	0.359
	O ₃ x muestreo	0.190	0.170	0.466	0.207	0.807	0.366	0.877
	SO ₂ x O ₃ x muestreo	0.486	0.627	0.337	0.283	0.871	0.572	0.683

1996	SO ₂	0.551	0.576	0.487	0.442	0.436	0.761	0.813
	O ₃	0.159	0.144	0.227	0.154	0.761	0.324	0.348
	SO ₂ x O ₃	0.844	0.831	0.887	0.764	0.998	0.548	0.388
	Muestreo	0.000						
	SO ₂ x muestreo	0.710	0.677	0.782	0.740	0.447	0.725	0.658
	O ₃ x muestreo	0.443	0.469	0.365	0.547	0.152	0.138	0.596
	SO ₂ x O ₃ x muestreo	0.760	0.774	0.727	0.889	0.918	0.007	(0.066)
1997	SO ₂	-	-	-	-	0.549	0.473	0.188
	O ₃	-	-	-	-	0.163	0.869	0.663
	SO ₂ x O ₃	0.028	(0.050)	0.013	(0.058)	0.241	0.323	0.297
	Muestreo	0.001	0.001	0.006	0.004	0.042	0.031	0.012
	SO ₂ x muestreo	0.922	0.896	0.964	0.993	0.738	0.559	0.647
	O ₃ x muestreo	0.722	0.731	0.717	0.804	0.777	0.660	0.985
	SO ₂ x O ₃ x muestreo	0.983	0.838	0.366	0.612	0.063	0.141	0.497

La relación clorofila *a/b* no indicó un efecto preferente del O₃ sobre uno u otro tipo de clorofila, excepto en las acículas de 1997 en octubre del mismo año (figura 5.4a), señalando en consonancia con lo que se ha descrito anteriormente una disminución más acusada de la clorofila *b* que de la clorofila *a* por efecto del O₃. Por otra parte, las diferencias significativas encontradas en el índice clorofila/carotenoides señalan que las alteraciones producidas por el O₃ en la clorofila fueron más importantes que las generadas en los carotenoides (figura 5.4b). El O₃ solamente afectó a la relación de absorbancias $A_{430/665}$ en las acículas de 1995 en mayo de 1997, en que produjo una disminución de esa relación. En el resto de los muestreos y clases de edad no se observaron diferencias significativas debidas al contaminante (figura 5.4c).

Los efectos de la mezcla de SO₂+O₃ no reflejaron interacciones entre los contaminantes en las acículas de 1995 y 1996: en marzo de 1997 los efectos de la mezcla fueron similares a los del SO₂, con una disminución de la concentración de pigmentos respecto al control. En las acículas de 1996 los efectos del SO₂+O₃ fueron semejantes a los del O₃ con una tendencia, como se ha comentado, al aumento de la concentración de pigmentos respecto al control.

Sin embargo, en las acículas de 1997 se observaron interacciones significativas de los contaminantes: mientras que los pigmentos, principalmente la concentración de clorofila *b*, reaccionaron al SO₂ con una tendencia a aumentar y al O₃ con una tendencia a disminuir, la coexistencia de los dos contaminantes aumentó proporcionalmente más la concentración que con sólo SO₂. Aunque la existencia de interacción fue generalizada (tabla 5.4), el análisis LSD no señaló diferencias significativas entre el SO₂+O₃ y el AF en cada muestreo (figura 5.3). Las máximas diferencias entre esos tratamientos fueron del 16 % en el caso de la clorofila *a* en

octubre de 1997. En las acículas de 1995 la presencia del SO₂ incrementó las diferencias debidas al O₃, aunque la interacción no fue estadísticamente significativa.

Efecto de cámara

La comparación entre la concentración de pigmentos en las cámaras con aire no filtrado (ANF) respecto a las parcelas ambiente (AA) se presenta en las figuras 5.5 y 5.6. Los resultados del ANOVA-RM para el efecto de cámara se muestran en la tabla 5.5.

La cámara incrementó la concentración foliar de clorofila *a*, *b* y *a+b* en las dos clases de edad, 1995 y 1996, de manera significativa ($p < 0.01$) en otoño de 1996 (figura 5.5). El efecto fue más generalizado en las acículas de 1996 que en las de 1995, como lo señalan los resultados del ANOVA-RM (tabla 5.5). La concentración de carotenoides se vio incrementada por efecto de la cámara solamente en las acículas más maduras ($p < 0.05$, figura 5.5d) en otoño de 1996.

Tabla 5.5. Resultados del ANOVA-RM del efecto de la cámara sobre la concentración foliar de pigmentos para cada clase edad. Se indican las probabilidades *p*. Las probabilidades menores de 0.05 se han señalado con negrita, las $p < 0.10$ con paréntesis. Las cuatro primeras columnas numéricas hacen referencia a la representación de la figura 5.5, las tres últimas a la figura 5.6.

Edad	Fuente de variación	Clorofila a + b (mg·m ⁻²)	Clorofila a (mg·m ⁻²)	Clorofila b (mg·m ⁻²)	Carotenoides (mg·m ⁻²)	Clorofila a/b	Clorofila/Carotenoides	A _{430/665}
1995	Cámara	(0.061)	0.118	0.012	0.311	0.008	(0.086)	0.040
	Muestreo	0.000	0.000	0.004	0.000	0.011	0.200	0.004
	Cám. x muest.	0.315	0.270	0.466	0.573	0.794	0.753	0.012
1996	Cámara	0.000	0.000	0.000	0.327	0.002	0.006	0.002
	Muestreo	0.024	0.017	0.091	0.040	0.051	0.477	0.042
	Cám. x muest.	(0.082)	(0.066)	0.175	0.668	0.276	(0.071)	0.003

Por otra parte, la cámara produjo un descenso del cociente clorofila *a/b* en ambas clases de edad ($p < 0.01$, tabla 5.5 y figura 5.6a), indicando que el aumento de la concentración de clorofila *b* por el efecto de cámara fue más importante que el de la clorofila *a*. El efecto de la cámara sobre la relación clorofila/carotenoides, con un aumento significativo del cociente, corrobora lo que se ha mencionado respecto a un aumento más importante de la concentración de clorofila que de carotenoides en el tratamiento de ANF respecto al AA, particularmente en las acículas de 1996 ($p < 0.10$ y $p < 0.01$ para las acículas de 1995 y 1996, respectivamente; tabla 5.5 y figura 5.6b). La relación A_{430/665} también resultó modificada por el efecto de cámara, disminuyendo significativamente ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ para acículas de 1995 y 1996

respectivamente, tabla 5.5 y figura 5.6c) en el tratamiento de ANF respecto al AA. La proporción de la concentración de clorofila con respecto a la concentración de N tuvo tendencia a ser superior en el tratamiento de ANF que en el de AA (figura 5.6d).

La cámara también influyó en las variaciones estacionales de la concentración de clorofila, puesto que mientras en otoño de 1996 su concentración se mantuvo constante (acículas de 1995) o aumentó en un 46 % (acículas de 1996) en el interior de las cámaras, en el aire ambiente dicha concentración disminuyó en un 15 % (acículas de 1995) o aumentó sólo en un 11 % (acículas de 1996) (figura 5.5 a). En el caso de los carotenoides el efecto de la cámara en la evolución temporal fue menos marcado (figura 5.5d).

5.4. DISCUSIÓN

Variaciones estacionales

Se observó una marcada estacionalidad en la concentración foliar de pigmentos, con una disminución en verano y una recuperación de valores en otoño-invierno, salvo en las acículas más maduras, en las que no se registró la recuperación otoñal debido posiblemente a su senescencia. Se han descrito cambios estacionales en la concentración de pigmentos en una amplio rango de especies arbóreas (Martin y Öquist, 1979; Öquist, 1983; Weikert *et al.*, 1989; Köstner *et al.*, 1990; García-Plazaola *et al.*, 1997; Elvira *et al.*, 1998). En la mayoría de esos estudios se han encontrado, no obstante, aumentos de la concentración de pigmentos en verano y disminuciones en invierno. Sin embargo, en consonancia con los resultados de nuestra experimentación, en *Pinus halepensis* se han registrado disminuciones de la concentración de pigmentos en verano en condiciones naturales (Velissariou *et al.*, 1992), en nuestros experimentos previos en invernadero (Barrantes *et al.*, 1993, 1994) y en experimentación de OTCs (Elvira *et al.*, 1995, 1998; Elvira, 1996). La reducción de la concentración de pigmentos en determinadas épocas del año se ha interpretado como una posible fotooxidación de las clorofilas mediada por altas temperaturas y sequía estivales en el caso de *Pinus halepensis* en Grecia (Velissariou *et al.*, 1992), altas temperaturas asociadas a elevados niveles de radiación luminosa en verano en esa misma especie en el NE español (Elvira *et al.*, 1998) o por bajas temperaturas invernales en el caso de *Pinus sylvestris* y *Picea abies* (Öquist, 1983; Köstner *et al.*, 1990). Otros autores han señalado también a los cambios ultraestructurales en la organización de los cloroplastos como responsables de la pérdida de clorofila durante la estación de reposo del período vegetativo (Martin y Öquist, 1979). En condiciones mediterráneas, se ha sugerido que la disminución de la concentración de clorofila en verano puede formar parte de una estrategia adaptativa de protección del daño fotoinhibitorio (Kyparissis *et al.*, 1995; Elvira *et al.*, 1998) mediante la disminución de la captación de luz y por tanto disminución de la sobreexcitación de los fotosistemas.

La disminución de la clorofila en verano estuvo asociada en las acículas de un año de edad a una disminución de la proporción clorofila *a/b*, mientras que en las del año en curso la proporción clorofila *a/b* permaneció aproximadamente constante. Tales resultados indican una disminución preferente de los “complejos core” (*core complex*, CC) respecto a los pigmentos captadores de luz (*light harvesting complex*, LHC) en acículas de un año (Lichtenthaler, 1987). Elvira *et al.* (1998) obtuvieron

similares resultados, aunque no existieron diferencias en función de la edad de las acículas.

La concentración de pigmentos, tanto en lo que se refiere a la clorofila como a los carotenoides, fue superior en las acículas más maduras que en las más jóvenes, coincidiendo con los resultados obtenidos por diversos autores para otras especies en condiciones naturales (Köstner *et al.*, 1990; Pfanz y Beyschlag, 1993; Wedler *et al.*, 1995) y en cámaras de cultivo (Siefertmann-Harms, 1990; Tausz *et al.*, 1996) y otras condiciones de experimentación (Ballach *et al.*, 1992a; Wulff *et al.*, 1996). Los valores medios de la concentración foliar de pigmentos registrados en nuestra experimentación son similares a los de experimentos anteriores realizados en invernadero (Barrantes *et al.*, 1993, 1994) y a los descritos por otros autores para *Pinus halepensis* (Barnes *et al.*, 1991; Elvira *et al.*, 1995; Elvira, 1996).

Efectos del SO₂

Los efectos del SO₂ sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos fueron mínimos en 1996, no observándose una influencia generalizada de ese tratamiento a lo largo de la experimentación durante dicho año. Sin embargo, en 1997, aunque cuantitativamente el efecto del SO₂ no fue muy importante, se observaron ciertas tendencias: las acículas de dos años (originadas en 1995) mostraron una disminución de la concentración de clorofila de hasta un 11 % en marzo de 1997. En las acículas de un año (de 1996) no se observaron diferencias significativas, mientras que en las acículas más jóvenes (de 1997) se registró un aumento significativo ($p < 0.05$) de entre un 13 % (en noviembre) y un 19 % (en julio) debido al SO₂. Con concentraciones menores (11 ppb de SO₂) pero tras un periodo mayor de experimentación, de 5 años, Siefertmann-Harms (1990) y Bermandinger *et al.* (1990) encontraron en *Picea abies* también una disminución de la concentración de clorofila en las acículas más maduras (de 2 y 3 años de edad) pero no en las de 1 año de edad. En ese mismo sentido, Ballach *et al.* (1992a) encontraron en plantas de *Populus nigra* fumigadas con SO₂/NO_x durante 6 semanas que la concentración de pigmentos disminuyó en las hojas más maduras mientras que aumentó en las más jóvenes. En trabajos en condiciones naturales se ha observado también disminución de la concentración de pigmentos, aunque a través de deficiencias nutricionales, fundamentalmente de Mg (Lange *et al.*, 1989; Weikert *et al.*, 1989; Köstner *et al.*, 1990) y N (Wedler *et al.*, 1995). En nuestro caso, la disminución de clorofila en las acículas más maduras no estuvo acompañada de disminución de Mg, pero sí de N en el tratamiento con SO₂ (ver capítulo 4).

Se han descrito efectos directos del SO₂ sobre la disminución de la concentración de pigmentos en algunos estudios con concentraciones de SO₂ elevadas, del orden de 800 a 1000 ppb (Shimazaki *et al.*, 1980; Grunwald, 1981; Sandman y Gonzales, 1989). Sin embargo, la concentración empleada en nuestro estudio está considerada por diversos autores como demasiado baja para producir efectos directos importantes (Wedler *et al.*, 1995; Tausz *et al.*, 1996). Dichos autores, así como Cornic (1987), Wolfenden *et al.* (1991), Pfanz y Beyschlag (1993), Wingsle y Hallgreen (1993) y Polle *et al.* (1994) no obtuvieron efectos en una amplia variedad de coníferas con tratamientos de SO₂ de entre 10 y 80 ppb. Contrastan no obstante con los resultados anteriores los efectos de disminución de la concentración de pigmentos en experimentos con 36 ppb de SO₂ durante 8 meses en *Pseudotsuga menziesii* (Van Hove *et al.*, 1992) y con 28 ppb de SO₂ en tan sólo 3 meses de tratamiento con *Pinus sylvestris* (Pérez-Soba, 1995).

Los efectos directos del SO₂ sobre los pigmentos fotosintéticos se han relacionado con la formación de sulfatos a partir de sulfitos, proceso en el que se desencadena una serie de reacciones que involucran la formación de radicales libres (Asada y Takahashi, 1987; Weigel *et al.*, 1989a). Los radicales libres son moléculas muy reactivas que atacan a los sistemas de membranas fotosintéticas, los sistemas pigmento-proteína y las biomembranas en general (Shimazaki *et al.*, 1980; Beauregard, 1991; Elstner y Osswald, 1991). Las células tienen mecanismos de protección frente a los radicales libres, como son los carotenoides (carotenos y carotenoides del ciclo de la xantofila), ascorbato, glutatión, superóxido dismutasa, conocidos genéricamente con el término de antioxidantes. Numerosos estudios han demostrado la existencia de tales mecanismos de protección de los sistemas pigmentarios por los radicales libres y la alteración de las sustancias o enzimas del sistema antioxidante de las células por efecto de contaminantes atmosféricos como el SO₂ (Wellburn, 1982; Peiser y Yang, 1985; Sandman y Gonzales, 1989; Bermandinger *et al.*, 1990; Tausz *et al.*, 1996). Sin embargo, cuando la acumulación de radicales libres excede a la capacidad detoxificadora de la planta, se puede producir un daño fotooxidativo con pérdida de pigmentos.

En nuestra experimentación, se observaron en agosto de 1996 disminuciones de β-caroteno y alteraciones en las relaciones de los componentes del ciclo de las xantofilas por efecto del SO₂, así como alteraciones en la concentración de ascorbato a lo largo de toda la experimentación (Moliner *et al.*, datos no publicados); además, se registraron debido al contaminante una disminución de los carotenoides totales y una tendencia a la disminución de la relación clorofila *a/b* en las acículas más maduras en marzo de 1997, así como una tendencia al aumento de la relación clorofila/carotenoides generalizada a lo largo del experimento en las acículas de

1995. Según Senser *et al.*, (1987), el pigmento más sensible a la fotooxidación es el β -caroteno, por lo que una degradación preferente de éste podría indicar una acción fotooxidativa. Ello se puede relacionar con el papel del β -caroteno como protector de la *clorofila a* cerca o en el centro de reacción (Lichtenthaler, 1987). La función de protección del complejo proteína-pigmento y de los cloroplastos frente a la oxidación es desempeñada por los carotenoides en general (Siefermann-Harms, 1990), pero es el β -caroteno, junto con la luteína, el más activo (Young y Britton, 1990). En otros trabajos se ha encontrado también una disminución de la concentración foliar de carotenoides por efecto del SO_2 (Sandmann y Gonzales 1989; Bermadinger *et al.*, 1990; Pérez-Soba, 1995; Tausz *et al.*, 1996), en algunos casos junto con otras alteraciones en el sistema de antioxidantes. Algunos autores (Lichtenthaler y Buschann, 1984) han observado una proporción de *clorofila a/b* reducida en acículas dañadas por fotooxidación, aunque en otros estudios no se han observado variaciones (Siefermann-Harms, 1990).

Los resultados obtenidos en nuestra experimentación en cuanto a las alteraciones en el sistema de extinción de radicales libres (Moliner *et al.*, datos no publicados) apuntan a un incremento del estrés oxidativo en las acículas por efecto del SO_2 . Sin embargo, debido al empleo de una concentración relativamente baja del contaminante, la capacidad destoxificadora en las plantas sería suficiente para evitar el daño fotooxidativo de los sistemas pigmento-proteína, no detectándose en general disminución de las concentraciones de *clorofila*. Solamente la coexistencia de varios factores disminuyó la concentración de pigmentos. Tales factores fueron: el tiempo de fumigación con SO_2 superior a 1 año; la edad de las acículas (de 2 años de edad), puesto que las acículas más maduras posiblemente tienen una menor capacidad destoxificadora que las acículas más jóvenes (Grunwald, 1981). El efecto observado pudo además estar coadyuvado por fenómenos de retranslocación de N desde las acículas más viejas a las de menor edad. Finalmente, esos efectos se produjeron precisamente en el momento de la producción de nuevos brotes de acículas, lo que apoya la hipótesis de mecanismos compensatorios de estimulación de la actividad de las hojas más jóvenes frente a las de menor actividad.

Efectos del O_3

Los efectos del O_3 sobre la concentración de pigmentos variaron como en el caso del SO_2 en función de la edad de las acículas. No obstante, fueron opuestos a los observados para el SO_2 en 1997, en el sentido de que mientras la concentración de *clorofila* tendió a aumentar en las acículas más jóvenes y a disminuir en las más maduras por efecto del SO_2 , el O_3 produjo una disminución de la concentración de *clorofila* (sobretudo de la *clorofila b*) en las acículas más jóvenes y una tendencia al

aumento de la concentración de clorofila en las más maduras. En las acículas de un año de edad, de 1996, no se produjeron efectos importantes, aunque la tendencia fue similar a la observada en las acículas más maduras. La disminución de la clorofila *b* por efecto del O₃ en las hojas más jóvenes fue de hasta un 29 %, el aumento en las más maduras fue de hasta un 19 %.

En estudios realizados por diversos autores en coníferas se ha observado también un efecto distinto del O₃ dependiendo de la edad de las acículas, pero la tendencia fue diferente a la observada en nuestra experimentación: en *Picea abies* se observó una disminución de la concentración de clorofila en las acículas más maduras y una disminución no significativa en las más jóvenes (Wallin *et al.*, 1992) o bien aumento de la concentración de clorofila en las acículas del año en curso (Senser *et al.*, 1990); el aumento de la concentración de clorofila en las hojas más jóvenes y su disminución en las más viejas ha sido también observado en *Populus nigra* (Ballach *et al.*, 1992a). En *Pinus halepensis* se observó una disminución de la concentración de clorofila en las acículas de un año y no se observaron efectos en las acículas del año en curso (Elvira, 1995; Elvira *et al.*, 1998). Sin embargo, en general en esos trabajos las acículas de más edad estuvieron expuestas a una mayor dosificación acumulada de O₃, mientras que en nuestro caso las tres clases de edad recibieron la misma dosificación acumulada del contaminante. Se ha descrito una disminución de la conductancia estomática con la edad de las acículas (p.e., Zimmermann *et al.*, 1988; Wedler *et al.*, 1995) lo que podría explicar una mayor captación y efecto del contaminante en las acículas más jóvenes respecto a las más maduras. Otra posibilidad sería una interferencia del O₃ con el patrón normal de movilización y retranslocación de nutrientes desde las acículas de más edad a las de menor edad, tal y como ha sido sugerido por algunos autores (Lucas *et al.*, 1993). Sin embargo, esta hipótesis no parece plausible, ya que no se registraron cambios, como en el caso del SO₂, en la concentración de nutrientes debidos al efecto del O₃.

La concentración foliar de glutatión disminuyó por efecto del O₃ en octubre de 1997 en acículas del año en curso y del año anterior (Moliner *et al.*, datos no publicados), lo que indica la existencia de mecanismos de detoxificación de radicales libres generados por el contaminante. Otros autores han observado también alteraciones en el sistema de extinción de radicales libres de las células por efecto del O₃ (Weigel *et al.*, 1989a; Bermadinguer *et al.*, 1990; Elstner y Osswald, 1991; Lucas *et al.*, 1993; Elvira *et al.*, 1998). Sin embargo, aparentemente esos mecanismos no fueron suficientes para evitar el daño en la clorofila *b* en las acículas de 1997. La degradación preferente de la clorofila *b* observada por efecto del O₃ por algunos autores (Kühl y Wagner, 1970; Nobel, 1974) y el aumento consistente de la relación clorofila *a/b* implica un mayor ataque del O₃ a los sistemas de captación de luz, ya

que la clorofila *b* se localiza fundamentalmente en los pigmentos antena del LHC (*light-harvesting complex*, complejo captador de luz) periféricos asociados al PSII. En ese sentido, algunos autores han relacionado el efecto del O₃ con una degradación del PSII, como en el caso de exceso de luz (Godde y Buchhold, 1992).

No obstante, es difícil establecer si el O₃ produjo un daño fotooxidativo directo sobre la clorofila en las acículas de 1997. En nuestro trabajo no se observó un efecto del O₃ sobre la concentración de carotenoides y de hecho hubo una tendencia al aumento de la relación clorofila/carotenoides en esa clase de edad. Según Senser *et al.* (1987) los carotenoides (y fundamentalmente el β-caroteno) son los pigmentos más susceptibles al daño fotooxidativo, por lo que habría cabido esperar un aumento de la relación clorofila/carotenoides. Sin embargo, esos resultados se obtuvieron solamente a altas intensidades de luz y exposición a altos niveles de O₃ (del orden de 1000 ppb) y otros autores no han observado tampoco tal aumento con niveles de O₃ más realistas (Bermandinger *et al.*, 1990; Senser *et al.*, 1990; Lucas *et al.*, 1993; Elvira, 1995; Takemoto *et al.*, 1997)

Efectos del SO₂+O₃

Se observó un efecto de interacción entre el SO₂ y el O₃ en las acículas más jóvenes, de 1997, con un aumento proporcionalmente mayor en la concentración de pigmentos en el tratamiento con SO₂+O₃ que con el SO₂ sólo; además, el tratamiento con sólo O₃, como se ha mencionado, produjo el efecto opuesto al del SO₂ con una disminución de la concentración de pigmentos. En cualquier caso, las diferencias entre el control y el tratamiento con SO₂+O₃ no fueron cuantitativamente importantes, observándose como máximo un 16 % de aumento en la concentración de clorofila *a*.

Son relativamente escasas las referencias a trabajos acerca de la interacción del SO₂ y del O₃ sobre los pigmentos fotosintéticos. A pesar de que hipotéticamente la coexistencia de los dos contaminantes disminuye el umbral de daño para los contaminantes por separado, en estudios realizados con concentraciones bajas y realistas no se ha encontrado dicho efecto. Así, Siefermann-Harms (1990) no encontró efectos interactivos sobre la concentración de pigmentos, observando efectos similares en *Picea abies* fumigados con SO₂ y con SO₂+O₃. En el mismo experimento, Bermadinger *et al.* (1990) hallaron un efecto más bien antagónico de ambos contaminantes, donde el efecto de disminución de la concentración de clorofila por efecto del SO₂ fue menos pronunciado en presencia de SO₂+O₃. Ballach *et al.* (1992a) señalaron mayor reactividad del tratamiento de SO₂+O₃+NO_x que de los tratamientos por separado en la disminución de la concentración de pigmentos en las hojas más maduras y aumento en las más jóvenes.

Las interacciones observadas en nuestro estudio son difíciles de interpretar. Se descartan efectos mediados por una acumulación diferencial de nutrientes en la mezcla, ya que apenas se observaron efectos interactivos en ese aspecto (ver capítulo 4). Los resultados apuntan a una estimulación de la síntesis o disminución de la degradación de los pigmentos en las acículas más nuevas, al menos en los primeros meses de experimentación. Nuestros resultados coinciden con el aumento de la concentración de pigmentos registrado por (Wedler *et al.*, 1995) en el tratamiento de SO₂+O₃ respecto al control en *Picea abies* durante el primer año de experimentación.

Efecto de cámara

El efecto de la cámara sobre la concentración y composición de los pigmentos fotosintéticos se explica satisfactoriamente desde el punto de vista de la aclimatación de las plantas a mayores o menores intensidades de luz durante un período de tiempo suficientemente extenso (tratamiento fuera de las cámaras, AA, respecto al interior de éstas, ANF).

La concentración de clorofila a , b , $a+b$, carotenoides y la proporción clorofila/carotenoides fueron menores en el exterior de las cámaras respecto a su interior, mientras que la proporción clorofila a/b y la relación de absorbancias $A_{430/665}$ aumentaron fuera de las cámaras. Otros autores han encontrado resultados similares en experimentaciones con plantas de *Pinus halepensis* expuestas a niveles de PAR crecientes (Espelta, 1996) y debidos al efecto de las cámaras OTC (Peñuelas *et al.*, 1995), que los autores atribuyen a la atenuación de la radiación solar y de la velocidad del viento que se produce en el interior de las cámaras.

La disminución de la proporción clorofila a/b en hojas adaptadas a la sombra se ha interpretado como una respuesta adaptativa de las hojas encaminada a maximizar la capacidad de captación de luz de los cloroplastos (Alberte *et al.*, 1976; Chow *et al.*, 1991; Dale y Causton, 1992). Al parecer el PSII, con su LHC asociado compuesto mayoritariamente por clorofila b , carotenoides, clorofila a y proteínas asociadas, es el fotosistema que más importancia tiene en la aclimatación de las hojas a diferentes regímenes de luz (Chow *et al.*, 1991). Como la clorofila a se encuentra en todos los complejos pigmento-proteína del cloroplasto pero la clorofila b se sitúa fundamentalmente en el LHC asociado al PSII, el mayor desarrollo que experimenta el LHCII en condiciones de sombra explica la menor relación clorofila a/b y el aumento de la relación clorofila/carotenoides en esas condiciones (Lichtenthaler, 1987).

Además, es interesante señalar una tendencia a la mayor proporción clorofila/N en las plantas del interior de las cámaras respecto al AA, lo que coincide con los resultados obtenidos por Espelta (1996) en *Pinus halepensis* aclimatados a condiciones de menor PAR. La mayor proporción clorofila/N se ha interpretado como una distribución preferente de este nutriente a la formación de pigmentos que a enzimas fotosintéticos, maximizando por tanto la captación y absorción de luz frente a la fijación de CO_2 . En condiciones de mayor iluminación la distribución de N se dedicaría preferentemente a los enzimas implicados en la carboxilación, disminuyendo la proporción Clorofila/N (Seeman *et al.*, 1987; Evans, 1989; Ellsworth y Reich, 1992).