

## 6. EFECTOS DEL SO<sub>2</sub> Y DEL O<sub>3</sub> SOBRE LA INDUCCIÓN DE FLUORESCENCIA.

### 6.1. INTRODUCCIÓN

Una parte de la energía de la luz absorbida por la clorofila dentro de la hoja se utiliza en las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis. Otra parte se pierde bien como calor, o bien es re-emitida como fluorescencia. Al ser esos procesos competitivos, los cambios en las tasas fotosintéticas y en la emisión de calor disipativo van a causar cambios complementarios en la emisión de fluorescencia. A temperaturas fisiológicas, prácticamente toda la emisión de fluorescencia procede de las moléculas de clorofila a asociadas con el fotosistema II (PSII) (Baker y Horton, 1987), un importante componente del aparato fotosintético de las plantas. El PSII es el lugar donde se producen la fotólisis del agua y la reducción de los transportadores electrónicos fotosintéticos.

Más que los valores absolutos de emisión de fluorescencia, que dependen de una gran variedad de factores fisicoquímicos y metabólicos, son interesantes las relaciones entre ellos (Bolhar-Nordenkampf *et al.*, 1989). Gran parte de los estudios sobre emisión de luz fluorescente ( $F$ , medida en unidades relativas) se han centrado en la respuesta de ésta cuando la hoja es rápidamente iluminada, tras un período de adaptación a la oscuridad. La cinética de la respuesta se denomina “curva de Kautsky” (figura 6.1). Si la hoja es iluminada con luz actínica, se produce un inmediato aumento de la  $F$  hasta un nivel inicial o fluorescencia basal “ $F_0$ ”.  $F_0$  se produce cuando la gran mayoría de los centros de reacción del PSII están abiertos, es decir, cuando el aceptor primario  $Q_A$  está oxidado. Ante una iluminación suficientemente intensa, la emisión de fluorescencia aumenta hasta un determinado nivel máximo ( $F_m$ ). Ese aumento se produce en un tiempo  $t_m$  muy corto, del orden de milisegundos, y refleja un proceso en el que el *pool* de aceptores electrónicos primarios ( $Q_A$  y  $Q_B$ ) está completamente reducido. A partir de ese momento, comienza la fase lenta de la inducción de fluorescencia. Los electrones comienzan a fluir desde el aceptor primario  $Q_A$  hasta la plastoquinona. La extinción de la fluorescencia a partir de  $F_m$  (“*fluorescence quenching*”) está asociada a dos tipos de procesos, fotoquímicos, originados por la transformación de energía en los centros de reacción del PSII, y no fotoquímicos, que representan fundamentalmente la vía de desexcitación a través de la emisión de calor. La fluorescencia variable ( $F_v$ ) es la diferencia entre la fluorescencia máxima y la fluorescencia basal y está relacionada

con la capacidad del PSII para reducir  $Q_A$ .  $F_v$  es máxima cuando el aceptor primario  $Q_A$  está completamente reducido. El índice  $F_v/F_m$  es proporcional a la máxima eficiencia fotoquímica potencial del fotosistema II.

La medida de la emisión de fluorescencia en hojas intactas, además de ser una técnica rápida y no intrusiva, proporciona información sobre la actividad de la cadena de transporte electrónico desde el PSII y por tanto sobre la actividad fotoquímica del fotosistema II. Se ha demostrado que el índice  $F_v/F_m$  es proporcional al rendimiento cuántico de las reacciones fotoquímicas (Björkman y Demmig, 1987). Por ello, el índice se ha convertido en un importante parámetro, fácilmente medible, y representativo del estado fisiológico del aparato fotosintético de la hoja (Krause y Weis, 1991).

Típicamente, el índice  $F_v/F_m$  se halla entre 0.70 y 0.85 en plantas sanas bien hidratadas (Butler y Kitajima, 1975; Björman y Demmig, 1987). Cualquier proceso de estrés como altas o bajas temperaturas, sequía o exceso de luz se puede reflejar en una disminución de  $F_v/F_m$  (Öquist, 1987). Sin embargo, la disminución de la eficiencia fotoquímica y por tanto del índice puede deberse a dos procesos distintos, entre los que a menudo es difícil distinguir: procesos de *down-regulation* o regulación de la actividad del PSII, que tendría un papel de protección ante el exceso de luminosidad, y el daño sobre centros de reacción del PSII. El primer proceso es reversible y produce una disminución de  $F_m$  y  $F_0$  (Epron *et al.*, 1992). El segundo produce un aumento de  $F_0$  (Osmond *et al.*, 1993). Ambos procesos tienen incidencia en la capacidad fotosintética (Björman, 1986; Baker y Horton, 1987).

Un ejemplo del primer proceso mencionado parece ser la disminución del índice  $F_v/F_m$  registrada a mediodía en especies esclerófilas mediterráneas por diversos autores (Faria *et al.*, 1996; Scarascia-Mugnozza *et al.*, 1996; García-Plazaola *et al.*, 1997). Hay un creciente consenso respecto a un posible papel de fotoprotección de la disminución de  $F_v/F_m$  a mediodía en ese tipo de especies. Las causas de la depresión de la fotosíntesis neta a mediodía en especies esclerófilas incluso en ausencia de un déficit hídrico significativo, no se conocen bien, pero parecen involucrar mecanismos regulatorios a niveles estomáticos y de cloroplasto (Tenhunen *et al.*, 1987; Lange, 1988). El descenso de conductancia estomática restringe severamente la difusión de gases, entre ellos el  $CO_2$ . Debido a que la fijación de  $CO_2$  es el principal destino de la energía de la radiación solar los cloroplastos pueden estar sujetos a un exceso de luz a mediodía resultando en procesos de aclimatación que resultan en una disminución de la fotosíntesis (Faria *et al.*, 1996). Este proceso de regulación, con disminución del índice  $F_v/F_m$ , está

energía mediado por el ciclo de las xantofilas (Demmig-Adams y Adams, 1990; Frank *et al.*, 1994) y a otros procesos que se detallan más adelante. Estos fenómenos no son exclusivos del exceso de luz, y otros autores han extendido este modelo de disipación no radiante del exceso de energía de la luz a una variedad de condiciones ecológicas (Bilger y Björman, 1994).

Como se discute más adelante, los contaminantes atmosféricos pueden reducir las tasas fotosintéticas. La monitorización simultánea de éstas y de cambios de los parámetros de la inducción de fluorescencia pueden ayudar a establecer si el efecto de los contaminantes se produce por daños directos sobre el PSII, por interacción sobre la regulación estomática, o mediante otro tipo de mecanismos.

Por otra parte, en general se han encontrado efectos poco importantes del SO<sub>2</sub> en concentraciones bajas sobre la eficiencia fotoquímica del PSII (Van Kooten *et al.*, 1988; Tausz *et al.*, 1996) y mayores ante concentraciones de SO<sub>2</sub> altas (Brecht y Schulz, 1988). Los efectos del O<sub>3</sub>, a concentraciones realistas, tampoco han sido importantes: ligera disminución de  $F_v/F_m$  (Farage, 1996; Kellomaky y Wang, 1997), lo que parece apuntar a un efecto de esos contaminantes atmosféricos sobre la fotosíntesis vía estomática u otros mecanismos, descartándose un efecto directo sobre el PSII.

Finalmente, siempre que un estrés ambiental limita el metabolismo del carbono, ocurre un incremento potencial de sobreexcitación del aparato fotosintético (Long *et al.*, 1994), debido a un desequilibrio entre la entrada de energía y su utilización, con los consiguientes cambios en la fotoquímica del PSII, por lo que cualquier tipo de estrés puede inducir modificaciones. En ese sentido, trabajos de Scarascia-Mugnozza *et al.* (1996) con *Quercus ilex* confirmaron que el estrés hídrico es la limitación ambiental más importante a la hora de causar descenso de la actividad fotosintética. La disminución de la disponibilidad hídrica del sustrato aumenta el estrés hídrico de las plantas en condiciones estivales, por lo que conocer su efecto sobre los parámetros de emisión de la fluorescencia es importante en clima mediterráneo, con severas restricciones durante buena parte del año. El índice  $F_v/F_m$  ha mostrado sensibilidad a situaciones de sequía en estudios de otros autores con especies mediterráneas (Scarascia-Mugnozza *et al.*, 1996; Faria *et al.*, 1996; Manetas *et al.*, 1997; Fleck *et al.*, 1998).

Los objetivos del capítulo son, por una parte, establecer si existe un efecto directo de los contaminantes sobre la funcionalidad del PSII y estudiar si las plantas muestran un comportamiento paralelo en las tasas fotosintéticas y en la eficiencia

fotoquímica del PSII, aunque este último aspecto se discute en el capítulo 7. Por otra, analizar la evolución estacional y diaria de la inducción de fluorescencia e identificar el efecto de la disminución de la disponibilidad hídrica en el sustrato en la capacidad fotoquímica del PSII. Por último, establecer los cambios en dicha capacidad que son debidos al efecto de la cámara en sí.

## 6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

La emisión de fluorescencia se midió a lo largo del experimento en varios días de primavera (27/05/96), verano (27/08/96, 03/09/96, 11/09/96) y otoño (04/12/96) de 1996 y en primavera (27/05/97), verano (18/07/97) y otoño (27/10/97) de 1997. En lo posible se hicieron coincidir los días de la medida de fluorescencia con la de intercambio gaseoso (días 27/05/96, 27/08/96, 03/09/96, 11/09/96 y 27/05/97). Asimismo se llevó a cabo una medida en invierno antes del inicio del experimento (06/02/96), en un total de 84 pinos a media mañana, para conocer las características de la emisión de la fluorescencia en la población de partida. Se efectuaron medidas de emisión de fluorescencia a lo largo de cada día de muestreo en primavera de 1996 y 1997 y en verano y otoño de 1996, estudiando la evolución diaria de sus parámetros característicos a intervalos de 2 a 3 horas. En verano y otoño de 1997 las medidas se hicieron alrededor de las 12 h.

Las medidas se realizaron en acículas *in vivo* con el equipo portátil “Plant Efficiency Analyser” (PEA) de Hansatech Instruments Ltd., UK. El área de la hoja era iluminada con un pico de emisión de 650 nm de longitud de onda por los 6 LEDs (diodos emisores de luz roja) montados en el soporte cilíndrico del sensor del PEA, de unos 4 mm de diámetro. El tiempo de adaptación a la oscuridad fue como mínimo de 30 minutos. El equipo proporcionó la medida de la emisión máxima de fluorescencia ( $F_m$ ), fluorescencia basal ( $F_0$ ), índice  $F_v/F_m$  (calculado como  $(F_m - F_0)/F_m$ ), y tiempo en el que se alcanza la fluorescencia máxima ( $t_m$ ).

Para las medidas se tomaron de 2 a 3 individuos de cada cámara (8 a 9 por tratamiento, con las excepciones que se detallan más adelante), de entre los que no se sometían a muestreos destructivos de pigmentos ni nutrientes. Los resultados de los 2 a 3 individuos de cada cámara o parcela ambiente se promediaron con lo que al existir tres cámaras por tratamiento, el tamaño de muestra fue  $n=3$ . La medida se realizó sobre la parte media de una pareja de acículas originadas en el año anterior a la medida (acículas de 1995 en los muestreos de 1996, acículas de 1996 en los de 1997), sin síntomas visibles de daño. En diciembre de 1996 se realizaron medidas simultáneas en acículas de 1995 y de 1996, sin encontrar diferencias significativas debidas a la edad de las acículas (resultados no mostrados).

Las medidas se efectuaron en el exterior de las cámaras, después de un período de aclimatación a las condiciones exteriores, manteniendo siempre el

sustrato bien regado, salvo en el experimento de estrés hídrico llevado a cabo en verano de 1996.

En verano de 1996, se sometió a un subgrupo 1 a 2 pinos de cada cámara (con 5 pinos por tratamiento) a un régimen de riegos de baja frecuencia e intensidad durante 15 días, consiguiendo valores de contenido volumétrico de agua en el suelo por debajo del 10 %. El resto de los árboles de cada tratamiento (1 árbol por cámara, 3 de cada tratamiento) se irrigó en abundancia durante esos días, manteniendo la humedad del suelo por encima del 20 %. La medida de este parámetro, contenido de agua en el suelo, se detalla en el capítulo 2.2 (*Medida de parámetros climáticos*). Las fechas de muestreo de este subexperimento con estrés hídrico fueron: 03/09/96 y 11/09/96.

El tratamiento estadístico consistió en un análisis de la varianza de dos factores ( $\text{SO}_2$  y  $\text{O}_3$  o bien  $\text{SO}_2$  y riego) con interacción para determinar el efecto del  $\text{SO}_2$ , el  $\text{O}_3$ , el riego y su posible interacción en cada fecha y hora de muestreo. En el caso de observarse una interacción significativa entre los 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  $\text{SO}_2$  con el AF, el AA con el ANF), se empleó el test de la t-Student. En las fechas en las que se realizaron ciclos diarios de medida se realizó un test ANOVA con medidas repetidas a lo largo del día. En los resultados que se presentan a continuación se señalan las diferencias significativas para  $p < 0.05$  y para  $p < 0.10$ .

## 6.3. RESULTADOS

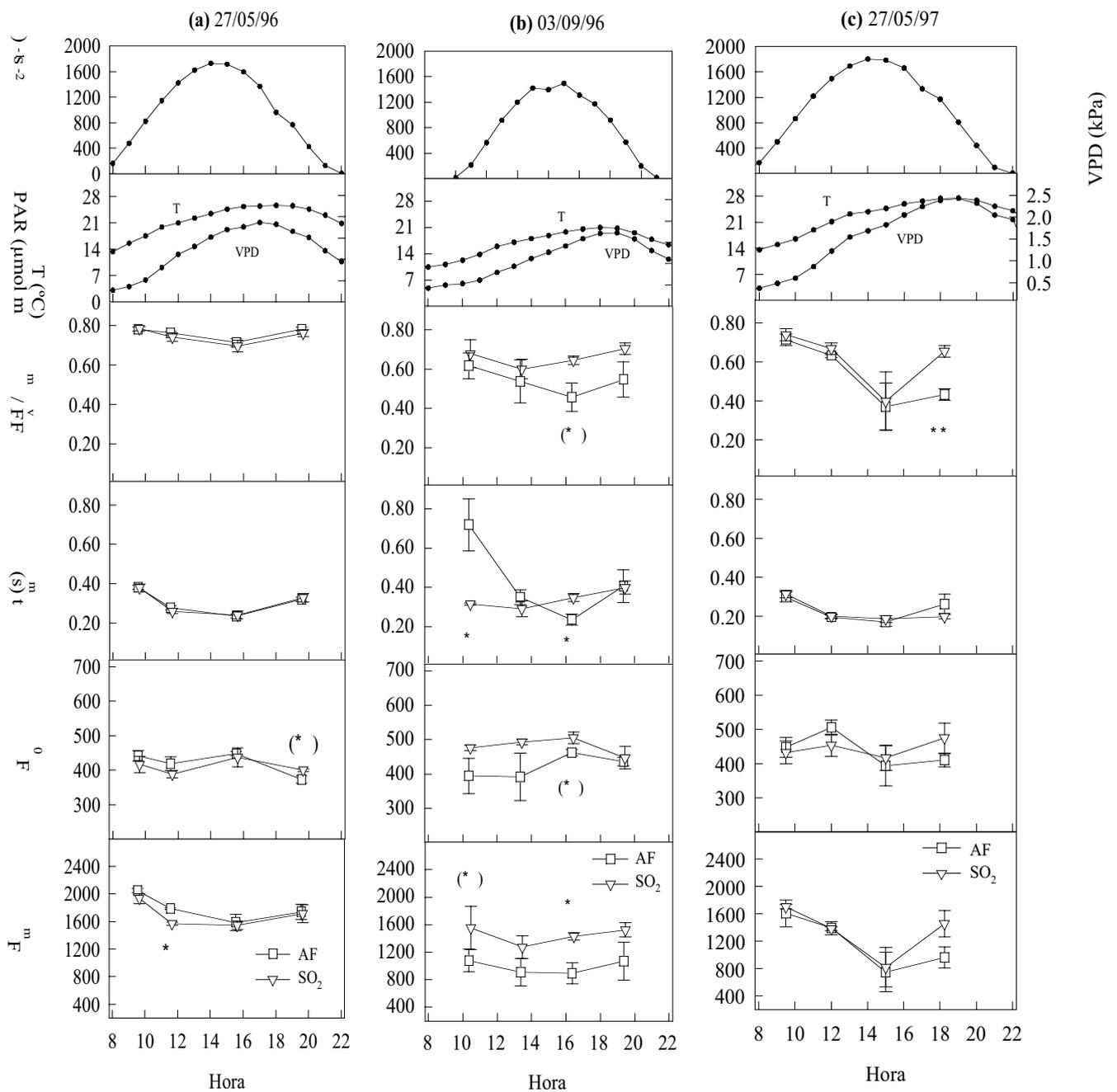
### Variaciones estacionales y diarias

En la tabla 6.1 se presentan los resultados de la medida de la máxima eficiencia fotoquímica potencial tras adaptación a oscuridad (índice  $F_v/F_m$ ), máximos y mínimos diarios, para diversos muestreos a lo largo de los dos años de experimentación. Se han omitido los días de verano poco característicos de la época estival. Todos los valores máximos diarios estuvieron por encima de 0.7, excepto en verano de 1996. La diferencia entre los valores máximos y mínimos diarios de  $F_v/F_m$  fue mayor en verano de 1996 y primavera de 1997 que en el resto de los muestreos.

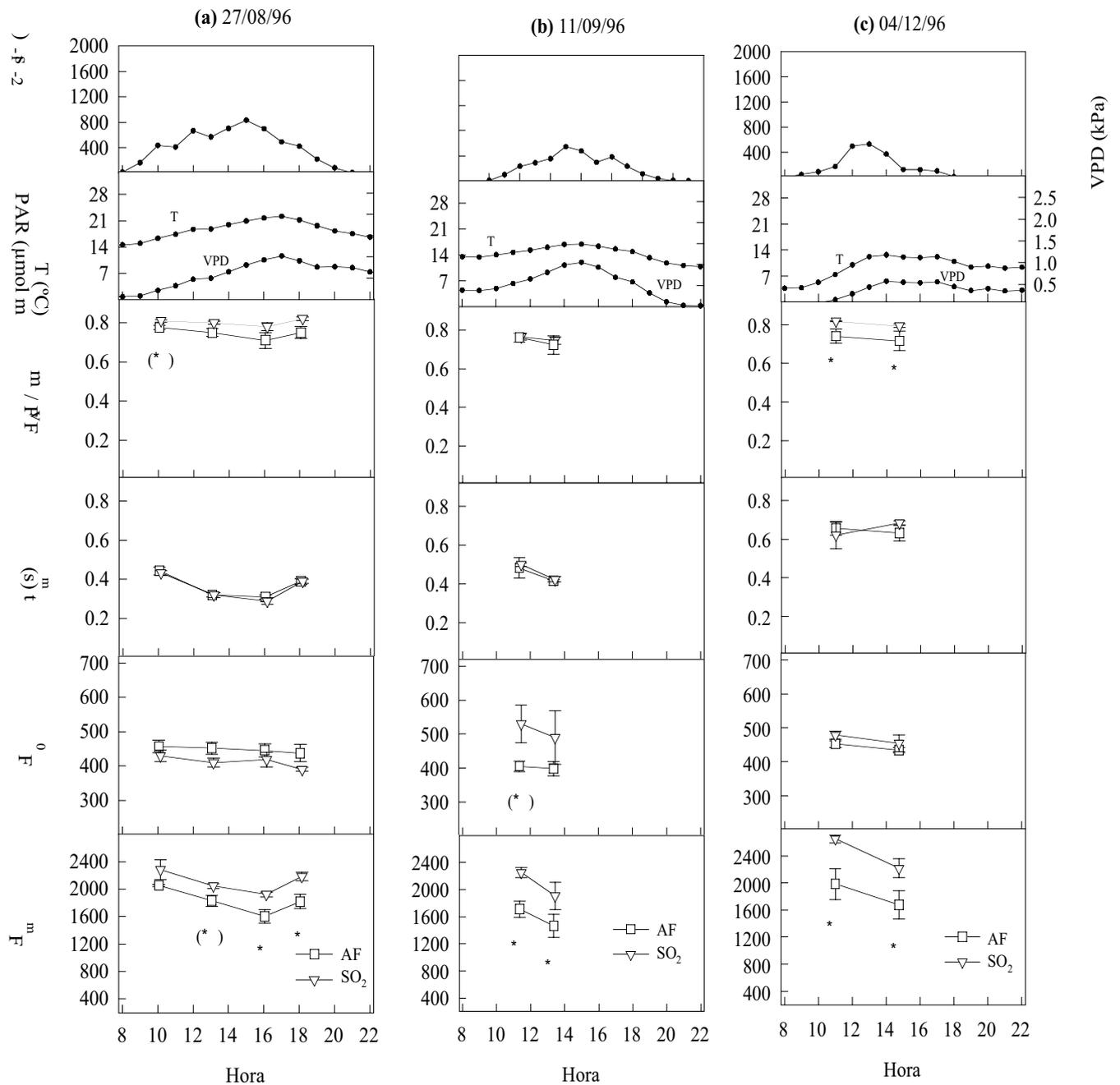
**Tabla 6.1.** Valores máximos y mínimos diarios del índice  $F_v/F_m$  en diversas épocas del año. Se presenta el promedio±error estándar del tratamiento de control (AF) en acículas de 1 año de edad (acículas de 1995 en 1996 y de 1996 en 1997) de individuos bien irrigados.

		Invierno	Primavera	Verano	Otoño
		06/02/96	27/05/96	03/09/96	04/12/96
1996	Máx.	0.74±0.01	0.78±0.01	0.62±0.07	0.74±0.04
	Mín.	-	0.72±0.02	0.46±0.07	0.72±0.05
			27/05/97	18/07/97	27/10/97
1997	Máx.	-	0.71±0.03	0.75±0.01	0.79±0.01
	Mín.	-	0.37±0.12	-	-

Las variaciones diarias de algunos de los parámetros de la cinética de fluorescencia  $F_v/F_m$ ,  $t_m$ ,  $F_0$  y  $F_m$  así como las condiciones climáticas para cada fecha de muestreo se representan en las figuras 6.2 (para días con elevada radiación solar) y 6.3 (días con baja radiación solar). En todos los días de medida los valores de  $F_v/F_m$  fueron máximos en la primera y última horas de medida, disminuyendo en las horas centrales del día, coincidiendo con los máximos valores de radiación fotosintéticamente activa (PAR) y de temperatura del aire. Por tanto, el índice  $F_v/F_m$  mostró un ciclo diario con un máximo a primera hora de la mañana, una disminución a mediodía y una posterior recuperación (parcial en algunos muestreos) por la tarde.



**Figura 6.2.** Ciclo diario de parámetros característicos de la emisión de fluorescencia, medidos en días soleados de primavera (1996 y 1997) y verano de 1996. Cada símbolo representa el promedio y el error estándar para plantas que reciben el mismo tratamiento. Se muestran también la evolución de la radiación fotosintéticamente activa (PAR), temperatura y demanda evaporativa del aire (VPD) durante esos días. Los asteriscos indican diferencias significativas entre AF y SO<sub>2</sub> para (\*) p<0.10, \* p<0.05 y \*\* p<0.01.



**Figura 6.3.** Ciclo diario de parámetros característicos de la emisión de fluorescencia, medidos en días de poca radiación fotosintéticamente activa (PAR) en verano y otoño de 1996. Cada símbolo representa el promedio y el error estándar para plantas que reciben el mismo tratamiento. Se muestran también la evolución de la radiación fotosintéticamente activa (PAR), temperatura y demanda evaporativa del aire (VPD) durante esos días. Los asteriscos indican diferencias significativas entre AF y SO<sub>2</sub> para (\*) p<0.10, \* p<0.05.

tarde contrasta con la ausencia de recuperación de las tasas fotosintéticas (figura 7.9). No se encontró por tanto una buena relación entre la emisión de fluorescencia y las tasas fotosintéticas. Por otra parte, después de experimentar reducciones importantes en días de características estivales, los máximos diarios recuperaron valores por encima de 0.7 en otoño y primavera (figura 6.2b-c respecto a figura 6.2a y 6.3a-c; tabla 6.1).

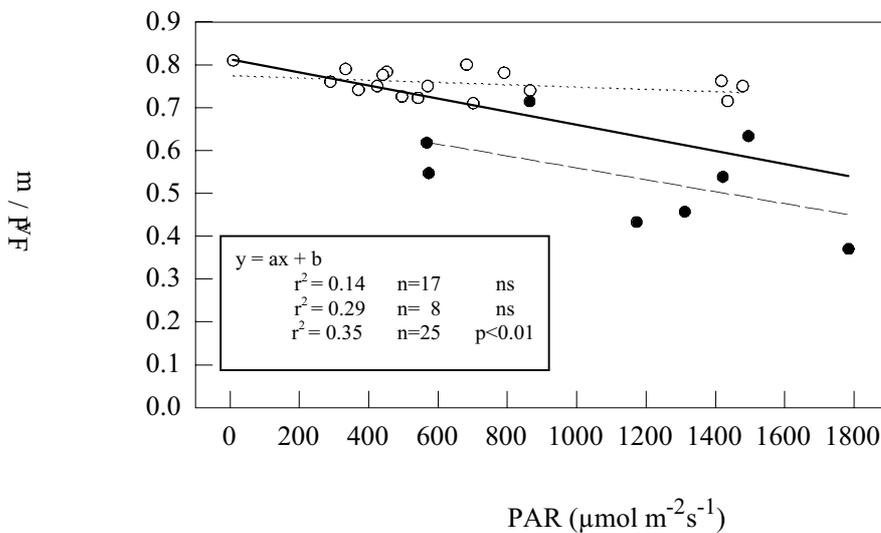
La disminución de  $F_v/F_m$  a mediodía fue más acusada cuanto mayor fue la radiación solar alcanzada a lo largo del día, aunque también tuvo importancia la época del año. Por ejemplo, en verano de 1996 se observó una disminución más acusada de  $F_v/F_m$  respecto a primavera de ese mismo año, a pesar de registrarse menores valores máximos de PAR (figura 6.2b respecto a 6.2a). Por otra parte, también se observaron cambios de  $F_v/F_m$  a lo largo de días con baja PAR en días nublados de otoño y verano, ante pequeñas variaciones de PAR (figura 6.3). La significación estadística del factor “hora del día” se presenta en la tabla 6.2.

**Tabla 6.2** . Resultados del análisis de la varianza del efecto del  $SO_2$  y de la hora de muestreo sobre parámetros de la emisión de fluorescencia. Se indican las probabilidades p. Las probabilidades menores de 0.05 se han señalado con negrita, las  $p < 0.10$  con paréntesis. Las tres primeras columnas numéricas hacen referencia a las fechas representadas en la figura 6.2, las tres últimas a la figura 6.3.

Parámetro	Fuente de variación	Fecha					
		27/05/96	03/09/96	27/05/97	27/08/96	11/09/96	04/12/96
$F_v/F_m$	$SO_2$	0.465	0.294	0.175	(0.095)	0.646	<b>0.015</b>
	Hora	<b>0.002</b>	(0.079)	<b>0.006</b>	<b>0.006</b>	<b>0.014</b>	0.163
	$SO_2$ x hora	0.882	0.209	0.490	0.429	0.478	0.563
$t_m$	$SO_2$	0.985	0.234	0.700	0.440	0.313	0.203
	Hora	<b>0.000</b>	(0.073)	<b>0.007</b>	<b>0.000</b>	0.166	<b>0.006</b>
	$SO_2$ x hora	0.664	<b>0.036</b>	0.355	0.606	0.491	0.772
$F_0$	$SO_2$	0.397	0.274	0.844	0.200	0.294	0.671
	Hora	<b>0.029</b>	0.518	0.230	<b>0.016</b>	0.356	0.139
	$SO_2$ x hora	0.373	0.329	0.560	0.449	0.397	0.664
$F_m$	$SO_2$	0.267	0.131	0.176	<b>0.038</b>	(0.081)	<b>0.004</b>
	Hora	<b>0.000</b>	0.577	<b>0.026</b>	<b>0.000</b>	(0.058)	<b>0.012</b>
	$SO_2$ x hora	0.510	0.994	0.749	0.537	0.333	0.590

La relación entre el índice  $F_v/F_m$  y la radiación solar se muestra en la figura 6.4. La disminución de  $F_v/F_m$  estuvo en efecto relacionada con el aumento de PAR, aunque se registraron valores del índice excepcionalmente bajos correspondientes a dos días de medida: en primavera de 1997, con un alto valor de PAR, y en verano de 1996, con un valor de PAR moderado a alto. Los datos se han agrupado en dos

clases, los pertenecientes a esos dos días de medida (círculos llenos,  $r^2 = 0.29$ ) y los resultados del resto de los días de medida (círculos vacíos,  $r^2 = 0.14$ ). Aunque los coeficientes de determinación de las regresiones fueron bajos, en el caso del conjunto de los datos ( $n=25$ ) el coeficiente fue significativo ( $p < 0.01$ ).



**Figura 6.4.**  
Relación entre

la radiación solar fotosintéticamente activa y la eficiencia fotoquímica del PSII. Las rectas de regresión corresponden a dos días de medida de características estivales ( $n=8$ , círculos llenos), al resto de los días de medida ( $n=17$ , círculos vacíos) y al conjunto de los días ( $n=25$ ). Aunque los coeficientes de las regresiones fueron bajos, en el caso del conjunto de los datos el coeficiente fue significativo ( $p < 0.01$ ).

Las variaciones de  $F_v/F_m$  a lo largo del día se debieron fundamentalmente a los cambios en la fluorescencia máxima ( $F_m$ ). La  $F_m$  presentó, como el índice  $F_v/F_m$ , valores máximos por la mañana y mínimos a mediodía, con una recuperación por la tarde. La fluorescencia basal ( $F_0$ ) experimentó, como es lógico, menos cambios diarios que la  $F_m$  y siguió patrones de variación diferentes en función del día de medida: se mantuvo constante e incluso bajó a lo largo de días con baja radiación luminosa, aumentó a mediodía en un día típico de verano y aumentó para después disminuir en un día de primavera. Los cambios diarios de  $t_m$  (tiempo en que se

significación estadística del factor “hora del día” se presenta en la tabla 6.2.

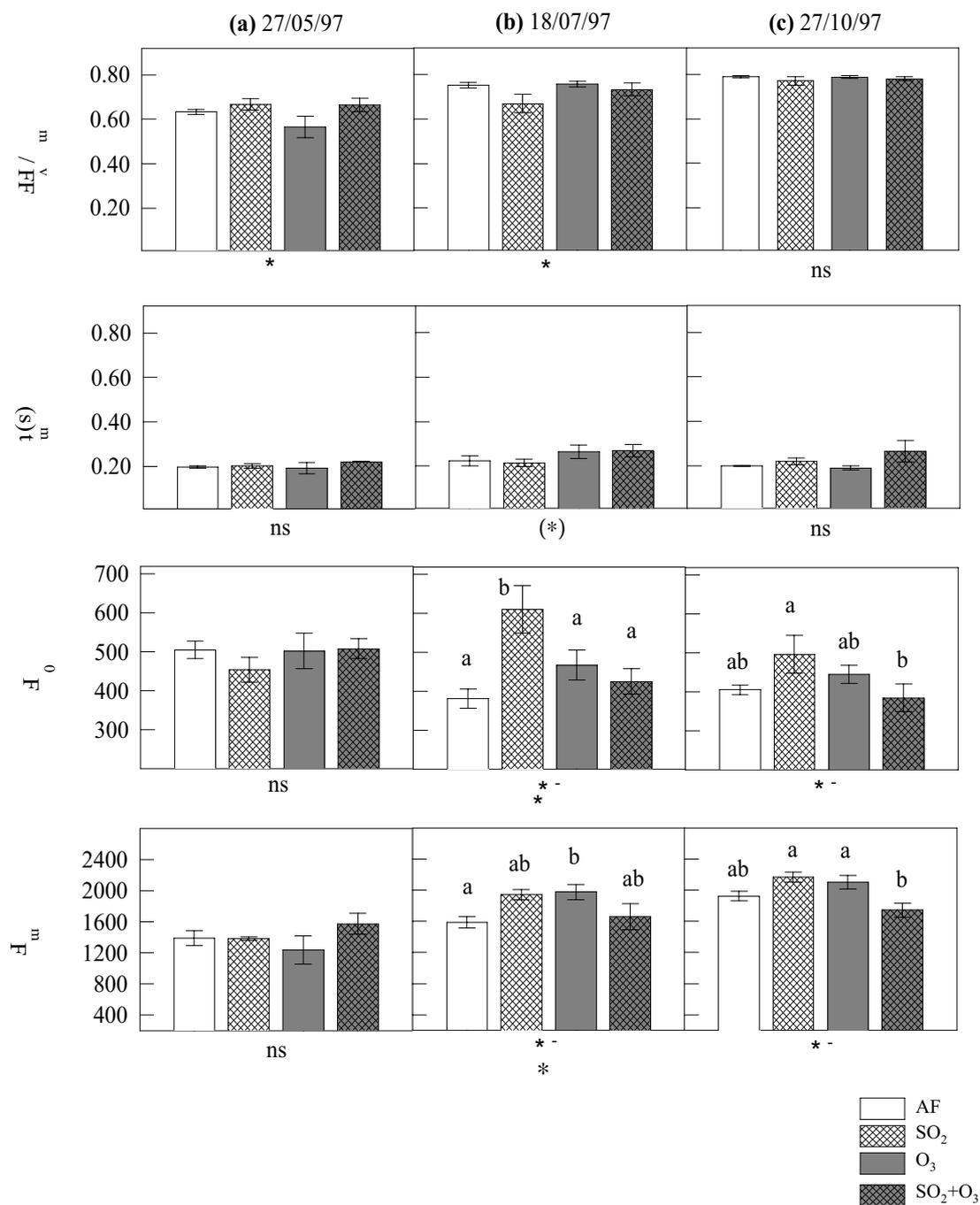
### **Efectos del SO<sub>2</sub>**

En el tratamiento con SO<sub>2</sub> respecto al tratamiento de aire filtrado, el índice  $F_v/F_m$  tuvo una tendencia a aumentar en la mayoría de los muestreos realizados en 1996. Las máximas diferencias entre ambos tratamientos se registraron cuando las condiciones climáticas fueron más limitantes para la fotosíntesis, en verano (figura 6.2b; exceso de radiación luminosa asociada a altas temperaturas y baja humedad relativa del aire) y en otoño tardío (figura 6.3c; fundamentalmente temperaturas y PAR bajos). En primavera de 1996, después de tres meses de tratamiento con SO<sub>2</sub>, la tendencia fue, sin embargo, opuesta a la mencionada: los valores de  $F_v/F_m$  tuvieron tendencia a encontrarse por debajo de los presentados por el aire filtrado, aunque no de manera significativa (figura 6.2a)

En las medidas de 1997 las diferencias en  $F_v/F_m$  dependientes del tratamiento mostraron variaciones en función de la fecha de muestreo: en primavera el índice  $F_v/F_m$  tuvo una tendencia a situarse por encima en el tratamiento con SO<sub>2</sub> respecto al AF (las diferencias fueron significativas por la tarde, figura 6.2c). Sin embargo en verano  $F_v/F_m$  fue significativamente inferior en los tratamientos con SO<sub>2</sub> (figura 6.5b). En otoño no se observaron diferencias significativas debidas al SO<sub>2</sub> (figura 6.5c).

A lo largo del experimento, excepto en el primer muestreo, se observó un aumento consistente de  $F_m$  en respuesta al tratamiento con SO<sub>2</sub> (figuras 6.2, 6.3 y 6.5). En la mayor parte de los muestreos, el aumento de  $F_m$  dependiente de SO<sub>2</sub> estuvo asociado a una tendencia a presentar mayores valores de  $F_0$  en ese tratamiento, aunque tal efecto no siempre fue significativo. El incremento de  $F_0$  bajo el efecto del SO<sub>2</sub> fue particularmente importante en julio de 1997 (figura 6.5b).

La disminución de  $F_m$  fue responsable del aumento de  $F_v/F_m$  debido al tratamiento con SO<sub>2</sub>. En cambio, en julio de 1997 el gran aumento de  $F_0$  en el



**Figura 6.5.** Parámetros característicos de la emisión de fluorescencia, medidos alrededor de las 12 h en diversos días. A esa hora, los valores de radiación fotosintéticamente activa (PAR) fueron de 1495, 1478 y 330  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  en mayo, julio y octubre, respectivamente. Se representa el promedio y el error estándar para plantas que reciben el mismo tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas debidas al  $SO_2$  (\*),  $O_3$  (\*) y a la interacción del  $SO_2 + O_3$  (\*) para (\*) $p < 0.10$  y \* $p < 0.05$ . ns=no significativo.

tratamiento con  $\text{SO}_2$  fue el que determinó la disminución de  $F_v/F_m$  en ese tratamiento. El tiempo en alcanzar la máxima emisión de fluorescencia ( $t_m$ ) no se vio afectado por el tratamiento con  $\text{SO}_2$ , salvo el día de verano 03/09/96, en que a primera hora de la mañana  $t_m$  disminuyó por efecto del  $\text{SO}_2$  (figura 6.2b). La significación estadística del factor “ $\text{SO}_2$ ” se muestra en las tablas 6.2 y 6.3 así como en la figura 6.5.

### **Efectos del $\text{O}_3$ y del $\text{SO}_2+\text{O}_3$**

Los efectos del ozono y de la mezcla  $\text{SO}_2+\text{O}_3$  se muestran en la figura 6.5. El ozono no afectó en ninguno de los muestreos a la relación  $F_v/F_m$ . En primavera y otoño de 1997 tampoco afectó al resto de los parámetros de fluorescencia estudiados  $t_m$ ,  $F_0$  y  $F_m$ . Solamente en verano de 1997 se observó un aumento de  $F_m$  y un ligero incremento de  $t_m$  por efecto del ozono.

Tampoco se observaron efectos interactivos significativos de la mezcla de contaminantes sobre el índice  $F_v/F_m$ , indicando que los efectos de ambos fueron aditivos. Pero se observaron interacciones negativas sobre otros parámetros, de manera que en julio de 1997 el aumento de  $F_0$  producido por el  $\text{SO}_2$  se vio neutralizado por la copresencia del  $\text{O}_3$ . La fluorescencia máxima también indicó interacciones negativas de los dos contaminantes en ese muestreo. En otoño de 1997 se observó la misma tendencia: en el tratamiento de  $\text{SO}_2+\text{O}_3$  disminuyó  $F_0$  y  $F_m$  respecto a la presencia de sólo el  $\text{SO}_2$ . En ninguno de los casos resultó significativamente diferente, sin embargo, el tratamiento  $\text{SO}_2+\text{O}_3$  respecto al de aire filtrado. La significación estadística de tales efectos se muestra en la figura 6.5.

### **Efecto de la humedad del sustrato**

En verano de 1996 las medidas de fluorescencia se realizaron en dos subgrupos: uno de ellos con contenido hídrico del sustrato por encima del 20 %. Otro subgrupo mantenido durante varios días con contenido hídrico del sustrato por debajo del 10 % (ver capítulo 6.2). Los resultados de los dos días de medida se muestran en la figura 6.6. Al no observarse interacciones entre el tratamiento con contaminantes y el contenido hídrico del sustrato (ver tabla 6.3), se han representado los promedios y el error estándar de cada tratamiento de humedad, independientemente del tratamiento de  $\text{SO}_2$ .

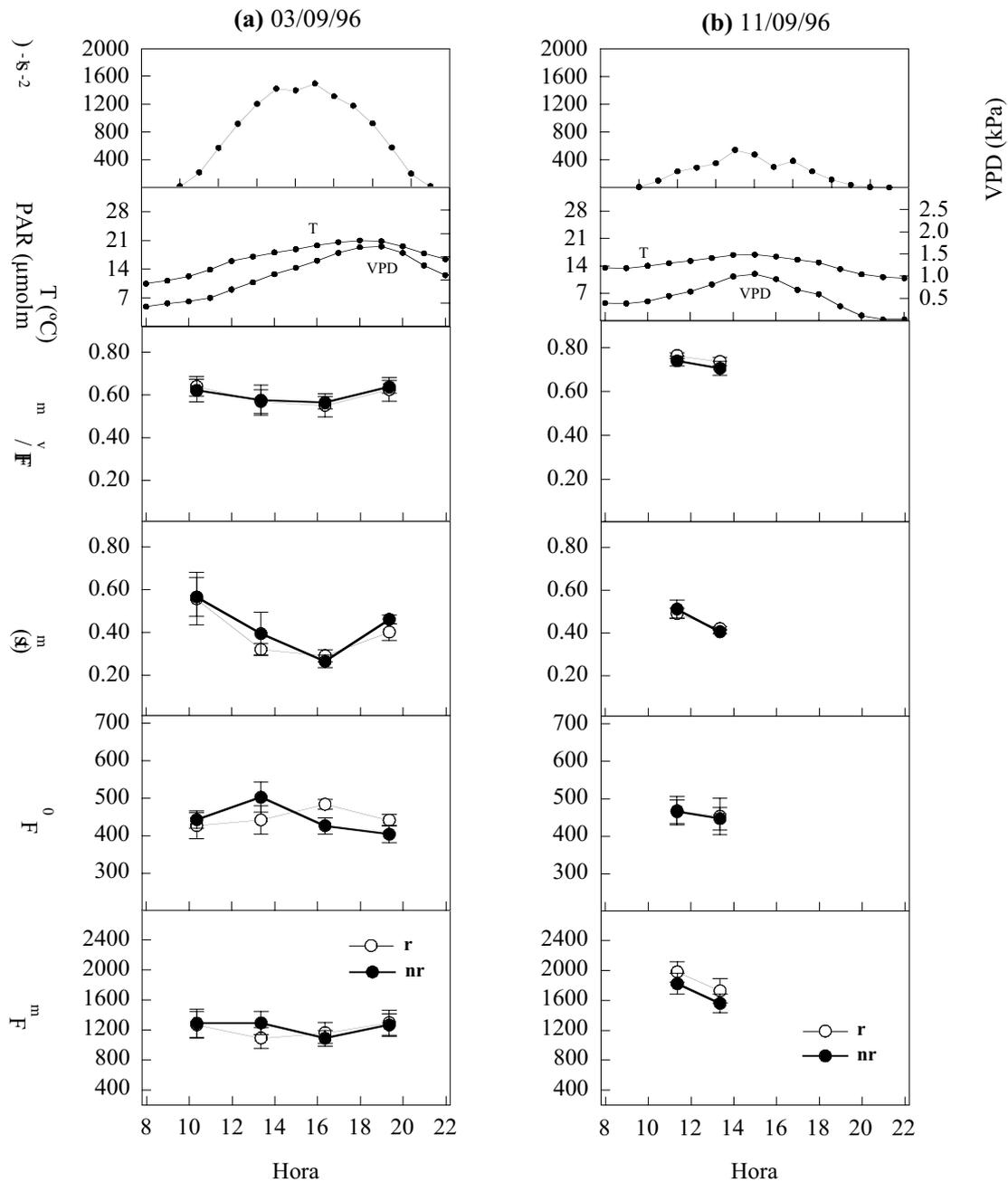
**Tabla 6.3.** Resultados del análisis de la varianza del efecto del SO<sub>2</sub>, el riego y la hora de muestreo sobre parámetros de la emisión de fluorescencia. Se indican las probabilidades p. Las probabilidades menores de 0.05 se han señalado con negrita, las p<0.10 con paréntesis. Los resultados hacen referencia a las fechas representadas en la figura 6.6.

Parámetro	Fuente de variación	Fecha	
		03/09/96	11/09/96
<b>F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub></b>	SO <sub>2</sub>	0.227	0.333
	Riego	0.889	0.509
	Hora	0.101	<b>0.002</b>
	SO <sub>2</sub> x riego	0.453	0.641
	resto de interacciones	ns	ns
<b>t<sub>m</sub></b>	SO <sub>2</sub>	(0.077)	0.196
	Riego	0.538	0.648
	Hora	<b>0.000</b>	<b>0.027</b>
	SO <sub>2</sub> x riego	0.580	0.801
	resto de interacciones	ns	ns
<b>F<sub>0</sub></b>	SO <sub>2</sub>	0.102	0.175
	Riego	0.929	0.974
	Hora	0.241	(0.076)
	SO <sub>2</sub> x riego	0.809	0.576
	resto de interacciones	ns	ns
<b>F<sub>m</sub></b>	SO <sub>2</sub>	(0.070)	<b>0.009</b>
	Riego	0.970	0.421
	Hora	0.206	<b>0.001</b>
	SO <sub>2</sub> x riego	0.566	0.742
	resto de interacciones	ns	ns

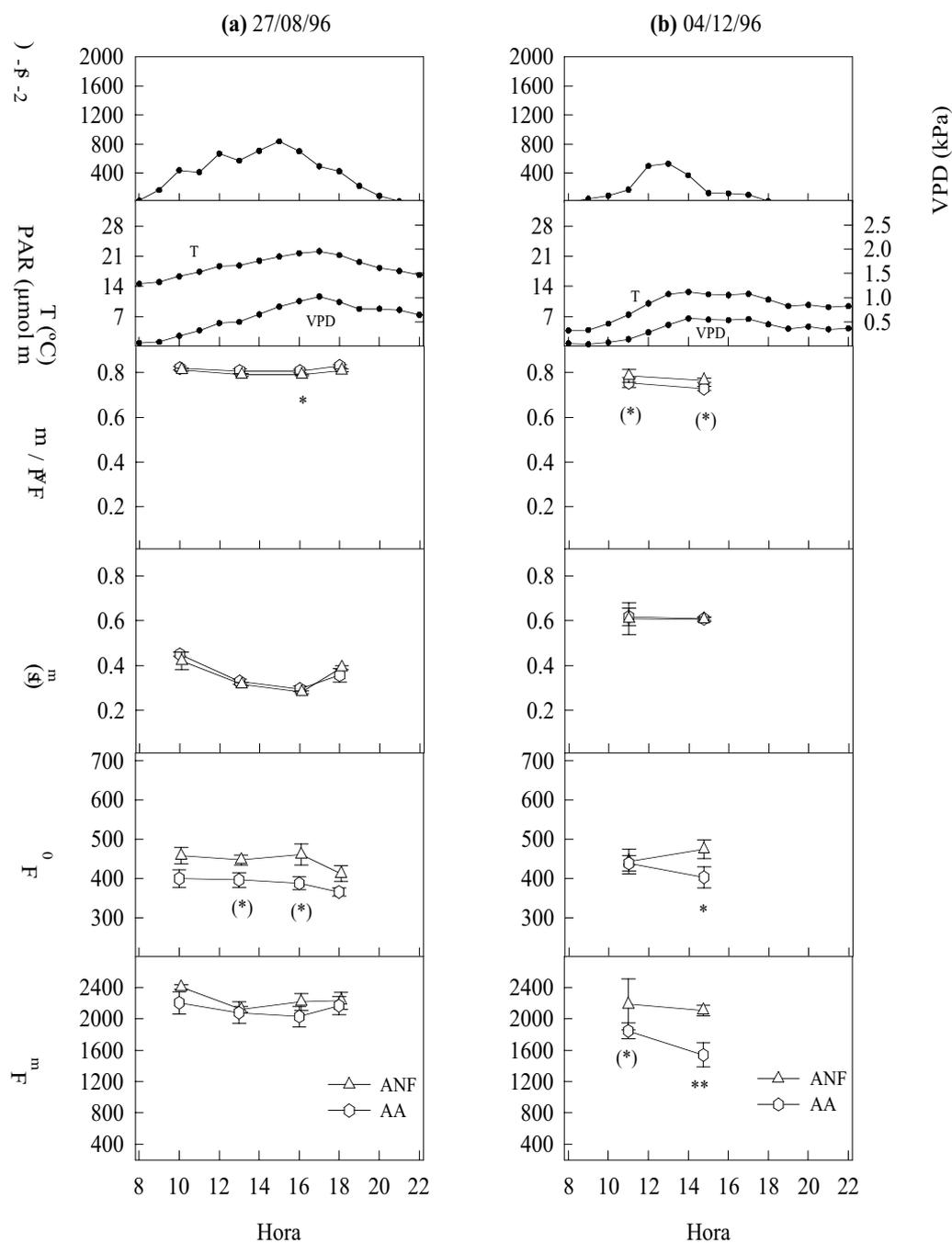
No se observaron diferencias significativas debidas al contenido hídrico del sustrato, aunque en el segundo día de muestreo, cuando la humedad del sustrato disminuyó hasta el 6 %, se observó una tendencia a la disminución de F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> y F<sub>m</sub> en ese tratamiento respecto al tratamiento bien irrigado.

### Efecto de cámara

El efecto de la inclusión de las plantas en las cámaras sobre la emisión de fluorescencia, una vez sacadas éstas al aire libre (ver en el capítulo 6.2 una descripción del protocolo seguido en las medidas) se muestra en la figura 6.7. Se han



**Figura 6.6.** Efecto de la humedad del sustrato en la evolución diaria de parámetros característicos de la emisión de fluorescencia, medidos en dos días de verano. Cada símbolo representa el promedio y el error estándar para plantas que reciben el mismo tratamiento. Se muestran también la evolución de la radiación fotosintéticamente activa (PAR), temperatura y demanda evaporativa del aire (VPD) durante esos días. No se observaron diferencias significativas debidas al efecto de la humedad del sustrato. **r**, individuos bien irrigados; **nr**, individuos con riego limitado.



**Figura 6.7.** Efecto de la cámara en la evolución diaria de parámetros característicos de la emisión de fluorescencia, medidos en dos días. Cada símbolo representa el promedio y el error estándar para plantas que reciben el mismo tratamiento. Se muestran también la evolución de la radiación fotosintéticamente activa (PAR), temperatura y demanda evaporativa del aire (VPD) durante esos días. Las diferencias significativas debidas al efecto de la cámara se señalan con asteriscos. (\*) $p < 0.10$ , \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ .

tendencia de los valores de  $F_m$  y  $F_0$  fue similar, como respuesta de la inclusión de las plantas en las cámaras, pero resultaron en diferentes tendencias en cuanto al índice  $F_v/F_m$ . El día 27/08/96 en el tratamiento de “aire no filtrado” (ANF) aumentó  $F_0$  ( $p < 0.10$ ) y tendió a aumentar  $F_m$ , aunque no significativamente respecto al tratamiento de “aire ambiente” (AA). Como resultado de esas variaciones,  $F_v/F_m$  tuvo en ese tratamiento tendencia a situarse por debajo del AA. Durante el día 04/12/96,  $F_0$  fue menor (sólo significativo a mediodía) en ANF que en AA y  $F_m$  fue significativamente menor en AA que en ANF. Sin embargo, el resultado fue que el índice  $F_v/F_m$  fue mayor en ANF respecto a AA. La significación estadística del efecto de cámara se muestra en la tabla 6.4.

**Tabla 6.4** . Resultados del análisis de la varianza del efecto de cámara y de la hora de muestreo sobre parámetros de la emisión de fluorescencia. Se indican las probabilidades  $p$ . Las probabilidades menores de 0.05 se han señalado con negrita, las  $p < 0.10$  con paréntesis. Las dos primeras columnas numéricas hacen referencia a las fechas representadas en la figura 6.7. El resto de las fechas no se ha representado gráficamente.

Parámetro	Fuente de variación	Fecha					
		27/08/96	04/12/96	27/05/96	03/09/96	27/05/97	11/09/96
$F_v/F_m$	Cámara	0.110	<b>0.037</b>	0.487	0.299	0.060	0.182
	Hora	<b>0.000</b>	0.218	<b>0.000</b>	0.151	0.000	0.533
	cámara x hora	0.436	0.597	0.352	0.526	0.147	0.634
$t_m$	Cámara	0.895	0.276	0.548	0.116	0.314	(0.009)
	Hora	<b>0.000</b>	<b>0.010</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.000	0.236
	cámara x hora	0.314	0.555	0.155	0.462	0.419	0.623
$F_0$	Cámara	(0.079)	0.125	<b>0.045</b>	0.389	0.544	0.131
	Hora	<b>0.007</b>	0.764	<b>0.025</b>	0.316	(0.078)	0.391
	cámara x hora	0.574	<b>0.015</b>	0.145	0.526	<b>0.003</b>	0.468
$F_m$	Cámara	0.413	<b>0.004</b>	0.215	<b>0.705</b>	(0.072)	0.403
	Hora	<b>0.022</b>	0.454	<b>0.000</b>	<b>0.272</b>	<b>0.000</b>	0.457
	cámara x hora	0.448	0.223	0.255	<b>0.626</b>	0.443	0.523

## 6.4. DISCUSIÓN

Se obtuvieron valores máximos diarios de eficiencia fotoquímica potencial del PSII (índice  $F_v/F_m$  tras adaptación de las hojas a oscuridad) por encima de 0.7, dentro de lo esperable en plantas sanas bien hidratadas (Butler y Kitajima, 1975; Björkman y Demmig, 1987). Sin embargo, se registraron valores máximos por debajo de 0.7 en verano de 1996. Una disminución de la relación  $F_v/F_m$  indica un menor rendimiento de las reacciones fotoquímicas del PSII implicando, bien un posible daño en el aparato fotosintético, o bien un proceso de regulación o aclimatación (“*down-regulation*”), como se ha apuntado en trabajos con otras especies en condiciones naturales (Demmig-Adams *et al.*, 1989; Adams y Demmig-Adams, 1995).

A lo largo del día, el índice  $F_v/F_m$  experimentó cambios, con una disminución a mediodía asociada al incremento de radiación luminosa y aumento de temperatura. Los cambios más notables se registraron en primavera tardía y en verano. En especies mediterráneas, diversos autores han encontrado también una disminución de  $F_v/F_m$  a mediodía (Faria *et al.*, 1996, 1997, 1998; Scarascia-Mugnozza *et al.*, 1996; García-Plazaola *et al.*, 1997; Manetas *et al.*, 1997). Se recuperaron posteriormente valores normales para plantas sanas, indicando que la disfunción en el aparato fotosintético fue temporal y reversible. Por tanto, los resultados apuntan más bien a una aclimatación que a un daño fotoinhibitorio. Esta interpretación se ve apoyada por el hecho de que la disminución de  $F_v/F_m$ , tanto a mediodía como estacionalmente, es el resultado básicamente de la disminución de  $F_m$ . La reducción de  $F_v/F_m$  puede estar relacionada con dos procesos diferentes: bien con un incremento en la disipación térmica del exceso de energía luminosa captada por los cloroplastos, bien con daños en los centros de reacción del PSII, o bien con ambos procesos (Demmig-Adams, 1990). El primer proceso reduce  $F_m$  y  $F_0$  (Epron *et al.*, 1992), mientras que el segundo resultaría en un incremento de  $F_0$  (Osmond *et al.*, 1993). Se ha encontrado el mismo resultado en otras especies mediterráneas, donde la disminución del índice se produjo debido a una disminución de  $F_m$  (Scarascia-Mugnozza *et al.*, 1996; Faria *et al.*, 1998).

Existe un acuerdo generalizado en la interpretación de la disminución de la eficiencia fotoquímica a mediodía como un mecanismo de fotoprotección de las plantas. Cuando la energía luminosa captada por los pigmentos antena excede el

excitación con efectos potencialmente dañinos (Biehler y Fock, 1996). En el clima mediterráneo esta situación se produce con frecuencia en verano, cuando coexisten altos niveles de radiación y temperaturas con una disminución de la disponibilidad hídrica (Castell, Terradas y Tenhunen, 1994). Como respuesta al incremento en la demanda evaporativa del aire, las plantas mediterráneas mantienen un estricto control estomático del intercambio gaseoso, y así de la entrada de CO<sub>2</sub> (Lange *et al.*, 1987a; Tenhunen *et al.*, 1990). La reducción de la concentración del CO<sub>2</sub> intercelular a mediodía como resultado del cierre estomático disminuye la carboxilación como destino de la energía y el poder reductor generados en la fase luminosa de la fotosíntesis. Como se discute a continuación, hay un suficiente acúmulo de pruebas de que las plantas poseen mecanismos disipativos de protección del aparato fotosintético ante el exceso de energía.

Uno de los mecanismos de desexcitación térmica del exceso de energía absorbida parece estar mediado por el ciclo diario de las xantofilas, concretamente por la de-epoxidación de la violaxantina, vía acidificación del lumen tilacoidal, y formación de zeaxantina (Demmig-Adams y Adams, 1990; Frank *et al.*, 1994). Otros mecanismos, menos contrastados que el anterior, apuntan a un papel de la fotorrespiración contra el daño inducido por la luz, mediante el mantenimiento de unas tasas altas de transporte electrónico cíclico o acíclico (Cornic *et al.*, 1989; Epron *et al.*, 1993). Finalmente, se han observado fluctuaciones estacionales de los sistemas antioxidantes en las hojas en *Quercus suber* y *Pinus halepensis* en clima mediterráneo, lo que se interpreta también como un mecanismo de fotoprotección (Faria *et al.*, 1996; Elvira *et al.*, 1998). En consonancia con los resultados obtenidos por dichos autores, en nuestro experimento y en otro experimento posterior con la misma especie, se detectaron un aumento proporcional de la concentración foliar de violaxantina en verano y cambios estacionales en la concentración foliar de dos componentes del sistema antioxidante de las hojas, el ascorbato y el glutatión (Moliner *et al.*, datos no publicados).

La relación entre la disminución de  $F_v/F_m$  y el incremento de PAR corrobora, por otra parte, la influencia que la intensidad luminosa a la que están sometidas las plantas tiene sobre la emisión de fluorescencia (Demmig-Adams y Adams, 1992a). Ahora bien, no sólo el PAR fue importante a la hora de determinar cambios en el índice, sino que los bajos valores alcanzados en verano de 1996, incluso con valores de PAR por debajo de los registrados en primavera de ese mismo año, indican la existencia de un comportamiento estacional, posiblemente dependiente de una regulación endógena. La importancia de los ritmos circadianos ha sido señalada por varios autores en lo que respecta a otros aspectos de la fotosíntesis como el intercambio gaseoso y la conductancia estomática (Faria *et al.*, 1996, 1998).

### **Efectos del SO<sub>2</sub>**

En relación con los efectos del SO<sub>2</sub>, nuestros resultados muestran que en plantas tratadas con el contaminante también ocurrió una regulación reversible de la actividad del PSII a mediodía en la mayor parte de los muestreos. Sin embargo, sorprendentemente, la regulación fue menor que en el tratamiento con aire filtrado (AF), de modo que el índice  $F_v/F_m$  resultó mayor en el tratamiento con SO<sub>2</sub> que en el AF. Los resultados contrastan con los obtenidos por otros autores en diversas especies de coníferas: en un experimento con 60 ppb de SO<sub>2</sub> durante tres meses, Tausz *et al.*, (1996) no encontraron efectos del contaminante. Tampoco en nuestros experimentos previos de invernadero (Barrantes *et al.* 1994) encontramos diferencias significativas en  $F_v/F_m$  en *Pinus halepensis* después de un año de tratamiento con 40 ppb de SO<sub>2</sub>. Sin embargo, Van Hove *et al* (1992) sí observaron disminuciones de las máximas tasas de transporte electrónico después de tres meses de tratamiento con unas 36 ppb de SO<sub>2</sub>. Con concentraciones altas de SO<sub>2</sub> (305 ppb) tras sólo 21 días de tratamiento, Brecht y Schulz (1988) detectaron disminución de la eficiencia fotosintética del transporte electrónico. En todo caso, en las referencias citadas se apunta bien a una ausencia de efectos, bien a una disminución del rendimiento de las reacciones fotoquímicas de las plantas tratadas.

Nuestros resultados sugieren varias hipótesis, relacionadas con una posible capacidad de desactivación térmica diferente en el tratamiento de SO<sub>2</sub> respecto al control, o con un posible papel de productos del metabolismo del SO<sub>2</sub> en el uso no asimilatorio del exceso de energía:

1.- Cuando la disminución de  $F_v/F_m$  está asociada a una disminución de  $F_m$  y  $F_0$ , como es el caso del tratamiento AF respecto al de SO<sub>2</sub>, suele ir acompañado de un aumento de la extinción de la fluorescencia no fotoquímica (*NPQ*, *non-photochemical quenching*; Faria *et al.*, 1996, 1998; García Plazaola *et al.*, 1997), y éste normalmente implica un incremento en la desactivación térmica por la vía del ciclo de las xantofilas (Demmig-Adams y Adams, 1990). Es decir, las plantas tratadas con SO<sub>2</sub> tendrían menor capacidad de poner en marcha este mecanismo de fotoprotección, o sea de inactivación mediante los carotenoides del exceso de energía que se produce cuando la fotosíntesis no es capaz de utilizar toda la energía captada por los pigmentos antena. Algunos autores han sugerido que los contaminantes atmosféricos pueden obstaculizar la operación de mecanismos de fotoprotección, reduciendo la capacidad de disipación térmica del exceso de energía absorbida por

observaron daños importantes sobre los pigmentos fotosintéticos en el tratamiento con SO<sub>2</sub> (ver capítulo 5), como cabría esperar ante fallos mantenidos en los sistemas de fotoprotección (por ejemplo, Elvira *et al.* (1998) encontraron fotodestrucción de clorofilas cuando el estrés oxidativo excedió la capacidad destoxificadora de la planta), lo que nos conduce a la hipótesis alternativa de que las plantas tratadas con SO<sub>2</sub> podrían poseer mecanismos efectivos de disipación del exceso de energía alternativos a la desexcitación térmica.

2.- Uno de los mecanismos podría estar asociado a un sistema antioxidante estimulado bajo tratamiento con SO<sub>2</sub>. El exceso de energía, como otros tipos de estrés como el hídrico y el exceso de temperatura, está relacionados con el estrés oxidativo (Eickmeier *et al.*, 1992) a través de la generación de especies de oxígeno reactivas, que pueden llegar a producir peroxidación de lípidos, deterioro de membranas (Smirnoff, 1993) y degradación de pigmentos y proteínas (Elstner y Osswald, 1991). La destoxificación de las especies de moléculas activas de oxígeno se lleva a cabo por un sistema de antioxidantes en la hoja, como el ascorbato y el glutatión (Polle y Rennenberg, 1994). Resultados obtenidos en nuestro experimento y en un experimento posterior acerca de la concentración foliar de antioxidantes (Moliner *et al.*, datos no publicados) apuntan a un incremento de la concentración de glutatión y una disminución de la concentración de ascorbato por efecto del SO<sub>2</sub>, apoyando la hipótesis mencionada.

3.- Otra posibilidad sería que moléculas intermediarias del metabolismo de destoxificación del SO<sub>2</sub> pudieran actuar como aceptores del poder reductor y el ATP generados en las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis actuando, por tanto, como sustrato disponible (en lugar del CO<sub>2</sub>) para consumir el exceso de energía. Vías alternativas al transporte electrónico asimilatorio pueden suministrar un importante sumidero o destino de los electrones cuando existen factores estresantes que disminuyen la asimilación del CO<sub>2</sub> y restringen la tasa de asimilación del NADPH (Polle, 1996).

En efecto, el metabolismo de destoxificación del SO<sub>2</sub> (y de sus productos de hidratación, fundamentalmente HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> y SO<sub>3</sub><sup>=</sup>) incluye la oxidación a sulfatos (esta vía se discute en el capítulo 4) y la reducción a H<sub>2</sub>S y compuestos orgánicos azufrados. La reducción del sulfito y bisulfito compite en las condiciones normales de la fotosíntesis con el CO<sub>2</sub> por los electrones. Si la presión de electrones en la cadena de transporte electrónico es elevada, la reducción del (bi)sulfito sobrepasa a la oxidación a sulfato (Ghisi *et al.*, 1990).

La reducción del SO<sub>2</sub> conduce a la formación de H<sub>2</sub>S y compuestos orgánicos azufrados como los aminoácidos cisteína y metionina. La formación de H<sub>2</sub>S se ha verificado por el registro de emisiones en plantas sometidas a SO<sub>2</sub> (Hällgren *et al.*, 1982) y esta vía se ha sugerido como una posible vía metabólica de detoxificación del SO<sub>2</sub> en presencia de luz (Sekiya *et al.*, 1982). La formación de aminoácidos está fundamentalmente destinada a la síntesis de proteínas. Sin embargo, la síntesis proteica requiere un crecimiento neto de la planta. Las coníferas están especializadas en reducir carbono, con una inversión mucho menor de materia y energía en proteína, lo que puede producir un exceso de aminoácidos. Se ha demostrado en plantas de tabaco que el exceso de cisteína se transporta a la vacuola de las células, donde se vuelve a degradar a sulfato (Smith, 1981). Esa vía metabólica resultaría por tanto en un consumo espúreo de ATP y poder reductor.

En el presente estudio, el aumento de  $F_v/F_m$  en el tratamiento con SO<sub>2</sub> respecto al AF no fue paralelo a un incremento de la fijación de CO<sub>2</sub>, por tanto no fue indicativo de un mejor estado del aparato fotosintético. Contrariamente, la absorción de CO<sub>2</sub> estuvo limitada en el tratamiento de SO<sub>2</sub>, debido fundamentalmente a una limitación estomática, como se discute en el capítulo 7, pudiendo incrementar la presión de excitación sobre el PSII.

En conjunto, los resultados apoyan la hipótesis de un posible papel de productos intermediarios del metabolismo del SO<sub>2</sub> como protectores contra el daño producido por un exceso de luz, quizá conjuntamente con un sistema antioxidante de la hoja estimulado por el contaminante. Ante esas condiciones, disminuiría la necesidad de una regulación del PSII, lo que explicaría una menor disminución de  $F_v/F_m$  respecto al tratamiento de aire filtrado. Sin embargo, esta vía consumiría energía y poder reductor sin incremento de fijación de CO<sub>2</sub>.

Por otra parte, en consonancia con los resultados obtenidos por otros autores (Van Kooten *et al.*, 1988; Adams *et al.*, 1989; Van Hove *et al.*, 1992), sí parece claro descartar un posible daño directo del SO<sub>2</sub> sobre el PSII. Solamente con altas concentraciones de SO<sub>2</sub>, del orden de partes por millón (ppm), y en cloroplastos aislados se observó un efecto directo sobre el PSII (Shimazaky *et al.*, 1984; Beauregard, 1991; Veeranjanyulu *et al.*, 1991). Únicamente cabe señalar en nuestros resultados el efecto del SO<sub>2</sub> sobre el fuerte aumento de  $F_0$  en julio de 1997. El aumento de  $F_0$  está asociado con el daño en centros de reacción (Osmond *et al.*, 1993). Sin embargo, esos efectos dejaron de observarse en el otoño siguiente, por lo que no parecen haber ocurrido daños importantes o irreversibles.

### **Efectos del O<sub>3</sub>**

El ozono no afectó al índice  $F_v/F_m$  en ninguno de los muestreos realizados. Estos resultados corroboran los estudios de otros autores con diversas especies de coníferas y condiciones de experimentación. En estudios llevados a cabo durante uno o dos períodos de crecimiento, en los que se trataron plantas con ozono en el entorno de las concentraciones empleadas en nuestro experimento (entre 50 y 100 ppb, promedios diarios), solamente se encontraron cambios poco importantes en la eficiencia fotoquímica del PSII (Barnes *et al.*, 1995, con *Picea abies* en experimentación con fitotrón; Elvira, 1996, con *Pinus halepensis* en OTCs; Meinander *et al.*, 1996, con *Pinus sylvestris* en OTCs; Takemoto *et al.*, 1997, con *Pinus ponderosa* en OTCs). Kellomaky y Wang (1997) encontraron una disminución de la máxima tasa de transporte electrónico ( $J_{max}$ ) en *Pinus sylvestris*, pero los autores reconocen que la inconsistencia de sus resultados con los de otros autores se debe a que el valor de  $J_{max}$  estimado a partir de resultados de intercambio gaseoso realmente representa la capacidad potencial para la regeneración de la RuBP, por lo tanto depende de un complejo sistema donde toda la cadena de transporte electrónico, y no sólo la del PSII, está implicada.

Se han encontrado disminuciones en la eficiencia fotoquímica del PSII por efecto del ozono en otro grupo de especies frondosas como *Populus nigra* (Reichenhauer *et al.*, 1997) y *Fagus sylvatica*, asociadas a una senescencia de las hojas incrementada por el efecto del contaminante (Zeuthen *et al.*, 1997) o bien por una acción conjunta del ozono y el exceso de luz (Mikkelsen, 1995). El último autor sugiere que las coníferas son menos sensibles que las especies de frondosas, estando la sensibilidad correlacionada con la toma del contaminante.

En cualquier caso, en ninguno de los estudios anteriores las disminuciones halladas en la asimilación de CO<sub>2</sub> por efecto del O<sub>3</sub> fueron explicables por una disfunción de la fotoquímica del PSII.

### **Efectos del SO<sub>2</sub>+O<sub>3</sub>**

No se observaron efectos interactivos del SO<sub>2</sub> y del O<sub>3</sub> sobre la eficiencia fotoquímica del PSII. Ahora bien, se registraron efectos de interacción negativa entre ambos contaminantes sobre la respuesta de  $F_0$  y  $F_m$  en verano y otoño de 1997, lo que conduce a la idea de que la reactividad del SO<sub>2</sub> y sus mecanismos de acción sobre el transporte electrónico del PSII difieren de aquellos de los productos de reacción del SO<sub>2</sub>+O<sub>3</sub> con los componentes celulares. Como hemos relacionado una disminución del

índice  $F_v/F_m$  con un posible papel del  $SO_2$  como aceptor de electrones, los resultados indican quizá que bajo presencia de  $O_3$  la vía de reducción del  $SO_2$  como metabolismo de destoxificación perdería importancia.

### **Efectos de la humedad del sustrato**

Por otra parte, el efecto de la disponibilidad hídrica de las plantas sobre la máxima capacidad fotoquímica del PSII ha sido demostrado por diversos autores. En plantas de *Pinus pinea* que recibieron riego adicional y que presentaron mayor contenido hídrico relativo (RWC) de las hojas, Manetas *et al.* (1997) observaron un aumento del índice  $F_v/F_m$  respecto a las plantas que sólo recibieron la precipitación atmosférica. Faria *et al.* (1997) registraron en *Quercus ilex* menores valores del índice a mediodía en plantas con estrés hídrico que en plantas sin estrés hídrico. Del mismo modo, Scarascia-Mugnozza *et al.* (1996) encontraron una disminución de  $F_v/F_m$  en plantas de *Quercus ilex* con el incremento del estrés hídrico.

Sin embargo, en nuestros resultados no se observaron efectos de la disminución de la humedad del sustrato en el índice  $F_v/F_m$ , a pesar de haberse observado unas menores tasas de asimilación neta de  $CO_2$  (A) por efecto de la disminución de la disponibilidad hídrica. Solamente durante el segundo día de medida, con una disminución de A de hasta un 77 % en el tratamiento con menor disponibilidad hídrica se observó una cierta tendencia a la disminución de  $F_v/F_m$ . Por tanto, se puede concluir que en nuestras condiciones experimentales no se alcanzó un grado suficiente de estrés hídrico como para desencadenar una respuesta en la capacidad fotoquímica del PSII, aunque sí de las tasas fotosintéticas. Esta interpretación se ve apoyada por el hecho de que las tasas de fotosíntesis neta disminuyen exponencialmente con el incremento de estrés hídrico, mientras que el índice  $F_v/F_m$  disminuye linealmente (Scarascia-Mugnozza *et al.*, 1996), de lo que se deduce que la A es más sensible al estrés hídrico que el índice  $F_v/F_m$ , al menos en la parte no lineal de la curva de respuesta de A al estrés. Ello puede explicar también la ausencia de efectos del aumento de disponibilidad hídrica sobre el índice  $F_v/F_m$  en plantas de rebrote de *Quercus ilex* tras el fuego, a pesar de un aumento del RWC (Fleck *et al.*, 1998). Esos autores lo explican porque, según Méthy *et al.* (1996),  $F_v/F_m$  solamente se vio afectado en *Quercus ilex* cuando el potencial hídrico de la hoja antes del alba (PWP) fue inferior a -4MPa, un valor observado con escasa frecuencia en árboles en condiciones naturales.

parte a mecanismos estomáticos y por otra por la actividad de los cloroplastos (regulación de la actividad fotoquímica del PSII, regeneración o actividad de la Rubisco, o bien ambos procesos). Pero en nuestro experimento la fotosíntesis no parece estar limitada por la regulación del PSII sino más bien parece ser que la baja conductancia estomática es el proceso que principalmente limita la fotosíntesis, iniciando una regulación de la actividad carboxilativa y desencadenando los procesos de disipación de energía.

### **Efecto de cámara**

Los resultados de este apartado hacen referencia, como se ha comentado, no al efecto de cámara en sí, sino a la respuesta de las plantas que, adaptadas a las condiciones del interior de las OTCs, se exponen durante varios días a las condiciones del exterior de éstas.

Como en nuestro caso, Meinander *et al.* (1996) observaron diferencias en los resultados de fluorescencia en las plantas crecidas dentro y fuera de las OTCs, que atribuyeron a variaciones microclimáticas (velocidad del viento, humedad y temperatura). Zeuthen *et al.* (1997), encontraron efectos positivos de la cámara en consonancia con una menor intensidad luminosa en verano y con una menor velocidad del viento en otoño dentro de las OTCs respecto al exterior.

Las plantas que están en continuo dentro de las OTCs están aclimatadas a condiciones de menor radiación luminosa y temperaturas máximas mayores durante todo el año. Al ser expuestas en verano durante varios días a otras condiciones climáticas (mayor luminosidad y menor temperatura) las plantas respondieron por una parte con menor desactivación térmica de la energía excedente (aumento de  $F_m$  y  $F_0$ ). Por otra parte, se observó un aumento proporcionalmente mayor de  $F_0$ . Ambos fenómenos fueron promovidos probablemente por el aumento en el exceso de luz respecto a las condiciones del interior de las cámaras. Como resultado, se observó un rendimiento fotoquímico menor de ANF. Sin embargo, en otoño tardío ambos procesos tuvieron una importancia relativa diferente. De nuevo se produjo una desactivación térmica menor en el ANF, pero no hubo un incremento añadido de  $F_0$  en ANF. Como resultado,  $F_v/F_m$  estuvo por encima del AA.