

Trabajo de Fin de Grado [G1021425].  
Grado en Biología. Facultad de Biología.  
Universidade de Santiago de Compostela.



# Variabilidad Interpoblacional en el Nivel de Inactivación de la Fotosíntesis por Estrés Térmico en *Arbutus unedo* L.



**Curso 2014 - 2015**  
Alicia LÓPEZ BRUZOS

## 1. ÍNDICE

1. ÍNDICE.....	2
2. RESUMEN .....	3
3. INTRODUCCIÓN .....	4
4. OBJETIVOS .....	6
5. METODOLOGÍA .....	7
5.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	7
5.2. Toma de medidas. ....	7
5.3. Rendimiento fotoquímico .....	7
5.4. Propiedades espectrales .....	8
5.5. Estrés térmico.....	8
5.6. Análisis estadístico .....	9
6. RESULTADOS Y DISCUSSION .....	10
6.1. Rendimiento fotoquímico .....	10
6.2. Propiedades espectrales .....	11
7. CONCLUSIONES.....	14
8. BIBLIOGRAFÍA.....	15
9. ANEXOS .....	18
9.1. Tablas:.....	18
9.2. Figuras:.....	18

## 2. RESUMEN

**Antecedentes y Objetivos.** Algunas plantas están expuestas a una combinación de condiciones medioambientales estresantes, como las altas temperaturas en verano. La distribución del madroño (*Arbutus unedo* L.) es predominantemente mediterránea, sin embargo, también se encuentra en la fachada atlántica europea llegando a latitudes irlandesas. En este trabajo se presenta un perfil de respuesta de la inactivación de la fotosíntesis de *A. unedo* para inferir la capacidad adaptativa de esta especie a unas futuras condiciones más calurosas.

**Métodos.** Se analizó el rendimiento fotosintético y las propiedades espectrales de hojas de *A. unedo* de diversas procedencias sometidas a diferentes grados de estrés térmico.

**Resultados Clave y Conclusiones.** El perfil de respuesta fisiológica a los efectos de la temperatura muestra un claro efector inactivador de la temperatura sobre el fotosistema II pero también la existencia de un efecto protector asociado al estrés térmico. La variabilidad en el nivel de inactivación de la fotosíntesis de las diferentes procedencias analizadas en respuesta a un estrés térmico es muy baja. Estudios previos sobre otras características ecofisiológicas de esta especie también mostraron poca variabilidad por lo que se trata de una especie con una estructura genética homogénea.

### 3. INTRODUCCIÓN

El **madroño** (*Arbutus unedo* L.) es un pequeño árbol leñoso de hoja perenne perteneciente a la familia *Ericaceae* (subfamilia *Arbutoideae*) que incluye varios taxones de esclerófitos (Torres et al. 2002). Presenta una distribución predominantemente mediterránea (Fig. 1) aunque también se encuentra a lo largo de la costa atlántica de Europa llegando a presentar en Irlanda poblaciones disjuntas (Webb 1983; Cox & Moore 2010; Sealy 1949).

La **variabilidad funcional intraespecífica** modula la respuestas de las especies a los cambios ambientales, por lo que su estudio es crucial para predecir su capacidad de evolución y, por lo tanto, su supervivencia a corto y largo plazo (Santiso Carral 2015). En la actualidad, es evidente el proceso de cambio climático global que afecta a la temperatura, precipitación y concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico (Hatfield et al. 2011). Con respecto a la temperatura, se han predicho incrementos no sólo en los valores medios sino también en la frecuencia de valores extremos (IPCC 2014). Teniendo en cuenta que la temperatura es un factor determinante de la actividad fotosintética (Marutani et al. 2012), las adaptaciones fotosintéticas a la temperatura son un factor crucial en la supervivencia de las plantas, especialmente en climas cálidos.

El daño en el **aparato fotosintético** (Fig. 2a) es uno de los primeros síntomas en plantas estresadas por altas temperaturas (Schreiber & Berry 1977) porque uno de los primeros componentes dañados es la membrana tilacoidal (Santarius 1974) en la que tienen lugar muchas de las reacciones fotosintéticas. El aparato fotosintético se compone de dos fotosistemas (PS) y se sabe que el PSII es más susceptible a las altas temperaturas que el PSI (Berry & Björkman 1980). El PSII es un complejo de varias subunidades (pigmentos y proteínas), embebido en la membrana tilacoidal, entre cuyas funciones se encuentran la fotoxidación del agua, la reducción de la plastoquinona (PQ) y la generación de un gradiente de pH en la membrana tilacoidal (Sanz-Miguel et al. 2002). Después de excitarse gracias a un fotón de energía luminosa, el PSII dispone de cuatro vías reactivas diferentes (Fig. 2b) para de-excitarse (Klughammer & Schreiber 2008): (1) captura fotoquímica ( $k_p$ ), (2) disipación regulada por captura no

fotoquímica ( $K_{NPQ}$ ), (3) radiación fluorescente ( $k_F$ ) y (4) decaimiento de la excitación sin la implicación de la radiación o de un mecanismo no fotoquímico (NPQ ( $k_D$ )).

En principio, la **radiación fluorescente clorofílica** puede funcionar como un indicador de la actividad fotosintética. Generalmente, la fluorescencia es mayor cuando las tres vías restantes son menores, de ahí que los cambios en la radiación fluorescente reflejen los cambios en la eficiencia fotoquímica. Por ello, la emisión de fluorescencia por las clorofilas incluidas en la membrana tilacoidal es un indicador muy sensible del estado de dicha membrana (Schreiber et al. 1995).

El estrés por altas temperaturas también afecta notablemente a la desestabilización de estructuras (proteínas, biomembranas, citoesqueleto) y a otras funciones no fotosintéticas (Larcher 2003). En las plantas existen diferentes fases de respuesta dinámicas y graduales ante eventos estresantes. La primera es la fase de alarma en que se produce un colapso de la integridad celular, la **reacción de estrés**, donde el catabolismo predomina sobre el anabolismo seguido de una **restitución** que pone en marcha procesos de reparación como síntesis de proteínas o de sustancias protectoras. Si el estrés continúa, la fase de resistencia permitirá la normalización del estrés o la entrada en la fase de agotamiento caracterizada por un daño permanente o incluso la muerte (Lichtenthaler 1996). El estrés es dependiente del tiempo por lo que los procesos y fases que tienen lugar en situaciones de estrés están en continuo cambio (Larcher 2003).

Muchos de los cambios en la fisiología o funciones de las hojas se correlacionan con cambios en el espectro de reflectancia de una hoja. En ecofisiología vegetal, por ejemplo, el incremento de reflectancia en el rango visible del espectro a unas determinadas longitudes de onda se relaciona con el contenido en clorofila (Lichtenthaler et al. 1996). Una desventaja del uso de los índices de reflectancia vegetal es que la mayoría de los publicados no son sensibles a cambios rápidos en el estado fotosintético de la planta provocado por factores de estrés ambientales comunes como el calor (Dobrowski et al. 2005).

## **4. OBJETIVOS**

Dado que *A. unedo* se encuentra en procedencias caracterizadas con grandes contrastes térmicos (desde Marruecos, Túnez o Turquía hasta Irlanda o Galicia), el objetivo de este estudio es testar la hipótesis de que las diferentes procedencias estudiadas difieren en el grado de inactivación de la fotosíntesis al ser sometidas a estrés térmico. Además, se busca la elaboración de un perfil de respuesta de la inactivación de la fotosíntesis que modelice el comportamiento de esta especie ante una situación de estrés por altas temperaturas.

## 5. METODOLOGÍA

**5.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.** Se utilizaron 12 individuos de *A. unedo* de 12 procedencias diferentes (Fig. 1), exceptuando, por problemas técnicos, las procedencias GS con 11 individuos, IK con 10 y FB con 7. En total 136 individuos, de dos años de edad, que crecieron a partir de semillas en el invernadero de la Facultad de Biología de la USC en condiciones homogéneas.

**5.2. Toma de medidas.** Se llevaron a cabo entre septiembre y octubre del 2014 en el laboratorio del Departamento de Ecología de la Facultad de Biología de la USC. Las medidas se tomaron en el haz de una hoja inmediatamente después de retirarse del individuo a estudiar. Para que las medidas fueran de hojas con un similar estado de desarrollo se seleccionaron, en la medida de lo posible, hojas de la parte superior de la planta no pertenecientes al último año.

**5.3. Rendimiento fotoquímico.** El fluorómetro (Mini-PAM, Walz, Effeltrich, Alemania) mide el rendimiento fotosintético antes y durante un pulso de saturación luminosa ( $>4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$  de fotones de luz actínica a una longitud de pulso de 0.8 s) (Klughammer & Schreiber 2008). El pulso de saturación luminosa modulada permite distinguir entre la extinción fotoquímica (“photochemical quenching”) y la disipación de calor (NPQ).

Con muestras adaptadas a la luz, el fluorómetro registra la fluorescencia previa al pulso de saturación ( $F_t$ ) y la fluorescencia durante el pulso de saturación ( $F_m'$ ). Se utiliza en estas muestras una lámpara halógena externa para igualar la intensidad de luz que recibe cada hoja. Con muestras adaptadas a la oscuridad, donde todos los centros de reacción del PSII están abiertos (Björkman & Demmig-Adams 1995), las fluorescencias registradas se denominan  $F_0$  y  $F_m$  respectivamente.

A partir de esos registros, se calculan dos parámetros fluorométricos para caracterizar el rendimiento fotosintético: el **rendimiento cuántico efectivo del PSII** de muestras adaptadas a la luz,  $\Phi_{\text{PSII}} = \Delta F / F_m' = (F_m' - F_t) / F_m'$ , y el **rendimiento cuántico máximo del PSII** de muestras adaptadas a la oscuridad,  $F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m$  (Klughammer & Schreiber 2008).

**5.4. Propiedades espectrales.** El espectrofotómetro (UniSpec Spectral Analysis System, PP Systems, Haverhill, MA, EUA) mide el espectro de radiación reflejado de una hoja que se divide entre la radiación de un blanco estándar para calcular el espectro de reflectancia foliar en un rango de longitudes de onda entre 300-1100 nm. A partir del espectro se calculan los siguientes índices:

- **“Normalized Difference Vegetation Index”**:  $NDVI_{750} = (R_{750} - R_{680}) / (R_{750} + R_{680})$  donde  $R_{750}$  y  $R_{680}$  son la reflectancia medida a 750 nm y 680 nm, respectivamente. Este índice nos da una estimación de la actividad fotosintética potencial (Garbulsky et al. 2011) y se ha correlacionado con la concentración de clorofila pero cuando ésta es alta no es un buen indicador (Lichtenthaler et al. 1996).

- **“Chlorophyll Index”**:  $CHL_{700} = R_{750} / R_{700}$ , donde  $R_{750}$  y  $R_{700}$  son la reflectancia medida a 750 nm y 700 nm, respectivamente. Este índice se correlaciona con el contenido de clorofila de la hoja (Lichtenthaler et al. 1996) con un error inferior a  $2,1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Peñuelas & Filella 1998).

- **Modified Simple Ratio Vegetation Index**:  $mSR_{750/705} = R_{750} / R_{705}$ , donde  $R_{750}$  y  $R_{705}$  son la reflectancia medida a 750 nm y 705 nm, respectivamente. Este es un índice empleado en investigación como indicador de la tolerancia a la salinidad (Gao & Li 2012).

**5.5. Estrés térmico.** Un total de 6 hojas de cada una de las 136 plantas experimentales (952 hojas en total) se sumergieron por tandas, durante cinco minutos, en un baño termostático (DigiBath BAD-2, Raypa, Barcelona); 6 hojas por cada uno de los niveles de temperatura ensayados (35°C, 40°C, 44°C, 48°C, 50°C e 52°C). Se envolvían en papel de aluminio antes de introducirlas en el agua bidestilada del baño termostático. A continuación, se tomaban las medidas de fluorescencia y reflectancia.

Debido a las altas temperaturas de la región mediterránea durante los veranos, las plantas están adaptadas a condiciones de altas temperaturas siempre y cuando no vayan acompañadas de estrés hídrico (Petanidou 1996). Dicho estrés es evitado en el diseño experimental con el empleo del baño termostático.



Después de la primera toma de medidas, se dejaban en reposo 70 minutos en un cuarto oscuro, a temperatura constante, en placas de plástico con papel de filtro ligeramente humedecido con agua para evitar la disecación. Pasado este tiempo, se procedía a realizar una segunda toma de medidas de fluorescencia y reflectancia.

**5.6. Análisis estadístico.** En primer lugar se comprobó que los datos a analizar cumplían los requerimientos de normalidad (test de Kolmogórov-Smirnov) y homocedasticidad de las varianzas (test de Levene) exigidos por la estadística paramétrica. Para cumplir estos requerimientos, fue preciso aplicar a los datos de fluorescencia base ( $F_v$ ) y rendimiento cuántico efectivo ( $\Phi_{PSII}$ ) una transformación logarítmica ( $y = \ln x$ ) y raíz cuadrada ( $y = \sqrt{x}$ ), respectivamente (Zar 1984).

Las variables de **fluorescencia** se analizaron mediante un análisis de la varianza (Tabla 1) de dos factores fijos, procedencia (12 niveles) y temperatura (6 niveles). El rendimiento cuántico máximo, cuyos datos no se ajustaban a una distribución normal, se analizó mediante el test no paramétrico de Scheirer-Ray-Hare, considerando los mismos factores.

Los índices de **reflectancia** se analizaron mediante un análisis de la varianza de medidas repetidas (Tabla 2), con un factor intra-sujetos, tiempo (2 niveles), y dos factores inter-sujetos, procedencia (12 niveles) y temperatura (6 niveles).

Para todos los análisis se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS v. 20.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) tomando  $\alpha=0,05$  como el umbral de significación estadística.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSSION

**6.1. Rendimiento fotoquímico.** La curva de **fluorescencia base** ( $F_t$ ) (Fig. 3a) es indicadora de una alta estabilidad de las membranas tilacoidales en el rango de temperaturas seleccionadas para este experimento. Una caída en los valores de dicha curva sería indicativo de daños irreversibles en la membrana tilacoidal (Larcher 2003).

Los valores de rendimiento cuántico efectivo ( $\Phi_{PSII}$ ) y de rendimiento cuántico máximo ( $F_v/F_m$ ) no mostraron diferencias significativas (Tabla 1) entre procedencias ni en la interacción procedencia por temperatura, esto es, todas las plantas, con independencia de su procedencia, mostraron el mismo patrón de respuesta. Esta respuesta homogénea (Fig. 3c) entre diferentes procedencias concuerda con otros estudios que demuestran que la diversidad genética de *A. unedo* es baja (Santiso Carral 2015). En cambio, los efectos de temperatura sobre los valores de  $\Phi_{PSII}$  y  $F_v/F_m$  sí mostraron diferencias significativas por lo que el rendimiento fotoquímico del *A. unedo* depende de la temperatura.

Para el **rendimiento cuántico efectivo** ( $\Phi_{PSII}$ ) se ha observado repetidamente el siguiente patrón (Fig. 3b): (1) disminución de los valores de rendimiento al aumentar progresivamente la temperatura hasta alcanzar un valor mínimo entorno a los 44°C seguido de (2) un aumento del rendimiento hasta un valor máximo entorno a los 50°C y finalmente, (3) una drástica caída a altas temperaturas. Estudios previos (Schreiber & Berry 1977) sugieren que la curva del rendimiento cuántico efectivo refleja cambios en las membranas y la existencia de un **efecto protector asociado al estrés térmico** y condicionado por el aumento de la intensidad de la luz (Marutani et al. 2012). La primera fase de disminución de los valores del rendimiento podría reflejar situaciones que todavía no activan este efecto protector de aclimatación mientras que la última fase de caída drástica sería a temperaturas que este efecto protector ya no soporta. A nivel molecular, este efecto se traduciría en la transcripción y translación de un pequeño grupo de *heat shock proteins* o HSPs (Vierling 1991; Larcher 2003) muy conservadas evolutivamente, dicha conservación está en armonía con la hipótesis del papel fundamental de las HSPs en una respuesta frente al estrés térmico (Vierling 1991).

El patrón de respuesta que muestra el **rendimiento cuántico máximo** ( $F_v/F_m$ ) no es análogo al del rendimiento efectivo como cabría esperar (Schreiber 1997). En este caso,  $F_v/F_m$ , medidas de fluorescencia tomadas tras pasar 70 minutos en la oscuridad, se mantiene estable hasta los 44°C (Fig. 3b) y a partir de esta temperatura disminuye drásticamente. El consumo de NADPH en el estroma puede disminuir en situaciones de estrés térmico (Sharkey 2005; Weis 1981) porque el Ciclo de Calvin Benson, principal consumidor de NADPH, es sensible a este estrés. Esto conduce a la acumulación de NADPH en el estroma, y causa la reducción de la plastoquinona (PQ) por la obstrucción del flujo de electrones debido al agotamiento del aceptor de electrones. El exceso de esta reducción en las membranas tilacoidales es peligroso para el PSII e induce la fotoinhibición en condiciones de luz (Yamamoto et al. 2008). Sin embargo, en la oscuridad, el flujo de electrones impulsados por la luz está ausente, los electrones no pueden fluir hacia PSI, resultando en una mayor reducción de la PQ que induce la producción de Reactive Oxygen Species (ROS) (Khorobrykh & Ivanov 2002). La proteína D1 que compone el PSII (Fig. 2a) es especialmente muy susceptible a los ROS (Marutani et al. 2012). Por todo esto, parece probable que una mayor reducción de la PQ implique la disminución del  $F_v/F_m$  cuando, en condiciones luminosas, el rendimiento efectivo aumentaba hasta una temperatura límite gracias a un efecto protector (44°C a 50°C, Fig. 2d).

En la naturaleza, el estrés térmico está asociado a situaciones luminosas, el mediodía en verano, y este es uno de los casos en los que ocurre la fotoinhibición (Allakhverdiev et al. 2008; Murata et al. 2007; June et al. 2004; Marutani et al. 2012). Por ello, cabría esperar que el efecto protector frente al estrés térmico se desencadene sólo en situaciones luminosas como la fotoinhibición ya que, en la naturaleza, los aumentos de temperatura en situaciones de oscuridad son menos acusados. Otra hipótesis sería que el efecto protector asociado al estrés térmico no esté evolutivamente optimizado y que no actúe el tiempo suficiente para que se recupere el *A. unedo* y que sólo lo proteja durante un período muy breve de tiempo. Se recomiendan futuros estudios.

**6.2. Propiedades espectrales.** Al igual que los resultados de rendimiento fotoquímico, la temperatura tuvo un efecto significativo sobre los índices de reflectancia (Fig. 4, Tabla 2),

aunque este efecto fue dependiente del tiempo. Destacar que las plantas de las diferentes procedencias presentaron diferencias significativas para los tres índices de reflectancia ( $CHL_{700}$ ,  $NDVI_{750}$  y  $mSR$ ) pero para  $NDVI$  las diferencias entre las procedencias dependieron del tiempo. Recientes estudios sobre la variabilidad interpoblacional del *A. unedo* (Santiso Carral 2015, capítulos 3 y 4) no mostraron diferencias significativas en procedencias pero cabe destacar que nuestro estudio usó 12 poblaciones mientras que el estudio referido usó 7 poblaciones, por lo tanto, es posible que el aumento de muestra sea la causa de la aparición de dichas diferencias significativas.

Después de someter las muestras al estrés térmico y tras 70 minutos en la oscuridad (T2), los índices (Fig. 4) muestran cambios de reflectancia foliar más acusados que en las primeras mediciones hechas tras la exposición al estrés (T1). Esto puede deberse a que la *reacción de estrés* (Lichtenthaler 1996) está más acentuada en la segunda medición porque el estrés es dependiente del tiempo (Larcher 2003) y en la primera medición no hubo tiempo suficiente para observar un daño o respuesta. Sería interesante la realización de un estudio de la dinámica temporal de la respuesta al estrés para poder determinar con exactitud los tiempos de respuesta.

Los resultados de  $CHL_{700}$  (Fig. 4a) y  $NDVI_{750}$  (Fig. 4b) muestran una respuesta similar lo cual es coherente porque ambos son empleados para estimar la cantidad de clorofila de las hojas (Lichtenthaler et al. 1996). En los resultados de la primera medición (T1) se produce un descenso significativo de los valores de ambos índices desde la temperatura control (23°C) hasta los 35°C, seguido de un aumento significativo hasta 44°C y una zona estable con oscilaciones hasta los 52°C. De forma similar a lo que ocurría con los resultados de fluorescencia (apartado 6.1), un **efecto protector** asociado al estrés térmico (Marutani et al. 2012) parece actuar a partir de una determinada temperatura umbral que se encontraría entre los 35°C y 40°C, es decir, una temperatura umbral más baja que la del efecto protector descrito para los resultados de fluorescencia fotoquímica. Dado que las plantas han desarrollado una variedad de respuestas a temperaturas elevadas para minimizar los daños y asegurar la protección de las células (Kotak et al. 2007) no sería de extrañar la existencia de diferentes efectos de protección. La familia de las HSPs comprende numerosas proteínas con diferentes funciones (Vierling 1991) aunque su

función última es la contribución a la supervivencia de la planta sometida a altas temperaturas (Kotak et al. 2007).

En los resultados de la segunda medición (T2) observamos la misma respuesta con la diferencia de un descenso significativo a altas temperaturas, es decir, al cabo de 70 minutos el efecto protector en las hojas sometidas a las temperaturas más altas (48°C, 50°C, 52°C) ya no es capaz de evitar el daño funcional.

Por último, destacar que los resultados del índice **mSR** (Fig. 4c) que se correlacionan con la tolerancia a la salinidad (Gao & Li 2012) también muestran el efecto protector asociado al estrés térmico. Un creciente número de estudios muestran la existencia de **fenómenos de protección o tolerancia cruzada** en plantas en los que la exposición de un tejido a condiciones de estrés moderado a menudo induce la resistencia a otros estreses (Sabehat et al. 1998).

## 7. CONCLUSIONES

☑ En concordancia con varios estudios sobre otras características de *Arbutus unedo* L., el análisis de la inactivación de la fotosíntesis mediante el estudio del rendimiento fotoquímico del fotosistema II y reflectancia foliar convergen en que la **diversidad interpoblacional** para las características estudiadas es **uniforme**.

☑ El perfil de respuesta de la inactivación de la fotosíntesis de *Arbutus unedo* L. por estrés térmico muestra un **efecto protector asociado al estrés térmico** a partir de una determinada temperatura umbral que parece actuar hasta llegar a un máximo de estrés térmico dónde el daño es irreversible. Nuestros datos sugieren que a nivel molecular, las *Heat Shock Protein* (HSPs) podrían ser las responsables de este mecanismo de protección.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Allakhverdiev, S., 2008. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 98, pp.541–550.
- Berry, J. & Björkman, O., 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher-plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 31, pp.491–543.
- Björkman, O. & Demmig-Adams, B., 1995. Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion and dissipation in leaves of higher plants. *Ecophysiology of photosynthesis Berlin: Springer*, Schulze ED, pp.17–48.
- Cox, C. & Moore, P., 2010. *Biogeography: An Ecological and Evolutionary Approach* 8th ed., Oxford (UK): Oxford U.
- Dobrowski, S.Z. et al., 2005. Simple reflectance indices track heat and water stress-induced changes in steady-state chlorophyll fluorescence at the canopy scale. *Remote Sensing of Environment*, 97, pp.403–414.
- Gao, Y. & Li, D., 2012. Detecting salinity stress in tall fescue based on single leaf spectrum. *Scientia Horticulturae*, 138, pp.159–164. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2012.02.018>.
- Garbulsky, M.F. et al., 2011. The photochemical reflectance index (PRI) and the remote sensing of leaf, canopy and ecosystem radiation use efficiencies. A review and meta-analysis. *Remote Sensing of Environment*, 115, pp.281–297.
- Hatfield, J.L. et al., 2011. Climate Impacts on Agriculture: Implications for Crop Production. *Agronomy Journal*, 103(2), p.351. Available at: <https://www.agronomy.org/publications/aj/abstracts/103/2/351>.
- IPCC (Core Writing Team: R.K. Pachauri and L.A. Meyer), 2014. *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, IPCC, Geneva, Switzerland.
- June, T., Evans, J. & Farquhar, G., 2004. A simple new equation for the reversible temperature dependence of photosynthetic electron transport: a study on soybean leaf. *Functional Plant Biology*, 31, pp.275–283.
- Khorobrykh, S. & Ivanov, B., 2002. Oxygen reduction in a plastoquinone pool of isolated pea thylakoids. *Photosynthesis Research*, 71, pp.209–219.
- Klughammer, C. & Schreiber, U., 2008. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Application Notes*, 1, pp.27–35.
- Kotak, S. et al., 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Current opinion in plant biology*, 10(3), pp.310–6. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526607000465> [Accessed July 16, 2014].
- Larcher, W., 2003. *Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*. 4th editio., Berlin: Springer-Verlag.

- Lichtenthaler, H.K., 1996. Vegetation Stress: An Introduction to the Stress Concept in Plants.pdf. *Plant physiology*, 148(1-2), pp.4–14. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80287-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80287-2).
- Lichtenthaler, H.K., Gitelson, A. & Lang, M., 1996. Non-Destructive Determination of Chlorophyll Content of Leaves of a Green and an Aurea Mutant of Tobacco by Reflectance Measurements. *Journal of Plant Physiology*, 148(3-4), pp.483–493. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80283-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80283-5).
- Marutani, Y. et al., 2012. Damage to photosystem II due to heat stress without light-driven electron flow: involvement of enhanced introduction of reducing power into thylakoid membranes. *Planta*, 236(2), pp.753–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22526503> [Accessed October 27, 2014].
- Murata, N. et al., 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767, pp.414–421.
- Peñuelas, J. & Filella, I., 1998. Visible and near-infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological status. *Elsevier Science Ltd*, 3, pp.151–156.
- Petanidou, T., 1996. Does temperature stress induce nectar secretion in Mediterranean plants? *New Phytologist*, 133(3), pp.513–518.
- Sabehat, A., Weiss, D. & Lurie, S., 1998. Heat-shock proteins and cross-tolerance in plants. *Physiologia Plantarum*, 103(3), pp.437–441. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-3054.1998.1030317.x> [Accessed April 19, 2015].
- Santarius, K. a., 1974. Seasonal changes in plant membrane stability as evidenced by the heat sensitivity of chloroplast membrane reactions. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 73(5), pp.448–451. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044328X74801145> [Accessed November 2, 2014].
- Santiso Carral, X., 2015. *Genetic structure and geographic variation in ecophysiological traits of Arbutus unedo* L. Universidade de Santiago de Compostela.
- Sanz-Miguel, M.Á. et al., 2002. Characterization of calcium deficiency in tomato plants by using physiological parameters. *Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (ITEA)*, 97(1), pp.26–38. Available at: <http://hdl.handle.net/10261/13725>.
- Schreiber, U., 1997. *Chlorophyll fluorescence and photosynthetic energy conversion.*, TEACHING-PAM Chlorophyll fluorometer.
- Schreiber, U. & Berry, J. a., 1977. Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in intact leaves correlated with damage of the photosynthetic apparatus. *Planta*, 136(3), pp.233–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24420396>.
- Schreiber, U., Bilger, W. & Neubauer, C., 1995. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of vivo photosynthesis. *Ecophysiology of photosynthesis Berlin: Springer*, pp.49–70.
- Sealy, J.R., 1949. *Arbutus unedo*. *The Journal of Ecology*, 37(2), pp.365–388. Available at: <http://www.jstor.org/discover/10.2307/2256613?uid=3737952&uid=2&uid=4&sid=21104447991051>.



- Sharkey, T., 2005. Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. *Plant, Cell Environ*, 28, pp.269–277.
- Torres, J.A. et al., 2002. *Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula mountains. *Plant Ecology*, 160(2), pp.207–223. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1015864821706#>.
- Vierling, E., 1991. The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42(1), pp.579–620. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pp.42.060191.003051>.
- Webb, D.A., 1983. The flora of Ireland in its European context. *Journal of Life Sciences, Royal Dublin Society*, pp.143–160.
- Weis, E., 1981. Reversible heat-inactivation of the Calvin cycle: a possible mechanism of the temperature regulation of photosynthesis. *Planta*, 151, pp.33–39.
- Yamamoto, Y. et al., 2008. Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. *Photosynthesis Research*, 98, pp.589–608.
- Zar, J.H., 1984. *Biostatistical Analysis* 2nd ed., Prentice-Hall.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Tablas:

**Tabla 1.** Resultados del análisis de varianza para los datos de fluorescencia base ( $F_0$ ) y para el rendimiento fotoquímico efectivo ( $\Phi$ PSII, Yield) y máximo ( $F_v/F_m$ ) del Fotosistema II. Los valores de F significativos ( $P < 0.05$ ) están resaltados en negra.

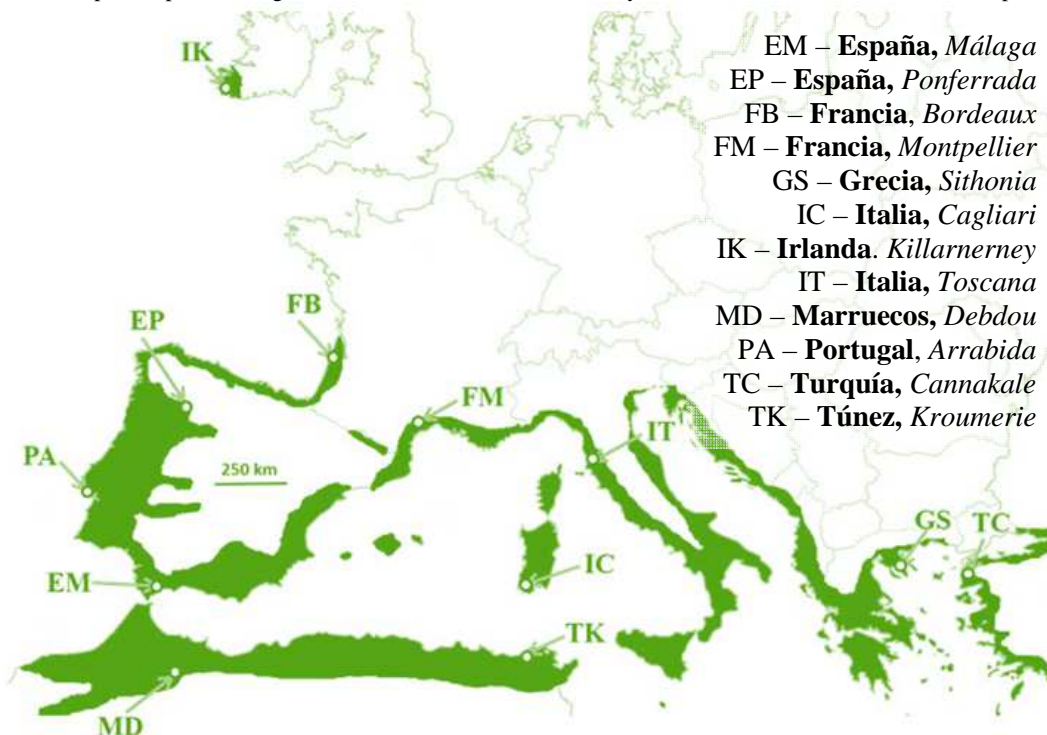
	gl	$\Phi$ PSII (Yield)			Fv/Fm			$F_0$		
		MS	F	P	MS	F	P	MS	F	P
Procedencia	11	0,537	1,506	0,124	1,690	0,803	0,999	0,006	1,152	0,317
Temperatura	5	5,979	16,769	<b>&lt;0,001</b>	52,530	54,997	<b>&lt;0,001</b>	0,098	17,803	<b>&lt;0,001</b>
Procedencia x Temperatura	55	0,245	0,686	0,960	5,630	0,536	1,000	0,003	0,544	0,997

**Tabla 2.** Resultados del análisis estadístico de medias repetidas los índices de reflectancia empleados. Los valores de F significativos ( $P < 0.05$ ) están resaltados en negra.

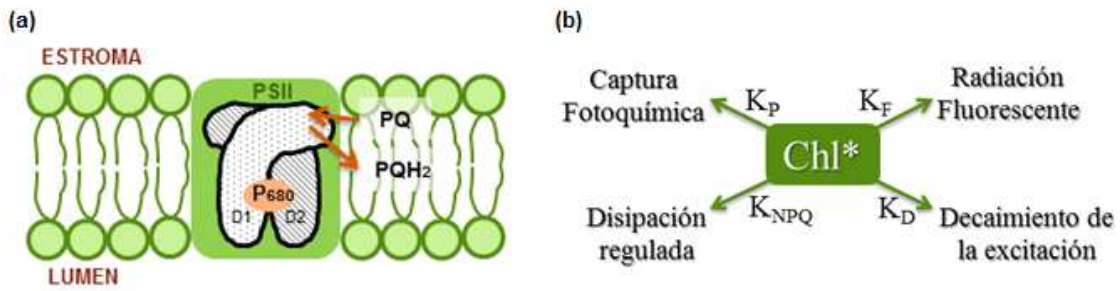
	gl	NDVI <sub>750</sub>			CHL <sub>700</sub>			mSR <sub>750/705</sub>		
		MS	F	P	MS	F	P	MS	F	P
<b>Intra-sujetos</b>										
Tiempo	1	0,154	70,23	<b>&lt;0,001</b>	3,507	102,0	<b>&lt;0,001</b>	1,592	92,90	<b>&lt;0,001</b>
Tiempo x Procedencia	11	0,004	1,921	<b>0,004</b>	0,047	1,355	0,190	0,022	1,313	0,212
Tiempo x Temperatura	5	0,007	3,384	<b>&lt;0,01</b>	0,120	3,426	<b>&lt;0,01</b>	0,080	3,502	<b>&lt;0,01</b>
Tiempo x Procedencia x Temperatura	55	0,001	0,425	1,000	0,018	0,509	0,999	0,009	0,515	0,999
<b>Inter-sujetos</b>										
Procedencia	11	0,059	2,855	<b>&lt;0,001</b>	0,596	2,641	<b>&lt;0,01</b>	0,316	2,951	<b>&lt;0,01</b>
Temperatura	5	0,009	0,428	0,830	0,179	0,794	0,554	0,102	0,954	0,445
Procedencia x Temperatura	55	0,001	0,046	1,000	0,022	0,099	1,000	0,014	0,134	1,000

### 9.2. Figuras:

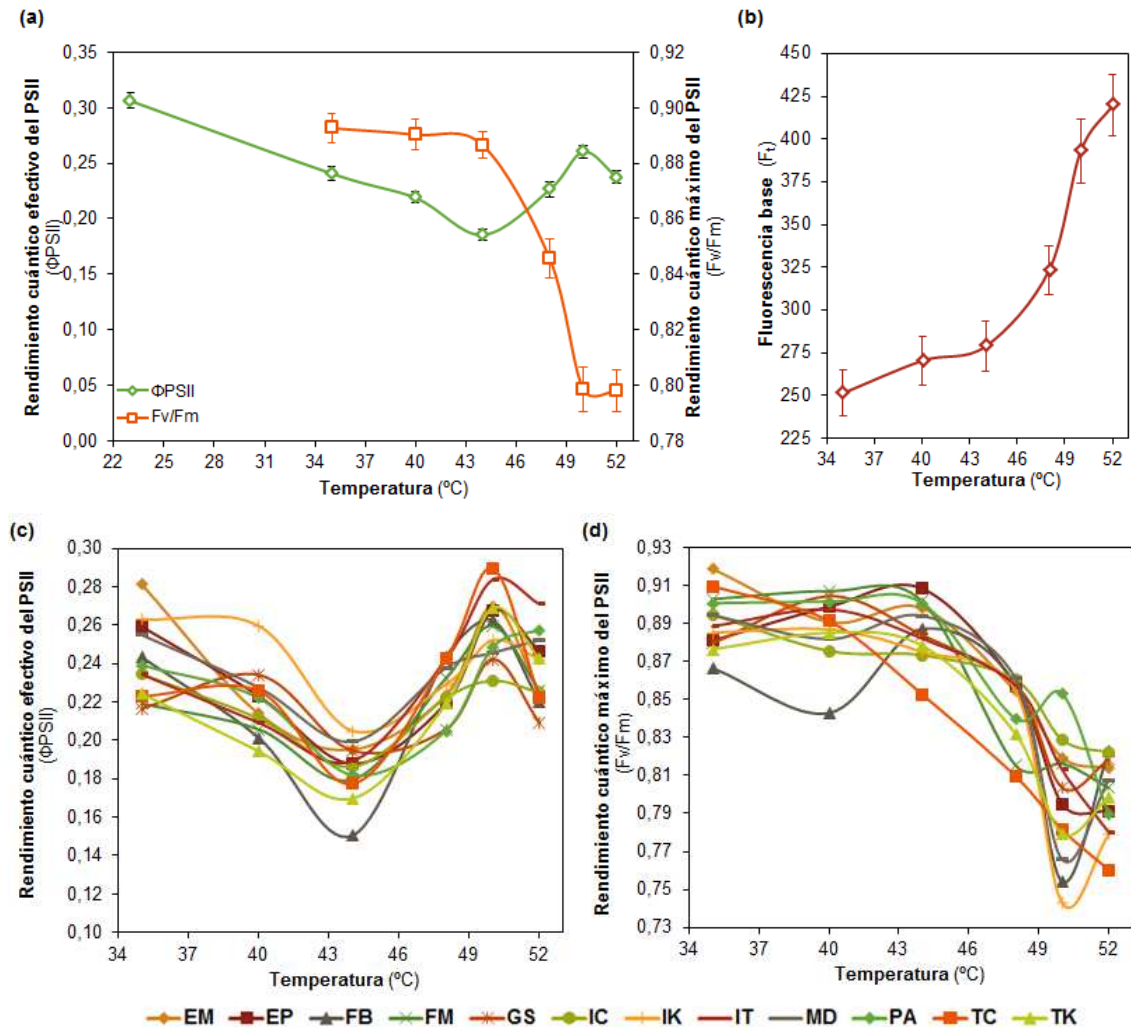
**Figura 1.** Mapa europeo del rango de distribución de *Arbutus unedo* y de las localidades de las muestras empleadas.



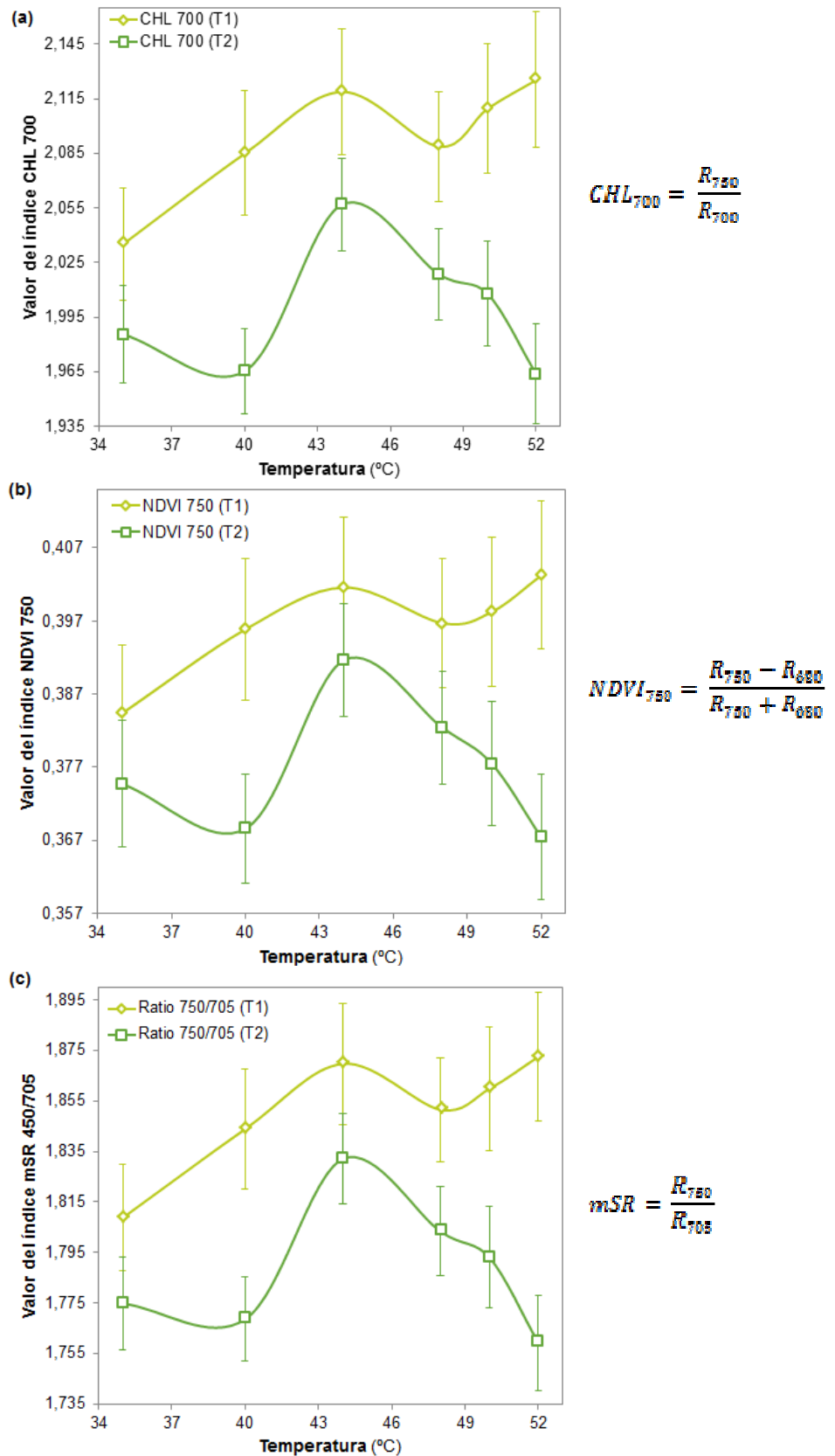
**Figura 2.** Funcionamiento del aparato fotosintético en relación al rendimiento fotoquímico. (a) Esquema del fotosistema II (PSII) formado por dos subunidades de proteínas D embebido en la membrana tilacooidal. (b) Cuatro rutas para la desexcitación del PSII (Klughammer & Schreiber 2008).



**Figura 3.** Resultados del rendimiento fotoquímico. (a) Valores medios de la fluorescencia base (F<sub>i</sub>) como indicador de la estabilidad de las membranas tilacooidales (Larcher 2003). (b) Valores medios del rendimiento cuántico efectivo ( $\Phi_{PSII}$ ) y del rendimiento cuántico máximo (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>) del PSII para las distintas temperaturas de estrés térmico y una temperatura control (23°C). (c) Valores del rendimiento cuántico ( $\Phi_{PSII}$  y F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>) para todas las procedencias estudiadas.



**Figura 4.** Resultados de los índices de reflectancia fotoquímica empleados para el tiempo 1 (medida tomada al sufrir estrés térmico, T1) y 2 (medida tomada tras una hora y media en oscuridad después del estrés térmico, T2). (a) Valores medios de Chlorophyll Index (CHL<sub>700</sub>). (b) Valores medios de Normalized Difference Vegetation Index (NDVI<sub>750</sub>). (c) Valores medios de Modified Simple Ratio Vegetation Index (mSR<sub>750/705</sub>).



### FE DE ERRATAS. Página 20.

**Figura 4.** Resultados de los índices de reflectancia fotoquímica empleados para el tiempo 1 (medida tomada al sufrir estrés térmico, T1) y 2 (medida tomada tras una hora y media en oscuridad después del estrés térmico, T2). (a) Valores medios de Chlorophyll Index ( $CHL_{700}$ ). (b) Valores medios de Normalized Difference Vegetation Index ( $NDVI_{750}$ ). (c) Valores medios de Modified Simple Ratio Vegetation Index ( $mSR_{750/705}$ ).

