

Nº REFERENCIA: CGL2006-07126/BOS



MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE PROGRAMAS Y TRANSFERENCIA DE CONOCIMIENTO

PROYECTOS I+D, ACCIONES ESTRATÉGICAS Y ERANETS

INFORME DE SEGUIMIENTO ANUAL

Investigador Principal: Juli García Pausas
Título del Proyecto: Mecanismos de persistencia tras incendio en plantas mediterráneas: consecuencias ecológicas y evolutivas (PERSIST)
Organismo: Fundación Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo (CEAM)
Centro: Fundación Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo (CEAM)
Departamento: Restauración Forestal
Fecha de inicio del proyecto: 1 Octubre 2006
Fecha de finalización del proyecto: 30 Septiembre 2009

Fecha: 28 Marzo 2009

SR. SUBDIRECTOR GENERAL DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN
C/ Albacete 5, 28071 MADRID

A. ACTIVIDADES REALIZADAS Y GRADO DE CONSECUCIÓN DE LOS OBJETIVOS PROPUESTOS

1. Describa brevemente las actividades realizadas en el pasado año de desarrollo del proyecto. Indique si existe algún resultado a que haya dado lugar el proyecto durante ese período.

A continuación se describe el estado actual de cada una de las tareas del proyecto. El total de publicaciones y presentaciones a congresos realizadas hasta la fecha se detallan en la web del proyecto: <http://www.uv.es/jgpausas/persist.htm>

TAREA 1. EXPERIMENTO DE REBROTE

Al largo del año de 2008 se han procesado las muestras (separación y cálculo de biomásas) de los individuos cortados en Agosto de 2007.

En Agosto de 2008 se tomaron medidas de rebrote de plantas cortadas en los 2 primeros años del proyecto (nº de brotes vivos y muertos, altura máxima y media de los brotes, peso fresco y fenología de los individuos), se recolectaron los rebrotes de cada individuo y se procesaron (cálculo de biomásas), para cuantificar el rebrote.

Los individuos se han mantenido protegidos por las jaulas (exclusión de herbivoría) para que se pueda hacer un nuevo seguimiento del rebrote, en Agosto de 2009.

TAREA 2. EXPERIMENTO DE GERMINACIÓN

Metodología utilizada:

- 30 especies leñosas con evidencias de germinación pos incendio (P+)
- 2 subconjuntos: R+ y R- (R-P+ y R+P+)
- 7 tratamientos de calor - combinación de diferentes temperaturas y tiempos de exposición (80°C 5'; 80°C 10'; 100°C 5', 100°C 10', 120°C 5', 120°C 10', 150°C 5') y respectivo control (seco)
- 2 tratamientos de humo – distintas concentraciones (1:1 y 1:10) y respectivo control (húmedo)
- Seguimiento de la germinación durante 2 meses
- Seguimiento del crecimiento inicial (aprox. 1 semana) de un subconjunto de individuos (para 18 especies)
- Análisis de la viabilidad pos tratamiento

Especies seleccionadas para el estudio:

Germinadoras obligadas (R-P+)	Especies facultativas (R+P+)
Lamiaceae	Lamiaceae
<i>Lavandula latifolia</i>	<i>Sideritis angustifolia</i>
<i>Lavandula stoechas</i>	<i>Teucrium capitatum</i>
<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Teucrium ronnigeri</i>
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Thymus piperella</i>
Ericaceae	Ericaceae
<i>Erica umbellata</i>	<i>Erica multiflora</i>
	<i>Erica terminalis</i>
Fabaceae	Fabaceae
<i>Genista triacanthos</i>	<i>Anthyllis lagascana</i>
<i>Ononis minutissima</i>	<i>Anthyllis cytisoides</i>
<i>Ulex parviflorus</i>	<i>Coronilla minima</i>
	<i>Dorycnium pentaphyllum</i>
Cistaceae	<i>Genista scorpius</i>
<i>Cistus albidus</i>	<i>Genista umbellata</i>
<i>Cistus monspeliensis</i>	<i>Ulex borgiae</i>

<i>Fumana ericoides</i>	Linaceae
<i>Fumana thymifolia</i>	<i>Linum suffruticosum</i>
<i>Helianthemum syriacum</i>	Primulaceae
<i>Xolantha tuberaria</i>	<i>Coris monspeliensis</i>
	Scrophulariaceae
	<i>Digitalis obscura</i>

2.1- Efecto de los tratamientos de calor y humo sobre la germinación de especies de la cuenca mediterránea.

Este experimento nos permite validar **el efecto del calor y humo** en los varios rasgos/características relacionadas con el reclutamiento pos incendio:

- Proporción de germinación
- Velocidad de germinación
- Crecimiento inicial

Objetivo: Proporcionar evidencias que tratamientos de calor y humo estimulan el reclutamiento pos incendio (estimulan germinación, incrementan la velocidad de germinación y estimulan el crecimiento inicial de las plántulas)

Resultados:

Efecto del calor y humo en la proporción de germinación:

- 15 especies con germinación estimulada por calor y no por humo (Cistaceae y Fabaceae)
- 3 especies con germinación estimulada por humo y no por calor
- 5 especies con germinación estimulada por calor y humo

Efecto del calor y humo en la velocidad de germinación:

- 12 especies con mayor velocidad de germinación con calor
- 8 especies con mayor velocidad de germinación con humo

Efecto del humo en el crecimiento inicial de las plántulas:

- 6 especies con mayor crecimiento inicial (en 18 especies estudiadas)

2.2 - Respuesta a los tratamientos de calor respecto a la capacidad de Rebrote (comparación R-P+ vs R+P+)

Este experimento nos permite validar la hipótesis sobre la mayor eficiencia de los tratamientos de calor y humo en la germinación de especies germinadoras obligadas (R-P+), en comparación con especies facultativas (R+P+) (Hipótesis 1 del proyecto).

Resultados: La respuesta al humo y al calor está correlacionada con la estrategia de regeneración post-incendio. Las especies germinadoras obligadas, en comparación con las que también tienen capacidad de rebrotar (es decir, especies facultativas) presentan:

1. Mayor grado de letargo y, consecuentemente, mayor capacidad de incrementar el banco de semillas.
2. Menor mortalidad después de los tratamientos de calor.
3. Mayor probabilidad de germinar más rápido en los tratamientos de calor
4. Mayor grado de estimulación de la germinación por los tratamientos de calor y humo
5. Menor grado de inhibición de la germinación por tratamientos calor.

Actualmente estamos en proceso de preparación de la publicación correspondiente a todos estos resultados.

TAREA 3. ANÁLISIS FUNCIONAL

Tarea 3.1 Estudio en vivero

El objetivo de esta tarea es estudiar los mecanismos de resistencia a condiciones de estrés hídrico en especies con diferentes estrategias regenerativas. La hipótesis de partida del estudio es que existen diferencias en la estrategia en el uso del agua entre especies con diferente

estrategia de regeneración debido a las características morfológicas que presentan (enraizamiento profundo/superficial, capacidad de rebrote, etc.).

Durante el presente periodo se han abordado tres sub-tareas:

3.1.1. Patrones de respuesta de las especies rebrotadoras y germinadoras a condiciones de sequía gradualmente más intensas.

El objetivo es estudiar la respuesta de las principales variables fisiológicas durante un periodo de estrés hídrico que simularía la sequía estival. Se sometió un total de 19 de especies de diferentes estrategias de regeneración post-incendio (germinadoras, facultativas y rebrotadoras) a un ciclo de sequía intensa. Las variables medidas fueron intercambio de gases (fotosíntesis, conductancia estomática, transpiración y eficiencia en el uso del agua), eficiencia del Fotosistema II (F_v/F_m al alba, Φ_{PSII} , ETR), contenido hídrico relativo foliar y potencial hídrico.

Los principales resultados analizados hasta el momento muestran que las especies germinadoras (R-P+) presentan tasas más altas de fotosíntesis y conductancia estomática que las especies con estrategia facultativa (R+P+) o rebrotadora (R+P-) bajo condiciones de máxima disponibilidad hídrica medidas al inicio del ciclo y tomadas como medidas control (Fig. 1).

En relación a la eficiencia en el uso del agua (WUE), las especies con estrategia de regeneración germinadora mostraron los valores más bajos en condiciones de máxima humedad del sustrato, mientras que en condiciones de sequía intensa los valores de WUE fueron mayores respecto a las especies facultativas y germinadoras (Fig. 2).

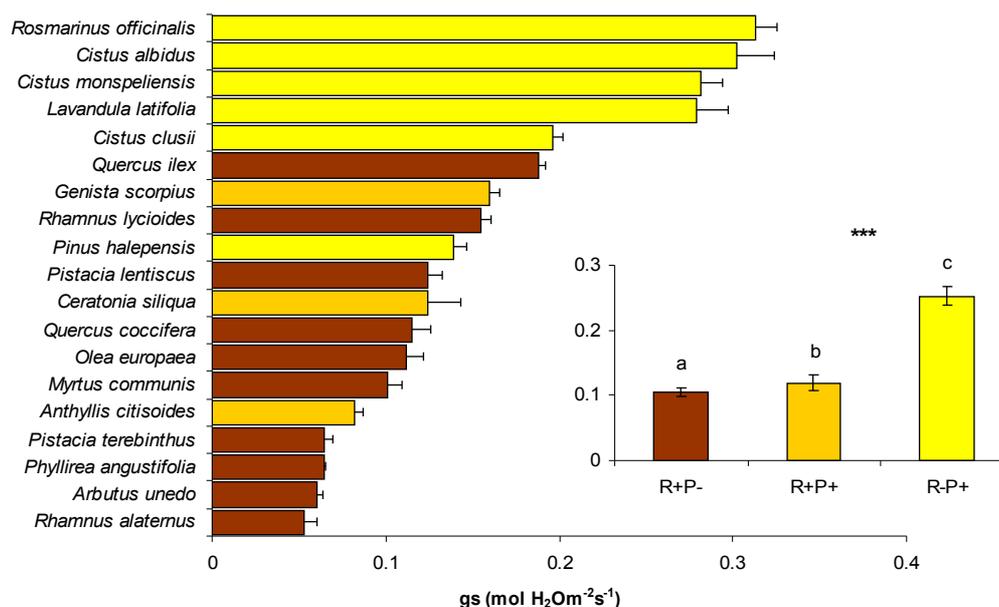


Fig. 1. Conductancia estomática para las diferentes especies en condiciones de máxima hidratación. Amarillo y R-P+: especies germinadoras, naranja y R+P-: especies rebrotadoras, marrón y R+P+: especies facultativas.

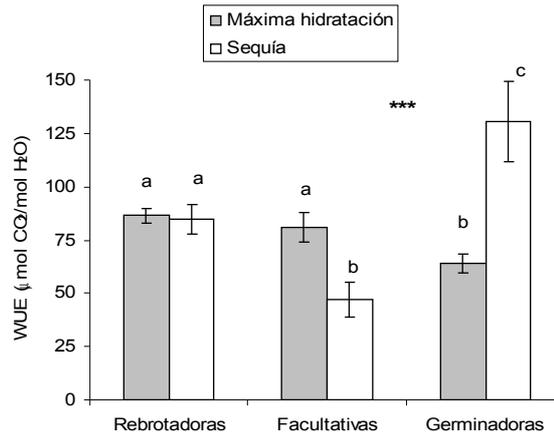


Fig. 2 Eficiencia en uso del agua para las tres estrategias estudiadas a máxima hidratación y en condiciones de sequía.

3.1.2. Relaciones hídricas celulares.

Se realizaron curvas de presión–volumen para estudiar las relaciones hídricas a nivel celular. Estas curvas permiten determinar diversas variables características de la especie y relacionadas con la estrategia hídrica. Entre las variables más importantes encontramos el potencial hídrico en el punto de pérdida de turgencia, el potencial osmótico o el contenido hídrico relativo celular. Se realizaron en especies con estrategia germinadora y rebrotadora, en un total de 18 especies (Fig. 3).

Los resultados muestran que las especies rebrotadoras mostraron potenciales hídricos en el punto de pérdida de turgencia más negativos que las especies no rebrotadoras y se separaron totalmente por estrategia ($p < 0,001$) (Fig. 3). Las rebrotadoras mostraron paredes más rígidas, perdiendo turgencia a contenidos hídricos relativos más altos, mientras que las no rebrotadoras mostraron paredes más elásticas, lo que les permite mantener la turgencia celular sin necesidad de bajar el potencial hídrico. También se observó una relación lineal negativa entre el potencial hídrico en el punto de pérdida de turgencia y el módulo de elasticidad, indicando que las especies con una pared más rígida (rebrotadoras) son las que pierden turgencia a potenciales más negativos.

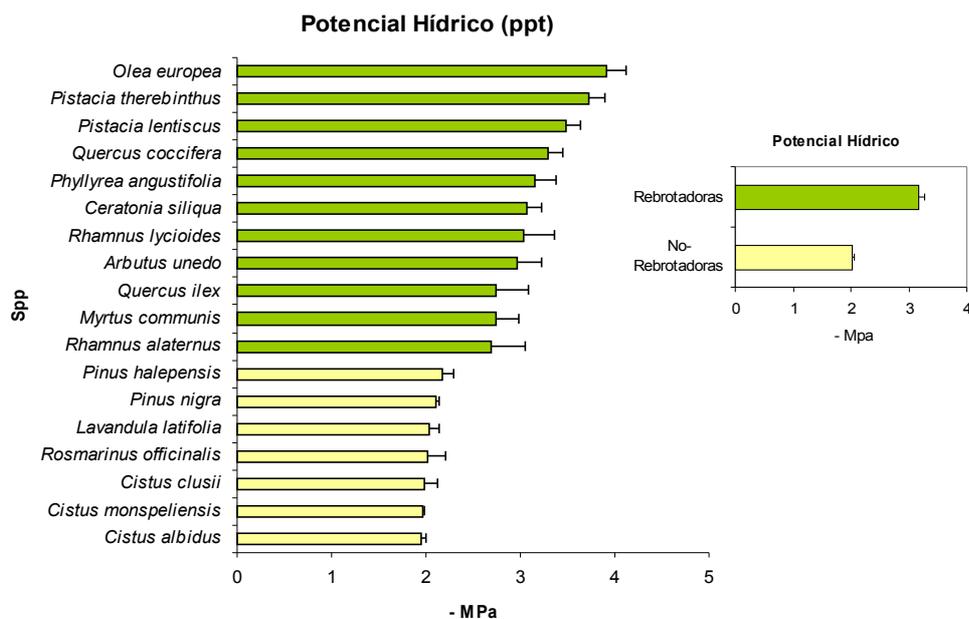


Fig. 3. Potencial hídrico en el punto de pérdida de turgencia (plasmolisis celular) para las diferentes especies analizadas. Color verde: rebrotadoras y color amarillo claro: germinadoras.

3.1.3. Experimento de resistencia foliar a las altas temperaturas en plantas rebrotadoras y no rebrotadoras

El objetivo de este trabajo fue determinar si la estrategia de regeneración estaba relacionada con una mayor o menor capacidad de aclimatación a altas temperaturas por parte de la maquinaria fotosintética. Para esto, hojas de cada especie fueron sometidas a altas temperaturas (entre 30°C y 55°C) en un baño termostático y evaluada su resistencia mediante fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm) utilizando los valores de daño incipiente (Lt₁₀), daño irreversible (Lt₅₀) y daño total (Lt₁₀₀). Las especies germinadoras mostraron un daño incipiente más temprano que las rebrotadoras observándose la misma tendencia para el daño irreversible y el daño total. Las distintas especies mostraron valores de Lt₁₀, Lt₅₀ y Lt₁₀₀ significativamente diferentes, y aunque en un rango corto de variación, sin embargo, se agruparon claramente en función de la estrategia regenerativa.

Tarea 3.2 Estudio de campo.

Durante la última parte del año 2008 y los primeros meses del 2009 se han visitado diversas zonas de la Comunidad Valenciana con el objetivo de localizar un área lo suficientemente extensa para ser representativa y con una elevada presencia de especies de las dos estrategias estudiadas (rebrotadoras y germinadoras). La zona seleccionada ha sido la zona de Pinet (sur de la provincia de Valencia). Durante la próxima primavera se realizará la primera campaña (máxima disponibilidad hídrica) para recoger las medidas previstas en la memoria del proyecto. Posteriormente, durante el periodo estival se realizará la segunda campaña que coincidirá con el momento de máximo estrés sufrido por las plantas.

Fruto de esta tarea, actualmente se ha realizado una publicación y dos presentaciones a congresos:

- Chirino, E., Vilagrosa, A., Cortina, J., Valdecantos, A., Fuentes, D., Trubat, R., Luis, V.C., Puértolas, J., Bautista, S., Baeza, J., Peñuelas, J.L & V. R. Vallejo. 2009. Ecological Restoration in Degraded Drylands: The Need to Improve the Seedling Quality and Site Conditions in the Field. In: Forest management. Nova Publisher.
- Hernández, E.I.; Vilagrosa, A.; Paula, S.; Pausas, J.. 2008. Morphological and functional traits in co-occurring Mediterranean species. XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB), 17-22 Agosto, Tampere, Finlandia.
- Luis, VC; Llorca, M; Pausas, J; Vilagrosa, A. 2008. Relaciones hídricas celulares en especies mediterráneas con estrategia regenerativa contrastada: Rebrotadoras y no rebrotadoras (germinadoras). IX simposium de relaciones hídricas en las plantas. Lloret de mar, Gerona. Presentación oral

TAREA 4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Las muestras de las especies (relacionadas en el anterior informe) han sido procesadas para realizar el estudio anatómico con el microscopio óptico y con Microscopía electrónica de Barrido (MEB) (en el SCSIE, Sección Microscopía Electrónica, Universitat de València).

Además de completar algunas secciones de muestras con la doble tinción descrita en el informe anterior, se han realizado cortes semifinos mediante el ultramicrotomo SORVALL MT 500, de la mayoría de las especies, para lo cual fragmentos de las hojas conservadas en etanol al 70% tras su fijación *in situ* han sido incluidos en resina LR White, London resins siguiendo las indicaciones de D'Ambrogio (1986) El material conservado fue fijado *in situ* en la mezcla tipo Karnoski (glutaraldehído y paraformaldehído) al 4% durante 8 horas, y lavado en una solución de tampón fosfato de Sorenson 0.1 M pH 7.2, en dos pasos de 30 minutos cada uno de ellos. Postfijación con O₄Os que proporciona electrodensidad a las muestras. Finalmente las secciones semifinas que se obtuvieron de las muestras infiltradas en resina se tiñeron mediante el colorante Azul de Toluidina.

Así mismo, para las especies con mayor cantidad de indumento, se han efectuado secciones paradermales de las hojas o folíolos que con la tinción diferencial Safranina-Verde rápido (Johansen, 1940) pone de manifiesto las paredes celulósicas así como las lignificadas o suberificadas, dando un contraste que facilita el estudio de las epidermis adaxial y abaxial, y por lo tanto el recuento de las células estomáticas y epidérmicas.

Se han realizado micrografías de las secciones transversales y paradermales de todo el material tratado con la finalidad de realizar las mediciones.

En cuanto al tratamiento de la muestra a estudiar en el MEB tras la recolección del material fue fijado rápidamente como se describe mas arriba. Las muestras fueron deshidratadas para eliminar el agua con series de etanol, 70, 96 y absoluto, con un par de lavados en cada etanol. Posteriormente se hace el secado en punto crítico, sustituyendo todo el etanol por CO₂ líquido mediante un Aparato marca Tousimis, modelo Autosamdri 814, que controla Temperatura y Presión, donde se alcanza un punto de equilibrio para que las superficies de la muestra no se colapsen al secarse. Se procede al montaje de los fragmentos a estudiar en soportes metálicos pegado con cinta de doble cara con carbón, para fijar el material con seguridad y garantía de estabilidad eléctrica de la muestra. Metalización con oro-paladio de las muestras, con sputtering (marca Polaron, sputter coater SC7620/QT). Las muestras a estudiar se introdujeron en un Microscopio Electrónico de Barrido HITACHI mod. S-2500, trabajando a 15 kV. La adquisición de imágenes se hizo con el programa Quartz PCI.

Relación de los parámetros medidos en las hojas estudiadas (desde el haz hasta el envés foliar):

- Grosor cutícula haz, Grosor epidermis haz, Tricomas haz, Glándulas haz, Estomas haz, Nivel estomas haz, Grosor pared externa epidermis haz
- Grosor total parénquima empalizada, N° capas parénquima empalizada, Tipo capas parénquima empalizada, Longitud células parénquima empalizada, Anchura células parénquima empalizada.
- Longitud haz vascular, Anchura haz vascular principal, Esclerénquima haz vascular, Colénquima haz vascular
- Grosor total parénquima lagunar, Longitud células parénquima lagunar, Anchura células parénquima lagunar
- Grosor epidermis envés, Grosor pared externa epidermis envés, Estomas envés, Nivel estomas envés, Glándulas envés, Tricomas envés, Grosor cutícula envés.

Las mediciones realizadas muestran correlación con la estrategia de persistencia postincendio de las especies estudiadas con algunos de estos caracteres. Con lo se corrobora la hipótesis inicialmente planteada sobre la relación de las características anatomo-histológicas de las hojas con la eficiencia en el uso de agua y resistencia al estrés hídrico.

En este momento los resultados se están analizando mas detalladamente, así como preparándolos para su presentación en reuniones científicas y posterior publicación.

Bibliografía:

D'Ambrogio de Argueso, A. 1986. Manual de técnicas en histología vegetal. Hemisferio Sur. Buenos Aires.
Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. Edit. Mc Graw Hill. Londres.

TAREA 5. ANÁLISIS DE DIVERSIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

Esta tarea finalizó durante el periodo pasado y dio lugar a la siguiente publicación (hipótesis 2 del proyecto):

Verdú M, Pausas JG, Segarra-Moragues JG, Ojeda F. 2007. Burning phylogenies: fire, molecular evolutionary rates and diversification. *Evolution* 61: 2195-2204.

TAREA 6. COMPILACIÓN Y BASE DE DATOS

Se ha continuado compilando información sobre características relacionados con la regeneración posincendio en especies de la Cuenca Mediterránea. Hasta el momento se ha

conseguido información para unas 860 especies (en 79 familias). Parte de los datos compilados se ha utilizado para validar la hipótesis 1 del proyecto en la siguiente publicación:

Paula S. & Pausas J.G. 2008. Burning seeds: Germinative response to heat treatments in relation to resprouting ability. *Journal of Ecology* 96: 543 - 552.

La base de datos entera (en su estado actual) se pone a la disposición de la comunidad científica en la siguiente publicación:

Paula S, Arianoutsou M, Kazanis D, Tavsanoğlu Ç, Lloret F, Buhk C, Ojeda F, Luna B, Moreno JM, Rodrigo A, Espelta JM, Palacio S, Fernández-Santos B, Fernandes PM, and Pausas JG. 2009. Fire-related traits for plant species of the Mediterranean Basin. *Ecology* 90 (en prensa).

2. Si ha encontrado problemas en el desarrollo del proyecto, coméntelos, especificando su naturaleza (de carácter científico, de gestión, etc).