

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL Y ENZIMÁTICO DE LOS
SIMBIONTES LIQUÉNICOS: ASPECTOS MICROCLIMÁTICOS
Y RELACIONES TALO-SUSTRATO



Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas con
mención Europea por:

ASUNCION DE LOS RÍOS MURILLO

Asunción de los Ríos

Trabajo realizado bajo la dirección de los doctores

CARMEN ASCASO CIRIA

VºBº

C. Ascaso

ROSALIA RAMÍREZ VERA

VºBº

R. Ramirez

A Mis padres

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quiero agradecer a todas las personas que han contribuido, de una manera u otra, a que esta tesis haya sido realizada. Es posible que alguna de ellas no sea nombrada pero mi agradecimiento es extensivo a todas ellas.

En primer lugar quiero mostrar mi más profundo agradecimiento a mis dos directoras de tesis, Carmen Ascaso y Rosalía Ramírez, por su dedicación, por todo lo que he aprendido con ellas y de ellas y por la confianza y el apoyo que siempre me han mostrado. A Carmen, por darme la oportunidad de trabajar con ella e introducirme en la microscopía, por su constante colaboración compartiendo conmigo muchas de sus ideas y por todas las oportunidades profesionales y formativas que me ha dado. A Rosalía por ser la que me introdujo en esto, por su paciencia en las duras horas de los electroenfoces y porque gran parte del orden con el que trabajo se lo debo a ella.

A Pilar Estévez le quiero agradecer toda su colaboración y dedicación desde que empecé, además de su incondicional apoyo tanto personal como profesional.

A Jacek Wierzychos por toda su ayuda en la microscopía confocal y en el estudio por microanálisis de la interfase talo-sustrato, por todas las ideas que me ha aportado y por estar siempre disponible a contribuir en este trabajo.

A Leopoldo García Sancho por sus ideas y sus contribuciones a la discusión de algunos de los resultados. A Fernando Valladares por toda su colaboración. A ambos agradezco su imprescindible ayuda en la realización y el análisis del estudio microclimático.

Especialmente quiero agradecer también a Fernando Pinto, M^a José Villoslada y Teresa Carnota por toda su colaboración en el día a día de la realización de esta tesis. A Fernando por su imprescindible apoyo técnico y colaboración y por todas sus interesantes ideas sobre cuestiones estéticas de la presentación de este manuscrito. A M^a José por toda su labor en la ultramicrotomía y en el procesado de las muestras sin la cual hubiera sido imposible llevar a cabo este trabajo. A Teresa por evitarme muchas de las tareas administrativas y por su total disponibilidad.

En el departamento de Geoquímica y mineralogía del Centro de Ciencias Medioambientales en el cual he estado integrada quiero expresar mi gratitud a las siguientes personas. A Ricardo Castelló por toda su colaboración en los aspectos geológicos y por su apoyo constante. A Virginia Galván por su amistad y aliento. A Willian Sanders por su ayuda con el inglés y por sus siempre estimulantes conversaciones científicas. A Virginia Souza por su colaboración en las últimas fases de esta tesis. También quiero agradecer al resto de miembros del departamento de Geoquímica y mineralogía en la persona de su directora Teresa García todo su interés.

En la cátedra de fisiología Vegetal, mi especial agradecimiento a Olvido Alguacil y Ángeles Guevara, por su compañerismo y amistad y por todos los buenos ratos que hemos pasado juntas. Quiero agradecer también a todo el resto de compañeros de laboratorio que he tenido a lo largo de estos años, de los primeros en especial a Berna de los Ríos por su aliento y amistad y de los últimos a M^a Carmen por su ayuda en las electroforesis. Mi gratitud también a Raquel por toda su colaboración y disponibilidad y a Teresa Rodríguez por su interés.

A Goran Samuelsson y Kristin Palmqvist (Universidad de Umea, Suecia), por su cordial acogida y por toda su ayuda en el trabajo realizado durante mi estancia entre ellos.

A Luis Balaguer por su contribución en el análisis de algunos de los resultados de esta tesis y por su apoyo y estímulo constante.

A Joaquín Moreno y Carlos García-Ferris del departamento de Bioquímica de la Universidad de Valencia, por suministrarme el anticuerpo frente a la subunidad L de la Rubisco de Euglena gracilis.

A M^a Rosario de Felipe y todo su equipo por toda su colaboración y en especial a Cristina de Lorenzo por introducirme en las técnicas inmunocitoquímicas.

A Ángela Ruano por su compañía en la recolección de muestras y Ana Pintado que también contribuyó a la recogida de los datos microclimáticos.

Esta tesis ha sido realizada gracias a la concesión por parte del Ministerio de Educación y Ciencia de una beca de formación de Personal Investigador.

A mi familia por todo su apoyo y comprensión durante estos años de tesis, en especial a mis padres porque sin ellos hubiera sido muy difícil llegar al final y a mis hermanos.

Indice

Introducción general.....	1
I. Simbiosis líquénica.....	1
II. Planteamiento y objetivos generales.....	3
III. Descripción de las especies.....	6
IV. Caracterización de la zona de estudio.....	7
1 Caracterización microclimática y estudio de los períodos de actividad líquénica potencial en la alta montaña mediterránea.....	14
1.1. Introducción.....	14
1.2. Material y métodos.....	16
1.3. Resultados.....	19
1.3.1. Caracterización microclimática	19
1.3.2. Caracterización de los períodos de actividad líquénica potencial.....	21
1.3.3. Evolución microclimática diaria.....	26
1.3.4. Resumen de los principales resultados.....	31
1.3.5. Características de los períodos previos a las recolecciones.....	32
2 Caracterización de las actividades nitrato reductasa y ribonucleasa en talos líquénicos.....	44
2.1. Introducción.....	44
2.1.1. Ribonucleasas.....	44

2.1.2. Nitrato reductasas.....	46
2.2. Material y métodos.....	48
2.2.1. Actividad ribonucleasa.....	48
2.2.1.1. Extracción enzimática	
2.2.1.2. Actividad enzimática	
2.2.1.3. Localización subcelular de la actividad RNasa de <i>Lasallia hispanica</i>	
2.2.1.4. Determinación del pH óptimo y sensibilidad al EDTA	
2.2.1.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS)	
2.2.1.6. Isoelectroenfoque en placa	
2.2.1.7. Localización de proteínas en geles de electroforesis y electroenfoque	
2.2.1.8. Localización de la actividad RNasa en geles de electroforesis y electroenfoque	
2.2.1.9. Determinación del peso molecular por FPLC	
2.2.2. Actividad nitrato reductasa.....	56
2.2.2.1. Valoración de la actividad nitrato reductasa	
2.2.2.2. Variabilidad intertalina e intratalina en <i>Lasallia hispanica</i>	
2.3. Resultados.....	58
2.3.1. Actividad ribonucleasa.....	58
2.3.1.1. Distribución subcelular de <i>Lasallia hispanica</i>	
2.3.1.2. pH óptimo y sensibilidad al EDTA	
2.3.1.3. Características electroforéticas	

2.3.1.4. Cálculo del peso molecular por cromatografía en gel en <i>Lasallia hispanica</i>	
2.3.2. Actividad nitrato reductasa.....	60
2.3.2.1. Actividad nitrato reductasa en talos liquénicos	
2.3.2.2. Variabilidad intertalina e intratalina en <i>Lasallia hispanica</i>	
2.4. Discusión.....	62
2.4.1. Actividad ribonucleasa.....	62
2.4.2. Actividad nitrato reductasa.....	63
3 Adquisición fotosintética del CO ₂ en <i>Trebouxia</i> aislada y liquenizada.....	66
3.1. Introducción.....	66
3.2. Material y métodos.....	68
3.2.1. Recolección del material y cultivo del alga.....	68
3.2.2. Procesamiento de las muestras para microscopía electrónica de transmisión.....	69
3.2.2.1. Protocolo para el procesamiento de muestras para la observación convencional	
3.2.2.2. Protocolo para el procesamiento de muestras para estudios inmunocitoquímicos	
3.2.3. Procesos inmunocitoquímico para la localización de la Rubisco.....	71
3.2.4. Medidas de fluorescencia	72
3.2.5. Medidas de la evolución fotosintética del oxígeno....	73
3.2.6. Medida de la actividad carbónico anhidrasa.....	74

3.3. Resultados.....	77
3.3.1. Localización de Rubisco.....	77
3.3.2 Medidas de fluorescencia.....	78
3.3.3. Evolución fotosintética del oxígeno.....	78
3.3.4. Actividad carbónico anhidrasa en <i>Lasallia hispanica</i> y <i>Trebouxia erici</i>	78
3.4. Discusión.....	80
4 Variaciones ultraestructurales y anatómicas estacionales y relacionadas con el microclima.....	84
4.1. Introducción.....	84
4.2. Material y métodos.....	86
4.2.1. Recolección del material.....	86
4.2.2. Procesamiento del material.....	86
4.2.3. Técnicas de cuantificación.....	87
4.2.4. Análisis estadístico.....	88
4.3. Resultados.....	89
4.3.1. Estudio ultraestructural cuantitativo del fotobionte de <i>Lasallia hispanica</i> , <i>Parmelia omphalodes</i> y <i>Cornicularia</i> <i>normoerica</i>	89
4.3.2. Estudio ultraestructural cuantitativo del micobionte de <i>Lasallia hispanica</i> , <i>Parmelia omphalodes</i> y <i>Cornicularia</i> <i>normoerica</i>	90
4.3.3. Estudio ultraestructural cuantitativo del fotobionte en relación a variaciones estacionales y microclimáticas.....	92

4.3.4. Estudio ultraestructural cuantitativo del micobionte en relación a variaciones estacionales y microclimáticas.....	100
4.3.5. Importancia del fotobionte en la capa algal y diferencias a nivel anatómico en los talos.....	104
4.4. Discusión.....	106
4.4.1. Estudio ultraestructural.....	106
4.4.2. Estudio del volumen relativo de las células del fotobionte y de diferencias anatómicas	115
5 Cambios en parámetros fisiológicos en relación a variaciones estacionales y microclimáticas.....	119
5.1. Introducción.....	119
5.2. Material y métodos.....	121
5.2.1. Recolección del material.....	121
5.2.2. Procesamiento del material.....	121
5.2.2.1. Actividad ribonucleasa y nitrato reductasa	
5.2.2.2. Contenido en Rubisco	
5.2.2.3. Contenido en clorofilas	
5.2.3. Actividad ribonucleasa.....	122
5.2.4. Actividad nitrato reductasa.....	122
5.2.5. Determinación del contenido en clorofilas.....	123
5.2.6. Determinación del contenido en proteínas.....	124
5.2.7. Estudio electroforético.....	124
5.2.8. Proceso inmunocitoquímico de localización de la Rubisco.....	124

5.2.9. Cuantificación del contenido en Rubisco.....	124
5.2.10. Estudio estadístico.....	125
5.3. Resultados.....	126
5.3.1. Actividad ribonucleasa.....	126
5.3.2. Actividad nitrato reductasa.....	128
5.3.3. Evaluación de la cantidad de clorofilas.....	129
5.3.4. Proteínas.....	131
5.3.5. Patrón proteico.....	131
5.3.6. Inmunomarcado de la Rubisco.....	132
5.4. Discusión.....	135
6 Cambios ultraestructurales y enzimáticos relacionados con variaciones en el contenido hídrico de los talos.....	142
6.1. Introducción.....	142
6.2. Material y métodos.....	145
6.2.1. Material vegetal.....	145
6.2.2. Microscopía de barrido a bajas temperaturas.....	145
6.2.3. Microscopía confocal.....	147
6.2.4. Ciclos de hidratación-deshidratación para el estudio enzimático.....	147
6.3. Resultados.....	149
6.3.1. Estudio del aspecto general del talo.....	149
6.3.2. Modificaciones del fotobionte según el grado de hidratación.....	151
6.3.3. Modificaciones del micobionte con el grado de hidratación.....	153

6.3.4. Actividad ribonucleasa.....	154
6.3.5. Actividad nitrato reductasa en <i>Lasallia hispanica</i>	155
6.3.6. Patrón electrofórmico.....	155
6.4. Discusión.....	158
7 Estudio de la interfase talo-sustrato.....	165
7.1. Introducción.....	165
7.2. Material y métodos.....	168
7.2.1. Recolección del material.....	168
7.2.2. Procesamiento del material.....	168
7.2.3. Observación del material.....	169
7.2.4. Inmunolocalización de la Rubisco en microorganismos litobióticos.....	169
7.3. Resultados.....	170
7.4. Discusión.....	175
Conclusiones generales.....	181
Bibliografía.....	187

Abreviaturas

ANOVA: análisis de la varianza

AZA: acetazolamida

CA: carbónico anhidrasa

CCM: mecanismo concentrante de CO₂

CHR: contenido hídrico relativo

CLSM: Microscopio Láser Confocal

DIC: carbono inorgánico disuelto

DEE: distribución espacial de los elementos.

EDTA: ácido etilendiaminotetracético sal disódica.

EZA: etoxizolamida

FPLC: Fast Permeation Liquid Chromatography

LTSEM: Microscopio Electrónico de Barrido a Bajas Temperaturas (Crio MEB)

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

PFFD: flujo incidente de fotones fotosintéticamente activos.

RNasa: ribonucleasa.

Rubisco: Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa

SDS: dodecil sulfato sódico

SEM: Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)

"SEM-BSE": Se utiliza esta terminología para denominar la aplicación de la microscopía electrónica de barrido en modo de electrones retrodispersados (SEM-BSE) a secciones transversales de la interfase talo-sustrato, fijadas, incluidas en resina y pulidas.

SEM-EDS: Microscopio Electrónico de Barrido y microanálisis de rayos X por dispersión de energía.

TEM: Microscopio Electrónico de Transmisión (MET)

Vv: volumen relativo

Introducción general

I. Simbiosis líquénica

Los líquenes son una simbiosis constituida basicamente por un hongo, micosimbionte y un alga y/o una cianobacteria, fotosimbionte. En palabras de Margulis y Sagan (1995) el resultado de la simbiosis es mucho mas que una simple suma, es una sorpresa aditiva, donde de algún modo, el alga y el hongo perciben la presencia del otro, formando un consorcio emprendedor y complejo.

Dentro de los organismos considerados como líquenes los tipos de asociaciones que tienen lugar entre simbiosiontes son muy variados. Los líquenes incluyen desde asociaciones, de forma practicamente al azar, de unas pocas células de fotobionte con células fúngicas (Caliciales), a asociaciones donde las células del fotobionte y el micobionte se organizan en un talo y las células del fotobionte se sitúan en una capa bajo el tejido fúngico cortical. En estos últimos casos, el liquen tiene muy poco parecido con los biontes que lo constituyen. Debido a todos estos diferentes grados de liquenización es muy difícil encontrar una definición que pueda incluir a todos las distintas relaciones existentes dentro de los líquenes (Nash, 1996a).

La naturaleza de la simbiosis líquénica ha sido ampliamente debatida desde que en 1869 Schwendener propusiera la idea de que los líquenes eran organismos de naturaleza dual y todavía en nuestros días sigue siendo objeto de debate. Para muchos autores los líquenes son un ejemplo claro de mutualismo en el que todos los miembros de la asociación obtienen beneficio de la relación. Alternativamente, los líquenes son considerados como un ejemplo de parasitismo controlado debido a que el hongo parece obtener la mayoría de los beneficios y que el organismo autótrofo en estado liquenizado crece de forma más lenta que en vida libre (Ahmadjiam, 1993). Kappen en 1994 tampoco encuentra desde un punto de vista ecofisiológico fundamentos para considerar que exista una relación mutualista entre ambos simbiosiontes.

En relación a estas dos concepciones es interesante destacar los siguientes aspectos:

- Está bien establecido la existencia de un flujo de carbohidratos desde el fotobionte al micobionte, en forma de polioles en el caso algas verdes y de glucosa en cianolíquenes (Smith & Douglas, 1987). Sin embargo, no está demostrado que exista flujo del micobionte al fotobionte, aunque no se puede descartar que el micobionte actúe como reservorio de nutrientes inorgánicos, al igual que sucede en otras simbiosis (Nash, 1996a).
- En los líquenes se producen compuestos secundarios únicos en la naturaleza y que generalmente no son producidos por los componentes de la simbiosis cuando no están en estado liquenizado.
- La simbiosis liquénica supone un éxito desde el punto de vista ecológico ya que los líquenes se encuentran en todos los hábitats terrestres desde los trópicos hasta las regiones polares. Como resultado de la simbiosis las algas y las cianobacterias, que funcionan como fotobiontes y los hongos que funcionan como micobiontes, se han expandido en hábitats donde aisladamente serían raros o no existirían. La mayoría de las algas de vida libre y cianobacterias se encuentran en hábitats acuáticos o al menos en hábitats terrestres muy húmedos, sin embargo, cuando forman parte de los líquenes pueden existir en hábitats frecuentemente secos (Nash, 1996a). Esta idea no es apoyada por todos los autores; en este sentido, Kappen (1994) considera que en general, no hay indicios de que la simbiosis sea una respuesta adaptativa de los organismos autótrofos, ya que las algas verdes y las cianobacterias de vida libre están presentes en la mayoría de los lugares donde los líquenes son pioneros y en ambientes con condiciones muy adversas.
- La organización del micobionte en el talo podría permitir una mayor acumulación de agua que beneficie al fotobionte (Nash, 1996a). Sin embargo, un alto contenido hídrico en los talos, puede no suponer tal beneficio porque provoca un aumento de la resistencia a la difusión del CO₂ (Lange et al., 1996).

- Una alta intensidad luminosa puede afectar adversamente al fotobionte; la formación por parte del micobionte de un cortex grueso y la pigmentación debida a sustancias liquénicas protege parcialmente al fotobionte ante una radiación excesiva.

De todo lo expuesto anteriormente se deduce que los beneficios obtenidos por el micobionte son mucho más claros que los del fotobionte. Pero quizás, lo mas importante no es tratar de evaluar la liquenización sólo desde un punto de vista coste-beneficio sino reconocer el gran éxito de la estrategia de la liquenización (Nash, 1996a). La vida puede evolucionar súbitamente a saltos cuando se unen partes separadas (Margulis & Sagan, 1995); la simbiosis liquénica pudo suponer un cambio evolutivamente importante y su permanencia hasta nuestros días demuestra sus ventajas. Es fundamental tener en cuenta que los líquenes son capaces de crecer en hábitats donde otros organismos menos emprendedores no son capaces de hacerlo (Margulis & Sagan, 1995).

II. Planteamiento y objetivos generales

En esta tesis se ha pretendido ahondar en el conocimiento de los simbioses liquénicas, obteniendo nuevos datos que permitan comprender mejor el funcionamiento de la simbiosis liquénica en condiciones naturales. Para ello, el trabajo se ha planteado a diferentes niveles: ultraestructural, anatómico y bioquímico, con el fin de obtener una idea global de la ecofisiología de los líquenes estudiados. Los aspectos de la simbiosis investigados en esta tesis pueden ampliar el conocimiento de su funcionamiento con un nuevo enfoque (microclima y sustrato), para lo cual, se han utilizado técnicas de imagen y bioquímicas, que en muchos casos se han puesto a punto en líquenes durante la realización de este trabajo.

El desarrollo de los talos liquénicos está muy influenciado por condiciones microclimáticas y por el sustrato sobre el que se asientan. El microclima y el sustrato pueden tener un papel fundamental en el funcionamiento de la simbiosis y es por ello por lo que se ha planteado su investigación.

La zona de estudio elegida, la cual será descrita con detalle en este mismo capítulo, pertenece a la zona denominada como alta montaña mediterránea. Esta zona presenta la peculiaridad de un clima caracterizado por una gran sequía estival, una elevada radiación que se mantiene durante todo el período invernal y un marcado contraste de temperaturas entre el verano y el invierno (Pintado, 1996). Aunque todas estas características hacen de ella un lugar de gran interés para investigaciones ecofisiológicas en líquenes, sólo en los últimos años se han abordado estudios en estas zonas (Sancho & Kappen, 1989; Valladares, 1993; Sancho et al., 1994 y 1997; Pintado, 1996).

Para poder estudiar la influencia del microclima sobre los líquenes, el trabajo se ha centrado en talos liquénicos de las especies *Lasallia hispanica*, *Parmelia omphalodes* y *Cornicularia normoerica*, recolectados en dos zonas muy próximas pero con características microclimáticas, *a priori*, muy diferentes y, de forma simultánea a la recolección del material, se ha realizado el seguimiento de ciertos parámetros microclimáticos a lo largo del año. En los líquenes recolectados se han estudiado aquellos parámetros ultraestructurales, anatómicos y fisiológicos que puedan estar influenciados por variaciones microclimáticas y estacionales. Con toda la información obtenida se ha tratado de establecer algunas pautas de comportamiento, de las especies liquénicas estudiadas, en su ambiente natural.

Para tratar de clarificar los cambios ultraestructurales y enzimáticos que se pueden producir en estas especies, tanto por variaciones microclimáticas como estacionales, se han llevado a cabo experimentos en el laboratorio bajo condiciones controladas. Se han estudiado los efectos de ciclos de hidratación-deshidratación sobre parámetros ultraestructurales y enzimáticos iguales a los que se estudian en condiciones naturales. También se han abordado estudios encaminados al conocimiento del funcionamiento de los procesos de adquisición fotosintética del CO₂ y su relación con el mecanismo concentrante de CO₂, que permitan comprender estos procesos en condiciones naturales.

Por último, para el estudio de las relaciones de los líquenes con el sustrato sobre el que se asientan se ha planteado la investigación de la interfase talo liquénico-sustrato. El sustrato con sus características específicas y los microorganismos que pueden vivir en él, están en estrecho contacto con el talo, por lo que las interrelaciones existentes entre todo el sistema pueden tener influencia en el establecimiento y mantenimiento de la simbiosis. Este es un tema que no ha sido muy estudiado hasta el momento y que puede aportar nuevos datos sobre el funcionamiento de la simbiosis.

Los objetivos generales propuestos con la finalidad de cumplir los citados planteamientos se resumen en:

- 1.- Caracterización microclimática y estudio de los períodos de actividad potencial en la alta montaña mediterránea.
- 2.- Caracterización de las actividades ribonucleasa y nitrato reductasa en talos liquénicos.
- 3.- Caracterización de la adquisición fotosintética del carbono en *Trebouxia* aislada y liquenizada.
- 4.- Estudio de las variaciones ultraestructurales y anatómicas en relación a variaciones microclimáticas y estacionales.
- 5.- Estudio de los cambios de los parámetros fisiológicos siguientes: actividad ribonucleasa, actividad nitrato reductasa, contenido en Rubisco, clorofilas y proteínas, en relación a variaciones microclimáticas y estacionales.
- 6.- Estudio de cambios ultraestructurales y enzimáticos relacionados con variaciones en el estado hídrico del talo.
- 7.- Estudio de la interfase talo-sustrato en relación a aspectos bióticos y abióticos.

Cada uno de estos objetivos generales constituirá un capítulo, al principio del cual se plantearán los objetivos específicos derivados del mismo (aparecen en negrita en cada introducción).

III. Descripción de las especies

Parmelia omphalodes:

Talos de hasta 20 cm, a menudo en apretado contacto con otros talos cubriendo amplias extensiones; están compuestos por lóbulos de ± 4 mm de ancho, algo quebradizos, sublineales, discretos, contiguos o imbricados y con ápices marcadamente truncados; superficie superior brillante marrón oscuro o parcialmente gris (en localidades de sombra) con pseudocifelas ovaladas o elongadas, las cuales se fusionan frecuentemente para formar una red blanca mas o menos continua; superficie inferior negra, rugosa con numerosas rizinas simples o bifurcados, raramente ramificados. Apotecios infrecuentes.

Biotipo foliáceo. Se asienta sobre rocas silíceas pobres en nutrientes.

Cornicularia normoerica:

Talos de 1-2 cm de alto, formando arbustillos más o menos erectos, firmemente unidos al sustrato; las ramas principales son de 0.3-1 mm de ancho, erectas, rígidas, duras, aplanadas, moderadamente ramificadas y afiladas hacia los ápices; la superficie es negra-marrón, más o menos brillante. Muestra con frecuencia apotecios de 1-5(-8) mm de diámetro, apicales o subapicales, constituidos por discos negros y brillantes, normalmente con algunas proliferaciones cilíndricas.

Biotipo fruticuloso. Se asientan sobre rocas silíceas.

Lasallia hispanica:

Talos de 2-8 cm de diámetro, moderadamente pustulado. Superficie superior grisácea, fuertemente areolada o lisa y espinoso-areolado en la zona central. Superficie inferior gris o marrón, mas o menos oscura, negruzca alrededor del ombligo, lisa o ligeramente areolada. Escasos isidios, marginales y laminares, negros e irregularmente ramificados (no coraloides). Apotecios comunes, redondeados, 1-2,5 (-3) mm de ancho, estipitados, a menudo con borde corticado, disco plano negro y ligeramente cóncavos.

IV. Caracterización de la zona de estudio

Situación geográfica

Las muestras han sido recolectadas en tres localizaciones situadas en la Sierra de Guadarrama (Sistema Central) que pertenece a la región Mediterránea y dentro de ella a la provincia Carpetano-Ibérico-Leonesa, sector Guadarrámico (subsector Guadarramense) (Rivas-Martínez et al., 1987). La zona de estudio se encuentra localizada en la hoja denominada Puerto de Navacerrada del mapa topográfico nacional, a escala 1:25.000, de la hoja de Cercedilla nº 508 del mapa topográfico nacional de España a escala 1:50.000 (II cuadrante).

Las tres áreas estudiadas denominadas: El Ventorrillo, Las Cabrillas y Bola del Mundo, están situadas en el sector oeste de Cuerda Larga, con la localización geográfica que se indica a continuación:

Localidad de El Ventorrillo (1600 m.s.m.): Se encuentra localizada al norte de la estación biogeológica de El Ventorrillo, más concretamente en el arroyo de la Fraguilla, en la vertiente meridional de la Sierra de Guadarrama. Sus coordenadas geográficas son: longitud 4°01'31" y latitud: 40°45'57" (Meridiano Greenwich).

Localidad de Las Cabrillas (1936 m.s.m.): Localizada en la zona cumbreña de la Cuerda de las Cabrillas, próxima a la zona norte del Risco de los Emburriaderos. Sus coordenadas geográficas son: longitud 3°59'50" y latitud 40°46'40" (Meridiano Greenwich).

Localidad de Bola del Mundo (2257 m.s.m.): Se encuentra localizada casi en el vértice y un poco al SE de Bola del Mundo. Sus coordenadas geográficas son: longitud 3°58'45" y latitud 40°47'05" (Meridiano Greenwich).

Entre la primera y la última localidad hay una distancia, en dirección SW-NE, de 6,5 Km.

Generalidades y morfoestructura

La Sierra de Guadarrama está ubicada en la parte más oriental del Sistema Central y presenta la morfología típica de este sistema: presencia de horst y grabens dando lugar a bloques graníticos con características distintas en cada sector. Su límite al este queda definido en la depresión de Buitrago (Somosierra) pero el occidental no queda caracterizado por falta de criterios orográficos y geológicos definitivos. Unos autores lo sitúan en la desembocadura del río Alberche en el Tajo y otros en la sierra de Malagón y su entorno.

En conjunto, las áreas de estudio se ubican en el horst intermedio de los tres que Pedraza et al. (1994) diferencia en la Sierra de Guadarrama. Este horst comprende la lineación Cuerda Larga-Llanos de la Morcuera. A lo largo de esta dirección, la interferencia de uno de los bloques alineados con otros secundarios, perpendiculares, han ocasionado morfologías en teclas de piano.

En este sector de la Sierra de Guadarrama el modelado más próximo en el tiempo se ha llevado a cabo por procesos fluviales, glaciares, periglaciares, gravitacionales y mixtos. La

intensidad e influencia es muy dispar siendo dominantes los procesos fluviales. Los únicos cursos de agua próximos son: al oeste el Arroyo de la Fraguilla que va a desembocar al río Navalmedio y el Arroyo de Peña Cabrita que junto con el Regajo del Pez y el del Cancho Negro da origen al río Navacerrada.

Los procesos glaciares en Cuerda Larga afectaron a ambas vertientes y fue una de las zonas de Guadarrama junto con el macizo de Peñalara y Peña Cabras donde estos procesos tuvieron su máximo desarrollo. Se trata en esencia de glaciares de circo en los que la cuenca de alimentación comenzaba alrededor de los 2000 m y los frentes de fusión, en la laguna de los Pájaros, a cotas variables desde 1650 m hasta 2170 m. Estos episodios se consideran producidos en la fase Würm (Pleistoceno superior).

El periglacialismo se manifiesta en formas morfológicas de canchales y pedreras, asociados a crestas y aristas. Estos procesos permanecen activos en la actualidad, aunque son la arroyada de fusión y la soliflucción los procesos dominantes.

Los bloques graníticos aludidos anteriormente vienen definidos por fallas y estas líneas de falla son concordantes con las direcciones de las laderas, por lo que éstas pueden considerarse estructurales, es decir las laderas son escarpes de falla.

Las acciones modeladoras sobre el paisaje se han quedado reducidas a efectos puntuales (glaciares, cuencas de recepción, etc) o lineaciones tectónicas (barranco, vaguadas, etc) que introducen pocos cambios al relieve inicial. En resumen, el único agente importante del modelado es la arroyada pluvial y nival (escorrentía en su sentido amplio). Quizás sea necesario hacer mención a los fenómenos de tipo gravitacional que pueden provocar deslizamientos de ladera de forma combinada con procesos de soliflucción y preferentemente en zonas donde aparezca una litología apropiada (canchales periglaciares).

Por último, es importante destacar que la cobertura edáfica está altamente erosionada y degradada por la acción antrópica lo que implica la posibilidad de producirse fenómenos de vertiente con arrastres por lavado de los sedimentos no fijados por la vegetación.

Encuadre geológico

La zona de desmuestra está constituida por rocas ígneas y metamórficas pertenecientes al Macizo Hercínico de edades precámbrico-paleozoicas. Estos materiales están afectados por la orogenia Hercínica y están ubicados en la zona Galaico-Castellana de Lotze (1945) o dentro de la zona Centro-Ibérica de Julivert et al (1972).

Dentro de la división que hace Bellido et al (1981) del Sistema Central la presente zona se localiza en el dominio central caracterizado por lo siguiente:

- Presencia de series preordovícicas exclusivamente.
- Alto grado de metamorfismo.
- Procesos de anatexia.
- Presencia de rocas graníticas tardihercínicas.

Localmente en el punto denominado El Ventorrillo la litología es una adamellita porfídica de grano grueso con fenocristales de feldespato y con enclaves o diques, de pequeña extensión o potencia, de microdioritas y pórfidos graníticos. Las adamellitas están compuestas por cuarzo, plagioclasa, feldespato potásico y biotita; los enclaves de microdioritas por plagioclasa, hornblenda y biotita como minerales principales y finalmente los pórfidos graníticos por cuarzo, plagioclasa, feldespato potásico y biotita.

En Las Cabrillas afloran leucogranitos de grano fino-medio. La composición mineralógica de estas rocas es de cuarzo, feldespato potásico, plagioclasa, biotita y moscovita, viéndose algún cristal de cordierita pequeño. Como accesorios se observan apatito, circón, opacos y turmalina. Puntualmente, se pueden apreciar coloraciones rojizas en estas rocas que corresponden a fenómenos de episienitización. Estos leucogranitos están atravesados por diques de pórfidos graníticos de dirección ENE-ESE, de potencia muy variable y formados por cuarzo, plagioclasa, feldespato potásico y biotita.

En **Bola del Mundo** los líquenes tienen un sustrato de rocas metamórficas (ortoneises glandulares). Son rocas cuarzofeldespáticas con megacristales de feldespato y algo de biotita.

Vegetación y bioclimatología

En la Sierra de Guadarrama están representados cuatro de los seis pisos bioclimáticos reconocidos en la región Mediterránea: mesomediterráneo, supramediterráneo, oromediterráneo y criomediterráneo (Rivas-Martínez et al., 1990). Las principales series de vegetación climatófilas correspondientes a estos cuatro pisos bioclimáticos son:

- Serie mesosupramediterránea de encinares silícolas Junipero oxycedri-Querceto rotundifoliae S.
- Serie supramediterránea subhúmeda-húmeda silícola de roble melojo, luzulo forsteri-Quercet pyrenaicae S.
- Serie oromediterránea silícola de los pinares, enebrales y piornales, senecioni carpetani-cytiseto oromediterranei S.
- Serie Criomediterránea de los pastizales psicroxerófilos, hieracio myriademni- Festuceto aragonensis S.

Las tres áreas estudiadas tienen las siguientes características:

Localidad de El Ventorrillo: se clasifica en la serie supramediterránea silícola de melojares supramediterráneos. Es una zona de bosque de pinares de repoblación de *Pinus sylvestris* L. var iberica con abundancia de *Pteridium aquilinum* L. y presencia de *Cytisus scoparius* (L.) Link y *Cistus laurifolius* L..

Localidad de Las Cabrillas: se clasifica en la serie oromediterránea silícola de pinares albares (*Pinus sylvestris* L. var iberica), piornales (*Cytisus oromediterraneus* Rivas-Martínez, T.E. Díaz, F. Prieto, Loidi & Peñas) y enebrales rastreros (*Juniperus communis* L. subespecie alpina). El

área de estudio comprende una zona de roquedo cumbreño, situada por encima del bosque y por tanto totalmente expuesta.

Localidad de Bola del Mundo: se clasifica en la serie criomediterránea de pastizales psicoxerófilos con presencia de *Festuca indigesta* Boiss. Constituye una zona totalmente expuesta.

1 Caracterización microclimática y estudio de los períodos de actividad liquénica potencial en la alta montaña mediterránea

1.1. INTRODUCCIÓN

El funcionamiento de la simbiosis liquénica en su ambiente natural está muy influenciado por el microclima de los biotopos. Las respuestas fisiológicas de los talos liquénicos son más dependientes de las características microclimáticas que de las climáticas debidas a la latitud (Kershaw, 1985). Los factores que mayor influencia tienen en la fisiología liquénica son fundamentalmente la luz, la humedad y la temperatura.

La radiación recibida por los talos es fundamental para los procesos fotosintéticos. La radiación fotosintéticamente activa se encuentra en el rango de 400-780 nm y puede ser fácilmente cuantificada por medio de sensores específicos (Nash, 1996b). Además de la intensidad de la radiación recibida, el fotoperiodo es otro factor que parece controlar las respuestas acomodativas de la fotosíntesis en condiciones naturales (Kramer, 1980; Tudela & Tadeo, 1993; Nash, 1996).

Respecto a la humedad, los líquenes como organismos poiquilohídricos son enteramente dependientes de períodos de lluvia, niebla o elevada humedad relativa ambiental que les permita alcanzar un nivel óptimo de hidratación y con ella una actividad metabólica relevante (Kershaw, 1985).

Los líquenes tienen la capacidad de sobrevivir a un amplio rango de temperaturas. Las temperaturas a las que los líquenes están expuestos en sus microhábitats pueden variar mucho respecto a las del aire circundante. En hábitats expuestos, las temperaturas suelen exceder a las del aire y sin embargo, en hábitats protegidos son similares o inferiores a las del aire circundante (Ahmadjian, 1993). El desarrollo reciente de sensores de temperatura tan finos que pueden ser introducidos en el interior de los talos liquénicos, permite una mejor determinación de la

temperatura de los talos. De esta forma, es posible conocer su temperatura interna que depende de la evapotranspiración y de la cantidad total de radiación absorbida por el talo, la cual es dependiente entre otros factores de su color y textura (Sancho & Kappen, 1989; Sancho et al., 1994).

En los ambientes rupícolas pueden existir importantes diferencias entre macro- y microclima que pueden permitir la presencia de comunidades liquénicas en regiones que aparentemente son poco apropiadas para ellas. La decisiva influencia de pequeñas variaciones topográficas en la distribución de las especies liquénicas ha sido demostrada en diversas regiones bioclimáticas, especialmente en zonas polares y subpolares (Kershaw & Larson, 1974; Jahns & Ott, 1983). En la alta montaña mediterránea se alternan estacionalmente condiciones típicas de la alta montaña centro europea con largos períodos de sequía estival. Debido a estas características climáticas, las especies que viven en este medio deben poseer mecanismos de adaptación específicos a estas situaciones extremas. La habilidad para adaptarse a diferentes condiciones de temperatura, luz, longitud del día y humedad, permite a los líquenes optimizar sus procesos fisiológicos (Hahn et al., 1989), sin embargo, la capacidad adaptativa y acomodativa es limitada por lo que los líquenes de estos hábitats pueden sufrir estrés en situaciones tales como:

- Altos niveles de radiación, sobre todo cuando los talos tienen un alto grado de hidratación, como puede ser durante los períodos de fusión de la nieve o las tormentas de verano.
- Cambios bruscos de temperatura dependientes de la exposición y de la alternancia día-noche.
- Déficit hídrico estival.

Debido a la gran influencia que el microclima parece tener en la fisiología liquénica y la falta de una caracterización microclimática anual en la alta montaña mediterránea, se han propuesto los siguientes objetivos:

1.- Caracterizar desde un punto de vista microclimático, dos biotopos rupícolas de la alta montaña mediterránea frente a las variaciones climáticas estacionales a lo largo de un año de medidas ininterrumpidas. Para ello se instaló un sistema de evaluación microclimática en continuo, en dos localidades de diferente altitud en la Sierra de Guadarrama.

2.- Caracterizar los períodos de actividad potencial de los talos liquénicos en la zona de estudio.

1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Una de las estaciones microclimáticas se instaló en la localidad de El Ventorrillo (Sierra de Guadarrama) en la cara oeste de un roquedo granítico donde crecen las poblaciones de *Lasallia hispanica* y *Parmelia omphalodes*. La segunda estación se instaló en la Cuerda de las Cabrillas (Sierra de Guadarrama) en las caras sur y noroeste de un roquedo granítico. Las dos localidades son ecológicamente muy diferentes (Introducción, apartado II), la de Las Cabrillas es una zona totalmente expuesta (Fig. 1a) y la de El Ventorrillo está situada en una zona boscosa (Fig. 1b).

En El Ventorrillo, se instalaron cuatro sensores de temperatura de 1,5 mm de grosor (Thermistor, Grant Instrument, GB), introduciéndose dos de ellos entre los lóbulos de *P. omphalodes* y otros dos bajo talos de *L. hispanica*, en contacto con sus superficies. Se instalaron también dos sensores de humedad (Humicamp, Vaisala, Finlandia) para medir la humedad relativa del aire en las proximidades de los talos y dos sensores de luz (LI-190SB, USA) para medir la densidad de flujo incidente de fotones fotosintéticamente activos (PPFD), a la cual a partir de ahora nos referiremos como radiación (Fig. 1c). Los datos se tomaron en intervalos de 2 minutos registrándose automáticamente las medias cada 15 minutos en un data-logger (Squirrel 1200, Grant, GB) (Fig. 1d).

En Las Cabrillas, en la cara noroeste se instaló un sensor de temperatura de 1,5 mm de grosor (Thermistor, Grant Instrument, GB) bajo un talo con orientación horizontal de *L. hispanica* y en contacto con su superficie (Fig. 1e). El otro sensor de temperatura de 0,4 mm de grosor, se situó entre los lóbulos de un talo con orientación noroeste de *P. omphalodes* (Fig. 1f). En esta cara se instalaron también un sensor de humedad (Humicamp, Vaisala, Finlandia) y uno de PPFD (LI-190SB, USA). En la cara sur se instaló un sensor de temperatura de 1,5 mm de grosor, en un talo con orientación horizontal de *L. hispanica* y otro de temperatura de 0,4 mm de grosor en un talo con orientación sur de *P. omphalodes*. Se instalaron también en esta cara, un sensor de humedad (Humicamp, Vaisala, Finlandia) y uno de PPFD (LI-190SB, USA). Los datos fueron registrados como en la localidad de El Ventorrillo en un data-logger (Squirrel 1200, Grant, GB).

Los datos obtenidos fueron procesados con la finalidad de comprobar la existencia de diferencias en los parámetros microclimáticos entre dos localidades distintas de la Sierra de Guadarrama y entre dos exposiciones distintas de una de ellas. También se estudió la evolución diaria de los datos microclimáticos en días representativos de las distintas estaciones, pudiendo así hacer una caracterización más fina de las diferencias microclimáticas. Para el estudio de los períodos de actividad potencial, se ha considerado que existe actividad potencial cuando hay una humedad relativa del aire en la proximidad de los talos superior al 90%. No se han tenido en cuenta los momentos en que los líquenes pueden estar hidratados debido a fenómenos de condensación con humedad relativa del aire menor del 90%.

Para la exposición y el estudio de los datos se calcularon, a partir de los datos microclimáticos medidos, los siguientes parámetros para cada localidad:

- **Temperatura media (°C)**: media de las medidas de los cuatro sensores de temperatura en un período de tiempo.
- **Temperatura máxima mensual (°C)**: valor de la temperatura máxima durante el mes.
- **Temperatura mínima mensual (°C)**: valor de la temperatura mínima durante el mes.

- **Temperatura media en "luz" u "oscuridad" (°C):** media de la temperatura de los cuatro sensores para un período de tiempo y una radiación incidente mayor o menor de $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente.
- **Temperatura media en período de actividad (°C):** media de la temperatura de los cuatro sensores de temperatura cuando la humedad relativa del aire es mayor del 90%, para un período de tiempo.
- **Humedad relativa mensual (%):** valor medio mensual de la humedad relativa del aire en la proximidad de los talos.
- **Porcentaje de días con actividad:** Porcentaje de días en los que se alcanza en algún momento una humedad relativa mayor de 90%.
- **Porcentaje de actividad diaria:** media del porcentaje de tiempo del día con humedad relativa mayor del 90% en días en los que en algún momento se alcanzó una humedad relativa mayor de 90%. Este parámetro es desglosado en "luz" y "oscuridad", siendo "luz" el porcentaje del tiempo del día con humedad relativa mayor del 90% y radiación incidente mayor de $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y "oscuridad" el porcentaje del tiempo del día con humedad relativa mayor del 90% y radiación incidente por debajo de $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, este último se ha denominado también respiración potencial en oscuridad.
- **Porcentaje de horas de actividad:** porcentaje de horas totales con humedad relativa del aire del 90% en la proximidad de los talos. Cuando se indique se desglosa este parámetro en "luz" y "oscuridad", con el mismo criterio ya utilizado.
- **Porcentaje de horas de actividad fotosintética potencial:** porcentaje de horas totales con humedad relativa del aire del 90% en la proximidad de los talos y una radiación incidente por encima de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
- **n° de días con actividad:** n° de días en los que en algún momento se ha alcanzado una humedad relativa del 90% en la proximidad de los talos.
- **Radiación diaria ($\text{mol m}^{-2} \text{día}^{-1}$):** media de los valores de la radiación total diaria recibida por los talos, en un período de tiempo.
- **Radiación diaria en período de actividad ($\text{mol m}^{-2} \text{día}^{-1}$):** media de los valores de la radiación total diaria recibida por los talos en condiciones de actividad potencial.

- **Radiación media en período de actividad ($\text{mmol m}^{-2} \text{h}^{-1}$):** radiación media recibida en una hora de actividad potencial.

El análisis estadístico fue realizado mediante análisis de la varianza (ANOVA) a través del programa estadístico Sigma-Plot (Jaendel Scientific USA), con el fin de establecer las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre parámetros.

1.3. RESULTADOS

1.3.1. Caracterización microclimática:

Las medidas se hicieron en el período comprendido desde el 24 de marzo de 1995 al 28 de octubre de 1995 para ambas localidades y del 28 de diciembre de 1995 al 17 de enero de 1996 para El Ventorrillo y del 28 de diciembre al 20 de febrero de 1996 para Las Cabrillas. La falta de medidas en el intervalo del 28 de octubre a 28 de diciembre se debió a un problema técnico en el volcado de los datos. La falta de medidas en El Ventorrillo a partir del 17 de enero se debió a una desaparición de la estación microclimática correspondiente.

A continuación se realiza una descripción detallada de la evolución de los distintos parámetros microclimáticos.

Las mayores diferencias entre ambas localidades se dieron en el parámetro de **radiación incidente diaria**. Este parámetro fue claramente mayor en la localidad de Las Cabrillas, sobre todo durante los meses de verano que fue cuando hubo una radiación incidente mayor (Fig. 2a). Las diferencias en radiación diaria, entre las dos localidades, fueron también claras cuando se expresaron los datos estacionalmente (Fig. 3a). La aplicación de ANOVA en los datos estacionales de radiación diaria, nos ha indicado que hubo diferencias estadísticamente significativas entre las

dos localidades sólo en las estaciones de primavera, verano y otoño. Los valores de radiación diaria en invierno fueron significativamente menores a los de las otras estaciones. En cada localidad, no existieron diferencias significativas entre la radiación diaria en las estaciones de primavera y verano, pero si respecto a las otras dos estaciones (Fig. 3a). La radiación diaria en otoño presentó valores más bajos que en primavera y verano, siendo en la localidad de Las Cabrillas del mismo rango que los obtenidos en El Ventorrillo para las estaciones de primavera y verano.

La **humedad relativa mensual** presentó los menores valores en los meses de julio y agosto, aumentó en septiembre y octubre y alcanzó los máximos valores en diciembre y enero (Fig. 2b). En las dos localidades la humedad media relativa del aire presentó valores similares en los meses de enero, marzo, abril, julio, agosto y diciembre. En mayo y junio la humedad relativa fue mayor en El Ventorrillo y en septiembre y octubre la tendencia se invirtió con mayores valores en Las Cabrillas.

El **porcentaje de días con actividad** presentó diferencias mensuales: aumentó de abril a junio, descendió mucho en los meses de julio y agosto y aumentó de nuevo en los meses de septiembre, octubre y diciembre (Fig. 2c). En la localidad de El Ventorrillo los valores del porcentaje de días con actividad, únicamente fueron superiores a los de la localidad de Las Cabrillas en los meses de abril y septiembre.

El **porcentaje de actividad diaria** presentó valores entre el 15-25% en los meses de mayo, junio, julio y septiembre, siendo siempre algo mayor en la localidad de El Ventorrillo (Fig. 2c). En los meses de abril, septiembre y octubre, el porcentaje de actividad diaria, está por encima del 30% y es siempre mayor en la localidad de Las Cabrillas. Las mayores diferencias entre las dos localidades en el porcentaje de actividad diaria se dan en el mes de abril, donde su valor es el doble en la localidad de Las Cabrillas que en la de El Ventorrillo. Existe por tanto la tendencia de que en los meses con mayor porcentaje de actividad diaria, esta es mayor en la localidad de Las Cabrillas.

El **porcentaje de horas de actividad** fue mayor en la localidad de Las Cabrillas y en horas nocturnas mayor que en diurnas (Fig. 3b). Las mayores diferencias entre las dos localidades y

dentro de cada localidad entre noche y día, se dieron en otoño. En verano los porcentajes de horas de actividad, fueron muy similares a excepción del porcentaje "nocturno" en la localidad de Las Cabrillas que fue superior, al de El Ventorrillo y a los "diurnos" de las dos localidades.

La **temperatura media** mensual aumentó de enero a julio donde se alcanzaron los valores máximos y disminuyó de julio a diciembre (Fig. 2d). La temperatura media fue siempre mayor en El Ventorrillo. La **temperatura máxima mensual** fue superior en la localidad de El Ventorrillo, a excepción del mes de Septiembre. La **temperatura mínima mensual** fue menor en la localidad de Las Cabrillas; en enero, marzo y abril se produjeron las mayores diferencias para este parámetro entre localidades (Fig. 2d). Cuando se han estudiado los datos de temperatura estacionalmente (Fig. 3c) y se ha aplicado ANOVA se ha visto que las mayores diferencias entre las dos localidades existieron para la temperatura durante la noche. Hubo diferencias significativas entre las dos localidades, en la temperatura nocturna de primavera, verano y otoño. La temperatura diurna solo mostró diferencias significativas entre las dos localidades en verano. En cada localidad las temperaturas diurnas y nocturnas mostraron diferencias significativas en todas las estaciones menos en invierno. Las temperaturas nocturnas de primavera y otoño fueron muy similares para cada localidad. Las temperaturas diurnas de primavera y otoño sólo estuvieron en el mismo rango en El Ventorrillo, ya que en Las Cabrillas en otoño fueron inferiores a las de primavera.

1.3.2. Caracterización de períodos de actividad liquénica potencial:

A continuación, se describirán los parámetros microclimáticos en condiciones de actividad liquénica potencial, condiciones que corresponden a una humedad relativa del aire mayor del 90% en la zona próxima a los talos.

Respecto a la radiación diaria en período de actividad, ANOVA nos ha mostrado que sólo los valores de radiación diaria en invierno en la localidad de Las Cabrillas fueron estadísticamente diferentes de los de la localidad de El Ventorrillo en la misma estación y de los de

las dos localidades en las demás estaciones (Fig. 4a). La radiación diaria en período de actividad siempre fue mayor en Las Cabrillas, pero debido a la gran varianza existente, las diferencias no fueron significativas. La radiación diaria recibida en El Ventorrillo fue muy constante a excepción del invierno donde los valores fueron mayores. En la localidad de Las Cabrillas la radiación diaria en período de actividad fue similar en verano y otoño y algo mayor en primavera. En invierno en las dos localidades a pesar de que la radiación diaria fue muy baja (Fig. 3a), fue cuando existieron los mayores valores de radiación diaria en período de actividad, porque los sensores de humedad en este período marcaron siempre una humedad relativa máxima. Coincidiendo con los datos de radiación diaria, existió la tendencia en primavera, verano y otoño a mayores valores de radiación diaria en período de actividad, en la localidad de Las Cabrillas, aunque las diferencias no fueron significativas.

El porcentaje de actividad diaria sólo mostró diferencias significativas en los valores pertenecientes al invierno, respecto a las otras estaciones (Fig. 4b). La tendencia es a mayores valores en El Ventorrillo que en Las Cabrillas y en los períodos nocturnos más que en los diurnos, pero sin ser en ninguno de los casos estadísticamente diferentes.

La temperatura media en período activo (Fig. 4c), fue menor que la temperatura media (Fig. 3c). La aplicación de ANOVA ha mostrado que en todas las estaciones hubo diferencias significativas en la temperatura en período de actividad entre las dos localidades (Fig. 4c), incluso en invierno, donde las temperaturas generales no las mostraron (Fig. 3c). Las temperaturas diurnas y nocturnas, en condiciones de actividad potencial, sólo mostraron diferencias significativas, en la localidad de Las Cabrillas, en las estaciones de verano y otoño (Fig. 4c). Los talos de El Ventorrillo mostraron la tendencia (no diferencias significativas) a mayores temperaturas diurnas en las estaciones de primavera y verano, invirtiéndose la tendencia en otoño e invierno. En Las Cabrillas a excepción del invierno donde las temperaturas medias diurnas y nocturnas fueron muy próximas, en el resto de las estaciones existió la tendencia (sin diferencias significativas) de temperaturas diurnas mayores.

Dentro de la caracterización de las dos localidades, hay que tener en cuenta que pueden existir diferencias también dentro de cada localidad debidas a diferente orientación. Para ilustrar este aspecto, se han comparado los parámetros microclimáticos en condiciones de actividad, en las dos orientaciones distintas de los talos de *P. omphalodes* en la localidad de Las Cabrillas, lo que ha permitido obtener los siguientes datos. En la orientación noroeste el porcentaje de horas de actividad durante el día fue mayor que en exposición sur, coincidiendo con una menor radiación media en período de actividad (tabla I). Durante la noche el porcentaje de horas de actividad fue similar para ambas orientaciones. La temperatura en período de actividad del talo de *P. omphalodes* de orientación noroeste, durante el día, fue mayor que en el de exposición sur. Las temperaturas nocturnas en período de actividad fueron similares en ambas orientaciones. Las diferencias entre orientaciones (tabla I) fueron muy inferiores a las existentes entre localidades (Tabla II).

TABLA I: Datos de los valores medios globales de *P. omphalodes*, de la localidad de Las Cabrillas, de orientación Noroeste y Sur. Los parámetros presentados son porcentaje de horas de actividad, media \pm desviación de la temperatura y la radiación media en período de actividad (a.p.).

	HORAS ACTIVIDAD (%)		TEMPERATURA (a.p.) (°C)		Radiación media (a.p.) (mmol m ⁻² h ⁻¹)
	día	noche	día	noche	rad>2
<i>P. omphalodes</i> (N.O)	11.2	14,9	3,9±4	3,7±4	581
<i>P. omphalodes</i> (Sur)	10.3	15,34	2,1±4	3,2±4	655

Para obtener conclusiones generales se han estudiado los datos de las dos localidades en todo el período de experimentación (Global) (Tabla II).

La **radiación diaria** recibida por los talos fue significativamente superior en la localidad de Las Cabrillas, incluso en condiciones de actividad. Los datos globales de radiación en período de actividad, confirman las tendencias (no significativas) que mostraba este mismo parámetro referido a los distintos períodos estacionales.

La **temperatura media** fue significativamente inferior en los talos de la localidad de Las Cabrillas y también la **temperatura media en período activo**. La temperatura media fue superior a la temperatura media en período activo.

El **porcentaje de actividad diaria** no mostró diferencias significativas.

El **número de días con actividad**, fue mayor en Las Cabrillas, coincidiendo con el mayor porcentaje de horas de actividad descrito para los talos de esta localidad (Fig. 3b).

El **porcentaje de horas con actividad** (tanto diurna como nocturna) y el **porcentaje de horas con actividad fotosintética potencial** fue mayor para los talos de Las Cabrillas.

Todos estos resultados globales confirman lo que se ha ido viendo en el estudio desglosado a nivel mensual y estacional.

TABLA II: Datos de los valores medios globales de todos los talos en la localidad de El Ventorrillo y la localidad de Las Cabrillas, para los períodos especificados en materiales y métodos (nº total de días: 239). Los parámetros empleados son: radiación diaria, temperatura media, porcentaje de actividad diaria, radiación diaria y temperatura en período de actividad y nº total de días con actividad. Los valores excepto en número total de días con actividad, el porcentaje de horas de actividad potencial y porcentaje de horas de actividad fotosintética potencial, se presentan como media \pm desviación típica.

	LAS CABRILLAS	EL VENTORRILLO	
Radiación diaria (mol.m ⁻² día ⁻¹) (talos HR>90%)	2,7 \pm 3,1	1,32 \pm 1,44	P<0,05
Temperatura (°C) (talos HR>90%)	4,5 \pm 3,6	7,2 \pm 2,9	P<0,05
Actividad diaria(%)	24,6 \pm 15,6	23,6 \pm 17,1	n.s.
Radiación diaria (mol.m ⁻² día ⁻¹)	17,5 \pm 8,1	11,7 \pm 4,7	P<0,05
Temperatura (°C)	9,7 \pm 5,8	12,2 \pm 5,4	P<0,05
nº total de días con actividad y (%)	121 (50%)	105 (44%)	
Horas de actividad dia (%)	10,3	9,16	
Horas de actividad noche (%)	13,7	10	
Respiracion en oscuridad potencial			
Horas de fotosintesis potencial (%)	8	5,3	

1.3.3. Evolución microclimática diaria

A continuación se presenta la evolución diaria de los parámetros microclimáticos para ciertos días característicos de las distintas estaciones.

PRIMAVERA:

- 18 de Abril de 1995:

Este día con una humedad relativa media del aire del 43% en El Ventorrillo y en Las Cabrillas 43,8% (exposición noroeste) y 42,8% (exposición sur), es representativo de un día de primavera sin precipitaciones. Las temperaturas medias fueron 11,3°C (El Ventorrillo) y 14,7°C (Las Cabrillas).

El Ventorrillo:

La radiación incidente alcanzó altos valores, en dos períodos uno a media mañana y otro a media tarde. La temperatura nocturna fue muy estable; con el día se produjo un aumento de temperatura muy estrechamente ligado a un aumento de radiación incidente. Los cuatro sensores de temperatura no presentaron grandes diferencias entre ellos (Fig. 5a). La humedad relativa estuvo regulada también por la radiación incidente, disminuyendo al comenzar el aumento de la radiación y no volviendo a subir hasta que esta descendió (Fig. 5b).

Las Cabrillas:

La radiación fue claramente diferente en las dos exposiciones. Los máximos de radiación no fueron muy diferentes pero en el sensor de exposición noroeste se alcanzaron por la tarde (con muchas subidas y bajadas), mientras que en el de exposición sur estos máximos se alcanzaron por la mañana (permaneciendo muy estable) (Fig. 5c). La temperatura y la humedad como sucedió en El Ventorrillo variaron reguladas por la radiación. El descenso de humedad relativa fue más acusado para la orientación sur donde el gran aumento de radiación se dio por la

mañana. En orientación noroeste este descenso fue más gradual, debido a que las altas radiaciones se alcanzaron por la tarde (Fig. 5d).

- 22 de Abril de 1995:

Este día de humedad relativa media del aire en El Ventorrillo del 86% y en Las Cabrillas 82% (exposición noroeste) y 93,4% (exposición sur), es representativo de un día de primavera con abundantes precipitaciones. Las temperaturas sufrieron un fuerte descenso desde el 18 del mismo mes, siendo la media 1°C (El Ventorrillo) y -3°C (Las Cabrillas).

El Ventorrillo:

Se trató de un día cubierto, la radiación presentó valores bajos alcanzando sólo radiaciones de $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en algunos momentos por la tarde. La temperatura aumentó paralelamente a la radiación, siendo similar en las talos de las dos especies (Fig. 6a). La humedad relativa fue muy alta durante todo el día, presentando sólo un descenso por la tarde cuando la radiación incidente fue mayor (Fig. 6b).

Las Cabrillas:

La radiación recibida por la mañana y por la tarde en exposición sur, al igual que sucedió en El Ventorrillo, presentó valores bajos. Por la tarde alcanzó en dos momentos radiaciones importantes alrededor de los $2500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en la exposición noroeste. Hubo una marcada diferencia entre la temperatura de los talos durante el día y la noche. La temperatura parece depender más de la especie que de la exposición. La temperatura de *L. hispanica*, cuando la comparamos con *P. omphalodes*, tuvo valores más bajos durante la noche, alcanzó valores superiores en las primeras horas del día y de nuevo inferiores, con mayores diferencias, a partir de las 10:00. Las diferencias entre especies pueden deberse bien a distinta exposición o al hecho de que tienen distinto tipo de sensor (1,5 mm y 0,4 mm de grosor) (Fig. 6c). La humedad relativa descendió algo en dos intervalos durante las primeras horas de la mañana en los dos sensores (atribuible al aumento de radiación), fue estable con valores máximos en el resto del día

para el sensor de exposición sur y sufrió un descenso a niveles del 60% en la exposición noroeste (mayor radiación) (Fig. 6d).

VERANO:

- 12 de julio de 1995:

Este día la humedad relativa media del aire fue del 45% en El Ventorrillo y en Las Cabrillas 53% (exposición noroeste) y 48,5% (exposición sur). La temperatura media fue de 21,4°C (El Ventorrillo) y 19°C (Las Cabrillas).

El Ventorrillo:

La radiación presentó valores máximos en dos períodos, uno por la mañana y otro por la tarde. La temperatura fue aumentando a lo largo del día, alcanzando los valores máximos cuando la radiación fue máxima (Fig. 7a). La humedad relativa descendió con el aumento de la radiación, siendo próximos al 0% cuando la radiación fue máxima (Fig. 7b).

Las Cabrillas:

En la exposición noroeste los valores de alta radiación se dieron por la tarde y en la exposición sur por la mañana. Para *L. hispanica* la temperatura medida por los dos sensores fue similar. *P. omphalodes* en exposición sur, presentó valores siempre inferiores, al resto de los sensores. *P. omphalodes* exposición noroeste, tuvo valores de temperatura similares a los de *L. hispanica*, aunque debido a que las máximas radiaciones en esta exposición se dan por la tarde, se retrasa su consecución (Fig. 7c). La humedad relativa descendió con el aumento de radiación, por lo que el descenso de humedad es más brusco en la exposición sur, donde la radiación fue más fuerte a primeras horas del día (Fig. 7d).

- 5 de agosto de 1995:

Día con una humedad relativa media del aire de 50,3% en El Ventorrillo y en Las Cabrillas 66,4% (exposición noroeste) y 55,3% (exposición sur). La temperatura media fue de 18,3°C (El Ventorrillo) y 22,1°C (Las Cabrillas). Fue un día de verano con tormentas.

El Ventorrillo:

El comportamiento fue similar al 12-7-95, pero con menores fluctuaciones de radiación (Fig. 8a) y con un descenso más brusco de la humedad relativa, debido a que sus valores durante la noche fueron más altos (Fig. 8b). No se alcanzaron valores del 100% de humedad relativa.

Las Cabrillas:

Las dos exposiciones presentaron máximos de radiación (con pocas fluctuaciones, como ocurre en El Ventorrillo) en períodos del día diferente como sucedió el 12-7-95. *L. hispanica* presentó muchas diferencias entre los dos sensores de temperatura. En *P. omphalodes* se alcanzaron valores similares de temperatura en los dos sensores, pero en distintos momentos como ocurrió con la radiación (Fig. 8c). Durante la noche se alcanzaron valores máximos de humedad relativa en los sensores de las dos orientaciones, sufriendo un descenso a lo largo del día que fue de nuevo más brusco en la exposición sur (Fig. 8d). Los valores de humedad relativa fueron superiores a los alcanzados en El Ventorrillo.

OTOÑO:

- 7 de Octubre de 1995:

Día de humedad relativa media del aire de 67,8% en El Ventorrillo y en Las Cabrillas de 79,4% (exposición noroeste) y 73% (exposición sur). La temperatura media fue de 14,9°C (El Ventorrillo) y 12,2°C (Las Cabrillas).

El Ventorrillo:

La radiación incidente alcanzó los máximos valores por la tarde, coincidiendo con los máximos valores de temperatura y los mínimos de humedad relativa (Fig. 9a, 9b). El descenso de la humedad relativa no fue gradual debido a que los valores máximos de radiación se dieron por la tarde.

Las Cabrillas:

La radiación incidente en las dos exposiciones tuvo pocas fluctuaciones y alcanzó valores mayores en exposición sur (mañana), que en la exposición noroeste (tarde). *L. hispanica* presentó valores diferentes en sus dos sensores de temperatura. *P. omphalodes* alcanzó mayores temperaturas que *L. hispanica*, pero los máximos se produjeron en diferente momento, según la distinta orientación (Fig. 9c). El descenso de la humedad relativa fue más brusco en orientación sur, como ocurrió en los otros días estudiados (Fig. 9d).

INVIERNO:

- 10 de enero de 1996:

Día con humedad relativa media del aire del 100% en las dos localidades, posiblemente los líquenes se encontraban cubiertos de nieve.

El Ventorrillo:

La radiación incidente alcanzó valores muy bajos, no superando los $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, máximo que ocurrió por la tarde. La temperatura aumentó durante el día dándose el máximo en el momento en que se produjo la máxima radiación (Fig. 10a).

Las Cabrillas:

La radiación incidente fue muy baja. Los máximos valores se produjeron durante la tarde. Las temperaturas fueron en todo momento muy estables, presentado valores muy bajos.

Las temperaturas en Las Cabrillas presentaron una gran diferencia con El Ventorrillo, siendo del orden de 3-4°C menores (Fig. 10b).

1.3.4. Resumen de los principales resultados

A continuación se describe de forma resumida los aspectos más característicos del microclima en las dos localidades estudiadas, a nivel global, mensual/estacional y diario:

Global:

En la localidad de Las Cabrillas la radiación fue significativamente mayor y la temperatura significativamente menor, que en la localidad de El Ventorrillo, tanto bajo cualquier condición como en las correspondientes a actividad potencial. La radiación diaria y la temperatura media en período de actividad fueron inferiores, a los valores generales.

El porcentaje de actividad diaria no mostró diferencias entre las dos localidades; sin embargo, en la localidad de Las Cabrillas hubo un mayor número de días con actividad.

El porcentaje de horas de fotosíntesis potencial y respiración en oscuridad potencial fue mayor en la localidad de Las Cabrillas.

Estacional/mensual:

La radiación diaria en la localidad de El Ventorrillo, fue significativamente inferior a la recibida en la localidad de Las Cabrillas, en todas las estaciones menos en el invierno. En condiciones de actividad también se recibió menos radiación en El Ventorrillo, pero sólo existieron diferencias significativas entre ambas localidades en invierno.

Las temperaturas nocturnas fueron estadísticamente inferiores a las diurnas. Las temperaturas nocturnas de la localidad de Las Cabrillas fueron significativamente inferiores a las de El Ventorrillo, en todas las estaciones menos en el invierno. Las temperaturas diurnas del verano en El Ventorrillo fueron significativamente superiores a las de Las Cabrillas y no lo fueron en el resto de las estaciones. Las temperaturas en condiciones de actividad, en la localidad

de El Ventorrillo fueron significativamente superiores, a las de la localidad de Las Cabrillas, en todas las estaciones. Las temperaturas diurnas y nocturnas, en período de actividad, sólo mostraron diferencias significativas en la localidad de Las Cabrillas en verano y otoño, siendo las diurnas superiores.

Existió un mayor porcentaje de horas de actividad en la localidad de Las Cabrillas y por las noches fue mayor que durante los días. No hubo diferencias entre el porcentaje de actividad diaria entre ambas localidades.

Diario:

Los máximos de radiación diaria en la localidad de El Ventorrillo se alcanzaron en dos períodos uno por la mañana y otro por la tarde. Los líquenes en la localidad de Las Cabrillas, recibieron los máximos valores de radiación en un único período aunque más amplio, que se produjo por la mañana en orientación sur y por la tarde en orientación noroeste.

Las variaciones de temperatura en las dos localidades fueron paralelas a las variaciones de radiación.

La humedad relativa, descendió paralelamente al aumento de radiación. El descenso de los niveles de la humedad relativa nocturna con el inicio del día, fue anterior y más acusado, en la localidad de Las Cabrillas, ya que la radiación se recibió más temprano. En la localidad de Las Cabrillas, el descenso fue diferente en las dos exposiciones, en la exposición sur fue más brusco que en la noroeste ya que los máximos de radiación se alcanzaron por la mañana.

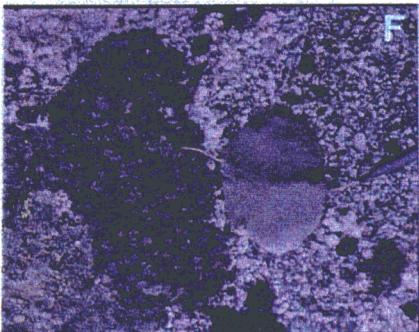
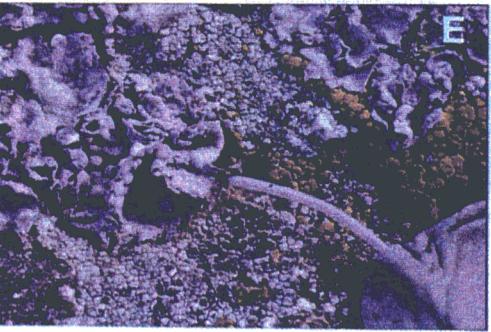
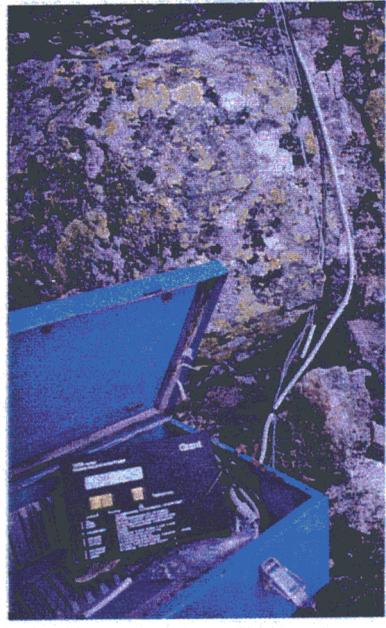
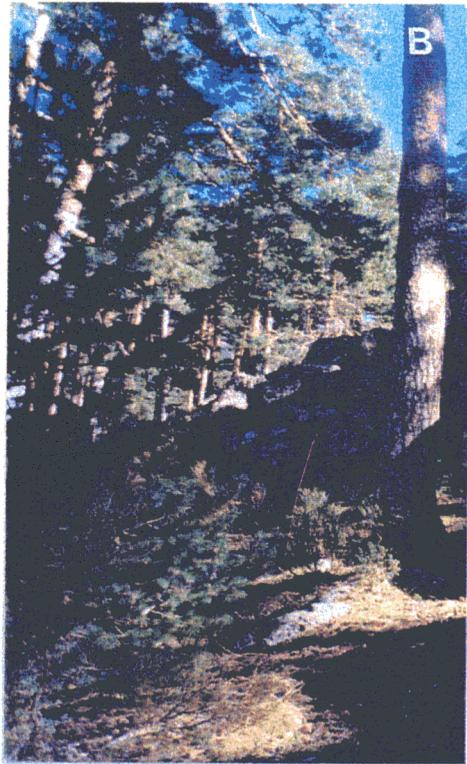
1.3.5. Características microclimáticas en los periodos previos a las recolecciones.

Para poder realizar un mejor análisis de las variaciones ultraestructurales y enzimáticas que se produjeron en el período de las medidas microclimáticas, se han calculado los valores medios de los parámetros más importantes para el período previo a la recolección de las muestras (Tabla III).

TABLA III: Datos de los valores medios de los talos en el período anterior a la recogida de muestras. V (El Ventorrillo) y C (Las Cabrillas). Los parámetros presentados son porcentaje de horas con actividad, temperatura en período de actividad y radiación media en condiciones de actividad potencial (a.p.).

PERIODO	HORAS ACTIVIDAD (%)		TEMPERATURA (a.p.) (°C)		Radiación media (a.p.) (mmol.m ⁻² h ⁻¹)	
	día	noche	día	noche	rad>2	
abril	V	0	0	-	-	
	C	0	0	-	-	
mayo	V	10,13	15,34	5,64	5,17	324,3
	C	14,3	19	1,5	1,25	692,5
sept	V	3,99	4,67	13,52	12,5	144,2
	C	4,4	5,75	8,86	8,75	451
marzo	V	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
	C	54	46	0,4	-1,43	674

Fig. 1: Aspecto de las localidades y especies estudiadas: A-Localidad de Las Cabrillas (en primer plano), con una flecha se indica la situación de la localidad de El Ventorrillo; B-Localidad de El Ventorrillo; C- Estación microclimática de la localidad de EL Ventorrillo; D- Data-logger (Squirrel, Grant); E- *Lasallia hispanica* con un sensor de temperatura (Thermistor, Grant instrument) bajo el talo; F- *Parmelia omphalodes* con un sensor de temperatura entre sus lobulos.; G- *Cornicularia normoerica*.



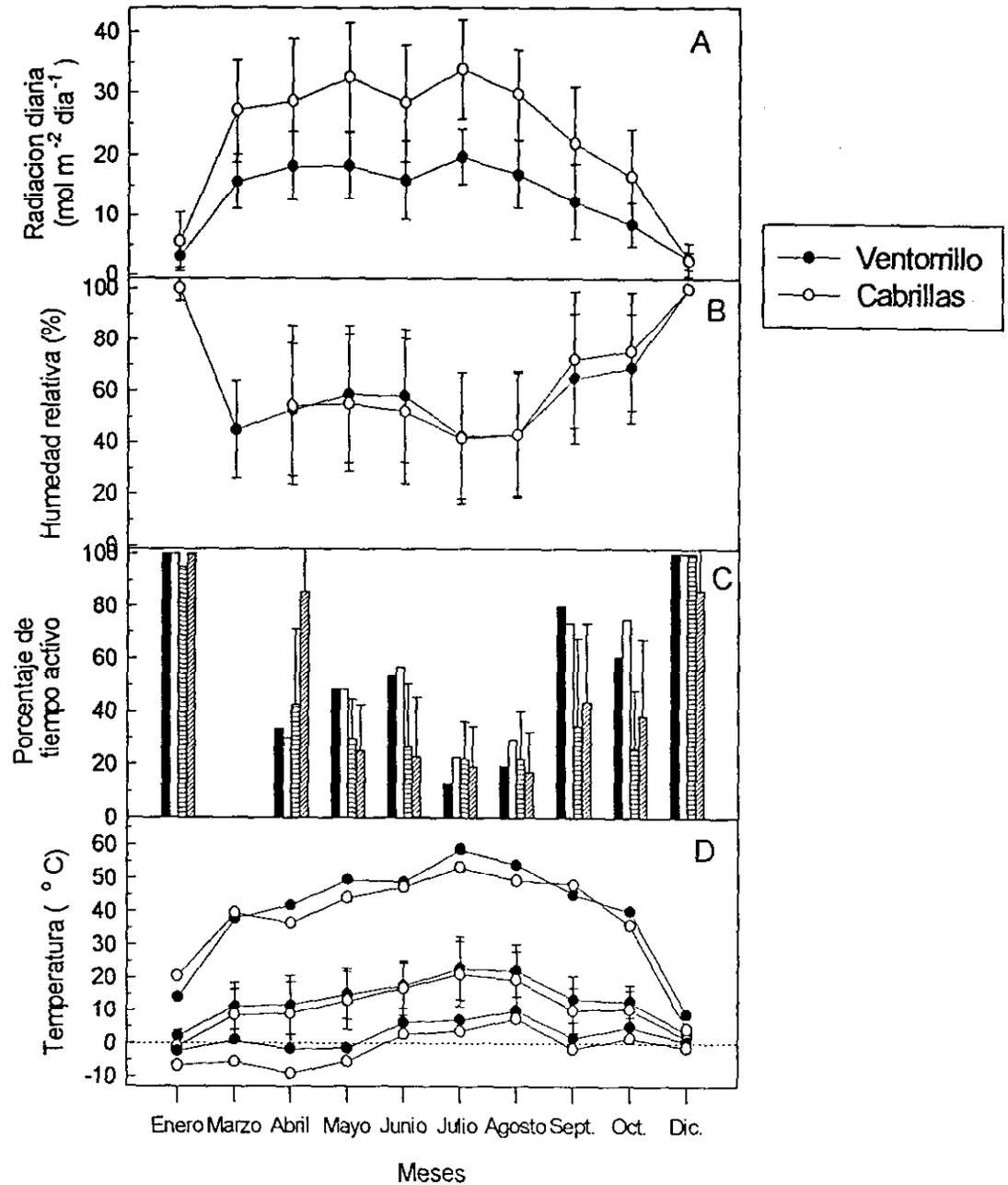


Fig. 2: Datos microclimáticos mensuales registrados en las localidades de El Ventorrillo y Las Cabrillas.
 A- Variación mensual de la radiación diaria; —●— (El Ventorrillo) —○— (Las Cabrillas).
 B- Variación mensual de la humedad relativa del aire en la zona próxima a los talos; —●— (El Ventorrillo)
 —○— (Las Cabrillas).
 C- Porcentaje de días con actividad; ■ (El Ventorrillo) □ (Las Cabrillas)
 Porcentaje de actividad diaria; = (El ventorrillo), /// (Las Cabrillas).
 D- Temperatura máxima mensual, Temperatura media y Temperatura mínima mensual; —●— (El
 Ventorrillo) —○— (Las Cabrillas).

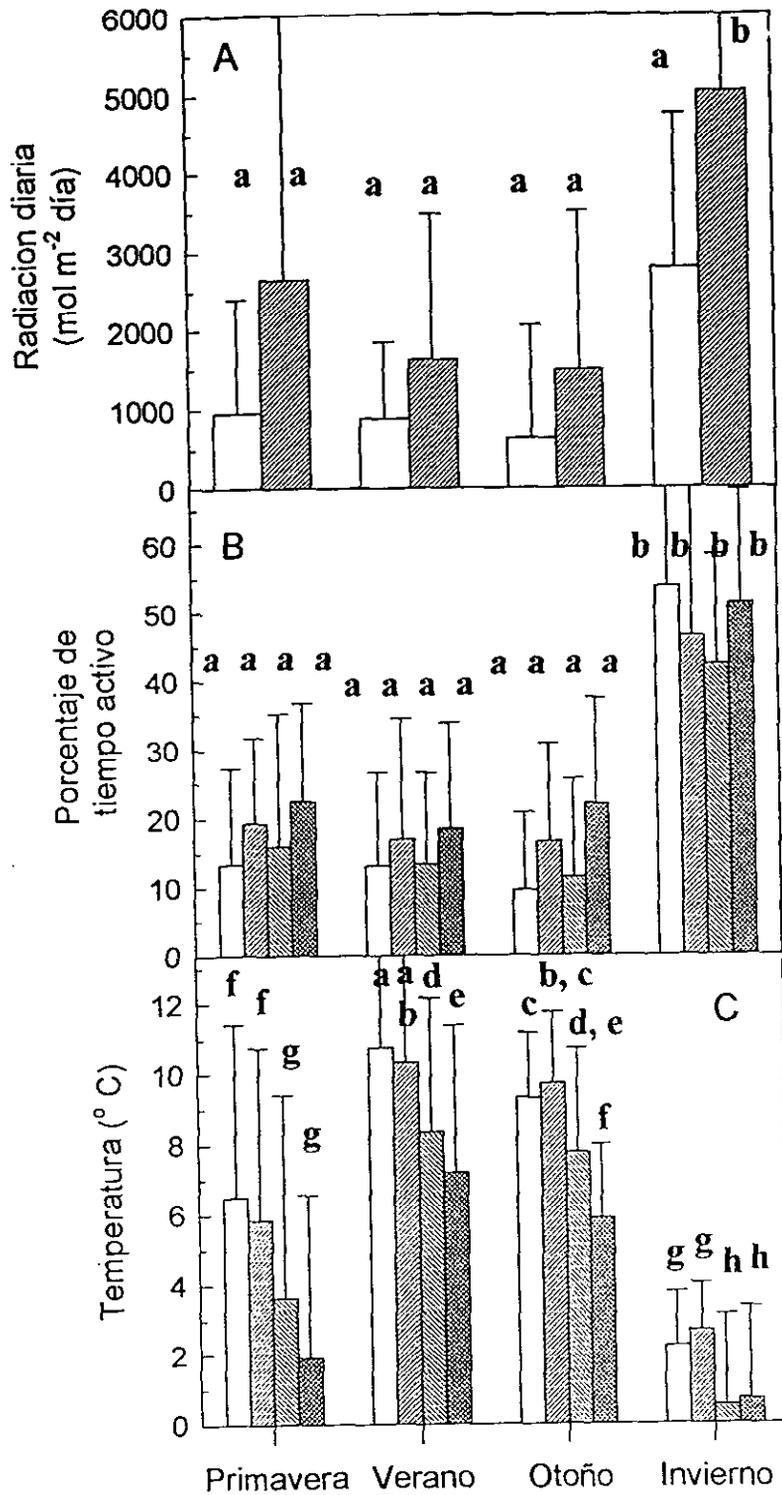


Fig. 3: Datos microclimáticos estacionales registrados en las localidades de El ventorrillo y Las Cabrillas. A- Variación estacional de la radiación diaria; □ (El Ventorrillo), /// (Las Cabrillas). B- Variación estacional del porcentaje de horas de actividad diurna y nocturna; □ (diurna, El Ventorrillo), /// (nocturna, El Ventorrillo), \\\ (diurna, Las Cabrillas), # (nocturna, Las Cabrillas). C- Variación estacional de la temperatura; □ (diurna, El Ventorrillo), /// (nocturna, El Ventorrillo), \\\ (diurna, Las Cabrillas), # (nocturna, Las Cabrillas).

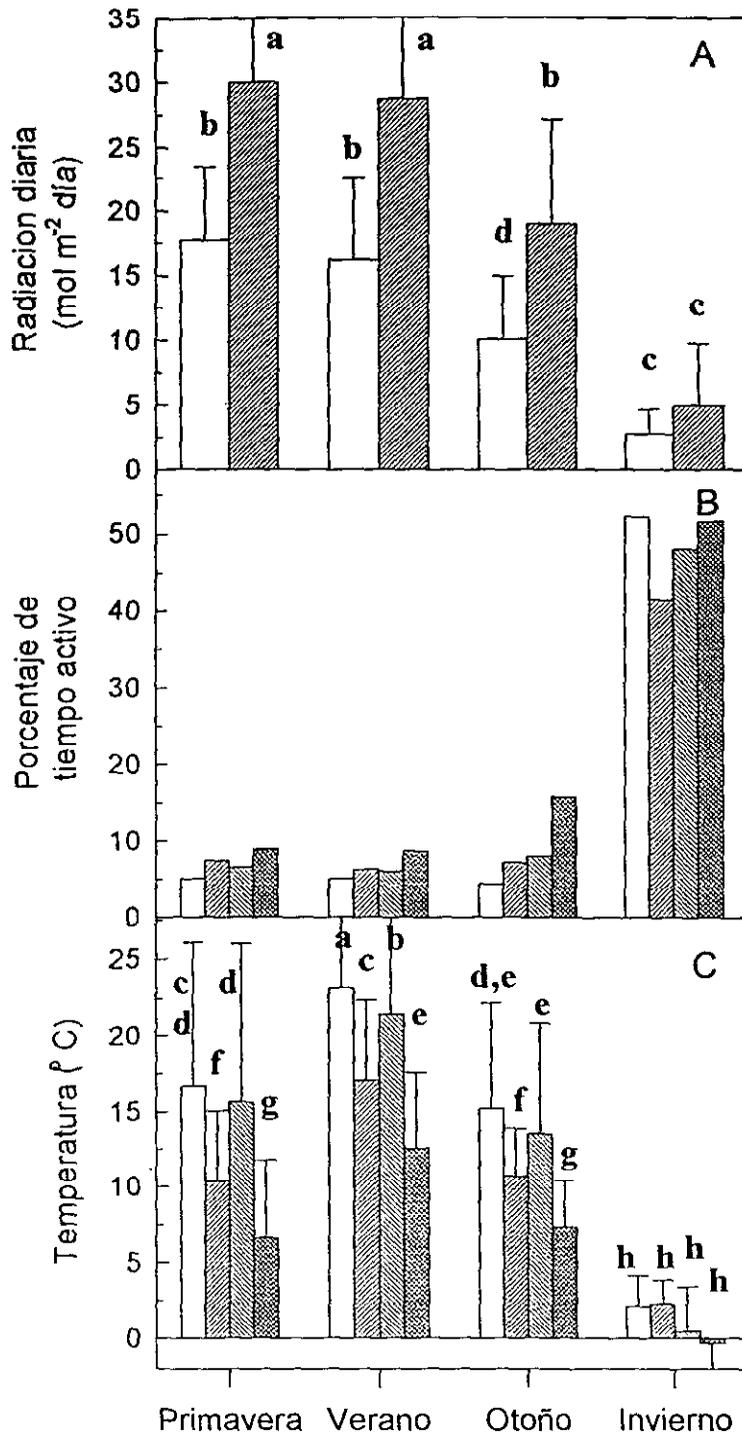


Fig. 4: Datos microclimáticos estacionales registrados en las localidades de El ventorrillo y Las Cabrillas, en periodo activo (Humedad relativa del aire en la proximidad de los talos mayor del 90%).

A- Variación mensual de la radiación diaria en periodo activo; □ (El Ventorrillo), /// (Las Cabrillas).

B- Variación mensual del porcentaje de actividad diaria diurno y nocturno; □ (diurna, El Ventorrillo), /// (nocturna, El Ventorrillo), \\\ (diurna, Las Cabrillas), # (nocturna, Las Cabrillas).

C- Variación mensual de la temperatura en periodo activo; □ (diurna, El Ventorrillo), /// (nocturna, El Ventorrillo), \\\ (diurna, Las Cabrillas), # (nocturna, Las Cabrillas).

Graficas de la evolución microclimática diaria:

Fig. 5-10: Evolución diaria de los parámetros microclimáticos en días representativos de las diferentes estaciones.

A y B- Localidad de El ventorrillo:

T1 (rojo) y T3 (verde): sensores de temperatura de *Lasallia hispanica* (orientación oeste).

T2 (rosa) y T4 (azul): sensores de temperatura de *Parmelia omphalodes* (orientación oeste).

H1 (marrón) y H2 (azul): sensores de humedad (orientación oeste).

R1 (...) y R2 (---): sensores PAR (orientación oeste).

C y D- Localidad de Las Cabrillas:

T1 (rojo) y T3(verde): sensores de temperatura en *Lasallia hispanica* (orientación noroeste).

T2 (rosa): sensor de temperatura de *Parmelia omphalodes* (orientación noroeste).

T4 (azul): sensor de temperatura de *Parmelia omphalodes* (orientación sur).

H1: sensor de humedad (orientación noroeste).

H2: sensor de humedad (orientación sur).

R1: sensor PAR (orientación noroeste).

R2: sensor PAR (orientación sur).

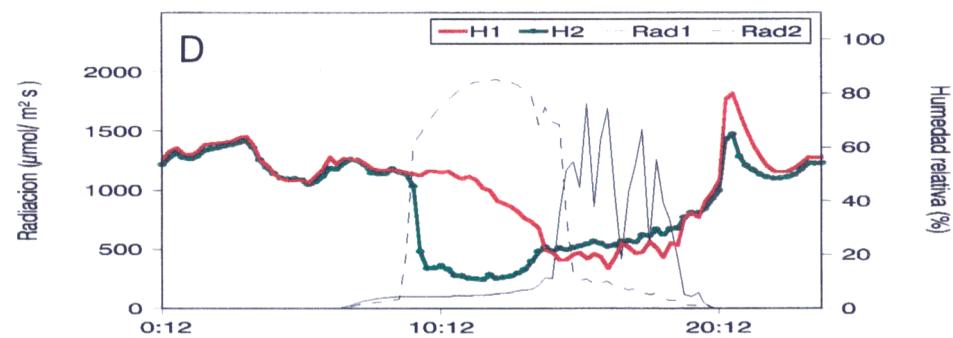
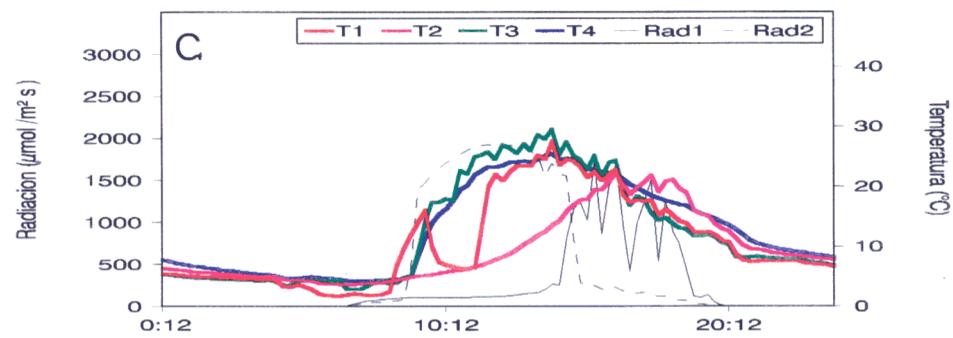
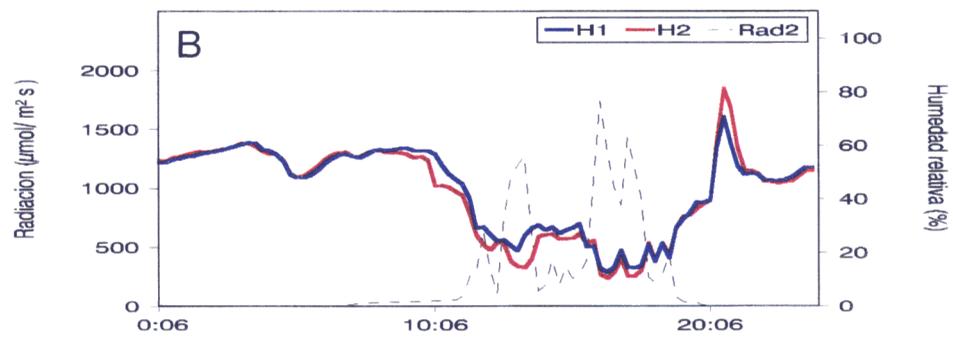
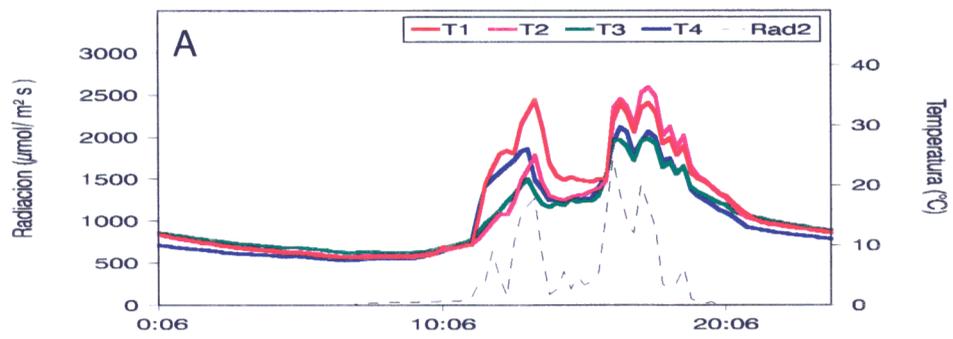


Fig. 5: 18 de abril del 95.
 A y B: El Ventorrillo
 C y D: Las Cabrillas

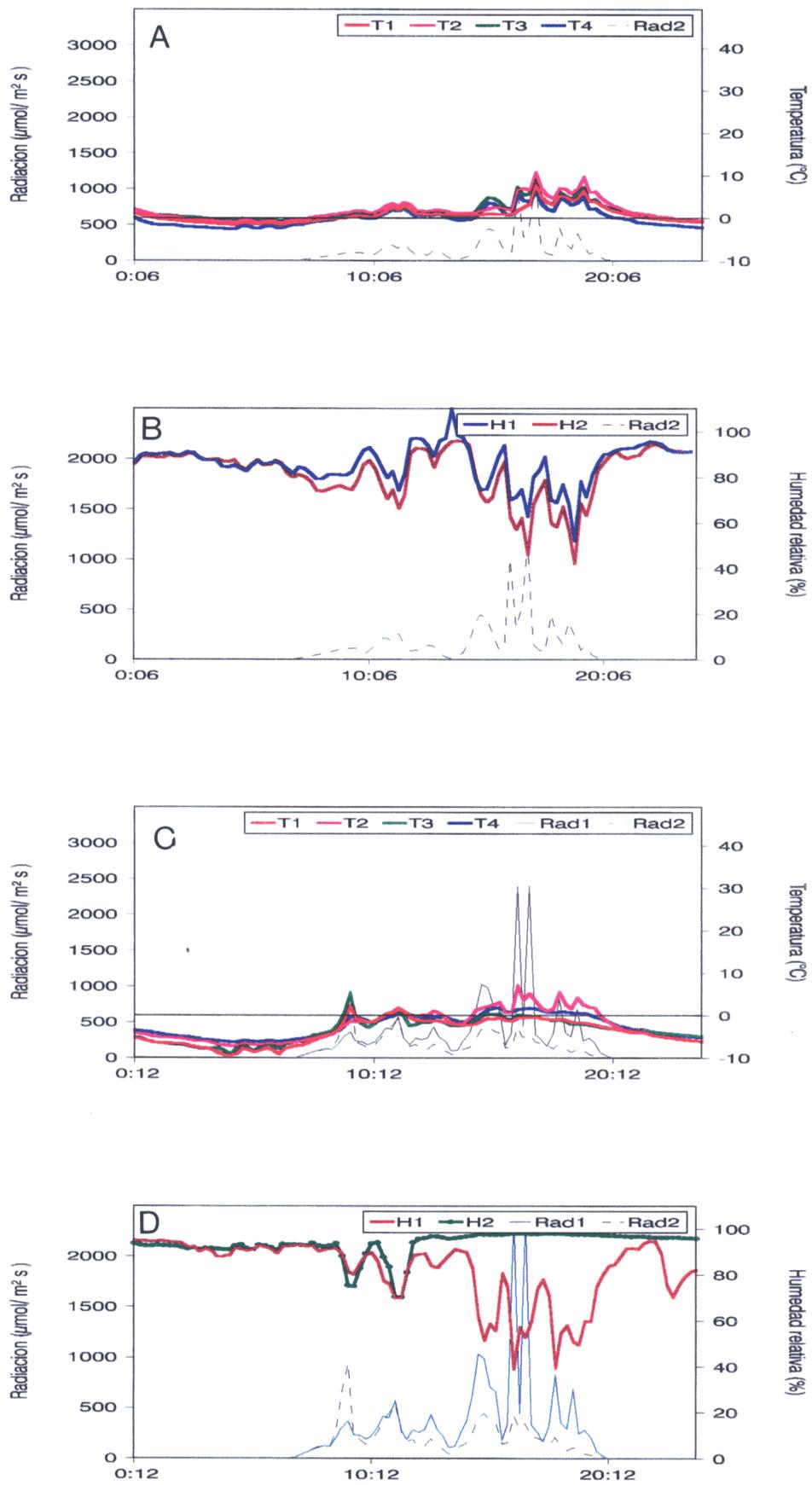


Fig. 6: 22 de abril del 95.
 A y B: El Ventorrillo
 C y D: Las Cabrillas

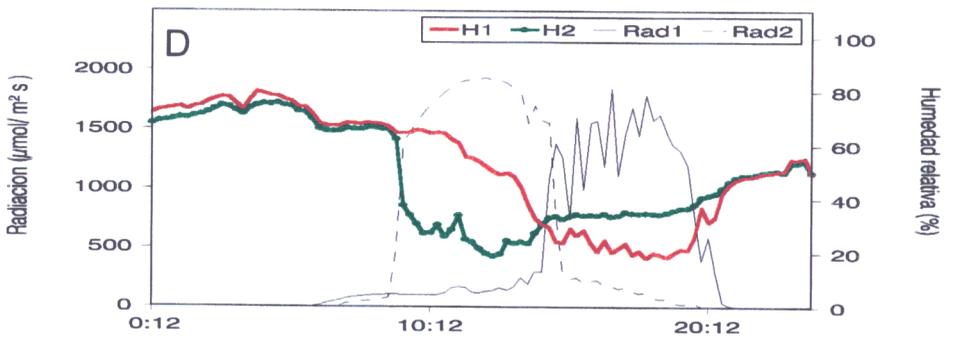
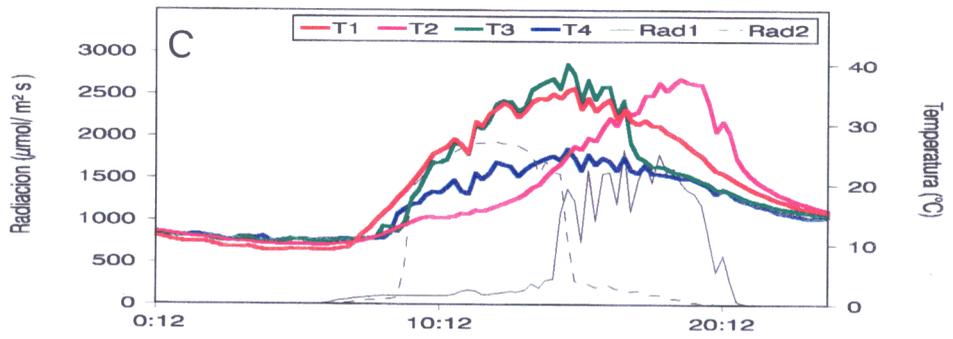
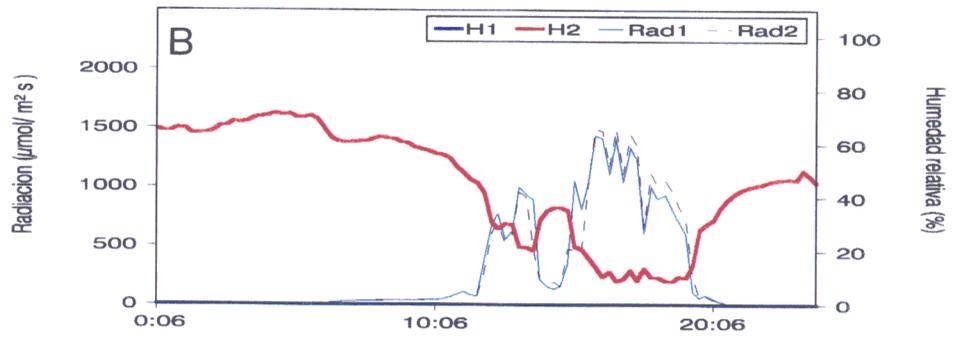
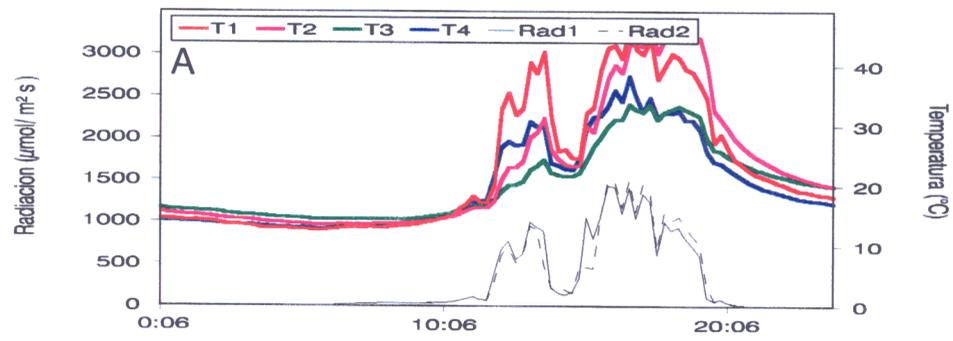


Fig.7: 12 de julio del 95.
 A y B: El Ventorrillo
 C y D: Las Cabrillas

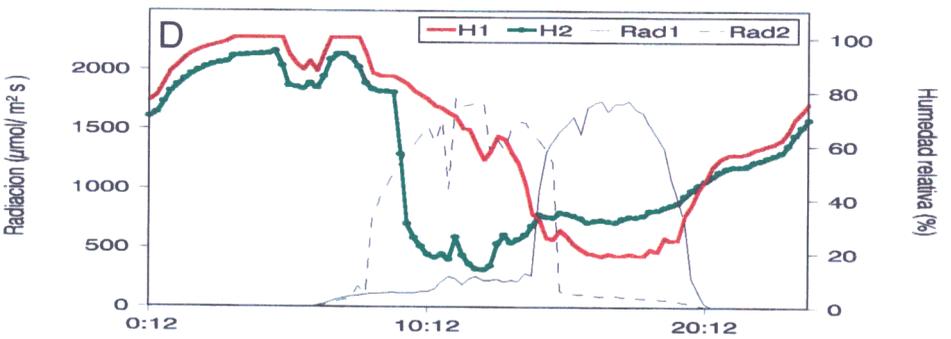
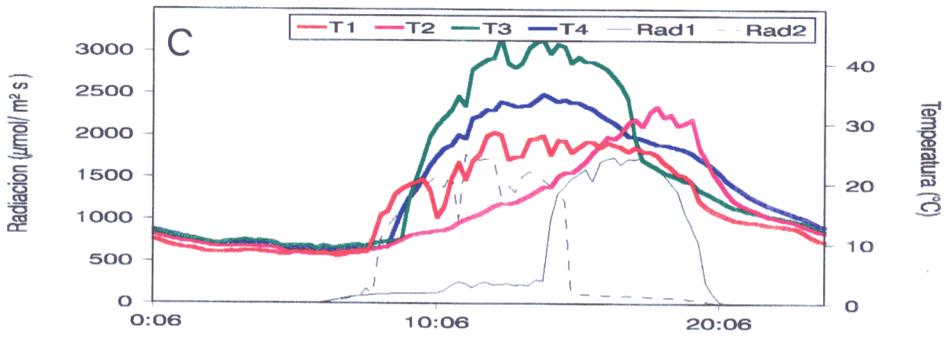
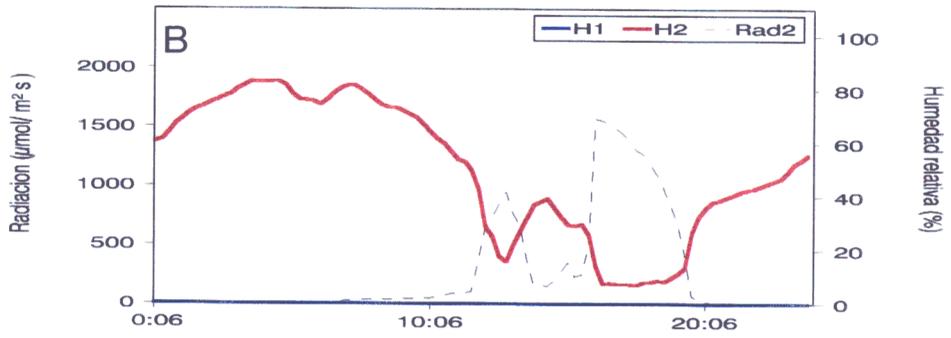
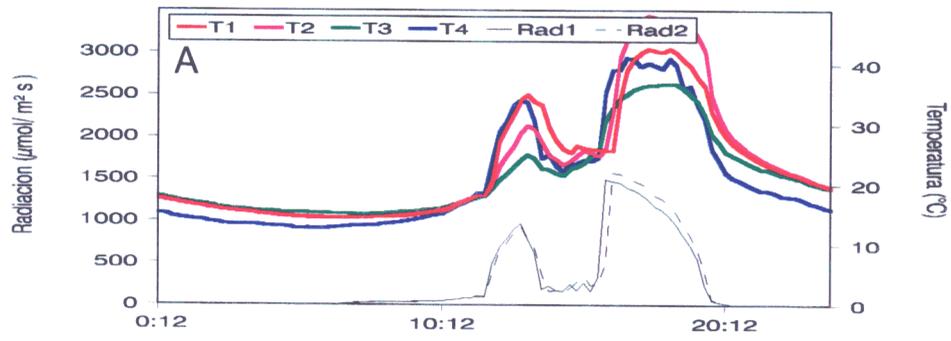


Fig.8: 5 de agosto del 95.

A y B: El Ventorrillo

C y D: Las Cabrillas

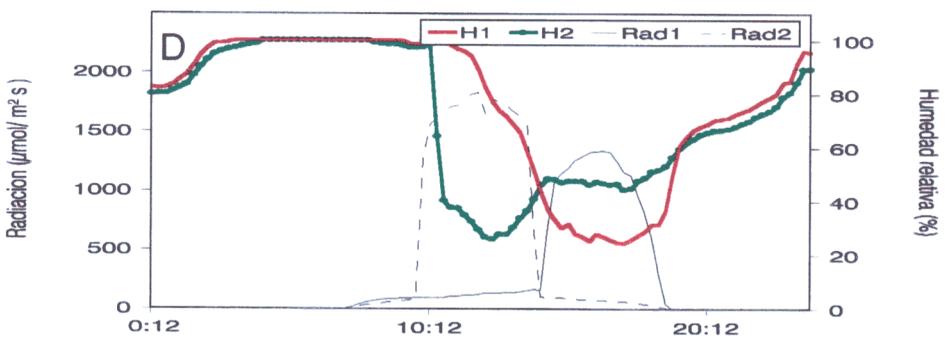
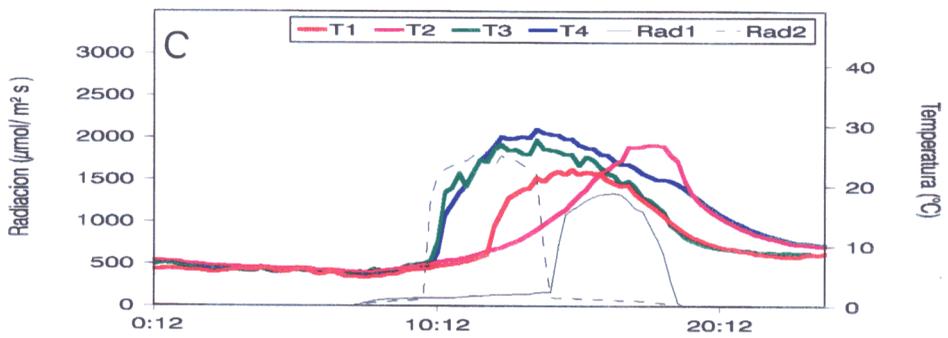
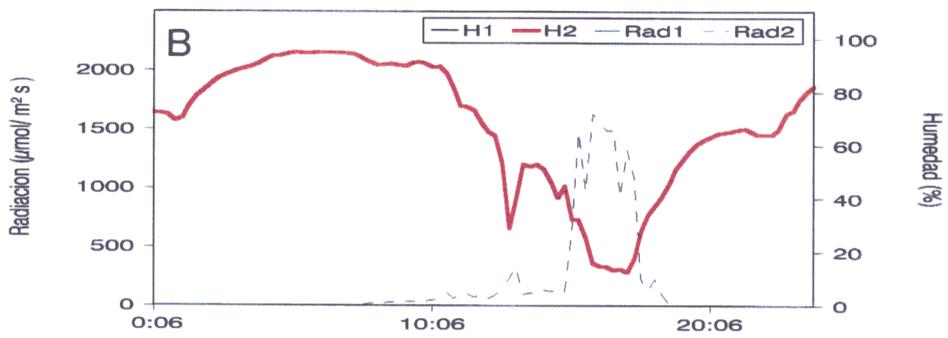
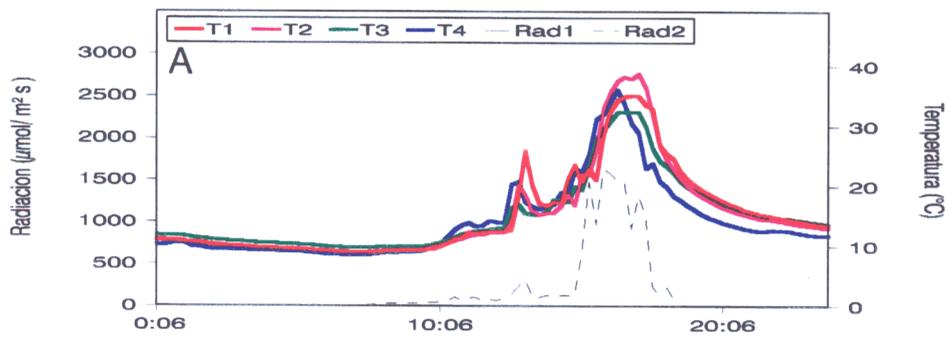


Fig.9: 7 de octubre del 95.
 A y B: El Ventorrillo
 C y D: Las Cabrillas

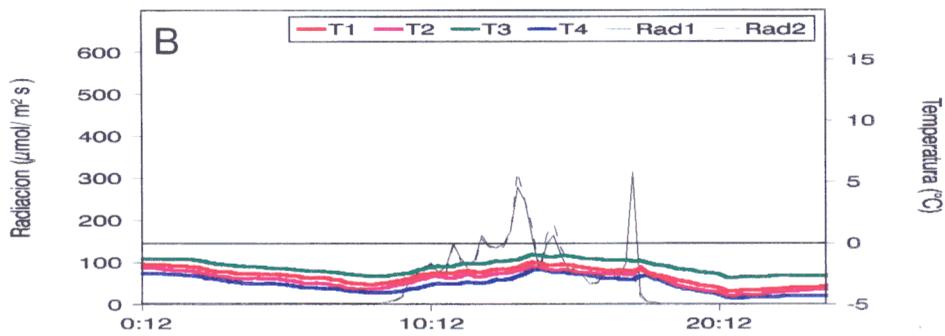
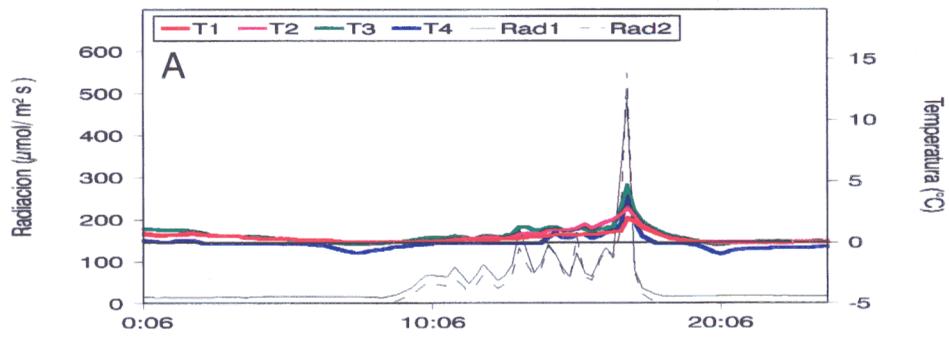


Fig.10: 10 de enero del 96
 A y B: El Ventorrillo
 C y D: Las Cabrillas

2 Caracterización de las actividades nitrato reductasa y ribonucleasa en talos líquénicos

2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. Ribonucleasas

Las moléculas de RNA son estables bajo condiciones fisiológicas e *in vivo* sólo pueden ser hidrolizadas enzimáticamente. Los niveles de las diferentes formas moleculares de RNA necesarios en la célula en cada momento, pueden ser controlados por regulación de su síntesis y por modulación de su hidrólisis.

Las ribonucleasas (RNasas), enzimas que degradan el RNA, son esterasas con modo de acción endo- o exo-, dependiendo de que actúen sobre las uniones diester internas o externas de la cadena polinucleótida. Algunas RNasas pueden también actuar sobre DNA (Farkas, 1982).

Dentro del reino vegetal han sido descritas en una gran variedad de organismos. En plantas superiores, en base a criterios bioquímicos, se distinguen cuatro tipos principales (Green, 1994):

- 1- RNasas tipo I, endoribonucleasas solubles, son específicas de RNA, su pH óptimo es 5-5,5, tienen un peso molecular de 20-25 KDa y baja sensibilidad al EDTA.
- 2- RNasas tipo II, endoribonucleasas microsomales, son específicas de RNA, tienen un pH óptimo entre 6 y 7, un peso molecular de 17-21 KDa y baja sensibilidad al EDTA.
- 3- Nucleasas tipo I, son endonucleasas que degradan tanto RNA como DNA, con un pH óptimo entre 5 y 6,5, un peso molecular de 31-35 KDa y una elevada sensibilidad al EDTA.
- 4- Exonucleasas tipo I, son exonucleasas solubles que degradan tanto RNA como DNA, tienen un pH óptimo entre 7 y 9, un peso molecular de 100 KDa y una elevada sensibilidad al EDTA.

En *Chlorella* se ha identificado una RNasa Tipo I (Brown & Marshall, 1977). En tejidos vegetales ha sido detectada actividad RNasa en distintas partes de la célula, como cloroplastos, mitocondrias, preparaciones ribosomales, núcleo, sistema vacuolar, pared y espacios extracelulares (Green, 1994).

Las RNasas en plantas están asociadas a un amplio rango de procesos fisiológicos y del desarrollo. Así mismo, se observan cambios en los niveles de RNasa en respuesta a diferentes factores tales como el déficit de agua, el déficit de fosfato, la luz, las bajas temperaturas y el ataque por patógenos (Green, 1994). No siempre el aumento de actividad RNasa se correlaciona con un descenso en los niveles de RNA. Esta aparente discordancia puede entenderse si a las RNasas se les atribuyen otras funciones además de la de control de los niveles de RNA. Por ejemplo, se han descrito RNasas exocelulares que intervienen en procesos de autoincompatibilidad. Otro ejemplo lo constituye la inducción de RNasas que se produce bajo condiciones de déficit de fosfato inorgánico. En este último caso se sugiere que estas enzimas formarían parte del mecanismo de recuperación de fosfato; las RNasas podrían proporcionar fosfato teniendo en cuenta que el RNA constituye el mayor reservorio interno de fosfato orgánico. Por último, señalar que las RNasas podrían intervenir en los mecanismos de defensa frente a patógenos, ya que ha sido descrito un aumento de sus niveles tras la infección (Green, 1994; Dods et al., 1996).

Cabe destacar que el incremento de actividad RNasa bajo determinadas condiciones se ve acompañado de un cambio en el patrón electrofórmico (Baumgartner & Matile, 1977; Bryant et al., 1976).

El conocimiento de las enzimas que degradan el RNA es fundamental para poder comprender un gran número de procesos regulatorios y del desarrollo en los que las moléculas del RNA intervienen. Hasta ahora la actividad RNasa no ha sido estudiada en líquenes, por ello y por sus importantes funciones se propone comprobar la presencia de esta actividad en talos liquénicos y caracterizarla bioquímicamente. El hecho de que la actividad

pueda venir determinada por varias isoformas, como sucede en otros organismos, justifica otro de los objetivos planteados, el realizar su estudio electroforético.

2.1.2. Nitrato reductasas

El nitrógeno es un macronutriente esencial para la vida, necesario para la síntesis, de ácidos nucleicos y proteínas, entre otros componentes celulares. Cuando existe una limitación en el suministro de nitrógeno, frecuentemente se produce una reducción del crecimiento y la productividad, de los ecosistemas así como de sus componentes considerados aisladamente (Nash, 1996c). En los suelos el nitrógeno experimenta cambios en su estado de oxidación-reducción como consecuencia de la actividad metabólica de diferentes grupos de bacterias. La forma de nitrógeno inorgánico más abundante del suelo es el nitrato, esto se debe a que las condiciones de la mayoría de los suelos, a excepción de los ácidos y los poco aireados, favorecen el proceso de nitrificación (Maldonado, 1992).

Los líquenes con un alga verde como único fotobionte pueden utilizar como fuente de nitrógeno nitrato y amonio. En el crecimiento y la supervivencia de dichos líquenes resulta crítica la cantidad de nitrógeno disponible (Nash, 1996c).

El nitrato absorbido por los vegetales es reducido a amonio y este es seguidamente incorporado a esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos. Este último proceso se denomina asimilación de amonio.

El proceso de reducción de nitrato se lleva a cabo en dos etapas; en la primera el nitrato se reduce a nitrito por acción de la nitrato reductasa y en la segunda el nitrito se reduce a amonio por acción de la nitrito reductasa. A continuación se produce la asimilación del amonio generado y la formación de distintos compuestos nitrogenados.

La enzima nitrato reductasa es clave en la regulación del proceso de reducción de nitratos. Existen dos tipos de nitrato reductasa según el donador de electrones que utilizan: nitrato reductasas dependientes de piridin nucleótidos, que están presentes en organismos eucariotas y las dependientes de ferredoxina, que son las que se encuentran en procariotas (Nakamura et al., 1994).

Se ha detectado actividad nitrato reductasa en líquenes, tanto con métodos de valoración "*in vivo*" como "*in vitro*" (Shapiro, 1985, 1987, 1989, 1991; Avalos & Vicente, 1985).

La enzima nitrato reductasa es inducible por sustrato y muestra una elevada velocidad de turnover (Sinha & Nicholas, 1981). Se encuentra estrictamente regulada por un mecanismo posiblemente complejo que se compone de:

- Regulación de la síntesis
- Regulación de la degradación
- Regulación de la actividad (inactivación reversible, activación por efectores, compartimentación).

La actividad nitrato reductasa se encuentra regulada por factores endógenos tales como la disponibilidad de poder reductor en hojas (Kenis et al., 1992) y en el caso de los líquenes, el contenido de sustancias liquénicas (Shapiro, 1987), así como por factores externos tales como la luz (intensidad y distribución espectral), la temperatura, concentración de oxígeno y dióxido de carbono, disponibilidad de nitrato y otros metabolitos (Kennis & Trippi, 1987; Kennis et al., 1989; Shapiro, 1989; Solomonson & Barber, 1990).

En base a la importancia que la nitrato reductasa tiene en el proceso de asimilación de nitrógeno y que es una enzima cuya actividad se ve afectada por factores muy diversos, se ha propuesto el valorar *in vivo* la actividad nitrato reductasa de las especies *Lasallia hispanica*, *Parmelia omphalodes* y *Cornicularia normoerica*. La técnica de valoración *in vivo* se presenta como una técnica muy atractiva en ecofisiología porque da una buena estima del

poder reductor y del contenido de la enzima y además requiere una menor inversión de tiempo en el proceso que la valoración "*in vitro*" (Pizelle & Thiéry, 1994). La actividad medida *in vivo* se puede denominar "actividad nitrato reductasa funcional" (Sinha & Nicholas, 1981). También se propone un estudio de la variabilidad intratalina e intertalina de la actividad en talos de *L. hispanica*. Los estudios de variabilidad se han realizado sólo con *L. hispanica* ya que su biotipo umbilicado permite reconocer más fácilmente los individuos independientes.

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1. Actividad ribonucleasa

2.2.1.1. Extracción enzimática:

Los talos líquénicos fueron previamente lavados con agua destilada y mantenidos en ella durante 15 minutos para su hidratación, eliminándose posteriormente el exceso de agua de los talos con papel de filtro. Los talos fueron macerados con nitrógeno líquido y homogeneizados en tampón Tris-HCl 0,05 M (pH 7,3), 0,25 M sacarosa, frío, en la proporción de 10 ml de tampón de extracción por gramo de peso seco. El homogeneizado fue centrifugado a 26.000g-30 minutos (2°C) y el sobrenadante correspondiente, tras ser filtrado a través de filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/A), constituyó el extracto libre de células utilizado en la valoración de la actividad ribonucleasa. La medida se realizó inmediatamente después de la obtención del extracto.

Los extractos utilizados para llevar a cabo, el isoelectroenfoque, la electroforesis y la determinación de peso molecular por cromatografía líquida (FPLC), se prepararon, partiendo de los extractos libres de células obtenidos como se ha indicado previamente, procesándolos según el método de Fashelt (1980) con algunas modificaciones. Las proteínas de los extractos fueron precipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80% de saturación y centrifugados a 23.000g-30 minutos. El precipitado fue resuspendido en 3 ml de glicina al 1% (p/v) y transferido a tripas de diálisis, las

cuales habían sido previamente embebidas en glicina al 1%. La diálisis se realizó a 5°C. A las 12 horas, se renueva la solución de glicina y se mantiene en las mismas condiciones otras 12 horas. Finalizada la diálisis las muestras fueron liofilizadas y almacenadas a -20°C hasta su uso.

2.2.1.2. Actividad enzimática:

La actividad ribonucleasa fue ensayada según el método descrito por Blackburn et al. (1977) con algunas modificaciones. El método está basado en la medida de la producción de mono- y oligonucleótidos solubles en medio ácido, en presencia de nitrato de lantano, usando RNA de levadura como sustrato.

Ensayo: Se incubaron a 37°, durante 5 minutos, 100 μ l de extracto enzimático, 100 μ l de tampón acetato 0,5 M (pH 4,5) y 50 μ l de seroalbumina bovina al 1% (p/v). La reacción que comenzó por adición de 250 μ l de RNA de levadura (Sigma, tipo III) al 0.2% (p/v) se llevó a cabo durante 60 minutos a 37°C. La reacción se paró introduciendo los tubos en un baño con hielo y adicionando, tras 5 minutos, 500 μ l de una solución fría de nitrato de lantano 22 mM en ácido perclórico 1,2 M como agente precipitante. La suspensión resultante se agitó vigorosamente y se mantuvo en el baño con hielo, durante 30 minutos. A continuación se centrifugó a 10.000g-10 minutos y el sobrenadante se diluyó diez veces con agua destilada, midiéndose la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Zeiss PM2 DL tras ajustar el aparato con el blanco. El control se preparó de la misma forma que el tubo de reacción pero omitiendo los 60 minutos de reacción. El blanco fue preparado con 500 ml de agua destilada. A los valores de absorbancia de la muestra se restaron los del control para calcular la absorción neta. Se define como unidad de actividad enzimática a la cantidad de enzima capaz de producir un aumento neto en la absorción a 260 nm de 1,0, en las condiciones del ensayo.

2.2.1.3. Localización subcelular de la actividad RNasa de *Lasallia hispanica*

Para poder determinar la localización subcelular de la actividad RNasa de *L. hispanica*, extractos libres de células fueron fraccionados como se indica a continuación. El liquen fue lavado en agua destilada, pulverizado con nitrógeno líquido, homogeneizado en frío con tampón Tris-HCl 0,05M, 0,25M sacarosa (pH 7,3) (10 ml por gramo de peso seco) y centrifugado a 1000g-10 minutos (2°C). El sobrenadante fue filtrado y centrifugado a 26.000g-30 minutos. Este segundo sobrenadante fue considerado la fracción F1. El precipitado fue lavado con agua destilada, centrifugado a 30.000g-30 minutos (2°C) y el sobrenadante resultante constituyó la fracción F2. En las fracciones F1 y F2. se valoró la actividad RNasa a diferentes pH.

2.2.1.4. Determinación del pH óptimo y sensibilidad al EDTA

El pH óptimo fue determinado usando tampón 0,05M en el rango de pH de 4,0 a 8,0, bajo las condiciones estándar. Para el rango de pH 4,0-5,5 se empleó tampón acetato sódico y para el rango 6,5-8,0 se utilizó tampón fosfato.

La sensibilidad al EDTA (Ácido Etilendiaminotetracético sal disódica) se determinó midiendo la actividad enzimática en presencia de una concentración 1 mM de EDTA en la mezcla de reacción.

2.2.1.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS)

- Preparación del gel:

Los geles discontinuos de poliacrilamida se prepararon según Laemmli (1970). En el molde de polimerización del Miniprotean II (Biorad), se vertió despacio, para evitar la formación de espuma, la mezcla correspondiente al gel separador que se trataba de una disolución filtrada y desgasificada de acrilamida al 11,7% (p/v), N,N'-metilénbis-acrilamida 0,32% (p/v), SDS al 0,1%

en tampón Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8), a la que se añaden 2,5 ml de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y 25 ml de una solución acuosa recién preparada de persulfato amónico al 10% (p/v). Con el fin de favorecer la polimerización sin formación de menisco, se depositó cuidadosamente una delgada capa de tampón Tris-HCl 0,3 M (pH 8,8) sobre la mezcla de polimerización. Transcurridos 45-60 minutos, se eliminó el tampón y sobre el gel separador, ya polimerizado, se vertió la disolución del gel concentrante compuesta de acrilamida 3,8% (p/v), N,N'-metileno-bis-acrilamida al 1% (p/v), SDS al 1% (p/v) en tampón Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8) a la que se añadió 5 μ l de TEMED y 25 μ l de persulfato amónico al 10%. Antes de que se produjera la polimerización del gel concentrante se colocó el molde que forma los pocillos de aplicación.

- Preparación de las muestras:

Las muestras liofilizadas, las cuales han sido preparadas según se explica en el apartado 2.2.1.1, se resuspendieron en agua destilada añadiendo previamente a la electroforesis un volumen igual al de la resuspensión de tampón de aplicación Tris-HCl 125 mM (pH 6,8) conteniendo SDS 4% (p/v), glicerol 21,4% (p/v) y azul de bromofenol 0,01%. El tampón de aplicación no llevaba mercaptoetanol porque los agentes reductores tienen efectos negativos sobre la detección de actividad ribonucleasa (Yen & Green, 1991). Las muestras así preparadas se calentaron en un baño a 100°C durante 2 minutos. Se cargaron aplicaciones de 10 μ l que contenían alrededor de 4 mg de proteína.

- Condiciones de la electroforesis:

La electroforesis se llevó a cabo en tampón glicina 38 mM, Tris 5 mM (pH 8,3), conteniendo SDS al 0,1% (p/v). Fue desarrollada a una diferencia de potencial constante de 80 Voltios cuando la muestra está en el gel concentrante y de 180 Voltios desde que alcanza el gel separador. El proceso se dio por finalizado cuando el azul de bromofenol alcanzó el extremo del gel separador.

Para el cálculo del peso molecular (P_m) de las proteínas de la muestra, se realizó una recta de calibración construida con las siguientes proteínas patrón (MW-SDS-70, Sigma):

- Lisozyma. $P_m = 14,3$ KDa.

- β -lactoglobulina. $P_m=18,4$ KDa.
- Trypsinogeno. $P_m=24$ KDa.
- Pepsina: $P_m=34.7$ KDa.
- Albúmina de huevo: $P_m=45$ KDa.
- Seroalbúmina bovina: $P_m=66$ KDa.

2.2.1.6. Isoelectroenfoque en placa

- Preparación del gel:

Geles de poliacrilamida de T 7,5%, C 3% y grosor 3 mm, sobre soporte de plástico, fueron elaborados siguiendo las instrucciones del Multiphor II (LKB). En el molde de polimerización se vertió la solución del gel desgasificada que contenía acrilamida 7,275% (p/v), N,N'-metilenbis-acrilamida 0,225% (p/v) y anfolitas al 8% (rango de pH 2-11, Serva) y a la que se añadió 60 μ l de TEMED al 10% y 75 μ l de persulfato amónico al 10%. Después de 60 minutos de polimerización el gel fue desmoldado y almacenado por un período no superior a 18 horas, en ambiente húmedo a 5°C, hasta su uso.

- Preparación de las muestras:

Las muestras liofilizadas, las cuales han sido preparadas según se explica en la sección 2.2.1.1, fueron disueltas en agua destilada, en función de la concentración requerida.

- Condiciones eléctricas del isoelectroenfoque en placa:

Para llevar a cabo el isoelectroenfoque se utilizó el equipo Multiphor II-2117, el cual fue conectado a un baño termostático LKB-Multitemp II, para mantener una temperatura de 4°C durante el experimento.

El gel fue preelectroenfocado durante 45 minutos a una intensidad constante de 15 mA. Tras este proceso se dispusieron las muestras sobre el gel, a un centímetro del cátodo, utilizando como aplicadores papel Whatman nº 1 de dimensiones (5 mm x 5 mm). El volumen de las aplicaciones fue de 10 μ l, conteniendo aproximadamente 8 mg de proteínas.

El enfoque fue llevado a cabo a una potencia máxima de 15 W y una diferencia de potencial máxima de 1500V, durante 180 minutos. Los aplicadores fueron retirados a los 30 minutos del inicio del enfoque.

El punto isoeléctrico de las proteínas de la muestra fue determinado a partir de una recta de calibración construida con las siguientes proteínas patrón (rango amplio de pI de Pharmacia):

Amyloglucosidasa, pI 3,50

Inhibidor de la tripsina de soja, pI 4,55

β -lactoglobulina A, pI 5,20

Carbónico anhidrasa B bovina, pI 5,85

Carbónico anhidrasa B humana, pI 6,55

Banda ácida de myoglobina de caballo, pI 6,85

Banda básica de myoglobina básica de caballo, pI 7,35

Banda ácida de lectina de lenteja, pI 8,15

Banda media de lectina de lenteja, pI 8,45

Banda básica de lectina de lenteja, pI 8,65

Tripsinógeno, pI 9,30

2.2.1.7. Localización de proteínas en geles de electroforesis y electroenfoque:

La tinción general de proteínas fue realizada con el sistema de tinción de plata Biorad, siguiendo la metodología recomendada por la casa Biorad, con algunas modificaciones. El protocolo constó de los siguientes pasos:

1-Fijación con retirada de las anfolitas (sólo en geles de isoelectroenfoque)

- Fijación en una solución de 30% metanol, 10% tricloroacético y 3,5% ácido sulfosalicílico (1 hora).
- Fijación en varios volúmenes de una solución 30% metanol, 12% ácido tricloroacético (2 horas).

2-Fijación:

- Incubación en 40% metanol, 10% ácido acético (Toda la noche).

- Incubación en 10% etanol, 5% ácido acético. (2x10 minutos)

3- Lavados con agua destilada, hasta eliminar el ácido acético de las etapas de fijación.

4- Incubación con solución oxidante (Biorad) (3 minutos).

5- Lavados con abundante agua hasta que se elimina el color amarillo de los geles.

6- Incubación con reactivo de plata (Biorad) (15 minutos).

7- Lavado con agua destilada (1 minuto).

8- Incubación en desarrollador (Biorad), varios cambios.

9- Lavado en ácido acético para parar el desarrollo.

En geles de isoelectroenfoque para revelar bandas minoritarias sin aumento del velo del gel, se realizó una doble tinción. Para ello los geles teñidos con el protocolo anterior, se lavaron con abundante agua destilada al menos durante 1 hora (eliminación del ácido acético) y después se repitió el protocolo anterior desde el paso 6.

En todos los pasos de protocolo se utilizó agua destilada y desionizada.

2.2.1.8. Localización de la actividad RNasa en geles de electroforesis y electroenfoque

En esta tesis siguiendo el método de Blank et al. (1982), se ha desarrollado un método de detección de la actividad sin necesidad de incluir el RNA del gel. La reacción tuvo lugar al incubar los geles en una solución de RNA y las zonas donde se ha producido la hidrólisis se detectan, por tinción negativa, utilizando un colorante básico, el cual sólo interacciona con el RNA no hidrolizado.

Rutinariamente el método de tinción seguido consta de las siguientes etapas:

1.- Fase de reacción:

Incubación del gel en una solución de RNA de levadura (Sigma, tipo III) 3mg/ml en tampón acetato 0,5 M (pH 4,5), a 37°C, durante 60 minutos.

2.- Fase de tinción:

Incubación en azul de metileno 0,2% (p/v) en tampón Tris-HCl 10mM (pH 8,0) a temperatura ambiente, durante 20 minutos.

3.- Fase de revelado:

Lavado con agua destilada abundante hasta que se ha eliminado el exceso de colorante y se hacen visibles las bandas incoloras de RNasa sobre fondo azul.

En el caso de los geles de electroforesis en condiciones desnaturalizantes, previamente a la detección de la actividad tienen que ser tratados con el fin de eliminar el SDS y renaturalizar la enzima. El método seguido se basa en el descrito por Blank et al. (1982), con algunas modificaciones:

A.- Incubación en tampón Tris-Hcl 10 mM (ph 8,0) a 20°C; (2x15 minutos)

B.- Incubación en tampón Tris-Hcl 10 mM (ph 8,0), isopropanol 25%(v/v), a 20°C (2x15 minutos).

C.- Incubación en tampón Tris-Hcl 10 mM (ph 8,0), a 20°C, (2x15 minutos).

2.2.1.9. Determinación del peso molecular por FPLC:

Se ha utilizado un sistema de FPLC (Fast permeation liquid chromatography) de Pharmacia.

El liofilizado de proteínas de *L. hispanica*, preparado según está descrito en la sección 2.2.1.1, fue resuspendido en tampón fosfato 0,05 M (pH 7,4), 0,15 M ClNa. La carga de 0,15 mg de proteínas en 100 μ l fue introducida en una columna Superdex 75HR1030 equilibrada con el tampón de resuspensión. La elución se realizó pasando este tampón a una velocidad de 0,25 ml/min a temperatura ambiente. Se recogieron fracciones de 0,5 ml en las cuales se valoró la actividad RNasa. El peso molecular fue determinado a partir de una recta de calibración construida con los datos obtenidos al cargar, en las mismas condiciones del ensayo, una mezcla que contenía las siguiente proteínas de peso molecular conocido (Sigma, MW-GF-70):

- Seroalbúmina bovina; Pm=66 KDa.
- Carbónico anhidrasa de eritrocitos bovinos; Pm=29 KDa.
- Citocromo C de corazón de caballo; Pm=12,4 KDa.
- Aprotinina de pulmón bovino; Pm=6,5 KDa.

Las proteínas fueron medidas por el método de Lowry et al. (1951) y tras la elución de la columna por absorbancia a 280 nm con un registrador

2.2.2. Actividad nitrato reductasa

2.2.2.1 Valoración de la actividad nitrato reductasa

La actividad nitrato reductasa fue valorada *in vivo* según el método descrito por Guerrero (1985). La actividad fue estimada midiendo la cantidad de nitrito producido por la enzima a partir de nitratos, utilizando el poder reductor endógeno. La reacción se realizó en oscuridad para evitar la reducción de nitritos a amonio y en condiciones anaeróbicas, para prevenir la competición del oxígeno por piridin nucleótidos reducidos (Guerrero, 1985).

La metodología seguida fue la que se describe a continuación. Los talos liquénicos fueron lavados e hidratados por inmersión en agua destilada, 15 minutos y partidos en trozos cuadrados de aproximadamente 5 mm² de área. Los fragmentos correspondientes a 0,2 g de peso seco fueron infiltrados al vacío durante 3 minutos en 5 ml del medio de incubación siguiente:

- Tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,7)
- Nitrato potásico (KNO₃), 0,1 M.
- Isopropanol 1% (v/v).

El isopropanol fue añadido para aumentar la permeabilidad a los nitratos y nitritos.

Tras la infiltración, que por un lado favorece la accesibilidad del medio del ensayo al interior de las células y por otro facilita condiciones anaeróbicas, se retiraron 0,9 ml para la medida de los nitritos que existían en la muestra a tiempo 0.

El tubo de reacción, tras introducir nitrógeno gas durante 5 minutos, se incubó 30 minutos a 37°C y en oscuridad. Transcurrido este tiempo se tomó una alícuota de 0,9 ml para la determinación de nitritos.

La valoración de nitritos se realizó según el método de Snell & Snell (1949). Este método está basado en la formación de una sal diazónica al reaccionar el nitrito con sulfanilamida, en medio ácido y la posterior formación de un complejo coloreado al reaccionar la sal diazónica con N-(1-naphtyl)etilendiamina. El complejo de color rosa, tiene un máximo de absorción en 540 nm.

El ensayo de nitritos consistió en mezclar 0,9 ml de solución problema, 0,3 ml de sulfanilamida al 1% (p/v) en HCl 2,4 N y 0,3 ml de dicloruro de N-(1-naphtyl)etilendiamina al 0,02% (p/v). Los tubos una vez agitados vigorosamente, fueron centrifugados a 5.000g-10 minutos, para clarificar la mezcla. En el sobrenadante se midió la absorbancia a 540 nm.

Como blanco de la reacción se utilizó 0,9 ml del tampón de incubación, el cual se procesó como el resto de los tubos para la medida de nitritos. Los datos de absorbancia se transformaron en nanomoles de nitrito, utilizando una recta patrón. La diferencia entre el tubo de reacción y el tubo a tiempo cero corresponde a los nitritos generados durante la reacción enzimática. Se define como unidad de actividad enzimática a la cantidad de enzima capaz de producir un nanomol de nitrito en las condiciones de ensayo.

2.2.2.2. Variabilidad intertalina e intratalina de la actividad nitrato reductasa.

Para el estudio de la variabilidad intertalina se valoró la actividad en 15 muestras diferentes, recolectadas el mismo día y en el mismo lugar. Cada una de las muestras está constituida por uno o varios talos siempre completos y de tamaño y aspecto externo similar hasta completar un peso suficiente para la valoración de la actividad. Se determinó el peso seco y el peso plenamente turgente de todos los talos y se calculó el área de su superficie a partir de una fotocopia de los talos en el momento de máxima hidratación, con un analizador semiautomático Mop-Videoplan.

Para el estudio de la variabilidad intratalina, se hicieron tres partes de cada talo, zona central, intermedia y marginal, obtenidas mediante el corte de círculos concéntricos determinados por la división del radio del talo en tres segmentos iguales.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Actividad ribonucleasa

2.3.1.1. Distribución subcelular en *Lasallia hispanica*:

La actividad ribonucleasa (RNasa) en esta especie líquénica presentó una localización predominante en la fracción soluble como puede verse en la tabla V.

2.3.1.2. pH óptimo y sensibilidad al EDTA

En las tres especies estudiadas la actividad presentó un pH óptimo ácido; para *Lasallia hispanica* y *Cornicularia normoerica* se situó a pH 4,5 y para *Parmelia omphalodes* a pH 4, bajo las condiciones de ensayo (Tabla I, Fig. 1a, 1b, 1c).

La actividad RNasa no se modificó en presencia de EDTA.

Tabla I. Localización subcelular de actividad RNasa en extractos de *Lasallia hispanica*. Los extractos fueron fraccionados en dos fracciones solubles, F1 y F2. La actividad RNasa fue medida a diferentes pHs y fue expresada como porcentaje de la actividad total detectada.

ACTIVIDAD RNasa (%)			
Fracción	pH		
	4,5	6,5	8
F1	99,72	99,4	0
F2	0,27	0,53	0

2.3.1.3. Características electroforéticas

En isoelectroenfoque en placa de extractos de *L. hispanica* se separaron 7 bandas de actividad, caracterizadas por los siguientes puntos isoeléctricos (pIs) 7, 6,28 , 4,58 , 4,45 , 4,25 , 3,98 y 3,47 (Fig. 2). Las bandas más intensamente teñidas para actividad RNasa, fueron las cuatro bandas dentro del rango de 3,95 a 4,58 (Fig. 2). En *C. normoerica* se detectaron 4 bandas con pIs 6,28 , 3,95 , 3,57 y 3,39 (Fig. 2). Las bandas más importantes fueron las de pIs 3,39 y 3,57. En *P. omphalodes* debido a la menor actividad de la enzima y la complejidad de su extracto (presencia de pigmentos difíciles de eliminar), no fue posible detectar bandas de actividad.

En electroforesis con SDS, en los extractos de *L. hispanica* fue detectada una única banda de actividad RNasa de peso molecular estimado de 31,8 KDa (Fig. 3). *C. normoerica* presentó tres bandas, dos de ellas más intensas con un peso molecular estimado de 36,07 KDa, 31,8 KDa y otra de 17,13 KDa.

2.3.1.4. Cálculo del Peso Molecular por cromatografía en gel de *L. hispanica*:

El peso molecular aparente de la RNasa no desnaturalizada de *L. hispanica*, fue alrededor de 33 KDa (Fig. 4a, 4b).

2.3.2. Actividad nitrato reductasa

2.3.2.1. Actividad nitrato reductasa en talos liquénicos

La actividad nitrato reductasa fue detectada *in vivo* en las especies liquénicas *Lasallia hispanica*, *Parmelia omphalodes* y *Cornicularia normoerica*. En la tabla II, se muestran los valores medios de actividad nitrato reductasa para talos recolectados a lo largo de todo el período de experimentación. La actividad medida en la especie *P. omphalodes* fue superior a la de las otras dos especies.

TABLA II: Tabla de los valores medios de actividad nitrato reductasa de talos de las especies *L. hispanica*, *P. omphalodes* y *C. normoerica*, recolectados entre marzo del 95 y abril del 96. Los valores se presentan como media (error estándar).

	Actividad nitrato reductasa (unidad/g peso seco)	n° muestras
<i>L. hispanica</i>	39,5 (3,3)	48
<i>P. omphalodes</i>	133,9 (11)	48
<i>C. normoerica</i>	21,9 (1.7)	20

2.3.2.2 Variabilidad intertalina e intratalina en *Lasallia hispanica*

Para estudiar la variabilidad intertalina de la actividad nitrato reductasa *in vivo* en talos de *L. hispanica*, se ha relacionado esta actividad con el peso plenamente turgente referido a peso seco (Fig. 5a) y con el área del talo referida a peso plenamente turgente (Fig. 5b). En ambos casos se observó una gran variabilidad de la nitrato reductasa.

Se ha estudiado también, la variabilidad intratalina, en talos de *L. hispanica*. La máxima actividad se detectó en la zona central del talo y la mínima en la zona marginal (Fig. 5c). El descenso entre las dos zonas se produce de forma gradual. Sin embargo, la actividad en las distintas zonas no mostró diferencias significativas. En la figura 5d se representa la variación en la retención de agua, determinada como peso plenamente turgente respecto a peso seco, en tres zonas del talo (central, intermedia y marginal). La retención de agua aumentó gradualmente desde la zona central a la zona marginal. La retención de agua no mostró tampoco diferencias significativas entre las distintas zonas del talo.

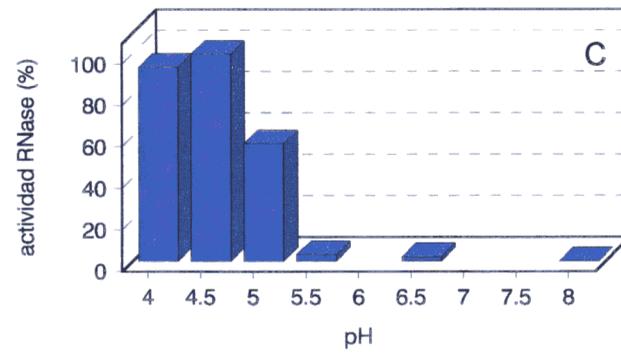
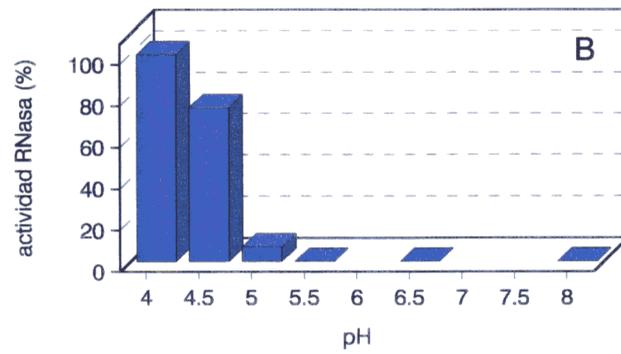
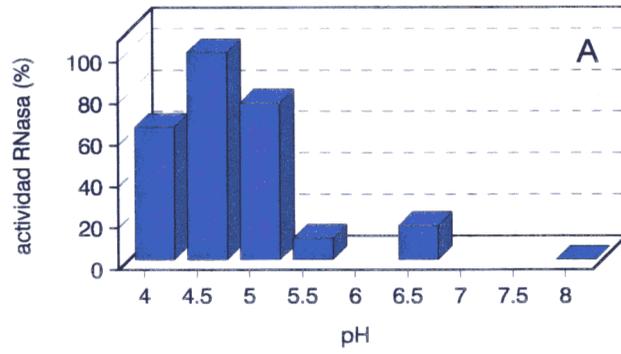


Fig. 1: Efecto del pH sobre la actividad RNasa en la fracción F1 de *Lasallia hispanica* (A), *Parmelia omphalodes* (B) y *Cornicularia nomoerica* (C).

Fig. 2: Isoelectroenfoque, en placa, de rango amplio (2-11), en geles de poliacrilamida de 0,3mm de grosor, de proteínas de *Lasallia hispanica* y *Cornicularia normoerica*. Línea A: Tinción de plata de las proteínas del *Kit* de rango amplio de pI (Pharmacia). Línea B: *Cornicularia normoerica*, tinción de actividad ribonucleasa. Línea C: *Lasallia hispanica*, tinción de actividad ribonucleasa.

Fig. 3: Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de *Lasallia hispanica* y *Cornicularia normoerica*. Línea A: *Cornicularia normoerica*, tinción de actividad ribonucleasa. Línea B: *Lasallia hispanica*, tinción de actividad ribonucleasa.

Fig. 2

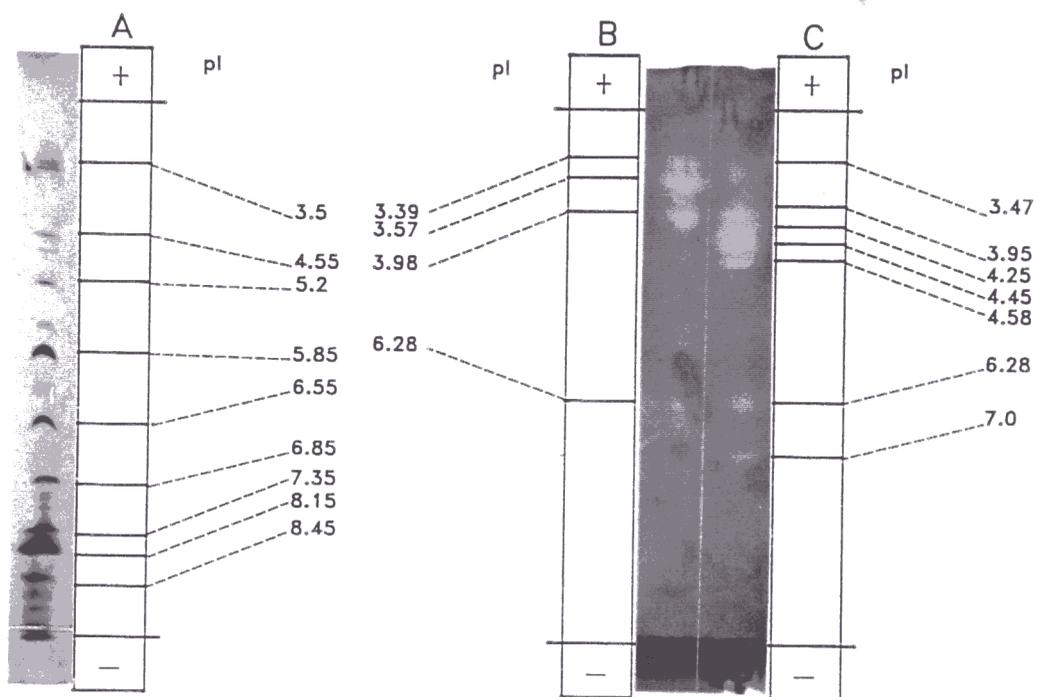
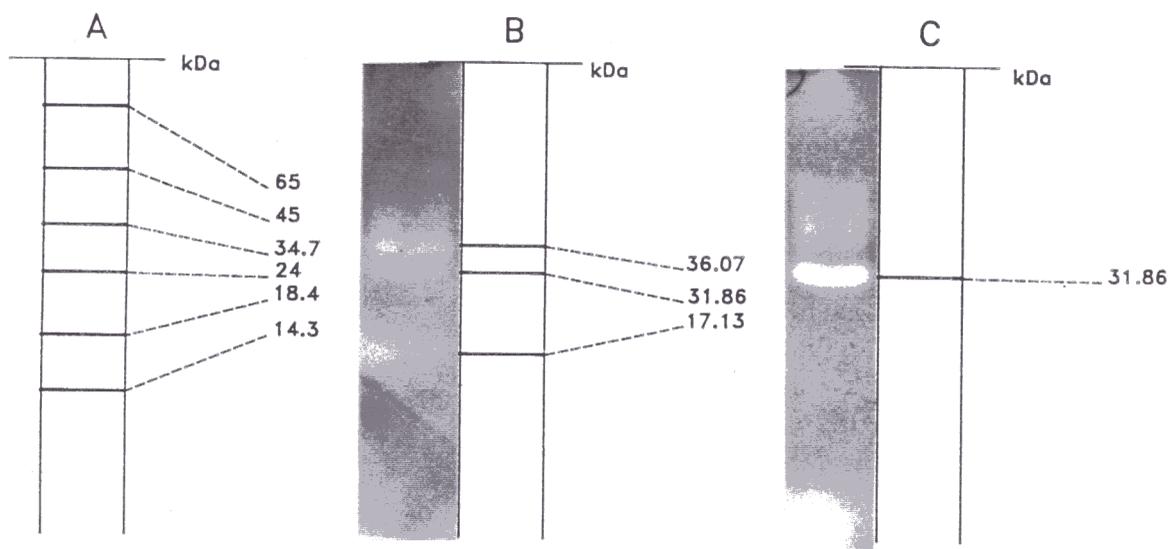


Fig. 3



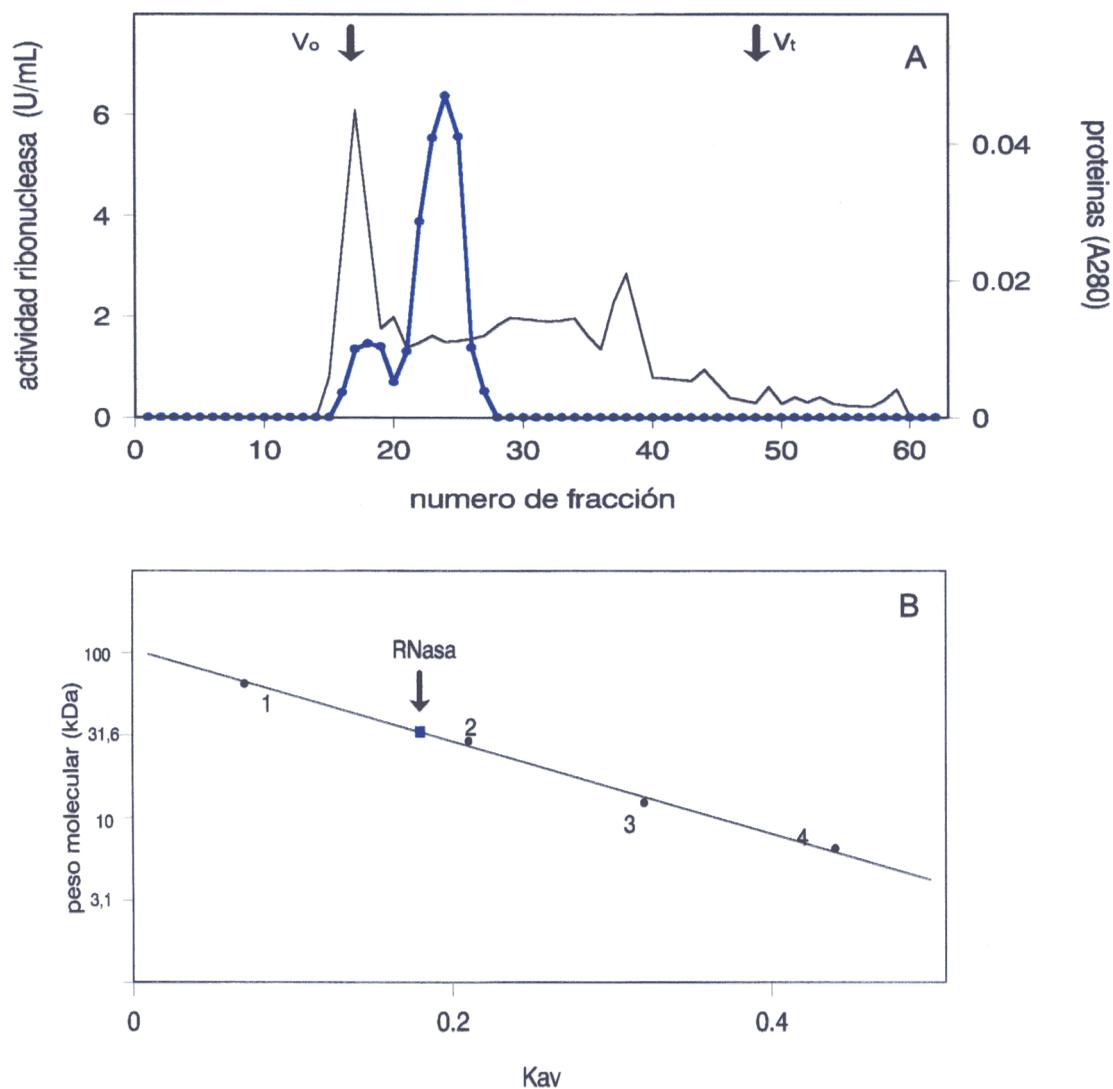


Fig. 4: A- Cromatograma de las proteínas de la fracción F1 de *Lasallia hispanica* precipitadas con sulfato amónico en una columna Superdex 75HR1030. ◆ Actividad ribonucleasa, -- proteínas. B- Estimación del peso molecular por calibración de la columna 75HR1030. Proteínas estándar (1): 1, seroalbúmina bovina (66 KDa); 2, carbónico anhidrasa de eriocito bovino (29 KDa); 3, citocromo c de corazón de caballo (12,4 KDa); apoproteína de pulmon bovino (6,5 KDa); RNasa principal de *L. hispanica* (33 KDa) (■). La línea ha sido dibujada según el ajuste $\log m = 2,022 - 2,79 \cdot K_{av}$ ($r = -0,997$).

2.4. DISCUSIÓN

2.4.1. Actividad ribonucleasa

Por primera vez se ha detectado actividad ribonucleasa (RNasa) en talos líquénicos, en las especies *Lasallia hispanica*, *Parmelia omphalodes* y *Cornicularia normoerica*, líquenes saxícolas de diferente biotipo.

La actividad RNasa en estas tres especies líquénicas está presente, como en otros organismos, principalmente en la fracción soluble. La mayor parte (por encima del 80-90%) de la actividad nucleolítica en extractos libres de células vegetales puede ser recuperada en la fracción soluble; esta actividad RNasa se suele considerar como "citosólica", aunque enzimas localizadas en compartimentos fácilmente fragmentables, como vacuolas y cloroplastos pueden representar las mayores fuentes de la fracción enzimática "citosólica" (Abel & Glund, 1986; Boller & Kende, 1979; Farkas, 1982). Por tanto, la RNasa de estas especies líquénicas podría proceder del citosol o de algún compartimento subcelular ya que la mayoría de las enzimas nucleolíticas pueden ser solubilizadas tanto si ellas están contenidas en algún orgánulo o unidas a él.

El pH óptimo ácido junto con su sensibilidad al EDTA y la localización en la fracción soluble de la enzima en *L. hispanica*, puede permitir el considerar a esta actividad como RNasa tipo Y (de los Ríos et al., 1996b). RNasa tipo I son endoribonucleasas solubles con un pH óptimo de 5,0-5,5 y un peso molecular de 20-25 KDa; generan como producto 3' nucleótidos (E.C.3.1.27.1), y no son sensibles a EDTA (Green, 1994). El pH óptimo de la actividad en los talos fue inferior, pero esta diferencia no debe considerarse importante ya que el pH óptimo de una enzima depende del tampón, del sustrato, de la fuerza iónica y de la composición del extracto (Farkas, 1982). Sin embargo, debido a la falta de ensayos de especificidad de sustrato, estas consideraciones deben tomarse con precaución. Además muchas enzimas degradadoras de RNA no son fácilmente clasificables dentro de alguna de las cuatro clases principales y las diferencias entre ellas no están siempre claras (Green, 1994).

La información del patrón electrofórmico sugiere que la enzima(s) es un complejo de formas moleculares diferentes unas de otras en punto isoeléctrico y comportamiento electroforético, como

ocurre en otros organismos (Kazmierczak & Knypl, 1994) y en otras actividades enzimáticas de líquenes (Hageman & Fashelt, 1990; Fashelt, 1994; de los Ríos et al., 1996, 1997). *L. hispanica* y *C. normoerica* tienen electroformas neutras y ácidas. El patrón electrofórmico es diferente en ambas especies; sólo existe una banda común de pI 6,28 por isoelectroenfoque y una banda de 31,9 KDa por electroforesis. La gran diversidad de puntos isoeléctricos observada sobre todo en *L. hispanica*, puede ser debida a la naturaleza dual de los líquenes. El patrón electroforético de bandas de enzimas extraídas de eucariotas normalmente incluye isoenzimas producidas en distintos compartimentos celulares. En líquenes, sin embargo, los patrones algunas veces son especialmente complejos porque las formas pueden tener su origen en cada uno de los simbioses. Además, en un talo pueden estar presentes varias razas genéticas (Fashelt, 1994). También hay que tener en cuenta las posibles modificaciones de los patrones electrofórmicos por diferentes situaciones fisiológicas.

2.4.2. actividad nitrato reductasa

Lasallia hispanica, *Cornicularia normoerica* y *Parmelia omphalodes* presentan actividad nitrato reductasa sin necesidad de incubar los talos en soluciones de nitrato.

La actividad nitrato reductasa encontrada en *P. omphalodes* es mayor que la presente en *L. hispanica* y *C. normoerica*. Teniendo en cuenta que estos tres especies de líquenes se asientan sobre el mismo sustrato, sería descartable que la diferente disponibilidad de nitratos sea la causa de las diferencias de actividad. Parece más acertado atribuir estas diferencias a la mayor tasa de crecimiento del género *Parmelia* (Hale, 1973), con el consiguiente mayor requerimiento de nitrógeno.

La alta variabilidad intertalina de la actividad observada podría deberse a muchos factores:

- El aporte de nitrógeno en forma de nitrato al talo es fundamental para el desarrollo de la actividad en una enzima inducible por sustrato como la nitrato reductasa. En el caso de los líquenes saxícolas la disponibilidad de nitrógeno es, posiblemente, dependiente de la disposición del talo en la roca, ya que los aportes están determinados por fenómenos meteorológicos tales como lluvia o nieve y de los restos animales o vegetales depositados sobre ellos.
- El hecho de que la valoración sea "*in vivo*", hace que la actividad enzimática dependa de la disponibilidad de poder reductor endógeno (Kenis et al., 1992). Esta disponibilidad puede variar según el estado fisiológico del talo.
- Además hay que tener en cuenta la alta heterogeneidad genética de los talos liquénicos, ya que en un talo pueden existir diferentes razas genéticas. Esta heterogeneidad que aumenta con la edad, puede ser atribuible a la incorporación de propágulos o a la acumulación de mutaciones somáticas (Larson & Carey, 1986; Fashelt, 1994).

Este comportamiento de alta variabilidad intertalina observado, ha sido también descrito en *Lobaria pulmonaria* (Shapiro, 1987).

Por último, hemos encontrado en *L. hispánica* que la actividad nitrato reductasa muestra una distribución no homogénea a lo largo del talo, siendo mayor en la zona central y descendiendo gradualmente cuando nos acercamos a la zona marginal. El origen de esta enzima es doble, fúngico y algal; siendo mayor la contribución del micobionte (Shapiro, 1988). La variación intratalina de la nitrato reductasa, podría deberse a la diferente proporción de los dos simbiontes a lo largo del talo; el hecho de existir una mayor proporción del fotobionte en la zona marginal (Valladares et al., 1994), podría confirmar el origen principalmente fúngico atribuido a esta actividad enzimática en los líquenes. Las diferencias aunque no son significativas, si muestran una tendencia a una distribución heterogénea, tendencia que se repite para otro parámetro, la retención de agua, medido como proporción de peso plenamente turgente y peso seco (Fig. 5d). La existencia de

gradientes intratalinos en líquenes de la familia *Umbilicaceae* ha sido descrita previamente para los siguientes parámetros: clorofilas, máximo contenido hídrico (Valladares et al., 1994) y sustancias líquénicas (Seriña et al., 1991). En esta familia también han sido encontrados patrones intratalinos heterogéneos de tipo mosaico (Larson, 1983; Larson & Carey, 1986; Posner et al., 1990; Posner et al., 1991).

3 Adquisición fotosintética del CO₂ en *Trebouxia* aislada y liquenizada

3.1. INTRODUCCIÓN

El proceso fotosintético se inicia con la fijación de CO₂ reacción catalizada por la Rubisco, enzima clave del proceso, que utiliza como sustrato el CO₂ y no su forma disuelta. Los fotobiontes liquénicos han desarrollado diferentes estrategias de adquisición fotosintética del CO₂. Los fotobiontes que son cianobacterias así como algas verdes con pirenoide como *Trebouxia* y algunas especies del género *Stichococcus* poseen un mecanismo concentrante del CO₂ (CCM), el cual permite acumular y mantener una mayor concentración de carbono inorgánico disuelto (DIC) en relación al medio externo (Badger & Price, 1992, 1994; Badger et al., 1993; Palmqvist, 1993; Palmqvist et al., 1994, Smith & Griffiths 1996a). Esta alta concentración en las proximidades del sitio activo de la Rubisco supone un aumento de la concentración de sustrato para la actividad carboxilasa, con lo que se favorece la fijación del CO₂ en perjuicio de la fotorrespiración (Badger & Andrews, 1987).

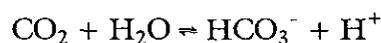
El CCM podría ser muy importante en talos liquénicos bajo ciertas situaciones tales como baja difusión del CO₂ en ellos por un alto contenido hídrico (Lange et al. 1996). Los organismos que poseen este mecanismo concentrante del CO₂ muestran una mayor eficacia en el uso del nitrógeno (biomasa producida por contenido de nitrógeno) debido a la disminución de la tasa de fotorrespiración (Beardall et al. 1982; Raven et al. 1985).

A pesar de su gran importancia no se conocen los detalles del mecanismo CCM en fotobiontes liquénicos; su presencia ha sido inferida de la medida de *pools* internos de DIC, de la eficiencia en la carboxilación de líquenes intactos y en base a experimentos de discriminación isotópica del carbono (Badger et al., 1993; Palmqvist et al., 1994b; Maguas et al., 1995; Smith & Griffiths, 1996a). La evidencia de la presencia de CCM en líquenes se ha obtenido por el estudio

de cambios rápidos en el intercambio gaseoso del CO₂. En cianolíquenes, con esta técnica ha sido posible detectar un aumento del *pool* interno de carbono inorgánico en luz y disminución en oscuridad, el *pool* desciende en presencia de etoxizolamida (EZA) inhibidor de la enzima carbónico anhidrasa (CA) (Badger et al., 1993). El fotobionte *Trebouxia* muestra también un aumento del *pool* aunque menor que el de cianobacterias, el cual es mayor en presencia de EZA a pesar de que la fotosíntesis se encuentre reducida bajo estas condiciones (Badger et al. 1993; Palmqvist et al., 1994; Palmqvist et al, 1997). El diferente efecto del EZA sobre el *pool* en ambos tipos de simbioses podría reflejar tanto diferencias en el funcionamiento del mecanismo concentrante de CO₂ entre algas verdes y cianobacterias, como la existencia y la localización de las diferentes isoenzimas de CA (Palmqvist, 1995).

El pirenoide parece jugar un papel muy importante en la acumulación y fijación del CO₂ en el cloroplasto (Smith & Griffiths, 1996a) y podría tener una función parecida a la de los carboxisomas en cianobacterias, donde se localizan las enzimas Rubisco y CA (Badger & Price, 1992, 1994). La Rubisco ha sido localizada en el pirenoide de algunas especies de algas verdes de vida libre (Lacoste-Royal & Gibbs, 1987; Kajikawa et al., 1988; McKay & Gibbs, 1989; Osafune et al., 1990); sin embargo, hasta el momento no se ha realizado una localización de la enzima en *Trebouxia* de vida libre y en *Trebouxia* liquenizada.

En algas con mecanismo concentrante de CO₂ se ha comprobado la existencia de diferentes isoenzimas de carbónico anhidrasa (CA) con funciones relacionadas con la adquisición y/o fijación del CO₂ (Badger & Price, 1994). La enzima CA cataliza la interconversión del CO₂ y HCO₃⁻



Esta enzima es totalmente necesaria ya que la reacción espontánea, no catalítica, se produce de forma más lenta de lo que se necesita en células vivas (Badger & Price, 1994).

La enzima CA se encuentra en animales, plantas, arqueobacterias y eubacterias. Se pueden agrupar en tres familias : α -CAs (eubacterias, algas verdes y animales), β -CAs (eubacterias y

cloroplastos de plantas) y γ -CAS (arqueobacterias, eubacterias y plantas) (Ericksson et al., 1996). Las distintas isoenzimas tienen diferente localización y función. Entre ellas, una CA periplásmica inducible a bajas concentraciones de CO₂ ha sido bien caracterizada (Coleman et al, 1984; Fukuzaba et al., 1990). Hay también una o varias CAs internas involucradas en el CCM (Karlson et al., 1995; Sultemeyer et al., 1995, Erickson et al., 1996). En varias ocasiones se ha intentado sin éxito medir la actividad CA interna y periplásmica en *Trebouxia* y líquenes con *Trebouxia* como fotobionte (Badger et al, 1993; Palmqvist et al., 1994). Hasta ahora sólo ha sido posible detectar actividad CA en *Trebouxia* con el método, extremadamente sensible, de valoración del intercambio de ¹⁸O *in vivo* por espectrofotometría de masas. Sin embargo, debido a la complejidad de los sistemas *in vivo* estos resultados de detección de la CA son difíciles de interpretar (Palmqvist & Badger, 1996).

En este estudio se ha propuesto localizar la enzima Rubisco y caracterizar la adquisición fotosintética de CO₂ incluyendo la CA, en un cultivo de *Trebouxia erici* y en *L. hispanica*. El conocimiento de las propiedades fotosintéticas del alga libre puede permitir una mejor comprensión del proceso fotosintético en el líquen sin la complejidad que conlleva el trabajar con el talo completo. Algunas medidas serán realizadas con el líquen a fin de comprobar si los resultados obtenidos con el alga de vida libre son transportables al estado liquenizado.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Recolección del material y cultivo del alga

Lasallia hispanica se recolectó en octubre de 1995 en la Sierra de Guadarrama en estado seco y se transportó en este estado y en oscuridad hasta la Universidad de Umeå, donde fue almacenado en las mismas condiciones en una cámara fría (4° C). Previamente a su uso para las

medidas de fluorescencia, talos sanos e intactos fueron reactivados, durante 2-3 días, a 15°C, en 90-95% de humedad relativa y una irradiancia de 30-35 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fotoperíodo de 14 horas) aportado por un banco de fluorescentes (Luxline-ES; Sylvania Danvers Mass, USA; cool-white F36W/184).

Para los estudios de microscopía electrónica de transmisión se recolectaron talos de *L. hispanica*, *Pamelia omphalodes* y *Cornicularia normoerica*, en estado seco, en la Sierra de Guadarrama; su procesamiento comenzó el mismo día de la recolección.

Trebouxia erici (IB 364) se obtuvo de la colección de algas de Innsbruck, Austria. Se hicieron crecer cultivos líquidos en botellas de 0,5 l a 20 °C en medio mínimo de Bold (BBM) (Nichols y Bold, 1965) y luz continua (80 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) suministrada por un banco de fluorescentes (TL 20W/55; Philips, Eindhoven, Holanda). En los cultivos se hizo burbujear aire ambiente (35 Pa CO₂) y fueron agitados con una varilla magnética para obtener una distribución homogénea de células (5-10 mg clorofila ml⁻¹) y diluidos cada semana con medio fresco.

3.2.2. Procesamiento de las muestras para microscopía electrónica de transmisión

Para microscopía electrónica de transmisión se han realizado dos tipos de procesamiento de la muestra según el uso posterior de cada una de ellas. Las muestras utilizadas para la observación ultraestructural convencional, se incluyeron en resina spurr (Spurr, 1969) y cuando se deseaban realizar estudios inmunocitoquímicos, la inclusión se realizó en resina LR-White.

3.2.2.1. Protocolo para el procesamiento de muestras para la observación convencional en microscopía electrónica de transmisión:

- Fijación durante 3 horas en glutaraldehído al 3% en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,1) (TP), a 4°C. Pasadas las tres horas se hacen dos lavados de 20 minutos y un tercer lavado durante toda la noche con TP, todos ellos a 4°C.
- Postfijación de cinco horas en tetróxido de osmio al 1%, en oscuridad y a temperatura ambiente. Pasadas las 5 horas se hacen tres lavados de 30 minutos con TP.
- Deshidratación en serie creciente de etanol, a temperatura ambiente. Lavados de 15 minutos en etanol del 30%, 50%, 70%, de 30 minutos en 90% y para finalizar 3 lavados de 1 hora con etanol absoluto. La deshidratación se completa con dos lavados de 20 minutos en óxido de propileno.
- Infiltración durante toda la noche en mezcla de resina Spurr- óxido de propileno 1:1.
- Impregnación en resina Spurr durante tres días en nevera.
- Inclusión y polimerización en Spurr, 24 horas a 37°C.
- Obtención de cortes ultrafinos, de aproximadamente 90 nm, con ultramicrotomo Reichert Ultracut-E provisto de una cuchilla de diamante. Los cortes son recogidos en rejillas de cobre cubiertas por una película de formvar.
- Tinción de los cortes durante 12 minutos con citrato de plomo (Reynolds, 1963).

3.2.2.2. Protocolo para el procesamiento de muestras para estudios inmunocitoquímicos por microscopía electrónica de transmisión.

- Fijación durante 2 horas y media en glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,05 M (pH 7,4) (TC), a 4°C. Transcurridas las 2,5 horas se hacen dos lavados de 20 minutos y un tercer lavado durante toda la noche, con TC, todos ellos a 4°C.
- Deshidratación en serie creciente de etanol, a 4°C, con lavados de 15 minutos en soluciones acuosas de etanol al 30%, 50%, 70% y tres lavados en 90%, el primero de media hora y los otros dos de 1 hora.
- Infiltración durante 4 horas, a 4°C, en una mezcla de alcohol del 90%:LR-White (2:1).

- Infiltración durante 4 horas, a 4°C, en una mezcla de LR-White:etanol absoluto (2:1).
- Impregnación en resina LR-White durante 3 días, realizándose dos cambios del medio de inclusión durante el período.
- Inclusión en cápsulas de gelatina cerradas, para evitar la presencia de oxígeno.
- Polimerización a 60°C durante 48 horas.
- Obtención de cortes ultrafinos de aproximadamente 90 nm, con ultramicrotomo Reichert Ultracut-E provisto de cuchilla de diamante. Los cortes son recogidos en rejillas de níquel cubiertas por una película de formvar.

3.2.3. Proceso inmunocitoquímico para la localización de la Rubisco

La técnica utilizada fue el inmunomarcado con oro coloidal post-inclusión. El proceso inmunocitoquímico se llevo a cabo en un período no superior a 12 horas después de la obtención de los cortes ultrafinos. El protocolo incluyó los siguientes pasos:

- Bloqueo: Las rejillas fueron introducidas durante 1 hora en tampón tris salino con seroalbúmina en una concentración de 20 mg/ml. El tampón utilizado fue Tris-HCl 10 mM (ph 7,4) (tampón A).
- Incubación a 37°C durante 1 hora con el anticuerpo primario diluido en tampón A con 20 mg/ml de seroalbúmina. El anticuerpo primario utilizado fue anticuerpo anti-subunidad L de la Rubisco de *Euglena gracilis* obtenido en conejo. El anticuerpo se utilizó con una dilución 1:1000
- Lavados en tampón A con 20 mg/ml seroalbúmina (5 lavados de 2 minutos). Temperatura ambiente.
- Incubación a 37°C durante 1 hora con anticuerpo secundario. Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo comercialmente disponible de cabra anti-conejo unido a oro coloidal de 15 nm (Biocell). Este anticuerpo secundario es utilizado a la dilución 1:25.
- Lavados en tampón A con 2 mg/ml de seroalbúmina (5 lavados de 3 minutos). Temperatura ambiente.
- Lavados en tampón A con seroalbúmina 2 mg/ml, triton x-100 al 0,1% (3 lavados de 1 minuto). Temperatura ambiente.

- Lavados en agua destilada. Temperatura ambiente.

- Tinción de las rejillas: una vez que las rejillas estuvieron secas, fueron teñidas durante 1 minuto con acetato de uranilo en oscuridad y 8 minutos con citrato de plomo.

Paralelamente al proceso descrito, fueron realizados dos controles:

* Rejillas las cuales no fueron incubadas con el anticuerpo primario sino con tampón A con 20 mg/ml de seroalbúmina.

* Rejillas las cuales no fueron incubadas con el anticuerpo secundario sino en tampón A con 2 mg/ml de seroalbúmina .

3.2.4. Medidas de fluorescencia

Para la medida de la fluorescencia modulada de la clorofila a se utilizó un fluorómetro PAM 2000 (Walz, Effeltrich, Alemania) en una cubeta de temperatura controlada (LD2, Hansatech). La luz de medida modulada, la luz actínica ($19-400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), la luz rojo lejano y los flashes saturantes ($8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), fueron suministrados por las fuentes de luz propias del PAM 2000 a través de un haz de fibra óptica. Todos los datos fueron almacenados en un ordenador portátil (compaq 386) conectado al PAM 2000 y en un registrador Seikonic SS 250F.

El talo liquénico reactivado como ha sido indicado previamente se introdujo en una cubeta con una temperatura controlada de 15°C (gracias a un baño termostatzado al que estaba conectada) y una humedad relativa del 100%. El talo hidratado se mantuvo dentro de la cubeta y en oscuridad durante 15 minutos; tras esta adaptación a la oscuridad se midió inmediatamente la fluorescencia mínima (F_0) y la fluorescencia máxima (F_m). Después de esta medida se suministró la luz actínica de menor intensidad ($19 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y cuando se alcanzó el estado estacionario de fluorescencia (10-15 minutos) se midió F_0' (F_0 de la muestra preiluminada), F_s (fluorescencia en el momento del estado estacionario) y F_m' (F_m de la muestra preiluminada). El mismo procedimiento se utilizó para la medida de estos parámetros a las otras intensidades de luz actínica: 44, 90, 200 y $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A partir de los datos recogidos se calcularon los siguientes parámetros:

- Rendimiento de fluorescencia:

$$\Delta F/F_m' = (F_m' - F_s)/F_m' \text{ (Genty et al., 1989)}$$

- Atenuación fotoquímica de fluorescencia:

$$qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0) \text{ (Genty et al., 1989)}$$

- Atenuación no fotoquímica de fluorescencia:

$$qN = (F_m - F_m')/(F_m - F_0') \text{ (Snel & van Kooten, 1990)}$$

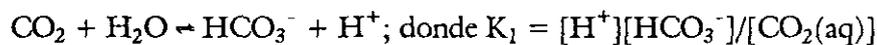
Se determinó también el efecto de inhibidores de la enzima Carbónica anhidrasa (CA) sobre estos parámetros. Para ello, se midió la fluorescencia en talos reactivados, incubados en tampón Hepps (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinapropanosulfónico) 100 mM (pH 8,0) durante 50 minutos y después en estos mismos talos tras ser incubados durante 50 minutos en acetazolamida (5-acetamido-1,3-thiadiazole-2-sulfonamida) o etoxizolamida (6-etoxi-2-benzotiazol-2-sulfonamida) en las mismas condiciones.

3.2.5. Medidas de la evolución fotosintética del oxígeno

La evolución fotosintética del O₂ en *T. erici* fue medida con un electrodo de oxígeno de fase líquida (Hansatech Ltd, King's Lynn, U.K.).

Previamente a las medidas las células fueron recogidas de su medio de crecimiento por una centrifugación ligera (700g-5 minutos) y lavadas dos veces en medio de ensayo libre de CO₂, BBM tamponado con 1,3-bis[tris(hydroximetil) metil-amino]propano (BBM-TTP). El precipitado algal final fue suspendido en medio de ensayo a una concentración algal de 1-2 mg Clorofila ml⁻¹, burbujeado con aire libre de CO₂ y mantenido en luz de baja intensidad (5 μmol m⁻² s⁻¹) a temperatura ambiente por un período previo al uso experimental no mayor de 2 horas. Los experimentos fueron llevados a cabo con luz de saturación (150 μmol m⁻² s⁻¹) medida en el punto donde está la cámara del electrodo con un sensor cuántico (Li-189; Li-Cor Inc., Neb., USA) y que es suministrada por una lámpara de proyector de diapositivas (Philips 24V, 250W).

Con el fin de poder estudiar los efectos de los inhibidores de la actividad CA sobre la evolución del O₂, antes de la medida, las muestras fueron incubadas en la cámara del electrodo durante 20 minutos con luz de baja intensidad (5 μmol fotones m⁻² s⁻¹), con diferentes concentraciones de los inhibidores o sin ellos (control). Tras el período de incubación se iluminó la muestra y se permitió el consumo del CO₂, que pudiera quedar en el medio, hasta que no se observó evolución de oxígeno. Después se comenzó con la adición en pasos sucesivos de concentraciones conocidas de NaHCO₃ en forma creciente (5-500 μM DIC). La adición de una nueva concentración se produjo cuando se alcanzaba una tasa constante de evolución de O₂ para la concentración anterior, tiempo que va aumentando según aumenta la concentración. La concentración de CO₂, al principio de cada adición, fue estimada a partir de la ecuación (1) usando la constante de equilibrio (K₁) corregida para la fuerza iónica y temperatura del medio (-log K₁=6,25 (25 °C) (Stumm & Morgan, 1981).



A partir de los datos obtenidos, se calcularon las curvas de respuesta DIC y CO₂, en todos los casos.

3.2.6. Medida de la actividad carbónico anhidrasa

Aislamiento de la carbónica anhidrasa:

Las células de *T. erici* fueron recogidas de su medio de crecimiento por centrifugación (700g-5 minutos), lavadas dos veces y resuspendidas en tampón A y entonces rotas al ser sometidas dos veces a una prensa francesa pre-enfriada (160 MPa). La actividad CA fue determinada como se describe abajo y referida al contenido de clorofila de este homogeneizado. El homogeneizado fue posteriormente centrifugado a 100.000g-1 hora, usando un rotor de ángulo fijo (Beckman Ti70); la mayoría de la actividad fue recuperada en el precipitado. Parte de la actividad CA quedó en el sobrenadante, pero su concentración fue demasiado baja para hacer

caracterizaciones bioquímicas. Con el fin de solubilizar la CA el precipitado fue resuspendido en tampón veronal 20mM (pH 8,3), 200 mM ClK, 1 mM ZnSO₄; la suspensión fue agitada vigorosamente en un baño de hielo durante 15 minutos y centrifugada a 100.000g-1 hora. Después de este proceso la mayoría de la actividad fue recogida en el sobrenadante el cual fue usado para determinar las características de la inhibición por AZA de la enzima.

Los talos de *L. hispanica* fueron lavados con agua destilada, pulverizados con nitrógeno líquido en un mortero y homogeneizados en tampón veronal 20 mM, pH 8,3 (tampón B) (5 ml/g peso seco) con un Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, TP 18/2N). El homogeneizado fue centrifugado a 1000g-5 minutos; el sobrenadante (S₁) fue conservado a 4°C y el precipitado fue resuspendido en tampón B (3 ml/g peso seco), agitado durante 1 hora en baño de hielo y de nuevo centrifugado a 1000g-5 minutos. El precipitado fue desechado y el sobrenadante (S₂) se unió con el primer sobrenadante. La actividad CA fue medida en esta mezcla (S₁+S₂) y referida al contenido en clorofilas. Posteriormente el homogeneizado se centrifugó a 17.000g-15 minutos; de nuevo la mayoría de la actividad fue recogida en el precipitado aunque una pequeña parte, como sucedía en *T. erici*, quedó en el sobrenadante. Para la solubilización de la CA, el precipitado fue tratado como en *T. erici* pero la ultracentrifugación fue sustituida por una centrifugación de 12.500g-15 minutos. El sobrenadante fue utilizado para determinar las características de la inhibición de la enzima por AZA.

Actividad Carbónico anhidrasa:

La actividad fue determinada en extractos del cultivo de *Trebouxia erici* y de talos de *Lasallia hispanica* en distintos pasos de purificación; también se intentó la medida de la actividad en células intactas de *T. erici*. La valoración de la actividad enzimática se realizó siguiendo el método electroquímico descrito en Karlson et al. (1995). El fundamento del ensayo es la medida potenciométrica del cambio de pH que se produce en el extracto celular al añadir agua saturada con CO₂. El CO₂ disuelto en el agua se hidrata transformándose en bicarbonato y H⁺, lo que hace que el pH descienda. La reacción fue llevada a cabo en una cubeta que se mantenía en un baño a 0°C, en la que se introducía un pHmetro conectado a un registrador. En la cubeta se puso de 0,25

a 1 ml de extracto y se completó hasta un volumen de 4 ml con tampón veronal 20 mM, pH 8,3 (tampón B). Se esperó hasta que se estabilizó la medida de pH y se adicionó 2 ml de agua destilada fría (2°C) saturada de CO₂; se midió el tiempo que tarda en descender el pH de 8,0 a 7,2. Se realizó también la medida con 4 ml de tampón, sin adición de muestra. La actividad enzimática se expresa en unidades WAU (Wilbur & Anderson, 1948; Yang et al., 1985) definido como:

$$\text{WAU} = (t_0 - t)/t$$

t_0 = tiempo invertido en la reacción química (descenso de pH con 4 ml de tampón).

t = tiempo invertido en el descenso de pH cuando se adiciona el extracto.

Para asegurar que la actividad medida se debía a actividad carbónico anhidrasa, se añadió a la mezcla de reacción el inhibidor de la enzima acetazolamida (AZA) a la concentración de 100 mM. La adición de acetazolamida inhibió la actividad, por lo que se confirmó como actividad carbónico anhidrasa.

La sensibilidad a la inhibición de la CA por AZA fue determinada valorando la actividad de muestras parcialmente purificadas como se indica en el siguiente apartado, con adición de concentraciones nanomolares de AZA (2,5-100nM) a la mezcla de reacción. El inhibidor se añadió un minuto antes de la adición del agua saturada con CO₂ para el inicio de la reacción. Una vez conocida la sensibilidad de la CA a las distintas concentraciones de AZA se realizó un ajuste de mínimos cuadrados y a partir de la recta resultante, se calculó la concentración de inhibidor requerida para obtener una inhibición de la actividad enzimática del 50% (I₅₀).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Localización de la Rubisco

La enzima Rubisco ha sido localizada en las células del fotobionte de *Lasallia hispanica*, *Parmelia omphalodes* y *Cornicularia normoerica* con el uso de anticuerpo frente a la subunidad L de la Rubisco de *Euglena gracilis*. El inmunomarcado apareció principalmente en el pirenoide (Fig. 1a, 1b) y dentro de él en la matriz pirenoidal; en los espacios o túbulos pirenoidales, no existió inmunomarcado como puede observarse en dichas imágenes. El marcado también se encontró en unas zonas denominadas "cuerpos proteináceos" que aparecen en algunas ocasiones en el cloroplasto de estos fotobiontes y que tienen una matriz similar a la pirenoidal, pero carecen de pirenoglóbulos y túbulos (Fig. 1c). La densidad de marcado en el pirenoide y en los cuerpos proteináceos fue muy similar (Fig. 1c). En la figura 1d podemos observar el aspecto de estos cuerpos proteináceos por microscopía electrónica de transmisión convencional y comprobar cómo su matriz tiene un aspecto muy similar a la que presenta el pirenoide satélite mostrado en la misma. Aunque en una densidad muy inferior también existió marcado en el estroma del cloroplasto. La ausencia de marcado en zonas como los túbulos tilacoidales nos hace descartar la posibilidad de que la baja densidad de marcado presente en el estroma tilacoidal se deba a fondo de la reacción inmunológica. En este mismo sentido hay que destacar que el marcado en otras zonas del cloroplasto, diferentes al pirenoide y cuerpos proteináceos, se da principalmente en el estroma y nunca sobre las membranas tilacoidales.

Para comprobar si el estado liquenizado influye en la localización de la Rubisco en el cloroplasto se realizó también el inmunomarcado de esta enzima en las células de un cultivo *T. erici*. La matriz del pirenoide de los cloroplastos de *T. erici* fue similar a la de los fotobiontes *Trebouxia* de los talos estudiados y se presentó igualmente lleno de pirenoglóbulos (Fig. 1e). El inmunomarcado presentó una localización similar (Fig. 1f) a la de *Trebouxia* liquenizada; la enzima se localizó principalmente en el pirenoide y con baja densidad en el estroma.

3.3.2. Medidas de fluorescencia:

Los efectos de los inhibidores sobre el rendimiento de la fluorescencia y la atenuación fueron muy leves. En *L. hispanica* el rendimiento fue ligeramente inferior a bajas intensidades lumínicas en presencia de etoxizolamida (EZA) y la atenuación no fotoquímica fue mayor en presencia de acetazolamida (AZA), también en bajas intensidades (Fig. 2a, 2b y 2c).

3.3.3. Evolución fotosintética del oxígeno:

En las figuras 3a y 3b se muestran las curvas de respuesta de la evolución del O₂ frente a la concentración de carbono inorgánico disuelto (DIC) y a la concentración de CO₂ disuelto en *Trebouxia erici* medida a dos pH distintos 6,2 y 7,9. Cuando la evolución fotosintética del O₂ fue relacionada con el carbono inorgánico disuelto total (DIC), las células medidas a bajo pH producen una mayor fotoproducción de O₂ que a pH 7,9 (Fig. 3a). Sin embargo, cuando la evolución se relacionó con la concentración de CO₂ (Fig. 3b), no existieron diferencias de la eficiencia fotosintética para las células ensayadas a los dos pH, lo que indicó que *T. erici* prefiere como sustrato externo para la fotosíntesis el CO₂ al HCO₃⁻. Se observó un descenso en la fotosíntesis por encima de 150-200 μM CO₂(acuoso), concentración que corresponde a 500 Pa CO₂(g) (Fig. 3b).

La incubación de *T. erici* con acetazolamida (AZA), inhibidor de la CA insoluble en lípidos, causó una inhibición de la fotosíntesis neta en concentraciones inferiores a 1 μM CO₂. La presencia de etoxizolamida (EZA), inhibidor de la CA soluble en lípidos, produjo un efecto mayor, alcanzándose una inhibición del 100% en concentraciones de CO₂ menores de 1 μM (Fig. 4).

3.3.4. Actividad carbónico anhidrasa en *Lasallia hispanica* y *Trebouxia erici*.

No se detectó actividad CA en células intactas de *Trebouxia erici*.

Los niveles de actividad CA presentes en los extractos libres de células de *Lasallia hispanica* y el cultivo de *T. erici*, fueron muy similares cuando se expresaron en relación a la cantidad de clorofilas (Tabla I).

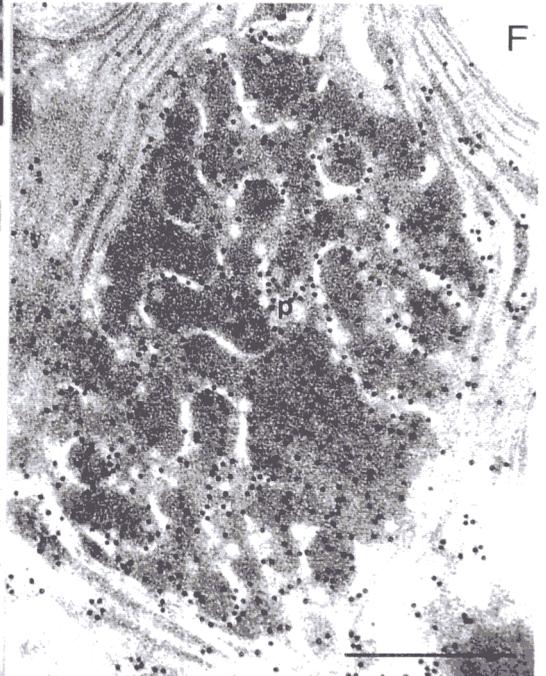
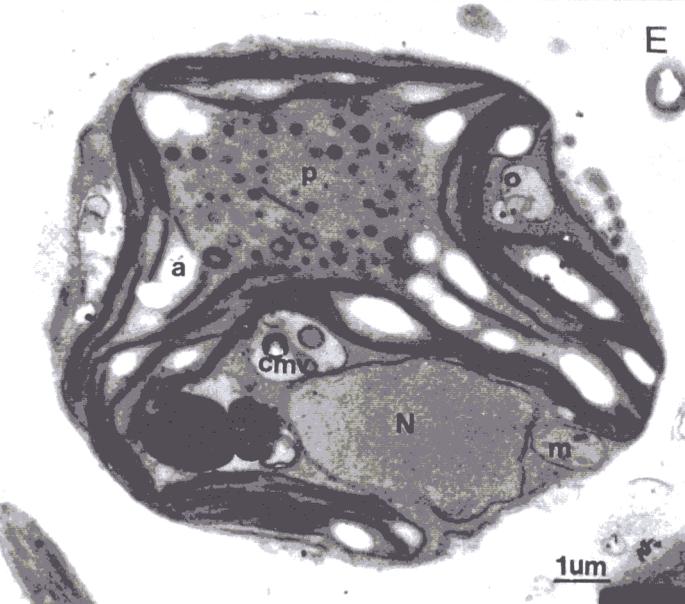
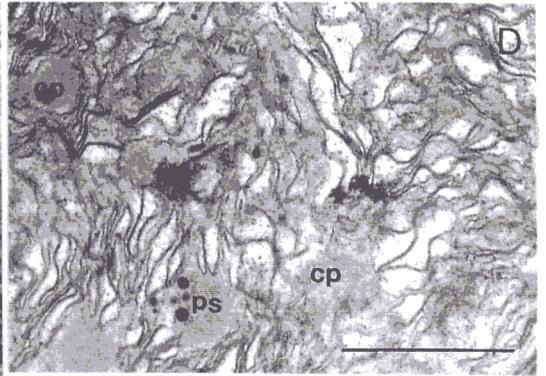
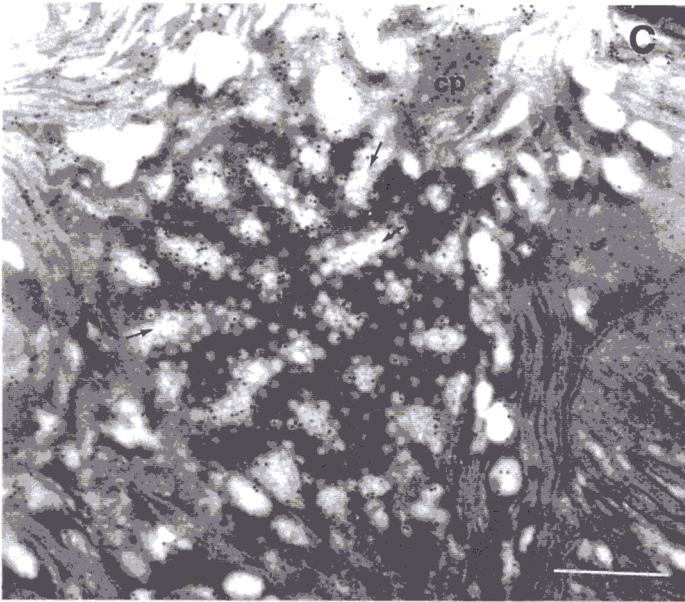
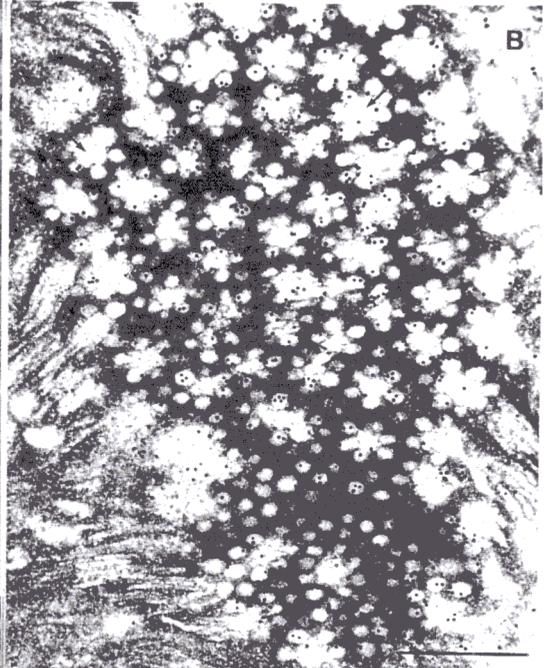
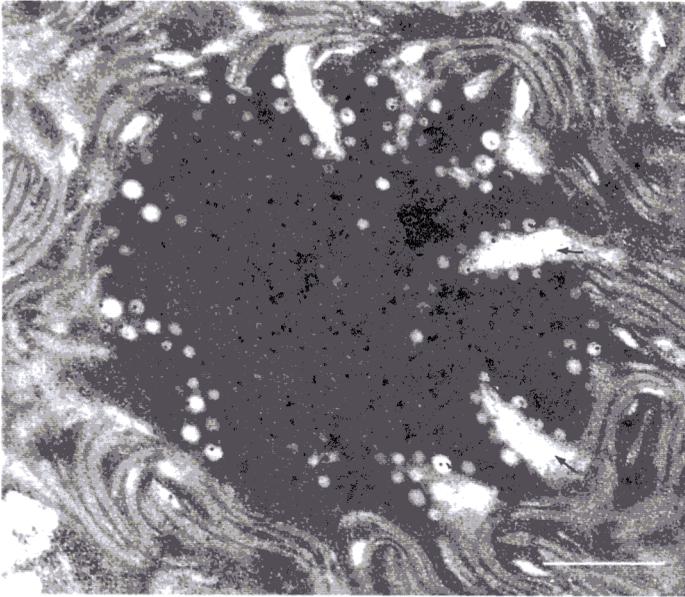
La actividad carbónico anhidrasa, en ambos organismos, ha sido detectada en la fracción insoluble.

La actividad se mostró muy sensible a la inhibición por AZA, como puede verse en la tabla I. *L. hispanica* presentó una mayor sensibilidad al inhibidor, lo cual no puede en principio ser atribuida como propia del estado liquenizado ya que otra especie liquénica ensayada *Cladonia rangiferina* presentó un I₅₀ en el rango de la presentada por *T. erici* (datos no mostrados).

TABLA I. Valores de actividad carbónico anhidrasa expresados como WAU/mg clorofila (media y desviación típica), nº de experimentos (entre paréntesis) y la concentración necesaria de inhibidor para obtener una inhibición de la actividad enzimática del 50% (I₅₀) en *L. hispanica* y *T. erici*.

Especies	WAU/mg Clorofila	I ₅₀
<i>L. hispanica</i>	24±2.3 (2)	3 nM
<i>T. erici</i>	25.7±6.7 (3)	10-20 nM

Fig. 1: Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión del fotobionte *Trebouxia* de talos de *Lasallia hispanica* y *Parmelia omphalodes* y de *T. erici* de vida libre. A y B- Inmunomarcado en el pirenoide de *P. omphalodes* C- Inmunomarcado en un pirenoide y en un cuerpo proteináceo de *L. hispanica*. D- Cuerpos proteináceos y un pirenoide satélite de *L. hispanica*. E- *T. erici* de vida libre. F- Inmunomarcado de la Rubisco en el pirenoide de *T. erici*. a, almidón; cp, cuerpo proteináceo; cmv, complejos multivesiculares; p, pirenoide; ps, pirenoide satélite; m, mitocondria; N, nucleo; las flechas indican los tubulos tilacoidales. Barra 0,5µm excepto la figura 3.



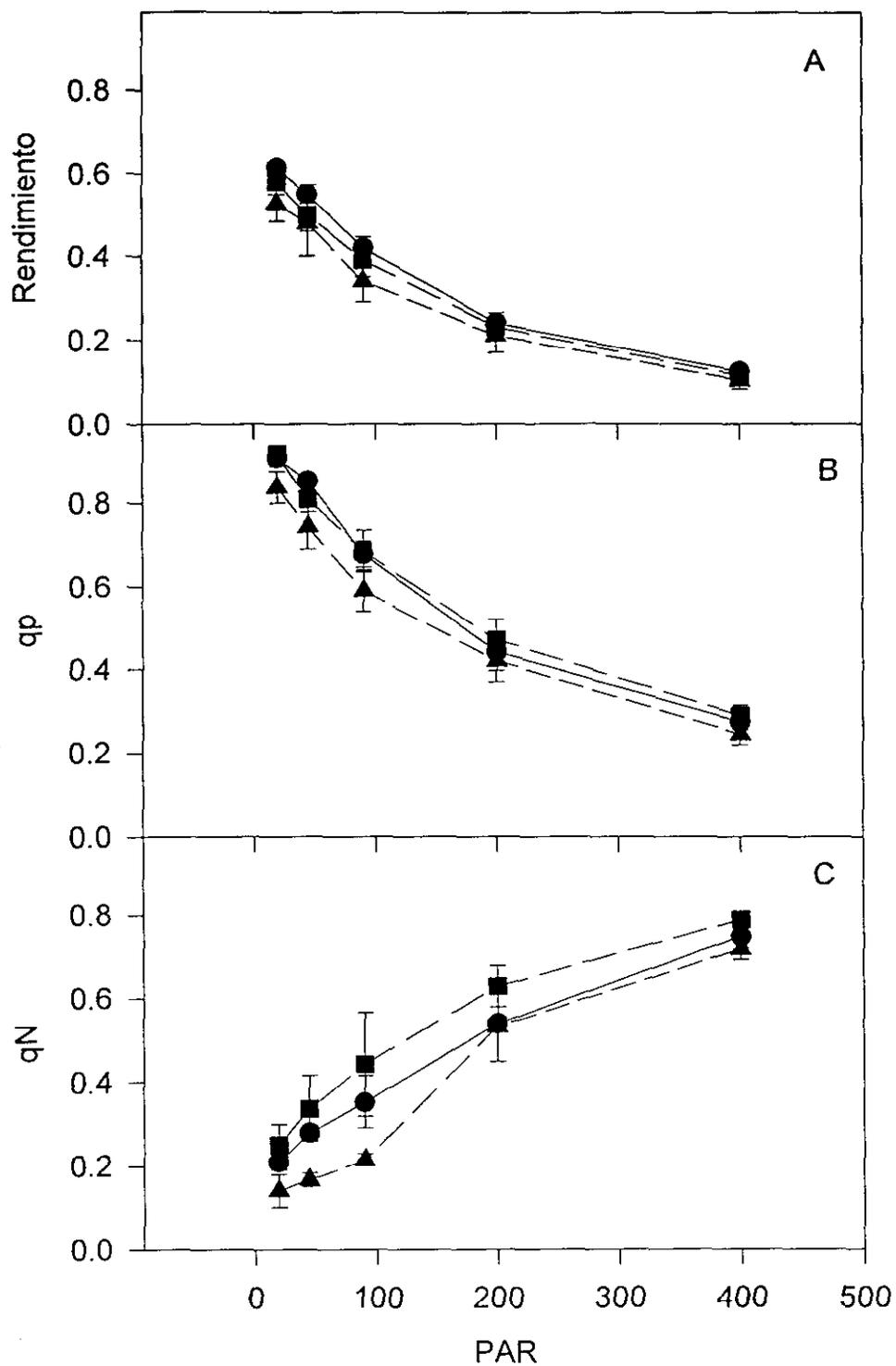


Fig. 2: Efecto sobre el rendimiento de la fluorescencia (A) y la atenuación fotoquímica (B) y no fotoquímica (C), en la especie *Lasallia hispanica*, de 500 μ M EZA (▲) y AZA (■) comparados con el control (●). Las barras de error indican la desviación estandar; $n \leq 3$ para cada serie.

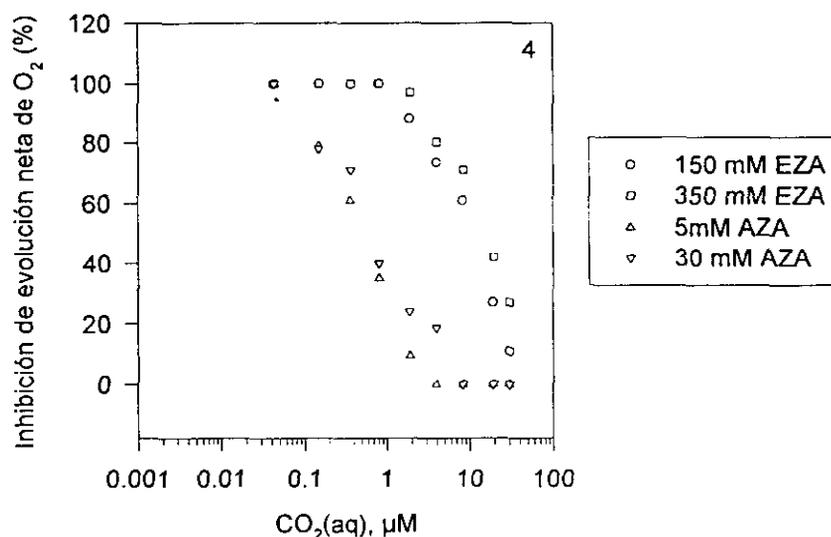
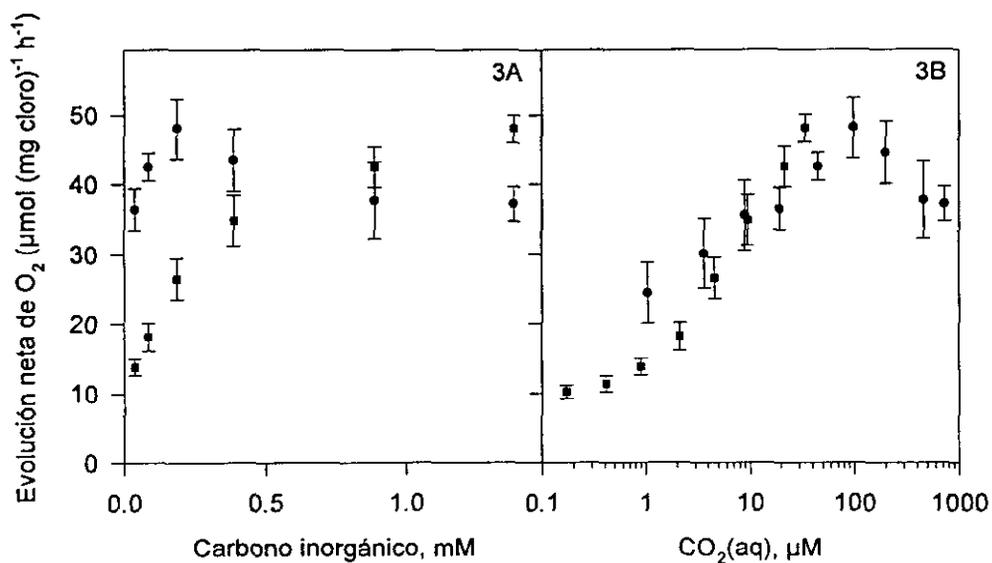


Fig. 3: Tasa neta de evolución fotosintética del O₂ en función de la concentración total de carbono inorgánico disuelto (DIC) (A) o de la estima de la concentración de CO₂ disuelto (B), en células de un cultivo de *Trebouxia erici*. Las medidas se llevaron a cabo a 25°C y luz de saturación (200 mmol fotones m⁻² s⁻¹) en BBM-TTP a pH 6,2 (●) o pH 7,9 (■) con adiciones controladas de de HCO₃⁻. Las barras de error indican el error estandar; n=3 para cada serie.

Fig. 4: Efectos de los inhibidores de la carbónica anhidrasa AZA (5 mM y 30 mM) y EZA (150 mM y 350 mM), sobre la evolución neta fotosintética del O₂ en función de la concentración de CO₂ disuelto. Las medidas se llevaron a cabo a 25°C y luz de saturación (200 μmol fotones m⁻² s⁻¹) en BBM-TTP a pH 7,9 con adiciones controladas de de HCO₃⁻. Los datos representan la media de dos experimentos independientes para cada concentración del inhibidor.

3.4. DISCUSIÓN

Hasta ahora, la técnica de inmunolocalización no había sido aplicada para la localización de la enzima Rubisco en el fotobionte *Trebouxia*. En este trabajo el uso de anticuerpos anti-Rubisco de *Euglena gracilis* ha permitido la localización de la enzima en el pirenoide de *Trebouxia* aislada y liquenizada, como sucede en otras algas verdes que presentan pirenoide (Lacoste-Royal & Gibbs, 1987; Kajikawa et al., 1988; McKay & Gibbs, 1989; Osafune et al., 1990). La Rubisco constituye el 90% de las proteínas aisladas del pirenoide en algunas especies de alga estudiadas (referencias McKay & Gibbs, 1989). En estudios con mutantes de *Chlamydomonas reinhardtii* sin Rubisco, se ha demostrado que la presencia física de la Rubisco es fundamental para la formación del pirenoide y no lo es tanto el proceso de la fijación de CO₂, ni el estado activo de la Rubisco (Rawat et al., 1996). En el fotobionte *Trebouxia* la densidad de marcado en el pirenoide es muy alta y como se muestra en el capítulo 5, existe una fuerte relación entre desarrollo del pirenoide y la presencia física de la Rubisco.

La función fisiológica del pirenoide no está clara, la acumulación de Rubisco en él podría constituir un almacén de enzima inactiva o favorecer la actividad carboxilasa de la Rubisco frente a la oxigenasa por existir en el pirenoide menor tensión de oxígeno. La localización en el pirenoide de algas de vida libre de una enzima auxiliar que activa a la Rubisco, Rubisco activasa (McKay et al., 1991) apoya la segunda opción. Además se ha comprobado una estrecha relación entre la presencia de pirenoide y el desarrollo del mecanismo concentrante de CO₂ (CCM) (Badger et al., 1993; Maguas et al., 1993; Palmqvist et al., 1994a; Maguas et al., 1995; Smith & Griffiths, 1996a, 1996b); la existencia de un pirenoide en *Trebouxia* con una alta concentración de Rubisco puede ser de gran importancia en el funcionamiento de este mecanismo en esta especie.

La presencia de la proteína Rubisco en los "cuerpos proteináceos" nos permite profundizar en el conocimiento de estas estructuras y el uso del calificativo proteináceo para denominarlos. Griffiths (1980) describió una progresión gradual en el reino vegetal, que comienza con un único gran pirenoide por célula, continúa con presencia de pequeños y múltiples pirenoides y finaliza con áreas proteináceas muy pequeñas distribuidas en el cloroplasto. En esta progresión, los cuerpos

proteináceos podrían representar situaciones intermedias entre pirenoides satélites y simples áreas proteináceas. Los cuerpos proteináceos no están siempre presentes en las células del fotobionte; en determinados estados fisiológicos estas estructuras podrían originarse generando acumulaciones de Rubisco en otras zonas del cloroplasto distintas del pirenoide. Los cuerpos proteináceos podrían también intervenir en el CCM pero hasta el momento no es posible afirmarlo.

El hecho de que no existan diferencias significativas en las medidas de fluorescencia, en presencia y ausencia de inhibidores de la carbónico anhidrasa (CA), apoya la idea de que en líquenes con *Trebouxia* como fotobionte el rendimiento cuántico del fotosistema II no es reflejo de la tasa de fijación del CO₂ de forma similar a como sucede en líquenes con *Nostoc* como fotobionte (Sundberg et al., 1997).

Las diferencias observadas en el rendimiento de la fotosíntesis en presencia de los dos inhibidores, AZA y EZA (Fig. 4), hace pensar en la posibilidad de la existencia de una forma interna de CA (inhibida por EZA) y una forma de CA periplásmica (inhibida por AZA). Sin embargo, la imposibilidad de detectar actividad CA periplásmica en *Trebouxia erici*, sugiere que el efecto del AZA es debido a la inhibición de la CA interna ya que posiblemente una pequeña parte de este inhibidor penetra al interior de la célula (Geib et al., 1996). Además la alta sensibilidad de la CA interna al inhibidor AZA mostrada en los estudios *in vitro* del presente trabajo, apoya también esta idea.

La actividad CA en la especie *Trebouxia*, tanto en estado liquenizado como en estado de vida libre, ha sido medida *in vitro* por primera vez en este trabajo. Los niveles de la actividad CA encontrada en *Trebouxia* aislada y liquenizada, fueron muy similares por lo que la actividad no parece verse afectada por el estado de liquenización.

La localización de la enzima mayoritariamente en la fracción insoluble junto con la sensibilidad a los inhibidores AZA y EZA, nos indican que la forma predominante en *T. erici* y *L. hispanica* es una carbónico anhidrasa tipo α . En *Chlamydomonas reinhardtii*, alga que posee CCM

ha sido descrita también la existencia de una CA interna tipo α , que juega un papel fundamental en la fijación del CO_2 (Karlsson et al., 1995).

Palmqvist y colaboradores (1997) señalan que *T. erici* y el fotobionte *Trebouxia* de *L. hispanica* son capaces de acumular carbono inorgánico disuelto. Este hecho junto con la presencia de Rubisco en el pirenoide y el requerimiento de carbónico anhidrasa en la fotosíntesis en ambas *Trebouxias* indican que la adquisición fotosintética del carbono en *Trebouxia* es similar a otras algas verdes con mecanismo concentrante de CO_2 , tales como *Chlamydomonas*, *Chlorella* y *Scenedesmus* (Badger & Price, 1992, 1994). En relación a la adquisición fotosintética del carbono en *Trebouxia* respecto a otros algas verdes con CCM se pueden señalar los siguientes aspectos.

1.- En algas de vida libre la concentración externa de CO_2 durante el crecimiento determina tanto la eficacia como la activación/inhibición del mecanismo concentrador del CO_2 (CCM) (Badger & Price, 1992; 1994). En este sentido, a altas concentraciones de CO_2 la fotosíntesis (Fig. 13) fue inhibida en *Trebouxia* y no se puede descartar que el CCM pueda ser también reprimido en este genero en estas condiciones.

2.- La alta actividad de la CA periplásmica que es inducida con baja concentración de CO_2 , por ejemplo en *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella* y *Scenedesmus* (Aizawa & Miyachi, 1986; Badger & Price, 1992, 1994), no pudo ser detectada en *T. erici* de vida libre. La CA periplásmica parece permitir a las células utilizar HCO_3^- como sustrato externo (Aizawa & Miyachi, 1986). Si ésta es la función de la CA periplásmica, su ausencia no es extraña en *Trebouxia*, ya que la forma HCO_3^- debe estar en pequeña cantidad debido a que el apoplasto de los líquenes es ácido.

3.- En *T. erici* y en el fotobionte de *L. hispanica* no se ha observado una cubierta de almidón alrededor del pirenoide como ocurre en especies de algas verdes crecidas a bajas concentraciones de CO_2 y que poseen CCM. A la citada cubierta de almidón se le ha atribuido la función de barrera a la difusión del CO_2 fuera del pirenoide (Badger et al., 1993; Ramazanov et al., 1994). Sin embargo, recientemente se ha demostrado con mutantes de *Chlorella pyrenoidosa* que no sintetizan almidón, que la formación de la cubierta de almidón es un proceso simultáneo al funcionamiento

del CCM pero no necesario (Plumed et al., 1996). Por tanto, la no existencia de grandes cantidades de almidón alrededor del pirenoide en estas especies de *Trebouxia* no sería un impedimento para el funcionamiento del CCM en ellas.

Evolutivamente, en cianobacterias, algunas algas eucariotas y *Anthoceros* el desarrollo del CCM usando DIC como fuente de carbono se pudo producir como respuesta a un aumento de O₂ en la atmósfera que supone una competencia con el CO₂ (Smith & Griffiths, 1996b). El desarrollo del CCM parece estar relacionado con una Rubisco de baja afinidad al CO₂ (Palmqvist, 1995). La menor presencia de Rubisco en las lamelas y su acumulación en zonas como el pirenoide tiene la ventaja de que la fijación de CO₂ se lleva a cabo en un ambiente con menor concentración de O₂, lo que implica menor fotorrespiración (Vaughn et al., 1990). Por tanto, la existencia de pirenoide puede conferir importantes ventajas para organismos con una Rubisco de baja afinidad. Otros fotobiontes como *Coccomyxa* que no presentan CCM, podrían haber perdido el pirenoide en su evolución y haber desarrollado una Rubisco con mayor afinidad y especificidad al CO₂ e incluso nuevas formas de CA (tipo β) (Palmqvist et al., 1997).

Esta ruta de adquisición del CO₂ de los talos líquénicos puede tener una gran importancia ecológica. En líquenes donde la difusión del CO₂ al fotobionte puede estar reducida debido al entramado formado por las hifas del micobionte, es importante la existencia de un mecanismo que permita la fijación de CO₂ a bajas concentraciones. Ahora bien, el CCM no está influido sólo por la disponibilidad del CO₂ sino que existen otros factores ambientales de los que puede depender que su funcionamiento sea ventajoso para el talo. La existencia de CCM supone un aumento de la proporción CO₂/O₂ en el entorno de la Rubisco lo que hace disminuir la tasa de fotorrespiración, en consecuencia, el CCM será más necesario a altas temperaturas ya que evita el aumento de la fotorrespiración que conlleva la mayor solubilidad del oxígeno a mayor temperatura (Badger & Adrews, 1987). La disponibilidad de nitrógeno podría ser otro factor importante en el desarrollo de los CCM ya que supone un uso más eficaz del nitrógeno por suprimir su inversión en la fotorrespiración.

ABRIR CAPÍTULO 4

