



Universidad de Los Andes
Facultad de Ciencias
Instituto de Ciencias Ambientales y Ecológicas
Postgrado de Ecología Tropical



RESPUESTAS ECOFISIOLÓGICAS DE PLANTAS DEL LÍMITE
ARBÓREO (SELVA NUBLADA-PÁRAMO) AL ESTRÉS TÉRMICO,
HÍDRICO Y LUMÍNICO EN LOS ANDES VENEZOLANOS.

Autor: Raphaël Dulhoste

Tutor: Dr. Fermín Rada

Mérida, 21 de junio de 2010.

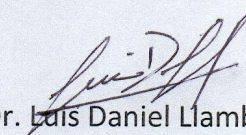
VEREDICTO

Quienes suscriben, integrantes del jurado designado por el Consejo de Estudios de Postgrado, de la Universidad de Los Andes para conocer y emitir Veredicto sobre la **TESIS DOCTORAL** presentado por **RAPHAËL FREDERIC DULHOSTE VIVIEN**, realizado bajo la tutoría del **DR. FERMÍN RADA** como requisito para optar al título de **Doctor en Ecología Tropical** y que se titula:

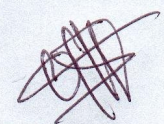
“Respuestas Ecofisiológicas de Plantas del Límite Arbóreo (Selva Nublada-Páramo) al Estrés Térmico, Lumínico e Hídrico en Los Andes Venezolanos.”

Hacen constar lo siguiente:

PRIMERO: que hoy 21 de junio de 2010 a las 2:30 p.m., nos constituimos como jurado en el salón de reuniones del Postgrado en Ecología Tropical, siendo el Presidente del jurado el Dr. Luis Daniel Llambí. **SEGUNDO:** A continuación procedimos a discutir si se lleva a cabo su defensa pública. Luego de considerar las observaciones críticas de cada miembro de jurado, acordamos por unanimidad autorizar su presentación. **TERCERO:** A las 3:00 p.m. de este mismo día, el jurado se reunió en el Auditorium A-10 de la Facultad de Ciencias y se dio curso al acto público de sustentación de trabajo de grado presentado. **CUARTO:** Una vez concluida la sustentación correspondiente, el jurado interrogó al aspirante sobre los diversos aspectos a que el trabajo se refiere. **QUINTO:** Seguidamente el presidente del jurado invito al público asistente a formular preguntas y observaciones sobre el trabajo presentado. **SEXTO:** Una vez concluido el acto de presentación, el jurado procedió a su deliberación final y concluyó que: **SE APRUEBA LA TESIS DOCTORAL PRESENTADO A NUESTRA CONSIDERACIÓN**

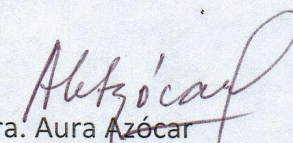

Dr. Luis Daniel Llambí

Jurado

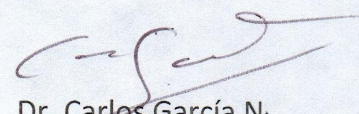

Dr. Wilmer Tezara

Jurado




Dra. Aura Azócar

Jurado


Dr. Carlos García N.

Jurado

Esta Tesis doctoral fue financiada por el
Interamerican Institute for Global Change (IAI),
bajo el Proyecto: From Landscape to Ecosystem:
Across-Scales Functioning in Changing Environments
(LEAF) (IAI CRNII 005).

Dedicado a todos los ángeles y santos que me han acompañado en la vida.

AGRADECIMIENTO.

La realización y culminación de toda tesis es mucho más que la labor de una sola persona, en este caso fue la suma de la buena voluntad de un gran conjunto de personas, familiares y amigos, que me ayudaron de forma muy diversa en cada una de las labores y eventualidades de este trabajo final. Con la certeza de saber que olvidaré a alguno en el camino quiero expresar mis más gratos y sentidos agradecimientos a todos los que forman parte de esta.

En primer lugar a DIOS por permitirme, llegar hasta aquí hoy,

A la Mujer más paciente e importante en mi vida, a ti Karen por estar siempre allí.

A un gran par de ayudantes de campo, de casa e igualmente compañeros, a Jean Paul y Christian, quienes han estado permanentemente ayudando y preguntando.

A mis padres, hermanos, y cuñados, quienes también se vieron metidos en todo este lío de múltiples formas, y contribuyeron cada uno a su manera.

A mis otros hermanos, Chicho, Edjuly, Pablo y Alvaro, quienes siempre estuvieron allí, a la espera para ayudar.

A Fermín, quien dirigió esta gran orquesta de ideas y personas, con mucho ahincó y paciencia.

A mis amigos y compañeros de campo en este proyecto, Alberto, Edgar, Érika, Claudia, Williams, Paola, Paolo, Alejandra, Guillermo, Wilmer quienes en muchas ocasiones dedicaron parte de su tiempo a trabajar en campo conmigo.

A Teresa compañera de trabajo en dos tesis, que contribuyeron de forma importante en la discusión de muchos de los aspectos de esta.

A los Jurados que leyeron una y otra y otra vez el manuscrito, con aportes importantes a cada vez.

A los técnicos y profesores de los laboratorios universitarios (LIC-C y Laboratorio de Control de la escuela de Sistemas), Fernando, Julián, Carlos,

Albeiro, Alfredo, quienes trabajaron en la solución de los muchos problemas técnicos en los equipos del laboratorio.

Al CITEC, quien contribuyó en construcción de diversas partes y componentes para la adaptación de los diversos equipos.

A todo el personal del ICAE indistintamente de su labor, quienes durante todo este tiempo me brindaron su apoyo incondicional, y su granito de arena en cada momento en el que fue necesario.

Al Sistema Teleférico de Mérida, quien permitió el ascenso continuo a la estación La Aguada, hasta su cierre.

Y finalmente a quienes financiaron esta investigación, a la IAI por medio del proyecto LEAF, quienes permitieron la inserción de este proyecto.

A todos mil gracias...

RESUMEN

El límite de crecimiento arbóreo es el más conspicuo de la naturaleza, en las zonas de alta montaña se ha estudiado por más de cien años, sin llegar a un consenso general sobre las causas finales que lo originan, existiendo en la actualidad un sin número de trabajos que buscan dar respuesta a esta interrogante. Desde un inicio, dichos estudios han considerado la temperatura como el factor de mayor importancia global sobre la formación y mantenimiento de este límite natural. Sin embargo, no se ha encontrado aún la forma en la cual este factor ambiental afecta de forma general el límite actual.

En las altas montaña tropicales se ha sugerido que el proceso de congelamiento nocturno es un factor crucial en la formación y mantenimiento del límite de crecimiento arbóreo, aunque se ha evidenciado que algunas plantas tendrían mecanismos de resistencia al congelamiento que contradicen esta hipótesis. Otro grupo de autores sugieren que este agente actúa de forma indirecta sobre la formación y mantenimiento del límite, bajo dos efectos claramente contrapuestos. Por un lado unos plantean que la temperatura limita los procesos metabólicos relacionados con el crecimiento, y por el otro se piensa que la temperatura afecta el balance de carbono en las plantas. En la alta montaña tropical, por otro lado, es importante señalar, que existe un déficit hídrico importante, tanto a nivel diario como estacional, factor que también podría ser importante en el límite antes mencionado.

Considerando lo anterior expuesto, en este trabajo examinamos los efectos de estos factores ambientales (bajas temperatura, altas radiaciones y déficit hídrico) sobre algunas plantas leñosas que forman parte del límite de crecimiento arbóreo en los Andes Venezolanos. Para lo cual se estudió el efecto de las temperaturas bajo dos enfoques contrastantes: por un lado, los procesos de congelamiento como factores de formación del límite, y por otro

lado, las bajas y altas temperaturas como factores que afectan la asimilación de CO₂ y posiblemente el balance de carbono en las plantas.

Para el primer enfoque, se encontró que en términos generales las especies leñosas tienen mecanismos que les permiten resistir temperaturas congelantes. Presentándose una gran variación en las temperaturas de resistencia al congelamiento y aumentando la resistencia al congelamiento a medida que ascendemos en altitud. Es evidente que para las especies estudiadas este factor no es crucial en el mantenimiento del límite.

En cuanto al efecto de las temperaturas sobre los procesos cruciales en el balance de carbono de las plantas, como la asimilación de CO₂, se evidenció que las mismas tienen un fuerte impacto negativo sobre este, disminuyendo las tasas de asimilación con la temperatura. A su vez este efecto negativo puede verse incrementado por otros factores ambientales importantes, como las altas radiaciones, las cuales producen también una disminución de las tasas de asimilación, a valores muy altos.

En cuanto al déficit hídrico, se evidencia una variación importante en la respuesta de las plantas, mostrando un grupo importantes de adaptaciones que les permiten superar los momentos críticos de deficiencia de agua. El ajuste más importante en este caso fue la modificación de la elasticidad en las paredes celulares, lo cual evidencia que el déficit hídrico en las zonas donde se desarrollan las plantas es de poca duración e intensidad, sugiriendo esto que dicho déficit no juega un rol crucial en la formación del límite de crecimiento arbóreo, a nivel de individuos adultos.

Los resultados evidencian que las plantas leñosas en la alta montaña tropical, sufren restricciones severas, como consecuencia de múltiples factores ambientales, estas restricciones pudiesen comprometer el balance de carbono, siendo esta posiblemente causante de la formación y mantenimiento del límite de crecimiento arbóreo.

CONTENIDO.

Capítulo 1. Introducción.	1
Hipótesis	13
Objetivos.	13
General	13
Específicos	14
Bibliografía	15
Capítulo 2. Mecanismo de resistencia al congelamiento en leñosas del ecotono selva nublada-páramo.	25
Introducción	25
• Hipótesis	28
• Objetivos	28
Métodos	29
• Especies estudiadas	29
• Capacidad de sobre-enfriamiento y punto de congelamiento	31
• Determinación de daño en el tejido foliar	32
• Determinación de temperaturas mínimas en campo	34
Resultados	35
Discusión	38
Bibliografía	42

Capítulo 3. Relaciones hídricas en plantas del ecotono selva nublada páramo al estrés hídrico diario y estacional	47
<hr/>	
Introducción	47
• Hipótesis	51
• Objetivos	51
Métodos	51
* Especies a estudiar	52
* Medición de potenciales hídrico foliares	54
* Componentes del Potencial Hídrico	57
* Curvas Conductancia potencial hídrico foliar	58
Resultados	59
Discusión	65
Bibliografía	68
Capítulo 4. Efectos de la temperatura sobre la fotosíntesis en plantas del ecotono selva nublada – páramo	73
<hr/>	
Introducción	73
• Hipótesis	77
• Objetivos	78
Métodos	78
* Especies a estudiar	80
* Determinación de parámetros morfo-anatómicos foliares de base	81

* Mediciones en campo	82
* Mediciones de Fluorescencia de la clorofila a y fotoinhibición	82
* Determinación de curvas radiación fotosíntesis	86
* Efecto de la temperatura foliar sobre las tasas de asimilación de CO ₂	87
* Respiración nocturna Foliar	88
* Temperatura y Radiación en el Límite de Crecimiento	88
Resultados	89
* Morfo-anatomía foliar de las especies	89
* Intercambio de gases	91
* Respuesta de la Asimilación de CO ₂ a Densidad de Flujo Fotónico Fotosintético y la temperatura.	92
* Fluorescencia de la clorofila a y fotoinhibición	100
* Respiración nocturna Foliar	106
* Temperatura y Radiación en el Límite de Crecimiento	106
Discusión	108
Bibliografía	116
Capítulo 5. Consideraciones finales	123
<hr/>	
Las Condiciones limitantes actuales	123
Lineamientos futuros	131
El cambio climático	133

Anexos

Anexo 1. Algunas consideraciones sobre tasas de enfriamiento y medición de la resistencia al congelamiento en especies de páramo. A1-1

Anexo 2: Método alternativo para la realización de curvas presión-volumen. A2-1

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.1	Distribución de zonas de límite arbóreo.	2
Figura 1.2	Distribución altitudinal del límite arbóreo a nivel global.	2
Figura 2.1	Patrón de aumento de la conductividad eléctrica para <i>Diplostephyum venezuelense</i> y <i>Vallea stipularis</i>	37
Figura 2.2	Relación temperatura de congelamiento y altitud para todas las especies.	38
Figura 3.1	Ubicación de la zona de estudio y vista general de la misma en los tres sitios de muestreo.	55
Figura 3.2	Vista de las especies estudiadas en la localidad de San José.	56
Figura 3.3	Curva presión-volumen obtenida para <i>Diplostephyum venezuelense</i> a 3200 m en la época seca, en la localidad de San José, Mérida-Venezuela.	62
Figura 3.4	Relación entre la conductancia estomática relativa y el potencial hídrico foliar.	64

Figura 4.1	Posición y Distribución de los sitios de estudio en el gradiente alto térmico, en el límite arbóreo del área de estudio.	79
Figura 4.2	Curvas de asimilación vs densidad de flujo fotónico fotosintético.	94
Figura 4.3	Relación entre tasas de transporte de electrones y asimilación de CO ₂ para las cuatro especies a las diferentes altitudes.	96
Figura 4.4	Relación entre temperatura foliar y asimilación para las cuatro especies a las diferentes altitudes.	98
Figura 4.5	Respuesta de la fotosíntesis calculada por transporte de electrones a diferentes regímenes de luz y temperatura.	105
Figura 4.6	Variación de la respiración en <i>Diplostephyum</i> venezuelense en la estación La Aguada.	106
Figura 4.7	Curso diario promedio de temperatura y densidad de Flujo fotónico fotosintético para los meses de febrero y octubre de los años 2008-2009	108

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 2.1	Lista de especies a las que se les determinó su resistencia al congelamiento, familia, amplitud altitudinal y grupo de muestreo.	31
Cuadro 2.2	Temperaturas de sobre-enfriamiento y de daño para las especies estudiadas con sus respectivos errores estándar.	36
Cuadro 3.1	Lista de especies y altitud de muestreo para los estudios de respuesta ecofisiológicas al estrés hídrico.	54
Cuadro 3.2	Valores de Potencial hídrico mínimo y antes del amanecer para las tres especies.	60
Cuadro 3.3	Principales Componentes del potencial hídrico foliar de las especies a cada altitud obtenidos por Curvas presión-volumen.	63
Cuadro 4.1	Lista de especies y lugar de muestreo para los estudios de respuesta de la fotosíntesis a la variación térmica.	80
Cuadro 4.2	Variables morfoanatómicas de las cuatro especies a las diferentes altitudes.	91

Cuadro 4.3	Valores de las mediciones de intercambio de gases en campo, para las cuatro especies a las tres altitudes.	93
Cuadro 4.4	Ecuaciones de ajuste para las regresiones entre el transporte de electrones y la asimilación para las cuatro especies.	95
Cuadro 4.5	Parámetros de las curvas asimilación vs radiación fotosintéticamente activa para las cuatro especies.	97
Cuadro 4.6	Valores de las curvas de asimilación vs temperatura foliar en condiciones de radiación saturante, no inhibitoria.	99
Cuadro 4.7	Valores de Fluorescencia de la clorofila a máxima (Fv/Fm) a diversas temperaturas.	101
Cuadro 4.8	Valores de las Curvas de Fluorescencia de la clorofila a.	102
Cuadro 4.9	Valores de campo Fluorescencia de la clorofila a.	103
Cuadro 4.10	Valores de promedio de las temperatura y densidad de Flujo fotónico fotosintético para los meses de febrero y octubre de los año 2008-2009	107

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.

El estudio ecofisiológico de las especies, pasa por la comprensión de los factores ambientales que afectan las plantas, así como las condiciones internas que modifican las respuestas de las mismas. En este sentido, los factores ambientales generan filtros que a su vez ponen límites a las especies. Uno de los límites más claros y conspicuos en la naturaleza, en todos los continentes, salvo en el antártico, se refiere al límite de crecimiento de las especies leñosas en altitud o latitud, denominado límite arbóreo (Tranquillini, 1979; Anthelme et al., 2003; Hoch y Korner, 2005; Holtmeier, 2009).

Dicho límite, más que una línea entre dos formaciones ecológicas, páramo y selva nublada en el caso de Venezuela, tiende a ser una zona de transición entre los mismos. Aunque en algunos casos muy particulares puede ser una zona de cambio muy abrupta, por razones topográficas locales o procesos de degradación, entre otros; este suele extenderse ampliamente altitudinalmente. Según algunos autores (Körner, 1998; Hoch y Körner, 2003; Camarero et al., 2006), tres zonas pueden ser diferenciadas en este ecotono: A) La zona donde existen árboles individuales dispersos en la matriz de vegetación paramera, B) La zona de parches de bosques dentro de zonas de vegetación alpina o paramera, y C) El límite del bosque como un continuo (parte inferior del límite arbóreo) (figura 1.1).

En las últimas décadas, tanto las diferentes comunidades como las respuestas de las plantas en estas regiones han sido muy estudiadas, considerando: las variaciones estructurales (Camarero y Gutiérrez, 2002; Doležal y Šrůtek, 2002; Anthelme et al., 2003; Dalen y Hofgaard, 2005; Geddes et al., 2005; Wang et al., 2006; Bader et al., 2007; Soja et al., 2007; Ramírez et al., 2009; Arzac, 2008) y los factores que limitan el crecimiento, establecimiento y la sobrevivencia de estas formas de vida en ambientes de alta montaña (Tranquillini, 1979; Rada et al., 1985; Körner, 1998; Wesche et al., 2000; Korner, 2003; Rada et al., 2001; Korner y Paulsen, 2004; Miede et al., 2007a; Miede et al., 2007b).

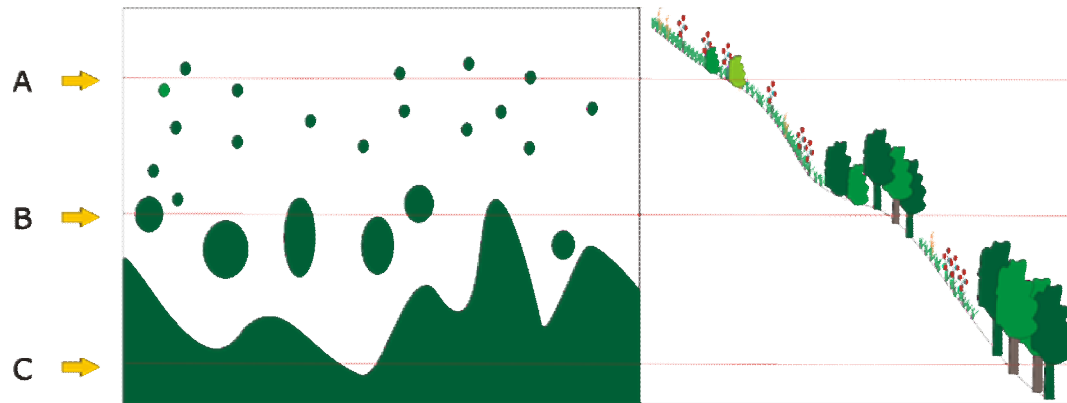


Figura 1.1: Distribución de zonas de límite arbóreo. A: Límite de árboles individuales presentes en una matriz de vegetación altimontana; B: Parches o Islas de Bosques y C: Límite del Bosque continuo.

Surgen muchas interrogantes sobre este límite presente en las zonas montañosas en cualquier latitud desde las zonas boreales hasta las zonas tropicales. Varios autores (Tranquillini, 1979; Körner, 1998; Miede et al., 2007a; Wieser y Tausz, 2007b) en distintas revisiones hechas a escala global o regional, muestran como la distribución actual de este límite varía con respecto a la latitud y la altitud (figura 1.2).

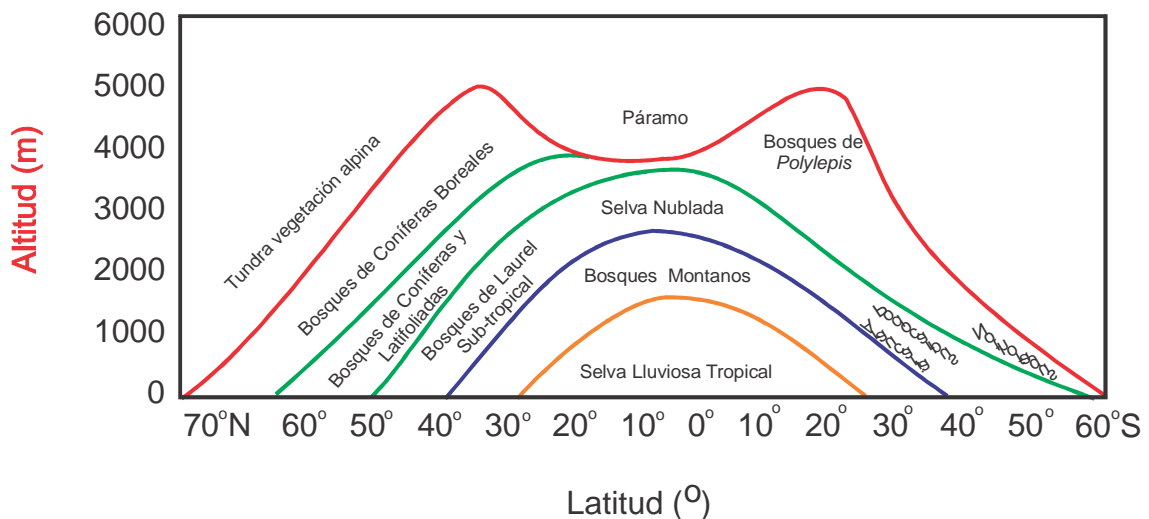


Figura 1.2: Distribución altitudinal del límite arbóreo a nivel global. Tomado de Miede et al. 2007a.

En estas recopilaciones los autores presentan una serie de hipótesis que se han planteado a lo largo de la historia con respecto a las causas que originan este límite, tanto a nivel templado como tropical; estas hipótesis pueden ser agrupadas en seis categorías (Wieser y Tausz, 2007a):

- a. Estrés climático,
- b. Disturbio,
- c. Balance de carbono insuficiente,
- d. Limitación en el crecimiento celular y la formación de tejidos vegetales,
- e. Limitación nutricional y
- f. Limitación durante la regeneración.

En el primer grupo de hipótesis se encuentran todas aquellas que han considerado los factores climáticos como la principal causa de este límite altitudinal y se consideran como los primeros enfoques que han intentado explicar la presencia de este límite. La temperatura es el primer factor ambiental considerado, debido a las relaciones entre la temperatura y la altitud o latitud, la buena relación entre la presencia del límite y la temperatura promedio de cada sitio de estudio, así como también, el aumento de la altitud del límite con el descenso en latitud.

Por otro lado, los estudios palinológicos, han mostrado una gran dinámica en el movimiento del límite arbóreo durante épocas glaciares e interglaciares, tanto en el trópico como en las zonas templadas (Tinner y Theurillat, 2003). Evidenciándose en el caso de los trópicos restos de polen de plantas de la selva nublada en zonas actuales de páramo para períodos de mayores temperaturas y por lo contrario, en períodos glaciares la presencia de la vegetación de páramo en altitudes mucho menores. Esto apoya la hipótesis de que las temperaturas juegan un papel crucial en el establecimiento y mantenimiento del límite en si (Van der Hammen, 1979; Hooghiemstra y Van der Hammen, 2004).

La temperatura en este sentido ha sido a su vez considerada desde varios puntos de vista, inicialmente considerada causante directa del límite por provocar daños en los tejidos vegetales como consecuencia de la producción de una sequía por congelamiento (Wieser y Tausz, 2007a), hasta ser el posible causante de problemas en el balance de carbono de las plantas leñosas (Tranquillini, 1979; Holtmeier, 2009), o las limitaciones en los procesos de división celular (Körner, 1998).

Aunque el daño directo por congelamiento no se ha descartado totalmente a nivel mundial, en la mayor parte de las zonas templadas y los límites boreales, las especies leñosas tienden a adaptarse en la estación desfavorable para soportar estos procesos de congelamiento sin que se produzcan daños irreversibles en sus tejidos. Las plantas están desprovistas de hojas durante este período desfavorable (especies caducifolias) o en la mayoría de las especies perennes se ha observado que el proceso de daño ocurre a temperaturas muy por debajo de las temperaturas mínimas registradas, en algunos casos superando temperaturas por debajo de los $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para plantas en la estación de invierno (Bower y Aitken, 2006). Para estas zonas templadas la resistencia al congelamiento de las plántulas está bien correlacionada con las temperaturas más frías en el ambiente de los progenitores (Bower y Aitken, 2006).

Por el contrario, en las zonas tropicales, donde las variaciones térmicas diarias son mucho más importantes que las variaciones estacionales pueden producirse temperaturas congelantes en cualquier momento del año (Goldstein et al., 1984; Rada et al., 2001), lo que sugiere que, la temperatura mínima congelante puede ser una importante limitante en el establecimiento y sobrevivencia de las especies leñosas, tal como lo reportan varios autores (Rada et al., 1985, Cavieres et al., 2000; Piper et al., 2006). Para *Polylepis sericea* (Rada et al., 2009) especie del límite arbóreo, por ejemplo, se plantea que los procesos de regeneración no pueden darse fuera de las condiciones de protección donde crecen los bosques, ya que las condiciones de temperaturas congelantes en zonas cercanas superan las temperaturas que resiste esta especie. Esto indica que las condiciones dentro de las pequeñas islas de

bosques son más favorables, permitiéndoles desarrollarse en altitudes superiores a la del límite continuo.

Un segundo factor ambiental que ha tomado importancia recientemente, en el trópico, es la radiación excesiva presente en las zonas de alta montaña, ya que con el aumento de la altitud se disminuye de forma importante la capa atmosférica protectora, aumentando la incidencia de la radiación, las cuales podrían causar la inhibición de la fotosíntesis (Ball et al., 1991, Germino y Smith, 1999, Bader et al., 2007), afectando el balance de carbono de las plantas por procesos foto-oxidativos (Holtmeier, 2009). Otros autores sugieren que en zonas extratropicales las plantas pueden también sufrir un proceso de fotoinhibición por bajas temperaturas, lo cual causaría en las zonas templadas un proceso lento de adaptación entre las estaciones de invierno y verano, en las cuales las plantas tendrían un período de 15 a 30 días antes de alcanzar tasas de asimilación máximas (Ball, et al., 1991, Germino y Smith, 1999).

Para las zonas altimontanas andinas tropicales, Bader (2007) sugiere que la alta radiación es responsable de la muerte de la mayoría de las plántulas; en experimentos realizados mediante trasplantes en zonas sombreadas y no sombreadas se señala una muy baja tasa de sobrevivencia de individuos trasplantados en zonas no protegidas. Sin embargo, en este estudio no se caracterizan ni miden los procesos de fotoinhibición posiblemente causados por las bajas temperaturas ni por las altas radiaciones, no pudiéndose desligar de la variación de otros factores ambientales asociados al sombreado que afectan de forma directa la sobrevivencia de las plántulas, tales como la disminución de la disponibilidad de agua, o la mayor variación térmica.

Los procesos de disturbio tienen que ver básicamente con dos fenómenos: uno natural, como la ocurrencia de avalanchas de nieve, abrasión por heladas, por vientos etc. Estos factores tienden a tener una importancia en las zonas templadas pero en menor grado en las zonas tropicales, donde en muchos casos no existen nieves perpetuas cerca del límite arbóreo. Y otro factor, es el impacto de origen antrópico, importante en el límite del hemisferio norte (Holtmeier, 2009). Gran parte de las zonas altas de las montañas a nivel

mundial han sido, desde hace siglos, utilizadas como áreas de pastoreo extensivo, así como también para la extracción de madera y de combustibles (Sarmiento y Frolich, 2002; Camarero y Gutiérrez, 2006; Mayer y Huovinen, 2007). Esto pudiese ocasionar un descenso del límite arbóreo (Sarmiento y Frolich, 2002), generando un ruido importante en la interpretación de la presencia y dinámica de este límite a nivel mundial. Este factor le dio mucho empuje al estudio de este límite, a consecuencia de grandes avalanchas en los Alpes en la década de los 50, atribuidas en parte a procesos de deforestación en las zonas altas de las montañas. Esto generó una gran base literaria sobre la reforestación y utilización de estos ambientes en los Alpes europeos (Holtmeier, 2009). Para América tropical, Bader et al. (2008) sugieren que son pocas las zonas naturales del ecotono, lo cual dificulta la interpretación del mismo, particularmente por las quemadas recurrentes en los páramos y la utilización de estas zonas con fines de pastoreo, y en menor grado la utilización de las plantas leñosas en los páramos como fuente energética.

La utilización de la vegetación leñosa así como de estas zonas de alta montaña, dificulta la interpretación que pueda realizarse sobre el avance de la vegetación leñosa tanto en el límite en las zonas alpinas como en las zonas tropicales, ya que no se puede saber si el avance se debe a una disminución sobre la utilización de estas zonas, o a la modificación de la temperatura a nivel global.

La hipótesis del balance de carbono (Boysen-Jensen, 1948, citado por Körner 1998) sugiere que los árboles no pueden desarrollar un balance de carbono positivo debido a la disminución de la tasa fotosintética con la temperatura y el aumento de las tasas de respiración con la altitud. Este desbalance se produce sobre todo en especies leñosas, como producto de la relación entre sus tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos. Al aumentar la proporción de biomasa no fotosintética, se aumentan las necesidades energéticas para mantenimiento sin un aumento proporcional de la capacidad de adquisición de energía por el tejido fotosintético. Algunos autores sugieren que la limitación por balance de carbono no parece explicar el límite arbóreo en las zonas templadas. Según ellos, bastaría con pocos días o semanas para reponer las pérdidas de carbono

por respiración de la estación desfavorable (Wieser, 1997). Otros autores por su parte han señalado, que en algunos casos se produce una reducción de las tasas máximas de asimilación de CO₂ con el aumento de la altitud (Rada et al., 1985; Zhang et al., 2005), principalmente por la disminución de las temperaturas por debajo de los óptimos fotosintéticos. Sin embargo, trabajos recientes en *Polylepis tarapacana* en Bolivia (Hoch y Korner, 2005) indican que se produce un aumento de estas tasas con el aumento de la altitud, lo cual, cuestiona la hipótesis de limitación por balance de carbono.

En muchos casos las especies que crecen en el límite arbóreo presentan hojas más gruesas, con una disminución del área foliar específica con la altitud (Tranquillini, 1979). Algunos autores sugieren que dicho engrosamiento foliar es respuesta a factores como la abrasión por el viento (Hadley y Smith, 1986), en otros casos dicho engrosamiento foliar ha sido correlacionado con la resistencia a la sequía (Brock y Galen, 2005). En cualquier caso dicha disminución del AFE tiene un impacto negativo sobre el balance de carbono, al favorecer las salidas por respiración y producir un aumento en los costos de producción de material fotosintético en las plantas. En este sentido, Reich et al. (1998) señalan que este aumento en el grosor de la hoja causa un aumento en las tasas de respiración. Esta disminución del AFE con la altitud ha sido evidenciada para todos los grupos funcionales en los Alpes Europeos (Körner y Diemer, 1987; Körner et al., 1989, Choler, 2005), para las zonas de alta montaña tropical trabajos realizados en *Espeletia schultzei*, muestran una disminución del área foliar y del área foliar específica con la altitud (Castrillo y Simoes, 1997; Castrillo, 2006).

Adicionalmente, a esto Terashima et al. (2005), desarrollando modelos de difusión de CO₂ en las hojas, indican que el espesor de la hoja disminuye la capacidad de las hojas de fijar CO₂, es decir, hojas más gruesas tendrán una menor tasa fotosintética, por unidad de masa, aun presentando una proporción similar de enzimas fijadoras de CO₂. Muchas de las plantas muestran, sin embargo, un aumento en la cantidad de proteínas fotosintéticas con aumentos

en la altitud lo cual compensaría la disminución del proceso de difusión del CO₂ (Brock y Galen, 2005).

Más recientemente, Körner (1998) presenta una nueva hipótesis relacionada con la imposibilidad de las plantas leñosas de crecer en temperaturas inferiores a los 5,5 °C, aparente umbral térmico para los procesos de crecimiento y división celular, dando como resultado la formación de sustancias post-asimilatorias no estructurales. Temperatura ésta, cercana al promedio de la temperatura del suelo en la estación favorable a la cual se encuentran las zonas de límite arbóreo a nivel mundial según el mismo estudio. El autor plantea en este caso que las copas de los árboles reducirían la penetración de la luz al suelo y con esto se mantendrían temperaturas del suelo inferiores dentro del bosque, comparadas con zonas abiertas aledañas al mismo. Con esto se explicaría el efecto exclusivo sobre la vegetación leñosa, comparada con la vegetación arbustiva o herbácea.

Esta hipótesis ha cobrado mucha importancia en los últimos años, sobre todo luego de que algunos estudios han mostrado el aumento de las tasas de asimilación de CO₂ con la altitud tal como se mencionó anteriormente (Hoch y Körner, 2005). Uno de los argumentos utilizados como evidencia de esta hipótesis ha sido que en algunos sitios a nivel mundial se ha detectado un aumento de los asimilados no estructurales, mostrando para *Pinus cembra* en los Alpes Suizos un aumento de la cantidad de lípidos en los sitios de mayor altitud (Hoch et al., 2002). Igualmente, otras especies de pinos muestran un comportamiento similar en México (Hoch y Körner, 2003).

Sin embargo, algunos detractores de esta hipótesis sugieren que la acumulación de solutos no es más que una respuesta funcional al estrés térmico (Smith et al., 2003), y que puede ser además relacionada con la posibilidad de realizar ajustes osmóticos (Rada et al., 1985). Otro estudios por su parte, muestran que la variación estacional de los compuestos no estructurales es más importante estacionalmente que altitudinalmente (Bansal y Germino, 2009). En los trópicos los pocos estudios realizados, señalan que no existe tal acumulación de compuestos no estructurales, así como tampoco

una disminución de las tasas de asimilación de CO₂, con lo que no es posible confirmar ni negar esta hipótesis completamente (Cavieres et al. 2004).

Otra de las hipótesis se refiere a las limitantes de las plantas, desde el punto de vista nutricional presente en las zonas alpinas, es causada por dificultades de generar micorrizas en las plantas de las zonas de ecotono, tanto de regiones templadas como tropicales, como consecuencia de las bajas temperaturas presentes (Stevens y Fox, 1991; Haselwandter, 2007). En cuanto a la formación de micorrizas en las zonas tropicales, los pocos trabajos realizados, demuestran que existe una disminución de las mismas en las zonas de vegetación herbácea, comparada con las formaciones de rosetales-arbustales generadas por una aparente exclusión por parte de las raicillas y los pelos radicales (Barnola y Montilla 1997; Montilla et al., 2002). Igualmente, estos estudios señalan que muchas de las especies leñosas de estos ambientes, son micotrofas obligatorias. Algunos autores sugieren por otra parte, que lo joven de los suelos así como la poca formación de los mismos por la baja actividad microbiana, pueden jugar un rol importante en el establecimiento y crecimiento de las plantas (Stöhr, 2007).

El último grupo de hipótesis que se plantean sobre el límite de crecimiento vienen dadas por la falta de propágulos de plantas leñosas en las zonas altas del límite arbóreo y la incapacidad de establecimiento de los mismos (Stevens y Fox, 1991). Dichos propágulos necesitan de condiciones favorables para desarrollarse. En muchos de los casos se consiguen muchas plántulas en las zonas cercanas al límite arbóreo, pero estas son rápidamente suprimidas por las condiciones ambientales o por la competencia con la vegetación alpina (Shrestha et al., 2007).

Adicionalmente, se ha señalado que las plantas leñosas del límite disminuyen la producción de semillas fértiles con respecto a la altitud en zonas de los Alpes, así como también se tienen registros los cuales evidencia un aumento de tiempo en el período de producción de semillas de entre 3 y 5 años en baja altitud, a cerca de 9 a 11 años en las zonas cercanas al límite arbóreo, en estos estudios se sugiere que dicho aumento en el período de producción de

semillas se debe a la falta de condiciones propicias para la floración y fructificación (Tranquillini, 1979). Estos dos factores disminuyen la probabilidad de colonizar nuevos espacios en cualquier escenario.

Finalmente, algunos autores plantean la posibilidad de procesos de facilitación que se dan por parte de algunos arbustos como elementos vitales para el establecimiento de las plantas leñosas más allá del límite arbóreo, ya que los mismos podrían disminuir el efecto de las condiciones estresantes del medio, tanto hídricas, como térmicas o lumínicas (Germino et al., 2002; Michalet et al., 2003). El avance del bosque se plantea entonces no como la posibilidad de aumento del crecimiento de las plantas ya establecidas sino, en la mejora de las condiciones de reclutamiento de nuevas plantas, que podría desarrollar una expansión del límite arbóreo (Holtmeier, 2009).

En Venezuela esta zona de transición puede darse bajo varias condiciones (Monasterio, 1980). En las vertientes húmedas (zona donde se realiza el presente estudio) el límite arbóreo es el ecotono entre una selva nublada densa al páramo abierto. Dentro de esta amplia zona se desarrolla una vegetación intermedia denominada bosque pre-paramero, caracterizado por especies leñosas de las selvas con una disminución importante del tamaño de los individuos, con ramificaciones desde la base, y la adición de un grupo de especies propias de este ambiente. En las zonas de páramo abierto se puede dar ocasionalmente la aparición de individuos aislados de especies tanto del bosque pre-paramero (ej. *Diplostephium venezuelense*, *Gaultheria strigosa*, *Vaccinium meridionale*) como de especies de la selva nublada (ej. *Drimys granatensis*, *Clusia multiflora*), hasta llegar a una vegetación típicamente paramera, en la que dichos individuos desaparecen por completo. En las vertientes secas se pasa de un bosque siempre-verde montano alto a zonas de bosque pre-paramero y luego el páramo propiamente dicho. La posición de este límite en Venezuela varía dependiendo de estas vertientes (Suárez, 2009), siendo siempre más bajo para las vertientes secas (2400 a 2700 m), y ubicándose en las vertientes húmedas entre los 3200 y 3500 m de altitud.

Las zonas de alta montaña tropical, tal como se mencionara anteriormente, son zonas de alta variación térmica diaria, y baja variación térmica anual, aunado a la ocurrencia ocasional y estocástica de heladas nocturnas (con mayor probabilidad de ocurrencia en períodos más secos (Monasterio, 1980). Estas características han originado importantes adaptaciones en las especies, dando como resultado características morfo-anatómicas muy particulares y convergentes en las diferentes zonas a nivel global (Hedberg, 1968,; Hedberg y Hedberg, 1979). Las plantas presentes en estos ambientes deben superar diariamente la posibilidad de verse sometidas a heladas, y a temperaturas elevadas en el día, factor particularmente importante a nivel del suelo.

Como sugieren algunos autores (Holtmeier y Broll, 2005), la temperatura, considerada uno de los factores limitantes para el establecimiento de especies leñosas en las zonas altas de montaña, es crucial en la determinación del límite arbóreo de las mismas, ya sea por la presencia de temperaturas congelantes o por la alta variación térmica diaria la cual muy probablemente puedan tener un efecto importante en el balance de carbono de las especies, al estar fuera de los límites aceptables para la realización de la fotosíntesis.

Otro de los factores críticos en los ambientes de páramo es la estacionalidad hídrica, con una estación marcadamente seca, aunque muy breve en algunas localidades, en la cual las especies se ven sometidas a una fuerte demanda evaporativa por las elevadas radiaciones, baja humedad relativa, y una baja disponibilidad de agua en el suelo, los cuales tendrían un efecto sobre el intercambio de gases, que a su vez pueden generar un déficit en el balance de carbono anual, tal como lo reportan García-Núñez et al. (2004) para *Polylepis tarapacana* en la época seca.

Estudios realizados en el páramo describen las variadas respuestas de las plantas a diferentes factores ambientales. La gran mayoría de ellos en plantas dominantes de estos ecosistemas: rosetas gigantes, de los géneros *Espeletia* y *Coespeletia* (Goldstein y Meinzer, 1983; Squeo et al., 1991; Rada et al., 1996; Melcher et al., 1998; Rada et al., 2001), en gramíneas (Márquez, 2002; Márquez et al., 2004), y algunos estudios en especies arbóreas tanto del límite

superior en páramos (*Polylepis sericea*)(Rada et al., 1985; Rada et al., 1996; Rada et al., 2001) así como también en ambientes altiandinos en Bolivia (Hoch y Korner, 2005; Kessler et al., 2007), como en algunas especies de la zona de transición selva-páramo (Cavieres et al., 2000).

En las zonas tropicales son muy pocos los estudios detallados en especies leñosas, en particular estudios que busquen evaluar el efecto del ambiente sobre el desarrollo de especies de selva nublada en las zonas del ecotono, selva nublada—bosque preparamero—páramo.

Se considera que las zonas de alta montaña son ambientes críticos muy susceptibles a los cambios climáticos (Holtmeier y Broll, 2005), evidenciado en los estudio palinológicos (Van der Hammen, 1979; Tinner y Theurillat, 2003; Hooghiemstra y Van der Hammen, 2004). Es por esto, que la comprensión de los mecanismos que controlan el desarrollo y mantenimiento del límite han sido tan estudiados a nivel global, ya que estos cambios serían responsables de modificaciones en diversidad y funcionamiento de los ambientes de alta montaña. Sin embargo, la velocidad con la que están ocurriendo los cambios actuales posiblemente cause la pérdida parcial o total de algunos ambientes.

Este estudio cobra mayor importancia en vista de los cambios climáticos potenciales a nivel mundial, ya que, muchos han sido los esfuerzos realizados para predecir los cambios potenciales en el ecotono entre la vegetación leñosa y la vegetación alpina o la de páramo (Cairns, 2001; Dullinger et al., 2004; Holtmeier y Broll, 2007; Bader et al., 2008). No obstante, la falta de una clara comprensión del efecto de la temperatura sobre las plantas leñosas en particular, así como de los efectos de otras variables ambientales, han hecho poco útiles los modelos predictivos. En revisiones sobre cambios en los últimas dos décadas se ha visto un retroceso o una estabilidad del límite aún cuando se han presentado cambios importantes de temperatura (Aerts et al., 2006; Camarero y Gutiérrez, 2007; Soja et al., 2007).

Surgen entonces las siguientes interrogantes: ¿Cuál es la importancia de las limitaciones térmicas en los ambientes del límite arbóreo tropical en especies leñosas? ¿Es la radiación una determinante del límite de crecimiento arbóreo

en zonas tropicales? ¿Presentan las especies leñosas adaptaciones ecofisiológicas que les permitan resistir estas condiciones adversas? ¿Serán importantes las limitaciones hídricas estacionales en las especies leñosas? La respuesta de las especies leñosas a estos factores nos podría permitir predecir posibles cambios en la estructura y composición de estas comunidades vegetales y ver si cambios ambientales puedan favorecer el reemplazo de especies herbáceas por especies leñosas.

HIPÓTESIS.

En este trabajo se plantea someter a prueba como hipótesis general lo siguiente:

De ser las condiciones ambientales estresantes, alta radiación, déficit hídrico y baja temperatura, responsables de la aparición del límite de crecimiento arbóreo, las respuestas ecofisiológicas (resistencia a temperaturas congelantes y déficit hídrico, y tasas de asimilación de CO₂) de las especies leñosas estudiadas que se desarrollan en este límite se encontrarán cercanas a sus límites en estos factores, condicionando así su desarrollo y crecimiento.

En cada capítulo se presentará hipótesis específicas sobre cada una de las limitantes estudiadas en estas especies.

OBJETIVOS.

Para tratar de dar respuesta a estas interrogantes y poner a prueba estas hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

Objetivo General

- Evaluar el efecto de la temperatura (bajas y altas temperaturas), la excesiva radiación y el déficit hídrico (baja disponibilidad de agua y alta demanda evaporativa) sobre el desarrollo de especies leñosas en el ecotono selva nublada-páramo. La respuesta de las diferentes especies a estos factores posiblemente sea determinantes para la formación y mantenimiento del límite arbóreo en los Andes Tropicales.

Objetivos Específicos

- Caracterizar el microclimática de las zonas del ecotono selva nublada-páramo, por medio de las mediciones de los valores máximos, mínimos y promedios de los factores ambientales (temperatura, radiación, humedad relativa). Así como también la cantidad de días con heladas.
- Determinar si las temperaturas congelantes nocturnas son una limitante en el desarrollo de las especies leñosas de selva nublada y bosque pre-paramero en los páramos andinos. De ser así, determinar sí algunas especies podrían superar esta barrera física y colonizar, bajo posibles escenarios de cambio climático, estos nuevos ambientes.
- Evaluar las posibles variaciones altitudinales a temperaturas de congelamiento y daño para algunas especies leñosas.
- Conocer el intervalo óptimo de temperaturas para la fotosíntesis en especies leñosas del ecotono selva nublada- páramo con el fin de evaluar si las variaciones térmicas diarias pueden ser una limitante en la asimilación de CO₂. Comparar estas temperaturas con las características térmicas ambientales en el ecotono selva nublada-páramo.
- Evaluar las variaciones altitudinales de los óptimos e intervalos de las tasas de asimilación de CO₂ con respecto a la temperatura, con la finalidad de evaluar límites físico-ambientales para este proceso del balance de carbono dentro del gradiente altotérmico.
- Cuantificar los valores saturantes de las tasas de asimilación de CO₂ en función de la radiación en especies de selva nublada, ecotono y páramo, y posibles efectos de fotoinhibición por bajas temperaturas en especies leñosas de selva nublada, bosques pre-parameros y páramo.
- Determinar los valores mínimos de potencial hídrico de las plantas en condiciones naturales, y la respuesta estomática de las plantas ante este factor, con la finalidad de determinar su influencia en las tasas de asimilación.

Este trabajo está enmarcado en el proyecto de la IAI, título: From Landscape to Ecosystem: Acrossscales Functioning in Changing Environments el cual busca comprender la dinámica del límite de crecimiento arbóreo a nivel continental, y poder generar mecanismos de predicción de posibles cambios en el límite y su dinámica.

Bibliografía.

- Aerts, R., Cornelissen, J. y Dorrepaal, E. (2006). Plant Performance in a Warmer World: General Responses of Plants from Cold, Northern Biomes y the Importance of Winter y Spring Events. *Plant Ecology* 182(1): 65-77.
- Anthelme, F., Michalet, R., Barbaro, L. y Brun, J.-J. (2003). Environmental y Spatial Influences of Shrub Cover (*Alnus viridis* DC.) on Vegetation Diversity at the Upper Treeline in the Inner Western Alps. *Arctic, Antarctic, y Alpine Research* 35(1): 48-55.
- Arzac, A. J. (2008). Distribución espacial de formas de vida de plantas en un gradiente altotérmico en los Andes tropicales. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias, Licenciatura en biología Mérida, Venezuela. Universidad de Los Andes. 122 pp.
- Bader, M. Y., Rietkerk, M. y Bregt, A. K. (2007). Vegetation Structure y Temperature Regimes of Tropical Alpine Treelines. *Arctic, Antarctic, y Alpine Research* 39(3): 353-364.
- Bader, M. Y., Rietkerk, M. y Bregt, A. K. (2008). A Simple Spatial Model Exploring Positive Feedbacks at Tropical Alpine Treelines. *Arctic, Antarctic, y Alpine Research* 40(2): 269-278.
- Ball, M.C., Hodges, V.S. y Laughlin, G.P. (1991). Cold-induced photoinhibition limits regeneration of snow at tree-line. *Functional Ecology* 5 : 663-668.
- Bansal, S. y Germino, M.J. (2009). Carbon balance of conifer seedlings at timberline: relative changes in uptake, storage y utilization. *Oecologia* 158 : 217-227.

- Barnola, L. y Montilla, M. (1997). Vertical distribution of mycorrhizal colonization, root hairs y belowground biomass in three contrasting sites from the tropical high mountains, Mérida, Venezuela. *Arctic y alpine Research* 29 (2) : 206-212.
- Bower, A. D. y Aitken, S. N. (2006). Geographic y seasonal variation in cold hardiness of whitebark pine. *Canadian Journal of Forest Research* 36: 1842-1850.
- Boysen-Jensen P. (1949). Causal plant geography. *Biology Medd* 21:1-19
- Brock, M. T. y Galen, C. (2005). Drought tolerance in the alpine dandelion, *Taraxacum ceratophorum* (Asteraceae), its exotic congener *T. officinale*, y interspecific hybrids under natural y experimental conditions. *American Journal of Botany* 92(8): 1311-1321.
- Cairns, D. M. (2001). A comparison of methods for predicting vegetation type. *Plant Ecology* 156(1): 3-18.
- Camarero, J. J. y Gutiérrez, E. (2002). Plant species distribution across two contrasting treeline ecotones in the Spanish Pyrenees. *Plant Ecology* 162(2): 247-257.
- Camarero, J. J., Gutiérrez, E. y Fortin, M.-J. (2006). Spatial patterns of plant richness across treeline ecotones in the Pyrenees reveal different locations for richness y tree cover boundaries. *Global Ecology y Biogeography* 15(2): 182-191.
- Camarero, J. y Gutiérrez, E. (2007). Response of *Pinus uncinata* Recruitment to Climate Warming y Changes in Grazing Pressure in an Isolated Population of the Iberian System (NE Spain). *Arctic, Antarctic, y Alpine Research* 39(2): 210-217.
- Castrillo, M. (2006). Fotosíntesis en tres poblaciones altitudinales de la planta andina *Espeletia schultzii* (Compositae). *International Journal of Tropical Biology and Conservation* 54(4): 1143-1149.

- Castrillo, M. y M. Simoes (1997). Leaf non-structural carbohydrates and leaf dry weight per area in three altitudinal populations of *Espeletia schultzii* WEDD. *Folia Geobotanica* 32(4): 355-360.
- Cavieres, L. A. y Piper, F. (2004). Determinantes ecofisiológicos del límite altitudinal de los árboles. In *Fisiología Ecológica en Plantas*, 221-234 (Ed H. M. Cabrera). Valparaíso: Ediciones de la Universidad Católica de Valparaíso.
- Cavieres, L. A., Rada, F., Azócar, A., García-Núñez, C. y Cabrera, H. M. (2000). Gas exchange y low temperature resistance in two tropical high mountain tree species from the Venezuelan Andes. *Acta Oecologica* 21(3): 203-211.
- Choler, P. (2005). Consistent Shifts in Alpine Plant Traits along a Mesotopographical Gradient. *Arctic, Antarctic, y Alpine Research* 37(4): 444-453.
- Dalen, L. y Hofgaard, A. (2005). Differential Regional Treeline Dynamics in the Scandes Mountains. *Arctic, Antarctic, y Alpine Research* 37(3): 284-296.
- Doležal, J. y Šrůtek, M. (2002). Altitudinal changes in composition y structure of mountain-temperate vegetation: a case study from the Western Carpathians. *Plant Ecology* 158(2): 201-221.
- Dullinger, S., Dirnbock, T. y Grabherr, G. (2004). Modelling climate change-driven treeline shifts: relative effects of temperature increase, dispersal y invasibility. *Journal of Ecology* 92(2): 241-252.
- García-Núñez, C., Rada, F., Boero, C., González, J., Gallardo, M., Azócar, A., Liberman-Cruz, M., Hilal, M. y Prado, F. (2004). Leaf Gas Exchange y Water Relations in *Polylepis tarapacana* at Extreme Altitudes in the Bolivian Andes. *Photosynthetica* 42(1): 133-138.
- Geddes, C. A., Brown, D. G. y Fagre, D. B. (2005). Topography y Vegetation as Predictors of Snow Water Equivalent across the Alpine Treeline Ecotone at Lee Ridge, Glacier National Park, Montana, U.S.A. *Arctic, Antarctic, y Alpine Research* 37(2): 197-205.

- Germino, M. J. y Smith, W. K. (1999). Sky exposure, crown architecture, y low-temperature photoinhibition in conifer seedlings at alpine treeline. *Plant, Cell y Environment* 22(4): 407-415.
- Germino, M., Smith, W. y Resor, A. (2002). Conifer seedling distribution y survival in an alpine-treeline ecotone. *Plant Ecology* 162(2): 157-168.
- Goldstein, G. y Meinzer, F. (1983). Influence of insulating dead leaves y low temperatures on water balance in an Andean giant rosette plant. *Plant, Cell y Environment* 6(8): 649-656.
- Goldstein, G., Meinzer, F. y Monasterio, M. (1984). The role of capacitance in the water balance of Andean giant rosette species. *Plant, Cell y Environment* 7(3): 179-186.
- Hadley, J. L. y Smith, W. K. (1986). Wind effects on the needles of sunalpine conifer: seasonal influence on mortality. *Ecology* 67: 12-19.
- Haselwandter, K. (2007). Mycirrhiza in the alpine timberline Ecotone: Nutritional implications. In *Tree at their upper limit. Treelife limitation at the Alpine Timberline*, Vol. 5, 57-66 (Eds G. Wieser y M. Tausz). Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Hedberg, O. 1964. Features of afroalpine plant ecology. *Acta phytogeografica Suecica* 49. pp 134.
- Hedberg, I. and Hedberg, O. 1979. Tropical-alpine life-forms of vascular plants. - *Oikos* 33: 297-307.
- Hoch, G. y Körner, C. (2003). The carbon charging of pines at the climatic treeline: a global comparison. *Oecologia* 135(1): 10-21.
- Hoch, G. y Korner, C. (2005). Growth, demography y carbon relations of *Polylepis* trees at the world's highest treeline. *Functional Ecology* 19(6): 941-951.
- Hoch, G., Popp, M. y Körner, C. (2002). Altitudinal increase of mobile carbon pools in *Pinus cembra* suggest sink limitation of growth at the Swiss Treeline. *Oikos* 98: 361-374.

- Holtmeier, F.-K. (2009). Mountain Timberlines. Ecology, Patchiness, y Dynamics. Geneva, Switzerland. Springer Science
- Holtmeier, F.-K. y Broll, G. (2005). Sensitivity y response of northern hemisphere altitudinal y polar treelines to environmental change at landscape y local scales. *Global Ecology y Biogeography* 14(5): 395-410.
- Holtmeier, F.-K. y Broll, G. (2007). Treeline advance, driving processes y adverse factor. *Landscape Online* 1: 1-33.
- Kessler, M., Bohner, J. y Kluge, J. (2007). Modelling tree height to assess climatic conditions at tree lines in the Bolivian Andes. *Ecological Modelling* 207(2-4): 223-233.
- Körner, C. (1998). A re-assessment of high elevation treeline positions y their explanation. *Oecologia* 115(4): 445-459.
- Korner, C. (2003). Carbon limitation in trees. *Journal of Ecology* 91(1): 4-17.
- Körner, C. y Paulsen, J. (2004). A world-wide study of high altitude treeline temperatures. *Journal of Biogeography* 31(5): 713-732.
- Körner, Ch., Neumayer, M., Pelaez Menendez-Riedl, S., y A., Smeets-Scheel. (1989). Functional morphology of mountain plants. *Flora*, 182: 353-383.
- Körner, Ch., y M., Diemer. (1987). In situ photosynthetic responses to light, temperature and carbon dioxide in herbaceous plants from low and high altitude. *Functional Ecology*, 1: 179-194.
- Lambers, H., Chapin, F. S. y Pons, T. (2008). *Plant Physiological Ecology*. New York: Springer.
- Márquez, E. F. (2002). Distribución altitudinal de gramíneas de páramo como respuesta a las rutas metabólicas y los mecanismos de resistencia a las bajas temperaturas. Postgrado en Ecología Tropical-ICAE, Mérida, Venezuela Universidad de Los Andes.
- Márquez, E. J., Fariñas, M. R., Briceño, B. y Rada, F. J. (2004). Distribution of grasses along an altitudinal gradient in a Venezuelan paramo. *Revista Chilena de Historia Natural*. 77(4): 649-660.

- Mayer, A. C. y Huovinen, C. (2007). Silvopastoralism in the Alps: Native plant species selection under different grazing pressure. *Ecological Engineering* 29(4): 372-381.
- Melcher, P., Meinzer, F., Yount, D., Goldstein, G. y Zimmermann, U. (1998). Short communication. Comparative measurements of xylem pressure in transpiring y non-transpiring leaves by means of the pressure chamber y the xylem pressure probe. *Journal of Experimental Botany* 49(327): 1757-1760.
- Michalet, R., Rolland, C., Joud, D., Gafta, D. y Callaway, R. M. (2003). Associations between canopy y understory species increase along a rainshadow gradient in the Alps: habitat heterogeneity or facilitation? *Plant Ecology* 165(2): 145-160.
- Miehe, G., Miehe, S., Vogel, J., Co, S. y La, D. (2007a). Highest Treeline in the Northern Hemisphere Found in Southern Tibet. *Mountain Research y Development* 27(2): 169-173.
- Miehe, G., Miehe, S., Will, M., Opgenoorth, L., Duo, L., Dorgeh, T. y Liu, J. (2007b). An inventory of forest relicts in the pastures of Southern Tibet (Xizang A.R., China). *Plant Ecology*.
- Monasterio, M. (1980). Las formaciones vegetales de los Páramos de Venezuela. En: Monasterio M. Estudios ecológicos en los páramos andinos, 93-158. Universidad de Los Andes Mérida-Venezuela.
- Montilla, M., Herrera-Peraza, R. y Monasterio, M. (2002). Influencia de los períodos de descanso sobre la distribución vertical de raíces, micorrizas arbusculares y pelos radicales en los páramos andinos venezolanos. *Ecotropicos* 15 (1):85-98.
- Piper, F., Cavieres, L., Reyes-Díaz, M. y Corcuera, L. (2006). Carbon sink limitation y frost tolerance control performance of the tree *Kageneckia angustifolia* D. Don (Rosaceae) at the treeline in central Chile. *Plant Ecology* 185(1): 29-39.

- Puentes, J. (2010). Patrones y mecanismos de establecimiento de dos especies leñosas en la transición entre el bosque paramero y el páramo en los andes tropicales. Postgrado en Ecología Tropical-ICAE, Mérida, Venezuela. Universidad de Los Andes 138 p.
- Rada, F., Azócar, A., Briceño, B., González, J. y García-Núñez, C. (1996). Carbon y water balance in *Polylepis sericea*, a tropical treeline species. *Trees - Structure y Function* 10(4): 218-222.
- Rada, F., García-Núñez, C., Boero, C., Gallardo, M., Hilal, M., González, J., Prado, F., Liberman-Cruz, M. y Azócar, A. (2001). Low-temperature resistance in *Polylepis tarapacana*, a tree growing at the highest altitudes in the world. *Plant, Cell y Environment* 24(3): 377-381.
- Rada, F., García-Núñez, C. y Rangel, S. (2009). Low temperature resistance in saplings and ramets of *Polylepis sericea* in the Venezuelan Andes. *Acta Oecologica* 35(5): 610-613.
- Rada, F., Goldstein, G., Azócar, A. y Meinzer, F. (1985). Daily y Seasonal Osmotic Changes in a Tropical Treeline Species. *Journal of Experimental Botany*. 36(6): 989-1000.
- Ramírez, L. A., Llambí, L. D., Schwarzkopf, T., Gámez, E. y Márquez N. (2009) Vegetation structure along the forest-Páramo transition belt in the Sierra Nevada de Mérida: Implication for under-standing treeline dynamics. *Ecotropicos*. 22 (2): 83-98.
- Reich, P. B., Ellsworth, D. S., Walters, M. B., Vose, J. M., Gresham, C., Volin, J. C. y Bowman, W. D. (1999). Generality of leaf trait relationships: A test across six biomes *Ecology* 80(6): 1955-1969.
- Sarmiento, F. O. y Frolich, L. M. (2002). Andean Cloud Forest Tree Lines. *Mountain Research y Development* 22(3): 278-287.
- Shrestha, B. B., Ghimire, B., Lekhak, H. D. y Jha, P. K. (2007). Regeneration of Treeline Birch (*Betula utilis* D. Don) Forest in a Trans-Himalayan Dry Valley in Central Nepal. *Mountain Research y Development* 27(3): 259-267.

- Smith, W., Germino, M., Hancock, T. y Johnson, D. (2003). Another perspective on altitudinal limits of alpine timberline. *Tree Physiology* 23: 1101-1112.
- Soja, A. J., Tchebakova, N. M., French, N. H. F., Flannigan, M. D., Shugart, H. H., Stocks, B. J., Sukhinin, A. I., Parfenova, E. I., Chapin Iii, F. S. y Stackhouse, J. P. W. (2007). Climate-induced boreal forest change: Predictions versus current observations. *Global y Planetary Change* 56(3-4): 274-296.
- Squeo, F. A., Rada, F., Azócar, A. y Goldstein, G. (1991). Freezing tolerance y avoidance in high tropical Andean plants: Is it equally represented in species with different plant height? *Oecologia* 86(3): 378-382.
- Stevens, G. C. y Fox, J. F. (1991). The causes of treeline. *Annual Review of Ecology & Sistematic* 22: 177-191.
- Stöhr, D. (2007). Soils - Heterogeneous at a microscale. In *Tree at their upper limit. Treeline limitation at the alpine timberline.*, Vol. 5, 37-56 (Eds G. Wieser y M. Tausz). Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Suárez, P. M. (2009). Modelización de la distribución de la línea de contacto bosque-páramo en los andes venezolanos. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias, Licenciatura en biología Mérida, Venezuela. Universidad de Los Andes. 128 pp.
- Terashima, I., Araya, T., Miyazawa, S.-I., Sone, K. y Yano, S. (2005). Construction y Maintenance of the Optimal Photosynthetic Systems of the Leaf, Herbaceous Plant y Tree: an Eco-developmental Treatise. *Annals of Botany* 95(3): 507-519.
- Tinner, W. y J.P. Theurillat. 2003. Uppermost Limit, Extent, and Fluctuations of the Timberline and Treeline Ecocline in the Swiss Central Alps during the Past 11,500 Years. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 35 (2):158-169.

- Tranquillini, W. (1979). *Physiological Ecology of the Alpine Timberline. Tree existence at high altitudes with Special reference to the European Alps.* Berlin: Springer-Verlag.
- Wang, T., Zhang, Q.-B. y Ma, K. (2006). Treeline dynamics in relation to climatic variability in the central Tianshan Mountains, northwestern China. *Global Ecology y Biogeography* 15(4): 406-415.
- Wesche, K., Miehe, G. y Kaeppeli, M. (2000). The Significance of Fire for Afroalpine Ericaceous Vegetation. *Mountain Research y Development* 20(4): 340-347.
- Wieser, G. (1997). Carbon dioxide gas exchange of cembra pine (*Pinus cembra*) at the alpine timberline during winter. *Tree Physiology* 17: 473-477.
- Wieser, G. y Tausz, M. (2007a). Current concepts for treeline limitation at the upper timberline. In *Trees at their upper limit. Treeline limitation at the Alpine timberline*, Vol. 5, 1-18 (Eds G. Wieser y M. Tausz). Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Wieser, G. y Tausz, M. (2007b). *Trees at their upper limit. Treeline limitation at the alpine timberline.* Dordrecht: Springer.
- Zhang, S.-B., Zhou, Z.-K., Hu, H., Xu, K., Yan, N. y Li, S.-Y. (2005). Photosynthetic performances of *Quercus pannosa* vary with altitude in the Hengduan Mountains, southwest China. *Forest Ecology y Management* 212(1-3): 291-301.

CAPÍTULO 2. MECANISMOS DE RESISTENCIA AL CONGELAMIENTO EN LEÑOSAS DEL ECOTONO SELVA NUBLADA-PÁRAMO.

INTRODUCCIÓN.

Las bajas temperaturas son uno de los factores más importantes en la distribución, crecimiento y sobrevivencia de las especies leñosas (Grace, 1987). Este factor abiótico que genera gran variedad de cambios en la fisiología de las plantas ha sido considerado como uno de los limitantes en la formación del límite arbóreo altimontano (Bader et al., 2007; Wieser y Tausz, 2007).

Las plantas a nivel mundial, han desarrollado mecanismos que les permiten superar este estrés, que en la mayoría de los casos es periódico. Estos mecanismos han sido divididos en dos grandes grupos: el primero, aquellas que evitan la formación de hielo dentro de los tejidos vivos, ya sea por pérdida del mismo, la protección del tejido foliar, ajustes osmóticos o por sobre-enfriamiento de los tejidos, corresponden a las plantas llamadas evasoras y el segundo grupo, las plantas que soportan la formación de hielo (extracelular) en sus tejidos, son llamadas plantas tolerantes.

Es necesario aclarar, que cuando se habla de congelamiento se refiere a la formación de hielo en los espacios intercelulares, ya que la formación de hielo intracelular siempre es letal. La formación de hielo en los espacios intercelulares provoca en la plantas una disminución de la presión de vapor de agua la cual produce una deshidratación de las células. Esto significa que aquellas plantas que toleren la formación de hielo en sus espacios intercelulares deben ser, necesariamente, también tolerantes al estrés hídrico (Levitt, 1980).

A nivel extratropical (en las zonas templadas y boreales), donde existe una estacionalidad térmica anual, las plantas han desarrollado estrategias de resistencia al congelamiento en estos períodos fríos. Estas van desde la

pérdida total del tejido fotosintético hasta procesos de aclimatación gradual (endurecimiento) de las hojas, variando la resistencia en este último caso, de temperaturas cercanas a cero grados centígrados en la estación térmica favorable (primavera y verano) a lograr superar, en casos extremos, temperaturas inferiores a los $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la estación fría (Beck et al., 2004). En estas zonas, la hipótesis de limitación por temperaturas congelantes, ha sido descartada casi por completo, ya que gran cantidad de especies podrían superar esta barrera térmica con facilidad (Bower y Aitken, 2006). Sin embargo, Arris y Eagleson (1989) indican que el límite boreal del bosque norteamericano, coincide muy estrechamente con la isoterma de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, en enero, sugiriendo estos autores que esta temperatura sería el límite máximo de resistencia al congelamiento en especies leñosas.

En las zonas altimontanas tropicales, por el contrario, al no existir una estacionalidad térmica marcada, las plantas deben estar preparadas en todo momento para soportar temperaturas congelantes. Esto impide que se utilicen los mismos mecanismos de aclimatación presentes en las zonas templadas. La ausencia de estos procesos de aclimatación en estas zonas ha hecho que algunos autores sugieran que muchas de las especies leñosas carezcan de mecanismos de resistencia al congelamiento (Cavieres y Piper, 2004). Por estas razones, se piensa que este factor puede ser crucial en la formación del límite arbóreo altimontano (Piper et al., 2006).

El límite arbóreo en los páramos venezolanos tiende a ser un amplio ecotono entre la selva nublada altiandina y el páramo. En dicho ecotono la vegetación va disminuyendo su tamaño hasta llegar a una vegetación arbustiva de bajo porte y muy dispersa (Bader et al., 2007; Ramírez et al., 2009). Este cambio puede ser gradual o muy abrupto dependiendo de las zonas.

Los mecanismos de resistencia al congelamiento han sido ampliamente estudiados en las zonas altimontanas de los trópicos. Para estas zonas, diversos autores señalan que en las plantas leñosas dominan las estrategias de

evasión al congelamiento (Squeo et al., 1991; Azocar, 2006). Entre estas estrategias, en la mayoría de los casos reportados en las zonas tropicales domina el sobreenfriamiento como estrategia de resistencia a las temperaturas congelantes. Según varios autores (Levitt, 1982; Sakai y Larcher 1987) este mecanismo de resistencia dominaría en sitios donde los períodos de temperaturas congelantes son breves en el tiempo y donde se presentan en la época favorable de crecimiento, caso particular del trópico durante todo el año (Goldstein et al., 1985; Rada et al., 2001; Rada et al., 1985b; Rada et al., 1987).

Son pocos los estudios sobre mecanismos de resistencia a las temperaturas congelantes, realizados en especies leñosas del límite arbóreo en los Andes tropicales. La mayoría de los trabajos se refieren al género *Polylepis* (Rada et al., 1985a; Rada et al., 2001; Hoch y Korner, 2005; Kessler et al., 2007; Cierjacks et al., 2007), y en el ecotono selva nublada páramo con *Podocarpus oleifolius* y *Libanothamnus neriifolius* (Sch. Bip. ex Wedd.) Ernst (Cavieres et al, 2000), más recientemente enmarcados dentro del proyecto LEAF, Cáceres, (2008) realizó estudios sobre los mecanismos de resistencia al congelamiento en *Vaccinium meridionale*, y por otro lado, Puentes (2010) realizó estudios similares en individuos juveniles de *Diplostegium venezuelense* y *Cybianthus marginatus*, especies típicas del ecotono selva-nublada páramo. Los resultados en estos trabajos no parecen concluyentes, por un lado, Cavieres et al. (2000) encuentra que la especie *P. oleifolius* no presenta mecanismos de resistencia al congelamiento, y para *V. meridionale*, e individuos juveniles de *D. venezuelense* y *C. marginatus* (Cáceres, 2008 y Puentes, 2010) presentan valores bajos de temperatura de congelamiento.

En este trabajo, nos proponemos determinar en 20 especies leñosas, de cuatro ambientes distintos (páramo, bosque preparamero, selva nublada y selva estacional) dentro de un amplio gradiente altitudinal (2000 metros de desnivel) en la zona de estudio: 1. Si las temperaturas congelantes nocturnas son una limitante en el desarrollo de estas especies leñosas del ecotono selva nublada-

páramo, de la selva nublada propiamente dicha o zonas más bajas, 2. De existir algún mecanismo de resistencia al congelamiento, cuál o cuáles son los mecanismos existentes en estas especies, y 3. La existencia de posibles variaciones altitudinales de la temperatura de congelamiento y daño para algunas de estas especies leñosas.

Hipótesis general

De ser las temperaturas congelantes el principal filtro ambiental que determina la presencia del límite arbóreo en las zonas tropicales, las plantas leñosas del ecotono selva nublada-páramo y de zonas inferiores carecerán de mecanismos de resistencia al congelamiento. La ausencia de mecanismos de resistencia serían los responsables de la imposibilidad de colonización y desarrollo de las especies leñosas en ambientes de páramo abierto. Finalmente, de existir mecanismos de resistencia al congelamiento, siguiendo los patrones presentados para otras especies típicas de las zonas altiandinas, las especies presentes en la zona deben aumentar la resistencia a las temperaturas congelantes nocturnas en función de un aumento de la altitud.

Objetivos

- Determinar las temperaturas de formación de exotermas y de la capacidad de sobreenfriamiento de material foliar de las diferentes especies leñosas, en el gradiente de estudio.
- Determinar la temperatura en la que ocurre el daño foliar en las diferentes especies leñosas, en el gradiente de estudio.
- Determinar si las temperaturas congelantes nocturnas son una limitante en el desarrollo de las especies leñosas de selva nublada y bosque preparamero en los páramos andinos. De ser así, determinar si algunas especies podrían superar esta barrera física y colonizar, bajo posibles escenarios de cambio climático, estos nuevos ambientes.

- Evaluar las posibles variaciones altitudinales a temperaturas de congelamiento y daño para algunas especies leñosas.

MÉTODOS.

El presente estudio se realizó en un gradiente altitudinal entre la Ciudad de Mérida y la estación La Aguada del Sistema Teleférico de Mérida, con un énfasis mayor en las especies del ecotono Selva Nublada-Páramo del gradiente, tomando 13 de las 20 especies en el ecotono, 4 especies típicamente de selva nublada y finalmente 3 especies pioneras de la selva nublada baja y/o de la selva estacional.

Dicho gradiente se caracteriza por un clima muy húmedo con altas precipitaciones (1700 mm en la ciudad de Mérida, 2400 mm en la estación la Montaña y 1811 mm en la estación La Aguada) y la temperatura es isotérmica con medias anuales de 22 °C para la Ciudad de Mérida y una media anual de 7,1 °C para la estación La Aguada, punto más alto del gradiente en estudio. En este último punto del gradiente pueden ocurrir heladas eventuales durante el año, principalmente en los meses de enero y febrero (Monasterio y Reyes, 1980, Yáñez, 1998).

Especies estudiadas.

Para el análisis de la resistencia al congelamiento en especies leñosas del ecotono Selva Nublada-Páramo se seleccionaron un grupo de especies, dentro del gradiente de distribución desde la selva estacional (1500 m en la ciudad de Mérida) hasta el páramo andino (inmediaciones de la estación La Aguada del Sistema Teleférico de Mérida a una altitud aproximada de 3500 m), justo sobre el límite de crecimiento arbóreo para la zona (Arzac, 2008, Ramírez et al., 2009, Yáñez, 1998) con la finalidad de comparar las respuestas de las plantas leñosas de los diversos ambientes. Estas determinaciones se realizaron en material foliar de individuos adultos de las diferentes especies.

Las especies leñosas se seleccionaron en cuatro grupos como se describe a continuación. El primer grupo (A en el cuadro 2.1), especies típicas y abundantes dentro del ecotono Selva-Páramo (Yáñez, 1998), las cuales se colectaron a dos altitudes (3250 y 3400 m, límites inferior y superior, respectivamente; del ecotono en el gradiente en la zona de estudio) con la finalidad de evaluar posibles variaciones altitudinales de la resistencia al congelamiento en estas especies. El segundo grupo (B en el cuadro 2.1) corresponde a especies arbustivas del páramo andino o especies leñosas del ecotono (Ramírez et al., 2009, Yáñez, 1998). Un tercer grupo de especies (C en el cuadro 2.1) son las especies características de la Selva nublada, típicamente especies pioneras en estos ambientes (Veillon, 1997). Finalmente, tres especies pioneras en el bosque estacional o Selva Nublada Baja (D en el cuadro 2.1) (Veillon, 1997). La selección de estos dos últimos grupos se realizó con la finalidad de evaluar la potencialidad de estas especies como colonizadoras de ambientes de mayor altitud, y descartar o no el congelamiento como elemento definitorio de la ausencia de leñosas en la zona de páramo en la alta montaña tropical.

En el caso de las especies leñosas estrictamente del ecotono se encuentra que algunas de ellas se hallan en zonas parcialmente protegidas, formando pequeños bosquetes aislados a modo de islas de bosques en páramos, o en lenguas de bosques que se interdigitan con vegetación de páramo, entre estas especies cabe resaltar a *V. stipularis* y *D. granatensis*, las cuales se encontraron en la zona de estudio principalmente en estos pequeños refugios.

Cuadro 2.1. Lista de especies analizadas en cuanto a su resistencia al congelamiento, familia, amplitud altitudinal, altitud de colección del material y grupo de muestreo: A / Especies muestreadas en dos altitudes en el ecotono; B / Especies de Páramo (*) o del Ecotono Selva-Páramo muestreadas a su mayor altitud o a 3500 m; C / Especies de Selva Nublada; D / Especies de Bosque Estacional o Selva Nublada Baja.

Especie	FAM	Altitud	Col.	
<i>Diplostegium venezuelense</i> Cuatrec.	AST	2800-4300	3200-3400	A
<i>Libanothamnus lucidus</i> (Aristeg.) Cuatrec.	AST	2400- 3600	3200-3400	A
<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth	ERI	2400-3800	3200-3400	A
<i>Podocarpus oleifolius</i> D. Don ex Lamb.	POD	2200-3400	3200-3400	A
<i>Chaetolepis lindeniana</i> Triana *	MEL	2700-3600	3500	B
<i>Miconia tinifolia</i> Naudin	MEL	2600-3300	3300	B
<i>Cybianthus marginatus</i> (Benth.) Pipoly	MYR	2800-3500	3300	B
<i>Gaultheria strigosa</i> Benth. *	ERI	2800-3950	3500	B
<i>Drimys granadensis</i> Mutis ex L. f.	WIN	1500-3300	3200	B
<i>Vallea stipularis</i> L. f.	ELA	2300-3800	3200	B
<i>Gaiadendron tagua</i> (Kunth) G. Don	LOR	2400-3200	3200	B
<u><i>Alnus jorullensis</i> (Kunth) Kuntze</u>	BET	1800-3800	2800	B
<i>Bejaria aestuans</i> Mutis ex L.	ERI	1950-4000	3200	B
<i>Paragynoxys magnifolia</i> Cuatrec.	AST	2400-3400	3000	C
<i>Cordia caracasana</i> DC.	BOR	2200-3400	2800	C
<i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth	CUN	2000-3000	2600	C
<i>Montanoa quadrangularis</i> Sch. Bip.	AST	1800-2800	1800	C
<u><i>Heliocarpus americanus</i> L.</u>	TIL	1000-2200	1600	D
<i>Myrsine coriacea</i> (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult.	MYR	1500-2800	1600	D
<i>Ficus insipida</i> Willd.	MOR	0-1900	1600	D

Capacidad de sobreenfriamiento y punto de congelamiento.

Se colectaron 9 ramas de cada una de las especies, en sus respectivas altitudes, a dos altitudes para las especies del grupo A, y una altitud para el resto de los grupos. Este material fue rehidratado durante un período de 12 horas en la oscuridad a baja temperatura, de forma que se saturaran

completamente. El proceso de saturación del material se realizó con la finalidad de suprimir el efecto del potencial hídrico foliar (Ψ_f) sobre el punto de congelamiento, ya que existen evidencias de que variaciones en el estado hídrico del material inducen variaciones en el punto de iniciación del congelamiento de las hojas (Goldstein et al., 1985, Rada et al., 1987). Se tomó el Ψ_f antes de comenzar el experimento, y solo se procedió a cortar las hojas de las ramas cuando la misma se encontraba en condiciones de saturación.

Se utilizaron hojas completas para aquellas especies con tamaños foliares pequeños. Para las especies de hojas grandes, se tomaron muestras de tejido foliar de aproximadamente 5 mm de ancho por 35 mm de largo, en sentido transversal a la hoja. Este material se colocó de forma inmediata, en un tubo de ensayo hermético cuyo tapón estaba provisto de unos termopares tipo T (Cobre-Constantan) conectados a una tarjeta de adquisición de datos, que permite el registro constante de la temperatura del tejido vegetal dentro del tubo. Estos tubos de ensayo fueron colocados en un baño refrigerado en una solución de etanol-agua en una proporción 2 a 1. Se registró la temperatura de cada uno de los tubos en el baño. Se comenzó el enfriamiento con una disminución de la temperatura a una tasa constante ($10^\circ\text{C}/\text{h}$), desde 5°C hasta -25°C . Se realizaron tres series para un total de ocho réplicas por especie.

Al ser el congelamiento un proceso exotérmico, se produce un aumento brusco de la temperatura al comenzar el proceso de cambio de fase de líquido a sólido. Este aumento abrupto de la temperatura marca el inicio de la formación de hielo dentro de los tejidos y determina la capacidad de sobreenfriamiento de las hojas.

Determinación de daño en el tejido foliar.

Se utilizó en este caso la metodología del lavado iónico, o de conductividad eléctrica (Dexter et al., 1930; Dexter et al., 1932; Linden, 2002), en la cual se mide la cantidad de electrolitos liberados en agua pura de las muestras de tejido vegetal. Cuando el material vegetal sufre daño por congelamiento, las células liberan electrolitos que aumentan la conductividad eléctrica de la solución. Mediante este aumento de conductividad eléctrica se puede determinar la proporción de electrolitos totales y liberados a cierta temperatura y calcular la temperatura a la cual ocurre el daño celular por congelamiento.

Para la estimación de la temperatura de daño en el tejido vegetal se tomaron muestras similares a las utilizadas en la metodología de determinación del punto de congelamiento antes descrita. Estas muestras se colocaron en el baño refrigerante, con las condiciones de enfriamiento antes mencionadas. En cada experimento se colocaron 18 muestras por especie en el que se obtuvieron tres réplicas para cada temperatura, a saber: 5, 0, -5, -10, -15, -20, °C, en cada ensayo de congelamiento realizado, para un total de 9 réplicas para cada especie. Cuando el baño alcanzaba la temperatura deseada durante el enfriamiento, se extraían los tubos de ensayo.

Las muestras de tejido vegetal, luego de alcanzar la temperatura ambiente a una tasa de calentamiento de 5° C/h, se retiraron de los tubos y se colocaron en envases contentivos de agua desionizada (MQ). Este procedimiento se realizó tres veces para cada especie. Las muestras se colocaron en la oscuridad, a una temperatura de 4°C para evitar su contaminación y la proliferación de bacterias presentes en el tejido vegetal. Luego de 72 horas se midió la conductividad eléctrica de la solución, en micro Siemens (μS), con la ayuda de un conductímetro marca Extech (EC500 Waterproof ExStik Conductivity /TDS/Salinity Meter).

Con la finalidad de producir la lisis total del tejido vegetal y la liberación de todos los electrolitos, luego de realizadas todas las mediciones, se congeló cada muestra en nitrógeno líquido. El material fue colocado nuevamente en los envases sin retirar la solución y llevados a las condiciones de oscuridad y temperaturas antes mencionadas. Se midió nuevamente la conductividad eléctrica de la solución con el mismo instrumento. El daño fue calculado por la proporción de electrolitos liberados en la primera medición en relación al total de electrolitos de la muestra.

Los resultados fueron analizados por medio de pruebas no paramétricas, por la no normalidad de los datos. Se aplicó el test de Mann-Whitney para evaluar las diferencias entre la temperatura de daño y la de congelamiento, así como para ver si existían diferencias entre las dos altitudes estudiadas para las especies del grupo A.

Determinación de temperaturas mínimas en campo

Dentro del desarrollo del proyecto, se contó con información de temperatura del aire a cuatro altitudes dentro del gradiente alto térmico, las cuales forman parte del desarrollo del Proyecto LEAF.

Estas estaciones están ubicadas en las cercanías de la Estación La Aguada del Sistema Teleférico de Mérida, a 3250, 3350, 3450 y 3550, en la zona del ecotono entre la selva nublada y el páramo, teniendo tres estaciones por altitud. Unas ubicadas en la zona de bosque, otras en zonas de páramo abierto y en posición intermedia en zonas de interdigitación bosque-páramo se encuentran las otras estaciones, tanto en zonas abiertas de páramo como en zonas de bosques.

En estas estaciones se realiza el seguimiento de la temperatura del aire a 1,5 metros de altura cada 10 minutos, mediante la utilización de sensores HOBO de temperatura de 8 bits, y data loggers de cuatro canales. Adicionalmente, estas estaciones llevan otras variables ambientales que serán presentadas en el capítulo 4.

RESULTADOS.

Mediciones realizadas durante los años 2007 y 2008 de temperatura del aire en la parte superior del gradiente (en el ecotono, entre los 3200 y 3550 m), muestran que el registro mínimo absoluto de temperatura del aire (1,5 m de altura) fue de -3.4 °C, y la temperatura media anual fue de 7.1 °C para el punto más alto del gradiente a 3500 en una zona abierta. Se presentan pocos días con heladas en estas altitudes con un total de 7 días para las zonas de páramo abierto y 12 días para las zonas de bosque.

Los datos de la temperatura media de sobreenfriamiento para todas las especies estudiadas en su mayor altitud se presentan en el cuadro 2.2. Dichos resultados indican que la mayoría de las especies leñosas estudiadas tienen capacidad de sobreenfriar. Se muestran, sin embargo, tres especies que aún cuando presenten valores de congelamiento por debajo del punto de congelamiento del agua, no se pueden considerar que utilicen el mecanismo de sobreenfriamiento como estrategia para resistir el congelamiento. Estas son: *H. americanus* L., *V. stipularis* y *A. jorullensis*, las cuales presentan, además, las temperaturas de daño más altas. Sin embargo, estas temperaturas de daño podrían ser suficientemente importantes para superar las limitantes impuestas por lo menos dentro del gradiente de estudio.

Para todas las especies estudiadas, la conductividad eléctrica sigue el patrón de la figura 2.1, se presentan las especies *D. venezuelense* y *V. stipularis* por ser estas dos especies las que presentan los valores extremos de resistencia al congelamiento, *D. venezuelense* la de mayor resistencia y *V. stipularis* una de las de menor resistencia a esta variable. En el mismo se observa que el aumento del porcentaje de electrolitos liberados en el agua ocurre a temperaturas cercanas al punto de congelamiento en todas las especies, no existiendo diferencias significativas entre las temperaturas de daño estimadas y las temperaturas de congelamiento, lo cual confirma que el mecanismo de resistencia al congelamiento presente en este grupo de especies leñosas es la

evasión al mismo (Mann Whitney, $\alpha=0,05$, analizados mediante la utilización del software estadístico de libre distribución PAST®).

La temperatura de sobreenfriamiento de los ensayos de congelamiento de las cuatro especies estudiadas a dos altitudes, no muestra diferencias significativas (no se presentan los datos) (Mann Whitney, $\alpha=0,05$, analizados mediante la utilización del software estadístico de libre distribución PAST®), posiblemente causado por la poca diferencia de altitud considerada. Sin embargo, al estudiar la relación general entre la altitud y la capacidad de sobreenfriamiento se observa que las especies colectadas a mayor altitud, en términos generales, tienen un punto de congelamiento más bajo, resaltando los valores mínimos obtenidos para *D. venezuelense*, cercanos a $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ como mínimo absoluto (Figura 2.2).

Cuadro 2.2: Temperaturas de sobreenfriamiento (Sob Enf)($^{\circ}\text{C}$) y de daño ($^{\circ}\text{C}$) para las especies estudiadas con sus respectivos errores estándar (ES).

Especie	Sob Enf	ES	Daño	ES	Grupo
<i>Diplostegium venezuelense</i>	-11,39	2,56	-12,20	0,92	A
<i>Gaultheria strigosa</i>	-10,98	1,04	-11,90	0,77	B
<i>Libanothamnus lucidus</i>	-10,80	2,00	-11,38	0,95	A
<i>Vaccinium floribundum</i>	-9,74	2,00	-12,02	1,03	A
<i>Paragynoxys magnifolia</i>	-9,72	0,45	-8,90	0,55	C
<i>Bejaria aestuans</i>	-8,80	2,27	-7,92	1,33	B
<i>Podocarpus oleifolius</i>	-7,96	1,50	-9,28	1,02	A
<i>Chaetolepis lindeniana</i>	-7,88	1,45	-8,54	1,32	B
<i>Gaiadendron tagua</i>	-7,53	2,54	-7,38	0,85	B
<i>Myrsine coriacea</i>	-7,49	1,43	-7,48	0,49	D
<i>Cybiathus marginatus</i>	-7,40	0,17	-8,32	0,62	B
<i>Ficus insipida</i>	-7,39	1,11	-7,62	0,59	D
<i>Montanoa quadrangularis</i>	-7,32	1,85	-6,38	0,42	C
<i>Weinmania fagaroides</i>	-7,30	1,03	-7,48	0,37	B
<i>Cordia caracasana</i>	-7,22	1,23	ND	ND	C
<i>Miconia tinifolia</i>	-6,93	0,61	-7,21	0,60	B
<i>Drimys granadensis</i>	-6,45	1,15	-6,96	0,37	B
<i>Vallea stipularis</i>	-5,87	0,58	-6,52	1,03	B
<i>Heliocarpus americanus</i>	-5,74	0,09	ND	ND	D
<i>Alnus jorullensis</i>	-5,61	0,13	-6,56	0,61	B

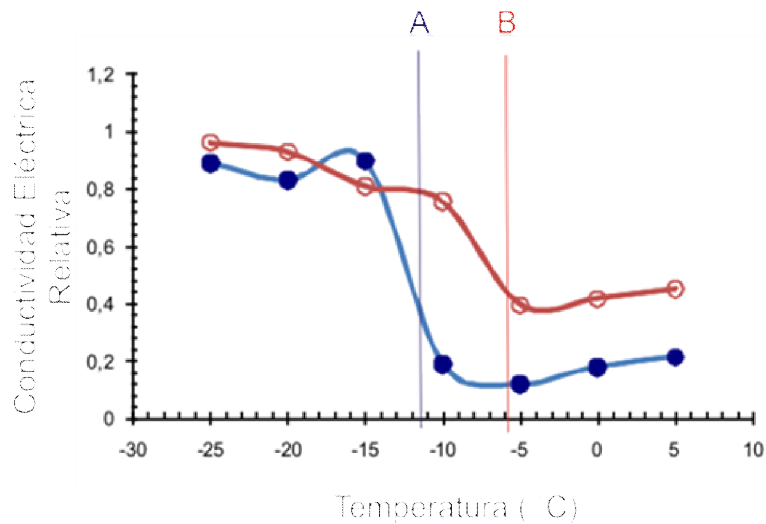


Figura 2.1: Relación entre la conductividad eléctrica y la temperatura para *Diplostegium venezuelense* (●) y *Vallea stipularis* (○), en el gradiente Mérida La Aguada, las líneas muestran las temperaturas de sobreenfriamiento para cada especie (A) *D. venezuelense* y (B) *V. stipularis*.

Las especies presentan diferencias finalmente en función del microambiente en los cuales se desarrollan. Existe un grupo de especies que fueron colectadas en pequeños refugios o bosquetes que muestran menor resistencia al congelamiento comparadas con especies de borde o páramo abierto colectadas a la misma altitud (figura 2.2). Entre estas especies tenemos a *V. stipularis*, estas variaciones ameritan más atención en trabajos futuros.

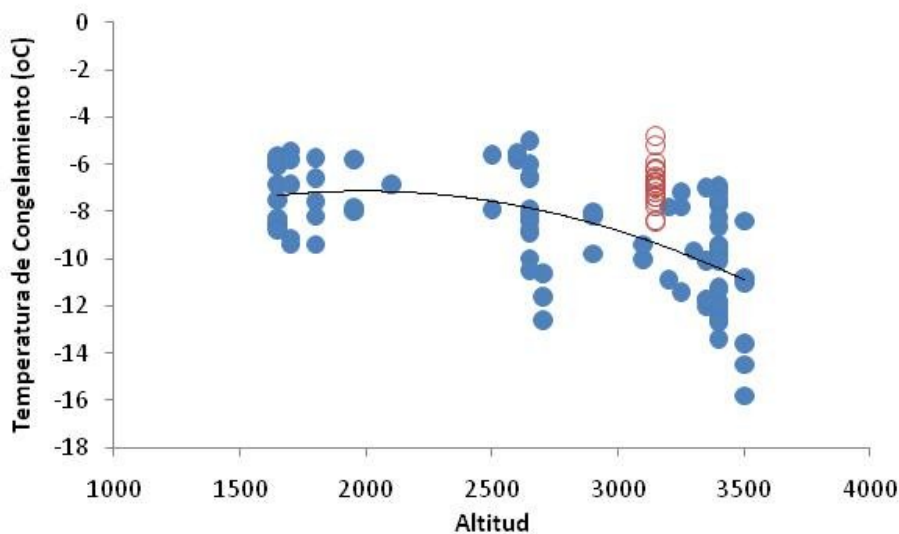


Figura 2.2: Relación temperatura de congelamiento y altitud para todas las especies. (●) Plantas expuestas (○) Plantas protegidas. (-) Ajuste polinómico de los datos excluyendo las muestras en zonas protegidas ($r^2= 0,354$; $y=-0,000002x^2 + 0,0069x - 14,1187$, $p<0,001$)

DISCUSIÓN

La mayor resistencia al congelamiento la presenta *D. venezuelense*, especie que en muchos casos coloniza espacios abiertos en el páramo (Ramírez et al., 2009, Puentes, 2010), así como especies de leñosas de pequeño porte (*G. strigosa*, *C. lindeniana*) que forman parte dentro de este ecotono y típicas de ambientes arbustal paramero. Los valores de sobre enfriamiento en *D. venezuelense* son similares a los obtenidos por Puentes (2010) para individuos juveniles de la misma especie. Estas tres especies presentan valores de resistencia al congelamiento similares a otros arbustos de páramo estudiados en otras localidades, como *Hypericum laricifolium* Juss. e *Hinterhubera lanuginosa* Cuatrec. & Aristeg. en el Páramo de Piedras Blancas (Squeo et al., 1991) y *Ephedra breana* Phil. y *Tetraglochin alatium* (Gillies ex Hook. & Arn.) Kuntze en la Cordillera Doña Ana en Chile (Squeo et al., 1996).

La especie *L. lucidus*, presenta una baja temperatura de sobreenfriamiento (cuadro 2.2) cercana a la de los arbustos de paramo (-10,8°C). Esta temperatura es superior a la de *L. neriifolius* (-6,5°C) presentada por Cavieres et al. (2000), quienes plantean que dicha temperatura sería suficiente para colonizar mayores altitudes y aún así esta especie rara vez se encuentra en zonas abiertas.

Las especies estudiadas en términos generales, presentan mecanismos de resistencia a las bajas temperatura que les permitirían colonizar ambientes de mayor altitud, siendo la más sobresaliente la especie *D. venezuelense*, la cual puede superar valores de resistencia al congelamiento de árboles como *P. sericea*, o incluso algunas rosetas gigantes.

Es importante hacer notar que los valores de resistencia al congelamiento presentados en este estudio son valores mínimos, esto debido a dos posibles factores que aumenten la capacidad de sobreenfriamiento de estas especies. En primer lugar, como ya se dijo, el Ψ_l afecta de manera inversa la capacidad de sobreenfriamiento, es decir, al disminuir el Ψ_l aumenta la capacidad de sobre-enfriar de las plantas (Rada et al., 1985b; Goldstein et al., 1985; Rada et al., 1987). Generalmente, los procesos de congelamiento en las localidades de páramo, son más frecuentes en el periodo seco, momento en el que las plantas se encuentran bajo un estrés hídrico importante, y donde se presentan los menores valores de Ψ_l . Otro factor que podría aumentar esta capacidad de sobreenfriamiento es la presión atmosférica. Halloy y González (1993) señalan que la resistencia al congelamiento varía con la presión atmosférica, generando un descenso de la temperatura de congelamiento con la disminución de la presión atmosférica. Al realizar nuestros ensayos en el laboratorio (1800 m aproximadamente), se está aumentando la presión atmosférica a la que están sujetos las muestras, es decir, que según estos autores las plantas en campo (3500 m, en zonas de páramo), podrían aumentar su resistencia al congelamiento.

Las especies leñosas estudiadas mantienen un patrón similar al de otras leñosas de ambientes de alta montaña tropical, en las cuales predominan las estrategias de evasión a las temperaturas congelantes, caso de la mayoría de las rosetas caulescentes (Rada et al., 1987; Goldstein et al., 1985; Meinzer et al., 1994; Rada et al., 1985b), *Polylepis sericea* Wedd. (Rada et al., 2001; Rada et al., 1985a), y *L. neriifolius* (Cavieres et al., 2000). Este mecanismo parece ser suficiente para permitirle a las plantas estudiadas crecer en estos ambientes de páramo y resistir las temperaturas congelantes nocturnas. Esto sugiere, que el congelamiento nocturno no parece ser uno de los factores de mantenimiento del límite arbóreo altimontano en los bosques estudiados.

Las tres especies que presentaron los valores menos negativos de congelamiento, son especies deciduas, las cuales podrían estar evadiendo el congelamiento en momentos extremos por medio de la caída de las hojas, tal como sucede en muchas plantas latifoliadas en las zonas templadas. Es necesario realizar estudios adicionales en estas especies deciduas con la finalidad de determinar cómo especies con tan baja capacidad de resistencia al congelamiento pueden llegar a altitudes de más de 3000 m., como es el caso de *V. stipularis* y *A. jorullensis*, especies importantes en el ecotono selva nublada páramo. La ocurrencia de este mecanismo de evasión sugiere que tal como se menciona en la literatura las especies evasoras al congelamiento son especies evasoras al déficit hídrico ya que como se mencionó los períodos de sequía son también los momentos de mayor ocurrencia de heladas.

Algunas especies generaron problemas para la medición de conductividad eléctrica. En el caso de *H. americanus*, por la presencia de un denso mucílago que podría estar liberando gran cantidad de sustancias electrólíticas que disminuyen la precisión de las mediciones. También pudiera ser por la presencia de tricomas estrellados (*M. quadrangularis*, *C. caracasana*), los cuales generaron una rápida contaminación de la solución. Se hace necesario realizar pruebas adicionales en especies de este tipo para corroborar el daño en el tejido vegetal a bajas temperaturas. Sin embargo, todas las especies

muestran una capacidad de sobreenfriar, aún cuando se mantengan en zonas de baja altitud. Las observaciones directas en el tejido vegetal, luego del proceso de congelamiento, mostraron diferencias en cuanto al color y la textura evidenciando un marchitamiento en temperaturas inferiores al punto de congelamiento de cada una de ellas.

Como confirman estos resultados, se pueden presentar variaciones en la temperatura de congelamiento y por ende de daño en las especies evasoras, debido a variaciones en los microambientes en los que se desarrollan las plantas. Esta podría ser posiblemente la explicación de la variación encontrada en la especie *P. oleifolius*, especie en la cual registramos temperaturas de sobreenfriamiento más bajas que las reportadas en la literatura en otras localidades (Cavieres et al., 2000), pudiendo estar en La Aguada bajo condiciones de mayor estrés térmico. Esto tal como sugiere la literatura, puede deberse a pequeños eventos de bajas temperaturas que pueden estimular la resistencia al congelamiento (Beck et al., 2004). De igual forma, las especies que crecieron en ambientes protegidos podrían presentar una menor resistencia al congelamiento, tal como lo refleja la figura 2.2.

La forma tradicional de estimar el daño presenta ciertas imprecisiones, ya que por considerarse que el daño ocurre de forma gradual, se estima el 50 % de daño mediante la interpolación entre dos temperaturas (anexo 1). En los dos ejemplos presentados en la figura 2.1, se podría sobreestimar la temperatura de daño, ya que en ambos casos el congelamiento ocurre cercano a la temperatura donde se realiza la extracción de las muestras en los ensayos de daño, y esta temperatura es utilizada para calcular por interpolación el daño.

Otros estudios en especies leñosas de alta montaña tropical muestran resultados que sugieren que la formación de hielo dentro de los tejidos vegetales es violenta una vez llegado al punto máximo de sobreenfriamiento (Rada et al., 1987; Squeo et al., 1991), y a su vez letal para el material vegetal. Esto, aunado a las imprecisiones técnicas antes mencionadas, hace

que sea mejor considerar la temperatura de inicio del congelamiento como la temperatura de daño en especies evasoras, lo que mejoraría la precisión en la estimación del daño.

BIBLIOGRAFÍA.

- Arris, L. L. y Eagleson, P. S. (1989). Evidence of a physiological basis for the boreal-deciduous forest ecotone in North America. *Plant Ecology* 82(1): 55-58.
- Arzac, A. J. (2008). Distribución espacial de formas de vida de plantas en un gradiente altotérmico en los Andes tropicales. Tesis de Licenciatura. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela, 122 pp.
- Azócar, C. J. (2006). Relación entre anatomía foliar, forma de vida y mecanismos de resistencia a temperaturas congelantes en diferentes especies en el Páramo de Piedras Blancas. Tesis de Licenciatura. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela. 64 pp.
- Bader, M. Y., Rietkerk, M. y Bregt, A. K. (2007). Vegetation Structure and Temperature Regimes of Tropical Alpine Treelines. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 39(3): 353-364.
- Beck, E., Heim, R. y Hansen, J. (2004). Plant resistance to cold stress: Mechanism y environmental signals triggering frost hardening y dehardening. *Journal of Bioscience* 29(4): 449-459.
- Bower, A. D. y Aitken, S. N. (2006). Geographic and seasonal variation in cold hardiness of whitebark pine. *Canadian Journal of Forestry Research* 36: 1842-1850.
- Cavieres, L. A. y Piper, F. (2004). Determinantes ecofisiológicos del límite altitudinal de los árboles. En *Fisiología Ecológica en Plantas*, 221-234 (Ed H. M. Cabrera). Valparaíso: Ediciones de la Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

- Cavieres, L. A., Rada, F., Azócar, A., García-Núñez, C. y Cabrera, H. M. (2000). Gas exchange and low temperature resistance in two tropical high mountain tree species from the Venezuelan Andes. *Acta Oecologica* 21(3): 203-211.
- Cierjacks, A., Wesche, K. y Hensen, I. (2007). Potential lateral expansion of *Polylepis* forest fragments in central Ecuador. *Forest Ecology and Management* 242(2-3): 477-486.
- Dexter, S. T., Tottingham, W. E. y Graber, L. F. (1930). Preliminary results in measuring the hardiness of plants. *Plant Physiology*. 5(2): 215-223.
- Dexter, S. T., Tottingham, W. E. y Graber, L. F. (1932). Investigations of the hardiness of plants by measurement of electrical conductivity. *Plant Physiology*. 7(1): 63-78.
- Goldstein, G., Rada, F. y Azócar, A. (1985). Cold hardiness and supercooling along an altitudinal gradient in andean giant rosette species. *Oecologia* 68(1): 147-152.
- Grace, J. C. (1987). Climatic tolerance and the distribution of plants. *New Phytologist* 106(s1): 113-130.
- Halloy, S. y González, J. A. (1993). An inverse relation between frost survival and atmospheric pressure. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 25(2): 117-123.
- Hoch, G. y Korner, C. (2005). Growth, demography and carbon relations of *Polylepis* trees at the world's highest treeline. *Functional Ecology* 19(6): 941-951.
- Kessler, M., Bohner, J. y Kluge, J. (2007). Modelling tree height to assess climatic conditions at tree lines in the Bolivian Andes. *Ecological Modelling* 207(2-4): 223-233.
- Linden, L. (2002). Measuring cold hardiness in woody plants. En Department of Applied Biology, 57 Helsinki: University of Helsinki.
- Meinzer, F. C., Goldstein, G. y Rada, F. (1994). Paramo microclimate and leaf thermal balance of Andean Giant rosette plants. En Rundel P. W. A. P.

- Smith y F. C. Meinzer: Tropical Alpine Environments. Plant form y function. Cambridge: Cambridge University Press. 45-59.
- Monasterio, M. y S. Reyes (1980). Diversidad ambiental variación de la vegetación en los páramos de los Andes Venezolanos. En: Monasterio, M. Estudios Ecológicos en los Páramos Andinos. Mérida-Venezuela, Universidad de los Andes: 47-91.
- Piper, F., Cavieres, L., Reyes-Díaz, M. y Corcuera, L. (2006). Carbon sink limitation and frost tolerance control performance of the tree *Kageneckia angustifolia* D. Don (Rosaceae) at the treeline in central Chile. *Plant Ecology* 185(1): 29-39.
- Puentes, J. (2010). Patrones y mecanismos de establecimiento de dos especies leñosas en la transición entre el bosque paramero y el páramo en los andes tropicales. Postgrado en Ecología Tropical-ICAE, Mérida, Venezuela. Universidad de Los Andes 138 p.
- Rada, F., García-Nunez, C., Boero, C., Gallardo, M., Hilal, M., González, J., Prado, F., Liberman-Cruz, M. y Azócar, A. (2001). Low-temperature resistance in *Polylepis tarapacana*, a tree growing at the highest altitudes in the world. *Plant, Cell and Environment* 24(3): 377-381.
- Rada, F., Goldstein, G., Azocar, A. y Meinzer, F. (1985a). Daily y Seasonal Osmotic Changes in a Tropical Treeline Species. *Journal of Experimental Botany*. 36(6): 989-1000.
- Rada, F., Goldstein, G., Azócar, A. y Meinzer, F. (1985b). Freezing avoidance in Andean giant rosette plants. *Plant, Cell and Environment* 8(7): 501-507.
- Rada, F., Goldstein, G., Azocar, A. y Torres, F. (1987). Supercooling along an Altitudinal Gradient in *Espeletia schultzii*, a Caulescent Giant Rosette Species. *Journal of Experimental Botany*. 38(3): 491-497.
- Ramírez, L. A., Llambí, L. D., Schwarzkopf, T., Gámez, E. y Márquez N. (2009) Vegetation structure along the forest-Páramo transition belt in the Sierra Nevada de Mérida: Implication for understanding treeline dynamics. *Ecotropicos*. 22 (2): 83-98.

- Sakai, A. y W. Larcher. 1987. Frost survival of plants. Springer-Verlag, Berlin, Federal Republic of Germany.
- Squeo, F. A., Rada, F., Azócar, A. y Goldstein, G. (1991). Freezing tolerance and avoidance in high tropical Andean plants: Is it equally represented in species with different plant height? *Oecologia* 86(3): 378-382.
- Squeo, F. A., Rada, F., García, C., Ponce, M., Rojas, A. y Azócar, A. (1996). Cold resistance mechanisms in high desert Andean plants. *Oecologia* 105(4): 552-555.
- Veillon, J. P. (1997). Los Bosques Naturales de Venezuela. Universidad de los Andes. Consejo de Publicaciones. Instituto Forestal Latinoamericano. Mérida- Venezuela.
- Wieser, G. y Tausz, M. (Eds) (2007). Tree at their upper limit. Tree limitation at the Alpine Timberline. Groningen: Springer.
- Yáñez, P. (1998). Caracterización florística en un sector de cambio páramo - selva nublada en el Parque Nacional Sierra Nevada, Venezuela. *Revista Forestal Venezolana*. 42(1) 51-62.

CAPÍTULO 3. RELACIONES HÍDRICAS EN PLANTAS LEÑOSAS DEL ECOTONO SELVA NUBLADA PÁRAMO.

INTRODUCCIÓN

Las condiciones de aridez en la tierra limitan el establecimiento de los árboles en un tercio de la superficie de la misma. En la superficie restante las plantas leñosas se ven sometidas, de forma estacional, a condiciones de estrés hídrico que limitan su desarrollo y buen funcionamiento (Kozlowski y Pallardy, 2002).

El déficit hídrico puede presentarse de varias formas. En algunos casos las plantas tienen pérdidas o demandas superiores al agua disponible de forma inmediata, produciéndose una limitación hídrica diaria. En otros casos más extremos se producen períodos secos en los cuales las precipitaciones son insuficientes para satisfacer la demanda, produciendo una sequía estacional.

Las plantas responden a estos períodos de estrés de forma muy diferente. Por un lado pueden tolerar la deshidratación del protoplasma, sin perecer (plantas tolerantes), o por otro evadir la sequía y mantener el estatus hídrico favorable y las funciones vitales, temporalmente. En términos generales la respuesta a estos procesos estresantes depende de su intensidad y su duración. En procesos de poca duración las plantas pueden disminuir las pérdidas de agua, regulando la tasa de transpiración. En procesos de mayor duración presentarán adaptaciones que les permita mantener el estatus hídrico como por ejemplo: producir ajustes osmóticos, disminución del tamaño de las hojas, pérdida de las hojas, entre otras (Levitt, 1980, Goldstein et al. 1989).

Uno de los aspectos importantes en la estrategia de las plantas en ambientes en los cuales se produce una variación de la disponibilidad de agua es el mantenimiento del turgor. Las plantas vasculares necesitan del mantenimiento de un balance hídrico positivo para poder realizar sus funciones vitales, tal como lo plantean Goldstein et al. (1989). Para que esto pueda darse, las plantas deberán mantener un suministro de agua

adecuado durante gran parte del día y/o mantener valores de turgor positivos de las células foliares.

La resistencia de las plantas al déficit hídrico viene dada por la capacidad de las mismas a ajustar sus características hídricas en periodos más desfavorables. En este sentido una herramienta clave para el estudio de esta capacidad de ajuste son las curvas presión-volumen, mediante las cuales es posible estimar los diferentes componentes del potencial hídrico foliar. Algunos autores (He et al., 2007) sugieren que puede estimarse la capacidad de las plantas a resistir la sequía con la utilización exclusiva de las curvas presión-volumen. Este análisis se basa en el cálculo de un índice de resistencia al estrés basado en los parámetros obtenidos en las curvas. La comparación directa de parámetros como el potencial hídrico en el punto de pérdida de turgor y los potenciales hídricos mínimos de campo nos permiten realizar mediciones de cuan cerca del punto crítico de funcionamiento se encuentran las plantas en campo.

En las altas montañas tropicales se presentan un conjunto de condiciones ambientales estresantes, entre las que cabe destacar las amplias variaciones térmicas diarias, bajas presiones de CO₂ y vapor de agua, y finalmente una marcada estacionalidad hídrica. A nivel general, Laushcer (1976) (citado por Leuschner, 2000), señala que las precipitaciones a nivel tropical y ecuatorial disminuyen de forma lineal a partir de los 1500 m. Para Venezuela, Rundel (1994) menciona que tanto para las vertientes húmedas como para las secas se produce una disminución de las precipitaciones con la altitud.

Varios autores han planteado que las restricciones hídricas en estas zonas podrían estar involucradas en la determinación del límite de crecimiento arbóreo en las mismas (Cavieres y Piper, 2004; Gieger y Leuschner, 2004; Brodersen et al., 2006). Jobbagy y Jackson (2000) encuentran que cerca del 80 % de los límites de crecimiento arbóreo en las zonas extratropicales muestran una fuerte correlación con las medias anuales de precipitación. En las zonas tropicales algunos estudios muestran que la disminución de crecimiento radial de las especies del límite está correlacionado con las variaciones interanuales de la precipitación (Biondi, 2001).

A nivel tropical, las especies de las zonas de la alta montaña, muestran características de plantas xeromórficas, estas características han sido frecuentemente relacionadas con las condiciones de alta radiación y baja temperatura. Sin embargo, Leuschner (2000) muestra que existe una relación entre estas variables y la presencia de déficit hídrico en la alta montaña tropical. Algunas de estas características estarían relacionadas con el almacenamiento de agua por las plantas, las cuales se verían sometidas a demandas evaporativas superiores en las zonas más elevadas, parcialmente causadas por la disminución de la presión de vapor y las altas radiaciones, sobre todo a nivel del suelo.

Las condiciones de déficit hídrico pueden causar varios problemas a las plantas, vinculables con la aparición del límite de crecimiento arbóreo en las montañas tropicales. Estas limitaciones hídricas pueden ser las causantes de la muerte de las plántulas en zonas abiertas por desecamiento, lo que apoyaría la hipótesis sobre la formación del límite, explicándola a través de las condiciones de establecimiento de las plántulas. Entre estas condiciones se establece el déficit hídrico estacional como factor importante en la mortalidad de las plantas durante el establecimiento.

En este sentido algunos autores han demostrado que existen procesos de facilitación, por parte de las plantas herbáceas y/o arbustivas de las zonas altimontanas templadas, sobre las plántulas de especies leñosas (Anthelme et al., 2003; Choler y Michalet, 2002; Michalet et al., 2003; Germino et al., 2002). En muchos casos estas plantas herbáceas o arbustivas actúan como elementos que disminuyen el estrés ambiental, el cual a su vez limita el proceso de establecimiento de las especies leñosas. En este capítulo no se considerara esta visión del estrés hídrico. Por un lado porque no está previsto trabajar con el proceso de establecimiento de las especies leñosas, y por otro porque no se estudiaran los procesos de facilitación, planteados por muchos autores como posibles mecanismos de colonización de las especies en ambientes abiertos en la alta montaña, por tratarse de otro aspecto de la ecología.

Las limitaciones hídricas pueden causar la disminución significativa en la adquisición de CO₂ de las plantas por cierres estomáticos. Estas limitaciones afectan de forma directa el balance de carbono de las mismas. En este

sentido, varios autores (Morales et al., 2004; Holtmeier, 2009; Holtmeier y Broll, 2007) sugieren, que las sequías estacionales pueden ser en gran parte causantes de limitaciones de crecimiento en los ambientes del límite arbóreo. Estos procesos, que limitan el balance de carbono, afectarán de forma más importante a las especies leñosas a causa de la proporción de tejido fotosintético versus tejido no fotosintético, el cual ya disminuyen el balance de carbono en esta forma de crecimiento, comparado con otras formas de vida de menor porte. Adicionalmente, las plantas leñosas ven disminuidas la capacidad de transporte de agua a las diversas partes de la misma, principalmente, por un sistema de conducción mucho mayor. Pocos son los estudios que buscan dar respuesta a estas limitaciones en plantas leñosas del ecotono selva nublada páramo y analicen la influencia del déficit hídrico sobre las tasas de asimilación.

Sin embargo, este proceso de limitación ha sido reportado en especies de las zonas montañosas tropicales, como en especies de rosetas (Goldstein et al., 1984; Rada et al., 1998), y árboles del género *Polylepis* (Rada et al., 1985; Rada et al., 1996; García-Núñez et al., 2004).

En este capítulo se busca evaluar el efecto del déficit hídrico diario y estacional sobre tres especies leñosas del ecotono selva nublada-páramo, mediante la determinación de los valores de potencial hídrico de las plantas en condiciones naturales. También se quiere determinar la presencia de ajustes estacionales en los componentes del potencial hídrico foliar (Ψ_l), que reflejen períodos de mayor estrés y evaluar la respuesta estomática ante variaciones del potencial hídrico foliar.

Hipótesis general

Si las limitaciones hídricas son causantes de la disminución de las especies leñosas con la altitud, las especies adaptadas a zonas más altas en el ecotono presentarán mecanismos que les permitan mejorar su estatus hídrico en condiciones de mayor déficit.

Objetivo.

Determinar los valores mínimos de potencial hídrico de tres especies del ecotono selva nublada- páramo en individuos adultos en condiciones de campo,

Determinar los diversos componentes del potencial hídrico de estas tres especies del ecotono selva nublada- páramo en individuos adultos, y

Caracterizar el comportamiento de la respuesta estomática al potencial hídrico foliar en hojas de individuos adultos de estas especies.

MÉTODOS

Para la realización de este estudio se seleccionaron tres especies del ecotono, en la localidad de San José del Sur, municipio Campo Elías del estado Mérida ($8^{\circ} 0'$; $8^{\circ} 30'$ Norte y $71^{\circ} 20'$; $71^{\circ} 40'$ Oeste) (figura 3.1a). En esta localidad se presentan dos vertientes contrastantes en la disponibilidad hídrica anual. Por un lado una vertiente seca (vertiente intermontana, San José) donde las condiciones hídricas tienden a ser mucho más desfavorables, con precipitaciones anuales de 900 mm (Estación climática de Tostos). Por otro lado, una vertiente húmeda en las que las condiciones de déficit hídrico son comparativamente más bajas con precipitaciones de 1300 mm (Estación Aricagua) (vertiente llanera, cuenca del Río Mucutuy), (Monasterio y Reyes, 1980).

Las precipitaciones tienden a tener un patrón típicamente llanero, con lluvias durante nueve meses o más, y una estación seca de tres meses o menos para la vertiente llanera (húmeda), y dos períodos de menor precipitación para la vertiente intermontana (seca). Sin embargo, se presenta en horas de la tarde una fuerte nubosidad en la mayor parte del año, dicha nubosidad cubre ambas vertientes en la parte más elevada de la montaña.

El límite de crecimiento arbóreo del bosque continuo en la zona ocurre entre los 2800 y 3200 m de altitud en la vertiente más húmeda y desde los 2600 hasta los 3000 m, en la vertiente más seca.

La vertiente seca presenta mayor grado de intervención humana, con la presencia de amplias zonas de cultivo de hortalizas y evidencias de antiguas siembras de cereales y pequeñas porciones de tierra actualmente cultivadas de trigo y avena para el consumo local, lo que dificultaría la interpretación de este límite en esta vertiente. Por esta razón se realizaron la mayoría de los muestreos en la vertiente húmeda, donde se presenta un aparente bajo impacto humano, con poca presencia de pastoreo de animales domésticos, evidenciados en pocas observaciones de los mismo, así como muy pocas trazas de excretas y evidencias de ramoneo.

Especies a estudiar.

Las especies fueron estudiadas en un gradiente altitudinal de 400 metros tal como se describe en el cuadro 3.1. Estas especies fueron seleccionadas por su abundancia y su distribución en el gradiente. Se seleccionaron para el estudio *Diplostegium venezuelense* Cuatrec., presente en zonas abiertas, tanto en la zona de estudios como en otros estudios de la vegetación en el límite de crecimiento arbóreo (Ramírez, 2008; Puentes, 2010) y *Libanothamnus neriifolius* (Sch. Bip. ex Wedd.) Ernst y *Miconia jahnii* Pittier reportadas por Sodja (2001), como abundantes en el ecotono y bosques en la zona de estudio (figura 3.2).

Estas especies se presentan en ambientes diferentes dentro del ecotono, selva nublada-páramo, la primera de ellas (*D. venezuelense*) forma parte de las zonas de avance del bosque sobre el páramo, se encuentra limitada a las zonas de borde del mismo, y con frecuencia esta especie puede encontrarse en zonas abiertas dentro del páramo, comúnmente en arbustales densos. Rara vez esta especie estará dentro del bosque en si (Rodríguez, 2010). Esta especie presenta hojas de pequeño tamaño, cubiertas de un indumento denso tanto por el haz como por el envés de las mismas.

La segunda especie (*L. neriifolius*) forma parte de los bordes de avance del bosque, pudiendo estar presente en algunas zonas de bosque. Esta especie tiende a formar parches de grupos de individuos mono específicos. Esta especie es la que presenta el mayor tamaño foliar entre las tres especies seleccionadas. Al igual que las rosetas gigantes, esta especie presenta una

amplia médula que le permitiría mantener ciertas condiciones hídricas favorables.

Por último la especie *M. jahnii*, una especie importante dentro del bosque en el ecotono y con poca o nula frecuencia en el borde de contacto del bosque y el páramo (Rodríguez, 2010). Esta especie presenta características morfoanatómicas diferentes a las dos primeras especies. Las hojas de esta especie presentan un denso indumento de color rojizo, y los tallos jóvenes presentan una pequeña médula parenquimatosa. Las diferencias en los ambientes en los cuales se presentan cada una de estas especies sugieren que las mismas tengan respuestas diferentes a las diferentes limitaciones ambientales.

Los análisis se realizaron en muestras tomadas de 5 individuos adultos por especie, en cada una de las diferentes altitudes. Para *D. venezuelense* el material fue colectado bajo dos condiciones contrastantes en individuos solitarios de la parte superior del gradiente (3200 m), y en individuos agrupados en el borde del bosque para el punto medio de muestreo (3000 m). Para las otras dos especies se tomaron muestras a diferentes altitudes, en el caso de *L. neriifolius* se colectó el material en individuos en el borde del bosque continuo en las tres diferentes altitudes (2800, 3000 y 3150m). En el caso de los individuos colectados a 3150 m, se trabajó con los dos únicos individuos presentes a esta altitud. Por otra parte la especie *M. jahnii* fue colectada en individuos adultos cercanos al borde de contacto en las dos altitudes (3000 y 3150 m).

En esta localidad, tal como ocurre típicamente en las zonas de ecotono selva nublada páramo, la vegetación muestra una disminución gradual de su altura, con la presencia de zonas de avance del bosque sobre la vegetación de páramo abierto, en la cual se interdigitan las zonas de páramo con islas o parches de bosque (Rodríguez, 2010).

Cuadro 3.1: Lista de especies y altitud de muestreo, para cada una de las mismas.

Especie	Altitud (m)
<i>Diplostegium venezuelense</i>	3200, 3000
<i>Miconia jahnni</i>	3150, 3000
<i>Libanothamnus neriifolius</i>	3150, 3000, 2800

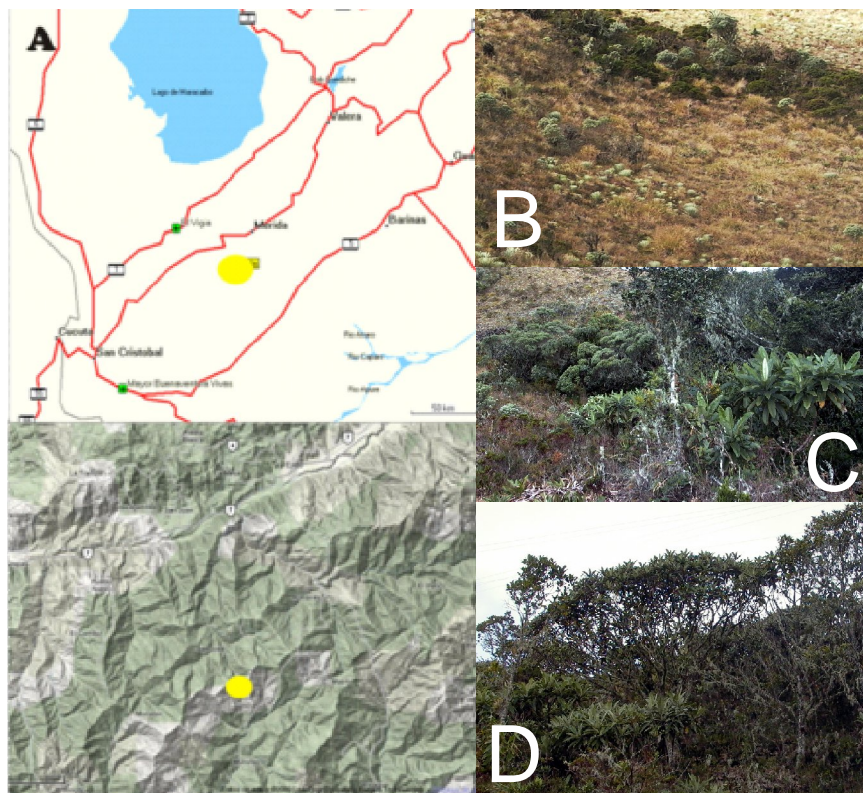


Figura 3.1. Ubicación de la zona de estudio y vista general de la misma en los tres sitios de muestreo. (a) Ubicación relativa del área de estudio, (b) Sitio de muestreo a 3200 m predominancia de vegetación paramera con árboles de *Diplostegium venezuelense*, (c) Sitio de muestreo a 3000, borde de contacto entre la vegetación de páramo y la vegetación de Selva Nublada, donde se encuentran presentes las tres especies (d) Sitio de muestreo a 2800 m, predominancia de *Libanothamnus neriifolius*.

Medición de potenciales hídricos foliares.

Se realizaron mediciones en el campo de potencial hídrico foliar antes del amanecer (Ψ_{Ipd}) y mínimo cercano a horas de mediodía (Ψ_{Imin}). Se tomaron, para cada una de estas variables, tres réplicas por especie por día. Para esto se tomó material vegetal en individuos adultos, el cual estuviese plenamente expandido sin daño aparente en su superficie. El material fue cortado e inmediatamente colocado en la bomba de presión de Scholander (PMS Instruments Company, Oregon, USA). Las mediciones fueron realizadas en la vertiente húmeda a 3000 altitud para las tres especies, las mismas se realizaron en cuatro meses distintos (agosto, octubre 2008 y enero, febrero 2009). Adicionalmente se realizaron mediciones de Ψ_{Imin} en todas las altitudes en el mes de diciembre de 2009, momento de fuerte estrés hídrico estacional.

Se realizaron adicionalmente, mediciones de Ψ_{Imin} en individuos de *L. neriifolius* en la vertiente seca, a 3000 m de altitud de la misma localidad, realizando mediciones en cuatro días de la época seca. Antes del cierre definitivo del sistema teleférico de Mérida fue posible realizar para *D. venezuelense* mediciones tanto de Ψ_{Ipd} y Ψ_{Imin} en la estación La Aguada, a 3400 m de altitud, en dos días distintos del mes de enero en un período seco.



Figura 3.2: Vista de las especies estudiadas en la localidad de San José, (a) *Diplostegium venezuelense*, (b) *Libanothamnus neriifolius*, (c) *Miconia jahnii*.

Componentes del potencial hídrico.

Para el análisis de los componentes del Ψ_1 se realizaron 3 curvas Presión-Volumen, por especie, por altitud y por época (seca o húmeda). Las mismas fueron realizadas con material colectado en la localidad de San José en todas las especies dentro del gradiente altitudinal entre los 2800 y los 3200 m, adicionalmente se realizaron curvas para *D. venezuelense* en plantas colectadas en la estación La Aguada a 3400 m de altitud, en la época seca antes del cierre del sistema teleférico de Mérida, con material colectado en espacios abiertos, condiciones similares a las encontradas en las zonas de mayor altitud en la localidad de San José. Las curvas se realizaron con la metodología presentada en el anexo 2. Tal como establece el método se colectó para cada curva material vegetal en campo, todas las especies a las diferentes altitudes fueron colectadas el mismo día para cada una de las réplicas realizadas. El material fue llevado luego al laboratorio en condiciones de total oscuridad y baja temperatura (aproximadamente 8 °C), en el laboratorio el material fue acondicionado y rehidratado por 12 horas para realizar las medidas de Ψ_1 y contenido relativo de agua, según la metodología propuesta. Para la realización de cada curva se realizaron 30 mediciones a diferentes Ψ_1 y contenido relativo de agua, estos puntos de la curva fueron obtenidos por la deshidratación libre del material foliar, se realizaron las diferentes mediciones de forma de distribuir estos puntos homogéneamente en la curva, tanto en la parte lineal, como en la parte exponencial de las mismas.

Se realizaron 3 réplicas (curvas de 30 mediciones cada una) para cada especie y a cada altitud para los dos períodos contrastantes. Se realizaron curvas en los meses de octubre, marzo y abril (período húmedo) y otras en los meses de enero y febrero (período seco). Se utilizó también la información aportada por las dos curvas realizadas inicialmente en *D. venezuelense* a 3400 metros de altitud, para la Estación La Aguada del Sistema Teleférico de Mérida, debido a las condiciones de mayor estrés hídrico en el momento de realizar estas mediciones.

Las curvas se analizaron con la ayuda de un programa elaborado en SCILAB 5.1 (INRIA, Paris Francia), el cual se detalla en el anexo 2. Con el mismo se obtuvieron los datos de los componentes del Ψ_1 : Ψ en el Punto de Pérdida de

Turgor (Ψ_{TLP}), Contenido Relativo de Agua en el Punto de Pérdida de Turgor (Ro_{tip}), Potencial Osmótico en saturación (Ψ_{sat}), Módulo de Elasticidad Máximo (E_{max}), y Cantidad de Agua Simplásmica (A_{simp}), para cada especie y cada altitud.

Curvas conductancia estomática-potencial hídrico foliar.

Con la finalidad de evaluar el efecto del déficit hídrico foliar sobre la conductancia estomática (g_s) se realizaron curvas de respuesta de la g_s en función del Ψ_l . Para realizar estas curvas se rehidrataron ramas de individuos adultos de cada una de las especies, colectados a 3000 m de altura en todas las especies. Se seleccionaron ramas expuestas, asegurándose de que las mismas no presentaran daño aparente, y una cantidad de hojas suficientes para la realización de al menos 20 mediciones de potencial hídrico foliar.

Las ramas fueron rehidratadas de manera similar a las ramas utilizadas para la realización de las curvas P-V. Se comprobó inicialmente la total rehidratación del material vegetal, luego se realizaron mediciones continuas de intercambio de gases en una de las hojas de la rama y se realizaron mediciones del Ψ_l en el resto de hojas de la misma, descartando una hoja en cada medición. Estas mediciones de potencial se basan en la premisa de que todas las hojas se encuentran en las mismas condiciones y por tanto al mismo Ψ_l . Se realizaron algunas comprobaciones de esta premisa, midiendo en forma consecutiva dos hojas ubicadas en diferentes lugares de la rama.

Dicho material se colocó en condiciones controladas de temperatura (20°C), humedad relativa (75%) e iluminación ($950 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), con la finalidad de no producir cambios en la conductancia por factores diferentes al Ψ_l .

Las mediciones del Ψ_l se realizaron cada 10 minutos, registrando a su vez el valor de la g_s en el mismo momento. Estas últimas se realizaron con la ayuda de un analizador de gases LCpro (ADC Ltd, Reino Unido). Las medidas iniciales de g_s se realizaron manteniendo la rama en una solución de KCl de 0,1 μmol , utilizada para mediciones de conductividad hidráulica (Cochard et al., 1994; Cochard et al., 2004), con el fin de evitar el cierre estomático causado por la pérdida de conductividad.

Para el análisis se graficó la g_s relativa por especie en relación con el Ψ_l , con la finalidad de evaluar el potencial de cierre estomático y la rapidez del mismo. La razón por la cual se mide la conductancia relativa es que existen variaciones intra-específicas que pueden causar variaciones en la conductancia absoluta, y la finalidad de este ensayo no es medir la capacidad de conducir agua sino el efecto del estrés hídrico sobre la apertura y cierre estomático.

RESULTADOS

Los resultados de las mediciones de Ψ_l en el campo, tanto mínimos como antes del amanecer, se presentan en el cuadro 3.2. Los valores corresponden a mediciones realizadas en los meses de enero, febrero, y diciembre de 2009 en la localidad de San José. En los datos de obtenidos en los meses de enero y febrero se presentaron pequeñas precipitaciones nocturnas o la presencia de neblinas a final de la tarde. Los datos de diciembre corresponden a días secos sin presencia de neblinas o precipitaciones de ningún tipo. Los Ψ_l antes del amanecer, en la localidad de San José, muestran valores cercanos a cero (-0,2 y -0,3 MPa), en todas las especies, indistintamente del mes en el que se realizaron las mediciones, tanto para los meses de la época seca (meses de enero, febrero y diciembre de 2009) como los de la época húmeda (meses de agosto y octubre de 2009). En esta localidad, se observó que durante los meses de la época seca) se presentó un marchitamiento de la vegetación herbácea, principalmente compuesta por gramíneas en las zonas de páramo abierto, y la desaparición total de pequeñas zonas de acumulación de agua.

En los días de medición en los meses de la época húmeda, por otro lado, los Ψ_{min} se mantuvieron altos (poco negativos) con valores superiores a los -0,8 MPa en todas las especies sin mostrar diferencias ni entre altitudes ni entre especies a una misma altitud (pruebas de Kruskal-Wallis, por ser datos no normales y con pocas replicas) (no se presentan los resultados en el cuadro), posiblemente por las condiciones de nubosidad frecuente, provocando una baja demanda evaporativa y una alta disponibilidad de agua en el suelo.

Cuadro 3.2: Valores promedios de potencial hídrico mínimo (Ψ_{\min}) en horas del medio día, y potencial hídrico foliar antes del amanecer (Ψ_{pd}) para las tres especies durante los días secos de enero, febrero y diciembre 2009, error estándar en paréntesis.

Especie	Altitud	Ψ_{\min} (Mpa)	Ψ_{pd} (Mpa)
	3400*	-1,50 (0,2)	-1,10 (0,2)
Diplostephium venezuelense	3200 ¹	-1,25 (0,2)	
	3000	-1,15 (0,3)	-0,20 (0,1)
	3000*	-1,30 (0,3)	-0,30 (0,1)
	2800 ¹	-0,90 (0,3)	
Libanothamnus neriifolius	3000	-1,05 (0,3)	-0,20 (0,1)
	3150 ¹	-1,20 (0,3)	
	3000	-1,10 (0,4)	-0,30 (0,1)
Miconia jahnii	3150 ¹	-1,20 (0,3)	

* Valores obtenidos para *D. venezuelense* en la estación La Aguada del Sistema Teleférico de Mérida, y para *L. neriifolius* en la vertiente seca del Páramo de San José. ¹ Valores obtenidos en los días de diciembre de 2009.

Aún cuando la localidad ubicada en los alrededores de la estación La Aguada del Sistema Teleférico de Mérida sea más húmeda, tal como lo reflejan los registros pluviométricos de la zona, con precipitaciones de 1800 mm anuales, comparados con 1300 mm en la zona húmeda del páramo de San José, las mediciones de Ψ_{pd} realizadas en esta localidad evidencian la posibilidad de presentar en algún momento del año un mayor déficit hídrico (3400 m). En las condiciones de páramo abierto, en términos generales, *D. venezuelense* muestra una disminución de los Ψ_{pd} en plantas ubicadas en zonas abiertas, con valores mínimos (-1,1 MPa, cuadro 3.2) cercanos al

punto de pérdida de turgor, mostrando un déficit hídrico estacional importante en el momento de realizarse los muestreos, para la época seca. Esto nunca pudo ser apreciado en la localidad de San José. Estos valores son los únicos que muestran diferencias significativas, en cuanto a los Ψ_{Imin} y los Ψ_{pd} , en esta especie, cuando se compara entre altitudes.

Los Ψ_{Imin} , tal como era de esperarse, disminuyen en todas las especies en horas de medio día, reflejando una demanda evaporativa importante, que limita las posibilidades de las plantas de resistir altas demandas por evaporación. Las mediciones de esta variable fueron realizadas en las tres altitudes en el mes de diciembre de 2009 y estas sugieren una disminución del Ψ_{Imin} con la altitud.

En la figura 3.3 se presenta una curva de presión-volumen representativa de las 48 curvas realizadas. Las curvas, en general, presentan un buen ajuste a la función bimodal utilizada, claramente representando la parte exponencial y la parte lineal.

Los valores obtenidos de las curvas presión-volumen se presentan en el cuadro 3.3. En dichos valores se observa una ligera disminución de los Ψ_{Sat} y Ψ_{tlp} , tanto altitudinalmente como estacionalmente, aún cuando no sean, significativamente diferentes (Test de Mann-Whitney, datos con distribución no normal). La mayoría de las especies muestran valores ligeramente inferiores del Ψ_{tlp} en la época seca, dicha disminución puede deberse a un pequeño ajuste osmótico para este momento de mayor estrés hídrico o a una disminución de la cantidad de agua simplásmica.

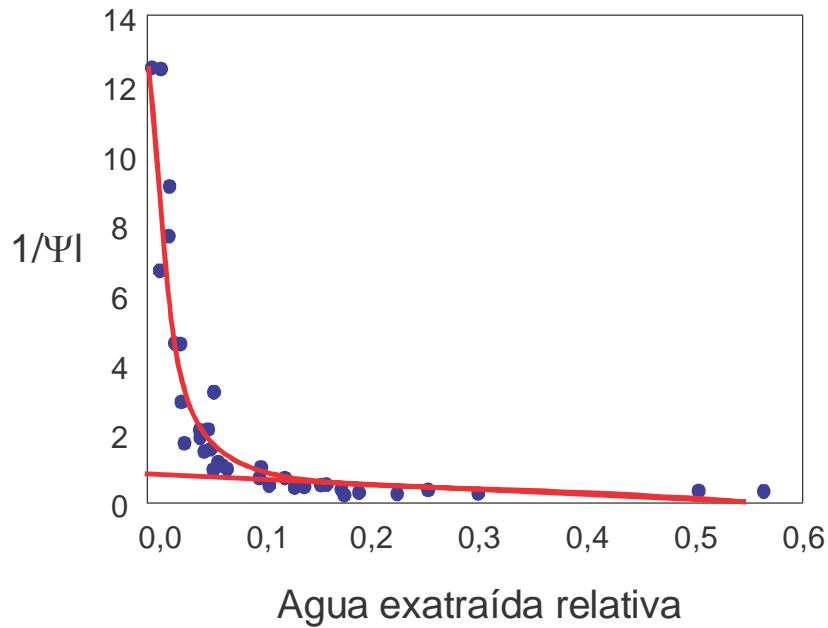


Figura 3.3: Curva presión-volumen obtenida para *Diplostegium venezuelense* a 3200 m en la época seca, en la localidad de San José, Mérida-Venezuela.

El aumento de los valores, tanto de Ψ_{tlp} como de Ψ_{sat} , en las diferentes especies con el aumento de la altitud, sugiere un aumento de las condiciones de estrés hídrico a lo largo del gradiente.

Para todas las especies se presenta una disminución del módulo de elasticidad de las paredes celulares en la época seca, dicha disminución refleja el aumento de la elasticidad de las paredes celulares en la época más desfavorable (Mann-Whitney $p < 0,05$ $\alpha = 0,05$).

Otro de los mecanismos de resistencia al estrés hídrico estacional o diario es el cierre estomático. El análisis de la respuesta estomática al estrés hídrico (Ψ_l) se presenta en las gráficas del comportamiento de la g_s en función del Ψ_l (figura 3.4). Se puede apreciar que todas las especies presentan un cierre estomático a medida que disminuye el Ψ_l y en el caso de *L. neriifolius* y *D. venezuelense* una vez alcanzado un potencial umbral que varía según la especie. La especie que presenta un cierre más temprano y rápido es *D. venezuelense*. *L. neriifolius* presenta un cierre estomático más tardío que esta pero igualmente rápido y *M. jahnii* es la especie que presenta el cierre estomático más lento y a un potencial similar al de *L. neriifolius* para la misma altitud.

Cuadro 3.3: Valores promedios de los Principales Componentes del potencial hídrico foliar de las especies a cada altitud obtenidos a través de las curvas presión-volumen (n=3). Ro: Contenido de agua en el punto de pérdida de turgor; Ψ_{tjp} : Potencial osmótico en el punto de pérdida de turgor (MPa); Ψ_{sat} : Potencial osmótico de saturación (MPa); A_{simp} : Fracción de agua simplásmica; E_{max} : Módulo de elasticidad máximo (MPa).

Especie	Alt	Época	Ro _{tjp}	Ψ_{tjp}	Ψ_{sat}	A_{simp}	E_{max}
Diplostephium venezuelense	3000	Húmeda	0,07 (0,003)	-0,91 (0,04)	-0,70 (0,04)	0,31 (0,01)	11,31* (0,19)
		Seca	0,19 (0,012)	-1,06 (0,01)	-0,75 (0,02)	0,40 (0,01)	8,25* (0,56)
	3200	Húmeda	0,13 (0,009)	-1,00 (0,06)	-0,81 (0,08)	0,57 (0,05)	15,66* (2,35)
		Seca	0,22 (0,012)	-1,47 (0,02)	-1,14 (0,01)	0,64 (0,02)	6,73* (0,30)
	3400 ^a	Húmeda	0,13 (0,013)	-1,17* (0,26)	-0,88* (0,23)	0,57 (0,09)	12,52 (2,01)
		Seca	0,12 (0,038)	-1,81* (0,11)	-1,68* (0,13)	0,59 (0,05)	11,42 (3,81)
Libanothamnus neriifolius	2800	Húmeda	0,06 (0,007)	-1,13 (0,27)	-1,01 (0,10)	0,60 (0,06)	20,22* (1,87)
		Seca	0,08 (0,017)	-1,77 (0,18)	-1,44 (0,24)	0,41 (0,06)	12,80* (2,26)
	3000	Húmeda	0,09 (0,042)	-1,36 (0,11)	-0,93 (0,09)	0,31 (0,04)	19,16* (2,72)
		Seca	0,15 (0,003)	-1,52 (0,08)	-1,23 (0,14)	0,60 (0,09)	5,51* (3,08)
	3150	Húmeda	0,08 (0,018)	-1,60 (0,09)	-1,25 (0,05)	0,38 (0,06)	19,20* (4,29)
		Seca	0,13 (0,023)	-2,04 (0,04)	-1,64 (0,11)	0,60 (0,04)	10,53* (0,80)
Miconia jahnii	3000	Húmeda	0,09 (0,015)	-1,06 (0,07)	-0,70 (0,13)	0,37 (0,12)	14,05* (3,61)
		Seca	0,21 (0,012)	-1,85 (0,06)	-1,08 (0,13)	0,47 (0,15)	11,51* (0,52)
	3150	Húmeda	0,07 (0,011)	-1,12 (0,13)	-0,96 (0,11)	0,48 (0,13)	26,28* (1,85)
		Seca	0,16 (0,021)	-1,53 (0,12)	-1,25 (0,17)	0,48 (0,14)	20,44* (1,87)

* Diferencias Significativas entre épocas a la misma altitud (test de Mann Whitney, $p=0,05$; $\alpha=0,05$)

^a Curvas realizadas con material proveniente de la estación La Aguada Sistema Teleférico de Mérida.

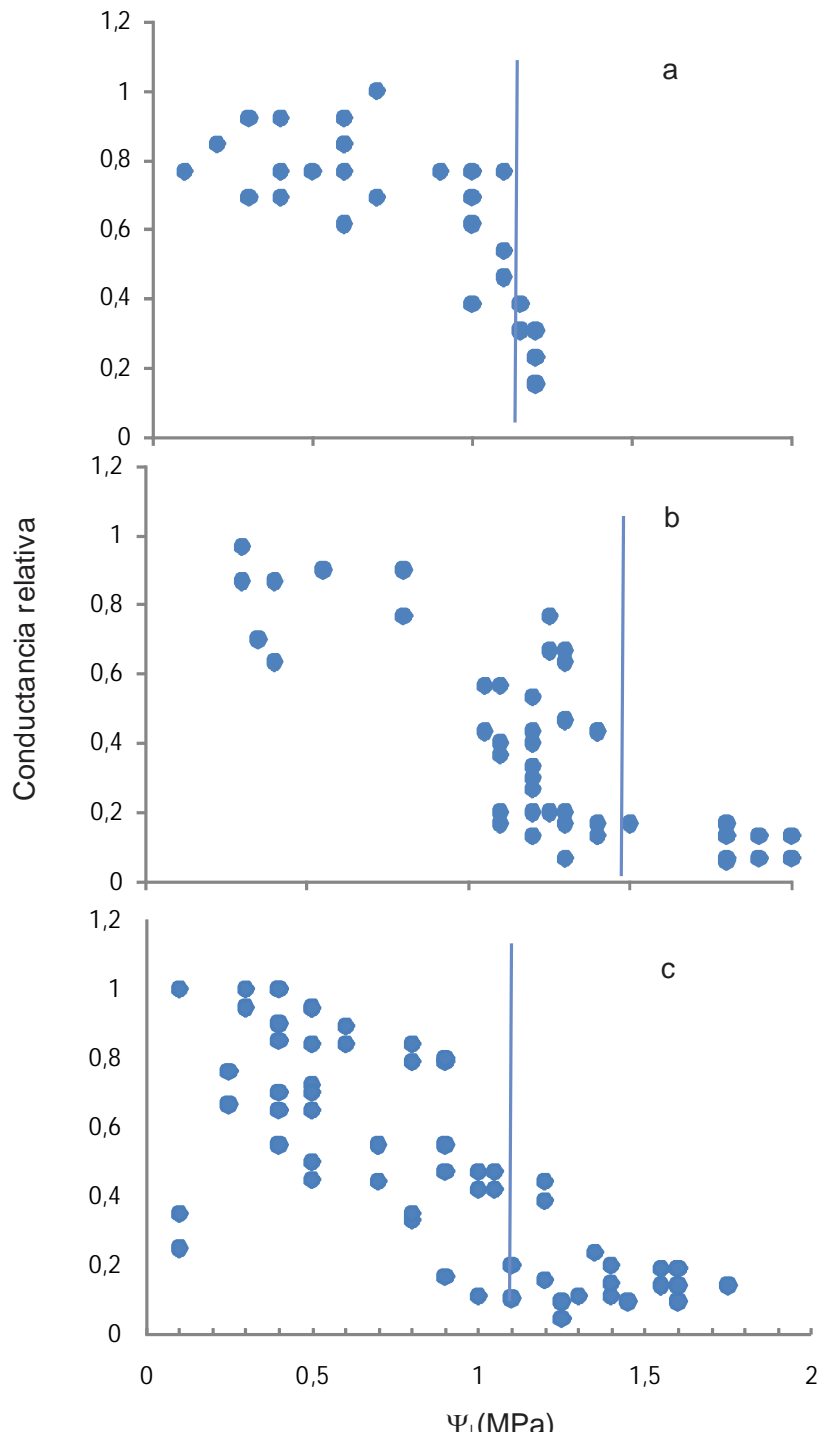


Figura 3.4: Relación entre la conductancia estomática relativa y el potencial hídrico foliar para las tres especies durante la época húmeda, (a) *Diplostegium venezuelense*, (b) *Libanothamnus neriifolius*, (c) *Miconia jahnii*. (●) Datos para las especies a 3000 m. Las líneas marcan el punto de pérdida de turgor para esta época.

En las mediciones de los meses de enero y febrero *M. jahnni* presenta los menores valores de Ψ_l , cercanos a los valores de punto de pérdida de turgor, evidenciando poco control sobre las pérdidas de agua en este especie.

Esta especie también es la que muestra mayor variación las curvas de respuesta de la gs al Ψ_l , es necesario continuar con mediciones de este tipo de forma de mejorar el entendimiento de la respuesta de los estómas a factores de estrés hídrico.

DISCUSIÓN

Los Ψ_{lmin} medidos para *L. neriifolius* fueron inferiores a valores reportados para la especie en la misma localidad por otros autores (Cavieres et al., 2000), quienes señalan valores mínimos de Ψ_{lmin} de 0,9 MPa en días excepcionalmente claros de época seca. Los valores aquí obtenidos evidencian que los períodos de muestreo fueron más secos en este estudio que los reportados hasta ahora. Los autores antes señalados mencionan que en estos días claros se produce una recuperación del Ψ_l en horas de la tarde, similar a lo ocurrido con los potenciales de base (Ψ_{pd}) de este estudio, para todas las especies. Esta recuperación puede deberse en parte a la presencia de fuertes neblinas y ligeras precipitaciones así como al cierre estomático con valores relativamente altos de Ψ_l (Cavieres et al., 2000). En observaciones directas en campo pudo evidenciarse que el suelo bajo el bosque se encontraba sustancialmente más húmedo que en las zonas abiertas en estos momentos más secos, lo cual explica también parcialmente la recuperación del Ψ_l de base.

Los valores de Ψ_{lmin} en *L. neriifolius* y *M. jahnni* son similares a valores encontrados para otras especies de selva nublada de diversas localidades a altitudes inferiores (Rada et al., 2009), entre los que cabe destacar los de otra especie de *Miconia* cuyos potenciales son -1,5 MPa para la época seca y -1,3 MPa para la húmeda. También son comparables a los valores de Ψ_{lmin} registrados en rosetas caulescentes de alta montaña de los géneros *Espeletia* y *Coespeletia* (Azocar y Rada, 2006), con valores mínimos cercanos a -1 MPa. Por otro lado, los valores de *D. venezuelense* son

similares a valores reportados para *P. sericea*, especie leñosa presente en zonas de mayor altitud que registra ajustes osmóticos estacionales y valores cercanos a los -2 MPa como punto de pérdida de turgor (Rada et al., 1985).

Los valores de Ψ_{imin} son siempre ligeramente superiores a los valores de Ψ_{tip} , esto sugiere que siguiendo los patrones de los resultados de las curvas de respuesta de g_s al Ψ_l , así como los datos presentados por Cavieres et al. (2000), para *L. neriifolius*, que las plantas leñosas producen un cierre estomático para evitar llegar a los Ψ_{tip} , evitando de esta forma la desecación excesiva, respuesta típicamente encontrada en especie leñosas a cualquier altitud. Este mismo mecanismo se ha reportado también en especies de las zonas más altas de los andes, en un grupo afín de especies de la misma tribu Espeletinae, caso reportado para la gran mayoría de especie de los géneros *Espeletia* y *Coespeletia* estudiados (Rada et al., 1998). *M. jahnii*,

Adicionalmente, todas las especies estudiadas, tal como ocurre con las rosetas gigantes (Goldstein et al., 1984), presentan una médula parenquimatosa que permite la acumulación de agua. Tal como en las rosetas esto le podría permitir mantener Ψ_l menos negativos, y mantener de esta forma las conductancias altas, lo que puede favorecer la adquisición de CO_2 . Bajo esta premisa, Giraldo (2009) señala que el cierre estomático es más importante en las plantas jóvenes de *L. neriifolius* que en las adultas, atribuyéndole a la médula (más desarrollada en los individuos adultos) un rol importante en el balance hídrico de la especie. Resultados similares se han reportado para algunas especies de rosetas caulescentes (Goldstein et al., 1984; Meinzer et al., 2003).

Estos resultados concuerdan con otros estudios en ambientes de límite arbóreo en la alta montaña tanto tropical como subtropical, en los que se plantea el almacenamiento de agua como una de las principales características asociadas con características xeromórficas de las diversas especies (Leuschner, 2000; Morales et al., 2004; Lentz et al., 2006). Estas características, tanto anatómicas (presencia de médulas parenquimatosa) como funcionales (cierre estomático antes del Ψ_{tip} , Ψ_{tip} poco negativos), nos evidencian la evasión al déficit hídrico por parte de estas especies, dicho

mecanismo tiende a ser el más común para las especies leñosas en términos generales (Levitt 1980; Pallardi, 2008).

El aumento de la elasticidad de los tejidos, en todas las especies y altitudes, sugiere que el estrés hídrico estacional es de poca duración e intensidad (Goldstein et al., 1989), lo cual en la localidad de estudio, como se mencionó anteriormente, se evidencia en la presencia de neblinas frecuentes aún en la época seca, y en la ocurrencia de precipitaciones leves que permiten recuperar en cualquier caso los Ψ_l . Incluso en la época seca, en la vertiente de menor precipitación, se presentaron días con abundante presencia de neblina, las cuales generan un aporte de agua al sistema y disminuyen la demanda evaporativa. Solo en *D. venezuelense* a 3400 m de altitud no se presentaron variaciones significativas en la elasticidad de las paredes celulares, esto fue reemplazado por una variación en el Ψ_{tip} , lo cual evidencia un período de déficit hídrico más importante en dicha localidad a esa altitud. En este sentido, es necesario realizar nuevos estudios sobre la factibilidad de estas plantas en fijar agua, por la saturación atmosférica, tal como se ha reportado en otras especies leñosas, para zonas templadas (Burns et al., 2009). La presencia de neblinas densas en los períodos desfavorables podría verse suplido por agua atmosférica.

La disminución de los Ψ_{lmin} y Ψ_{pd} para *D. venezuelense*, así como los ajuste osmóticos que presenta esta especie a 3400 m de altitud, sugieren que tal como se menciona en la literatura la altitud parece aumentar las condiciones de estrés hídrico en las plantas, así como también que algunas de las especies estudiadas podrían ajustarse a estas condiciones menos favorables permitiéndoles mantener un estatus hídrico favorable. En la zona de estudio queda claro que el estrés hídrico no es una causa crucial de las limitaciones de las plantas leñosas. Es posible sin embargo, que este pueda afectar a las plantas leñosas, tal como se presenta en otros estudios, limitando su establecimiento y desarrollo por el efecto del déficit hídrico sobre la *gs* en plantas juveniles, tal como sugiere Giraldo (2009), para la especie *L. neriifolius*.

La disminución de las conductancias estomáticas no permite explicar, en estos casos la formación del límite arbóreo. Sin embargo, los estomas pueden ser responsables de una disminución en las posibilidades de las

plantas de mantener tasas favorables de asimilación de CO₂, disminuyendo, tal como se plantea para otras localidades, las tasas de crecimiento (Morales et al., 2004; Brancaleoni et al., 2007). Esto afectaría el balance de carbono, en individuos más susceptibles a estas condiciones, como lo son las plántulas de las distintas especies leñosas, aumentando en estas el efecto de otros factores abióticos considerados en el capítulo siguiente.

Se hacen necesarios más trabajos, en los cuales se puedan evaluar estos parámetros en individuos juveniles de especies del ecotono Selva Páramo, con la finalidad de evaluar los efectos del estrés hídrico sobre la colonización de nuevos ambientes por parte de estas especies leñosas. Es necesario también estudiar el posible efecto facilitador de plantas arbustivas sobre las plantas arbóreas del límite, ya que según Santaella (2007), parecen ser estos arbustales los posibles focos de colonización de la vegetación leñosa arbórea dentro del páramo.

BIBLIOGRAFÍA

- Anthelme, F., Michalet, R., Barbaro, L. y Brun, J.-J. (2003). Environmental y Spatial Influences of Shrub Cover (*Alnus viridis* DC.) on Vegetation Diversity at the Upper Treeline in the Inner Western Alps. *Arctic, Antarctic, y Alpine Research* 35(1): 48-55.
- Azócar, A., y Rada, F. (2006). *Ecofisiología de Plantas de alta montaña tropical*.
- Brancaleoni, L., Gualmini, M., Tomaselli, M. y R., Gerdol. (2007). Responses of subalpine dwarf-shrub heat to irrigation and fertilization. *Journal of Vegetation Science*. 18: 337-344.
- Brodersen, C. R., Germino, M. J. y Smith, W. K. (2006). Photosynthesis during an Episodic Drought in *Abies lasiocarpa* y *Picea engelmannii* across an Alpine Treeline. *Arctic, Antarctic, y Alpine Research* 38(1): 34-41.
- Burns, E., Simonin, K., Bothman A., y T. Dawson (2009). Foliar water uptake: a common water acquisition strategy for plants of the redwood forest. *Oecologia* (2009) 161:449-459

- Cavieres, L. A. y Piper, F. (2004). Determinantes ecofisiológicos del límite altitudinal de los árboles. In *Fisiología Ecológica en Plantas*, 221-234 (Ed H. M. Cabrera). Valparaíso: Ediciones de la Universidad Católica de Valparaíso.
- Cavieres, L. A., Rada, F., Azócar, A., García-Núñez, C. y Cabrera, H. M. (2000). Gas exchange y low temperature resistance in two tropical high mountain tree species from the Venezuelan Andes. *Acta Oecologica* 21(3): 203-211.
- Choler, P. y Michalet, R. (2002). Niche differentiation y distribution of *Carex curvula* along a bioclimatic gradient in the southwestern Alps. *Journal of Vegetation Science* 13(6): 851-858.
- Cochard, H., Ewers, F. W. y Tyree, M. T. (1994). Water relations of a tropical vine-like bamboo (*Rhipidocladum racemiflorum*): root pressures, vulnerability to cavitation y seasonal changes in embolism. *Journal of Experimental Botany* 45(8): 1085-1089.
- Cochard, H., Nardini, A. y Coll, L. (2004). Hydraulic architecture of leaf blades: where is the main resistance? *Plant, Cell y Environment* 27(10): 1257-1267.
- García-Núñez, C., Rada, F., Boero, C., González, J., Gallardo, M., Azócar, A., Liberman-Cruz, M., Hilal, M. y Prado, F. (2004). Leaf Gas Exchange y Water Relations in *Polylepis tarapacana* at Extreme Altitudes in the Bolivian Andes. *Photosynthetica* 42(1): 133-138.
- Germino, M., Smith, W. y Resor, A. (2002). Conifer seedling distribution y survival in an alpine-treeline ecotone. *Plant Ecology* 162(2): 157-168.
- Gieger, T. y Leuschner, C. (2004). Altitudinal change in needle water relations of *Pinus canariensis* y possible evidence of a drought-induced alpine timberline on Mt. Teide, Tenerife. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 199(2): 100-109.
- Giraldo, P. (2009). El papel de la médula en las relaciones hídricas de dos especies de la subtribu Espeletinae. *Libanothannus neriifolius* Ernst. y *Carramboa tachirensis* (Aristeg) Cuatrec. Instituto de Ciencias

Ambientales y Ecológicas Facultad de Ciencias, Mérida, Venezuela:
Universidad de Los Andes. (informe de Pasantías)

- Goldstein, G., Meinzer, F. y Monasterio, M. (1984). The role of capacitance in the water balance of Andean giant rosette species. *Plant, Cell & Environment* 7(3): 179-186.
- Goldstein, G., Rada, F., Orozco, A., Montilla, M., Zabala, O., Cavelier, J. y Azocar, A.(1989). Mantenimiento del turgor en especies leñosas tropicales: un modelo basado en cambios estacionales de osmolaridad y elasticidad. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 27: 37-49.
- Holtmeier, F.-K. (2009). *Mountain Timberlines. Ecology, Patchiness, y Dynamics* Geneva, Switzerland: Springer Science.
- Holtmeier, F.-K. y Broll, G. (2007). Treeline advance, driving processes y adverse factor. *Landscape Online* 1: 1-33.
- Kozlowski, T. T. y Pallardy, S. G. (2002). Acclimatation y adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *The Botanical Review* 68(2): 270-334.
- Lauscher, F 1976. Weltweite Typen der Hohenabhängigkeit des Niederschlags. *Wetter und Leben* 28:80-90.
- Lenz, T., Wringht I. y M. Westoby. (2006) Interrelation among pressure-volume curve traits across species and water availability gradients. *Physiologia Plantarum* 127: 423-433.
- Leuschner, C. (2000). Are high elevation in tropical mountains arid environments for plants. *Ecology* 81 (5): 1425-1436.
- Levitt, J. (1980). *Responses of plant to environmental stresses*. New York: Academic Press.
- Meinzer, F. C., James, S. A., Goldstein, G. y Woodruff, D. (2003). Whole-tree water transport scales with sapwood capacitance in tropical forest canopy trees. *Plant, Cell & Environment* 26(7): 1147-1155.
- Michalet, R., Rolland, C., Joud, D., Gafta, D. y Callaway, R. M. (2003). Associations between canopy y understory species increase along a

- rainshadow gradient in the Alps: habitat heterogeneity or facilitation? *Plant Ecology* 165(2): 145-160.
- Monasterio, M. y Reyes, S. (1980). Diversidad ambiental variación de la vegetación en los paramos de los Andes Venezolanos. En Monasterio : Estudios Ecologicos en los Paramos Andinos, Mérida-Venezuela. Universidad de los Andes. 47-91.
- Morales, M. S., Villaba, R., Grau, H. R. y Paolini, L. (2004). Rainfall-controlled tree growth in high-elevation subtropical treelines. *Ecology* 85(11): 3080-3089.
- Morales, M., Villalta, R., Grau, R., y L. Paolini. (2004). Rainfall-controlled tree grow in high-elevation subtropical treelines. *Ecology* 85 (11): 3080-3089.
- Pallardi, S. (2008). *Physiology of Woody Plants*. New Yord. Academic Press. 3. Edition. 454 pp.
- Rada, F., Azócar, A., Briceño, B., González, J. y García-Núñez, C. (1996). Carbon y water balance in *Polylepis sericea*, a tropical treeline species. *Trees - Structure and Function* 10(4): 218-222.
- Rada, F., Azocar, A., Gonzalez, J. y Briceño, B. (1998). Leaf gas exchange in *Espeletia schultzii* Wedd, a giant caulescent rosette species, along an altitudinal gradient in the Venezuelan Andes. *Acta Oecologica* 19(1): 73-79.
- Rada, F., García-Núñez, C. y Ataroff, M. (2009). Leaf gas exchanges in canopy species of a Venezuelan cloud forest. *Biotropica* 41 (6):659-664.
- Rada, F., Goldstein, G., Azocar, A. y Meinzer, F. (1985). Daily y Seasonal Osmotic Changes in a Tropical Treeline Species. *Journal of Experimental Botany*. 36(6): 989-1000.
- Ramírez, L. A. (2008). Estructura de la vegetación en la zona de transición entre el bosque y el páramo en la Sierra Nevada de Mérida. Departamento de Biología- Facultad de Ciencias, Licenciatura. Mérida-Venezuela: Universidad de Los Andes.

- Rodríguez, E. (2010). Caracterización del componente leñoso en comunidades del ecotono bosque paramero páramo en San José Estado Mérida. Trabajo especial de grado. Departamento de Biología. Universidad de los Andes. Mérida. Venezuela.
- Rundel, P. (1994). Tropical Alpine Climates. En: Rundel, P.W., Smith A.P. y F.C. Meinzer Tropical alpine Environments: Plants form y function. . Cambridge: Cambridge University Press. 21-44 pp.
- Santaella, W. A. (2007). Análisis del cambio del paisaje en la línea de selva nublada – páramo, La Aguada, Mérida. Facultad de Humanidades, Vol. Licenciatura en Estudios Ambientales Cabudare-Venezuela: Universidad de Yacambú.
- Sodja, I. (2001). Estudio Florístico del Cerro Pozo Negro, Páramo de San José (Mérida-Venezuela). Departamento de Biología. Facultad de Ciencias, Licenciatura en biología Mérida, Venezuela. Universidad de Los Andes. 165 pp.

CAPÍTULO 4. EFECTOS DE LA TEMPERATURA Y LA RADIACIÓN SOBRE LA ASIMILACIÓN DE CO₂ EN PLANTAS DEL ECOTONO SELVA NUBLADA - PÁRAMO.

INTRODUCCIÓN

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes en el desarrollo y establecimiento de las plantas, afectando todos los procesos vitales de las mismas (Lambers et al., 2008). Este factor se ha considerado como uno de los principales filtros ambientales en la alta montaña, y posiblemente la causa de la aparición del límite más conspicuo de la naturaleza (Holtmeier y Broll, 2005), el límite de crecimiento arbóreo.

Dos hipótesis alternativas tratan de dar explicación a la presencia del límite de crecimiento arbóreo por la temperatura. Por un lado las limitaciones en el balance de carbono, relacionada con problemas en el proceso de adquisición de CO₂ (Stevens y Fox, 1991) y por otro las limitaciones de crecimiento, relacionadas con la disminución de la actividad meristemática y metabólicas por las bajas temperaturas (Körner, 1998).

La segunda hipótesis plantea que no existen evidencias de disminuciones importantes en las tasas de asimilación de CO₂ con la altitud. Adicionalmente plantea que en estudios realizados en varios lugares se ven aumentos importantes en la cantidad de compuestos no estructurales de carbono con la altitud, lo cual evidencia, según los autores, la presencia de limitaciones metabólicas en las plantas que ven afectadas la posibilidad de crecer. Sin embargo, existen en la actualidad diversos trabajos que han cuestionado esta hipótesis. En el trópico por ejemplo, Piper et al. (2006), en estudios sobre el aumento de los compuestos no estructurales con la altitud, no consiguieron tales efectos, y la proporción de compuestos no estructurales no varió con la altitud. Adicionalmente, Bansal y Germino (2009) han demostrado que es más importante la variación estacional de compuestos no estructurales que altitudinal, con lo que estos compuestos podrían ser utilizados por las plantas

en mantener fuentes energéticas disponibles para procesos de reparación y mantenimiento celular.

La hipótesis de balance de carbono desfavorable, establece que el aumento en altitud genera una disminución de las tasas de asimilación. Sin embargo, algunos estudios, como en el caso de *Polylepis tarapacana* (Hoch y Körner, 2005) en Bolivia, muestran que se produce un aumento de las tasas de asimilación con la altitud. Surge la pregunta de si en verdad aumentan las tasas de asimilación de CO₂ con la altitud, y si existe un efecto directo de las temperaturas sobre estas tasas en condiciones de campo, o si otros factores son más importantes y finalmente lo que se reduce es el crecimiento celular.

Son pocos los estudios en los que se desarrolla por completo el estudio del balance de carbono en las plantas, es decir, las mediciones completas de los ingresos de CO₂ por la asimilación de CO₂, el almacenamiento y finalmente las salidas de CO₂ por respiración (de mantenimiento, crecimiento y reparación) mortalidad, exudaciones o herbivoría. Diferentes trabajos mayoritariamente estudian parte de este balance, ya sea con balances parciales a nivel foliar, o por medio de la estimación de alguno de estos compartimientos del balance. En este sentido, las plantas leñosas presentan desventajas funcionales con otras formas de vida, al producir un gran almacenamiento de CO₂ en la formación del leño, crucial para la conducción de agua.

La respiración al igual que la fotosíntesis se ven influenciadas por la temperatura, en este caso las tasas de respiración tienden a disminuir con el descenso de la temperatura. La medición de esta tiende a ser muy compleja, en parte por la cantidad de partes diferentes a considerar a nivel de toda la planta. En términos generales es aceptado que la respiración en las plantas utiliza cerca del 50 % de los asimilados diarios (Lambers et al. 2008).

Muchos de los estudios de balance de carbono, finalmente basan sus estimaciones en valores relativos de crecimiento y/o asimilación, o la medición de respiración a nivel foliar. En uno de estos trabajos en el que se evaluó el balance de carbono en individuos juveniles de dos especies del límite de

crecimiento arbóreo en zonas templadas (Bansal y Germino, 2008), se estimó que las tasas de asimilación de CO₂ en base a peso presentaban una correlación positiva con el crecimiento de las plantas. Esta relación sugiere que las limitaciones de las plántulas sean más un problema en la adquisición de carbono y no en la utilización de los compuestos derivados. Esta limitación por utilización de los compuestos derivados de la asimilación de CO₂, es una de las evidencias utilizadas como base para la justificación de la hipótesis de limitación de crecimiento.

Adicionalmente, tal como se plantea en el capítulo 3, las plantas de alta montaña tienden a producir modificaciones en sus tejidos causado por las condiciones de mayor estrés térmico, lumínico e hídrico, entre estas modificaciones se tienen las modificaciones en el sistema de conducción del xilema (Wodzicki, 2001), una disminución del área foliar así como del área foliar específica (Choler, 2005), entre otras. Estas necesitan del uso de mayor cantidad de asimilados para la construcción y mantenimiento de dicho tejido vegetal, lo cual afecta también negativamente el balance de carbono total de las plantas. Las plantas en la alta montaña producen modificaciones de las características foliares con la altitud, dichas modificaciones pueden causar diversos efectos sobre la adquisición y uso de asimilados por las plantas. Por otro lado, la adquisición de luz por parte de las hojas es determinada en parte por la cantidad de la misma que es absorbida por la hoja, en tal sentido se ha determinado que existen variaciones en las propiedades espectrales de las hojas en diferentes altitudes (Molina-Montenegro, 2008).

En el caso de las zonas de alta montaña tropical no solo las bajas temperaturas afectan a las plantas, sino que a nivel del suelo, en las zonas de páramo abiertos se pueden producir temperaturas extremadamente elevadas en el día. Se sabe que al igual que muchos de los procesos fisiológicos de las plantas, a medida que la temperatura aumenta, la asimilación de CO₂ muestra un aumento hasta un valor óptimo o máximo para luego decrecer a mayores temperaturas. Mediante este tipo de análisis se pretende conocer el óptimo de

temperatura de cada especie, así como la amplitud térmica en la cual cada especie mantiene niveles de asimilación de CO₂ suficientemente elevado para poder mantener un balance positivo de carbono.

El efecto de la temperatura sobre la asimilación de CO₂ ha sido poco estudiado en especies del límite arbóreo tropical. Existen reportes sobre algunos de los efectos que podría tener este factor sobre la asimilación de CO₂. En las zonas templadas se ha demostrado que existe un efecto de las bajas temperaturas (temperaturas congelantes) sobre la fotosíntesis. En este sentido se ha demostrado que las noches con temperaturas congelantes se producen procesos de fotoinhibición en los días sucesivos, las cuales disminuyen la capacidad fotosintética de las plantas reduciendo así el balance de carbono (Germino y Smith, 1999). Igualmente, temperaturas extremadamente altas (Wolf et al., 1990; Pastenes y Horton, 1996; Al-Khatib y Paulsen, 1999) pueden producir la disminución de las tasas diarias de asimilación de CO₂, causando una disminución en la fijación de asimilados por las plantas.

Las bajas temperaturas producen la disminución de las tasas de asimilación en las plantas, este efecto sobre los procesos fotosintéticos en especies de zonas templadas ha sido estudiado en muchas especies. Jordan y Smith (1994) muestran que se produce una disminución de la actividad con la temperatura, en estudios en zonas tropicales esta disminución puede llegar a ser negativas a temperaturas superiores a los cero grados (Rada et al., 1996).

Otro factor importante en las zonas de alta montaña es la radiación. Por ejemplo, Dozier (1980) señala que en la Sierra Nevada en Estados Unidos de Norte América a 1200 m se presentan radiaciones 25% menores que a 4400 m. Algunos autores sugieren que el estrés foto-oxidativo y los procesos de fotoinhibición pueden ser importantes en los claros y las zonas despejadas tanto en límites templados como límites tropicales. Estos procesos limitarían la ganancia de carbono y el crecimiento de las plántulas (Germino y Smith, 1999; Johnson et al., 2004; Bader et al., 2008).

Los estudios sobre el efecto combinado entre bajas temperaturas y altas radiaciones, frecuentes en la alta montaña tropical, son pocos, y los existentes se basan en procesos de regeneración y supervivencia de plántulas más que en medidas directas de las tasas de asimilación de CO₂ (Bader et al., 2007). Más recientemente Puentes(2010), en mediciones de fotoinhibición realizadas en plántulas de dos especies del ecotono bosque-páramo, menciona que *Cybianthus marginatus*, especie típicamente de bosque, parece tener procesos de fotoinhibición crónica al ser expuesta a condiciones de plena insolación en las zonas de páramo, mientras que *Diplostephium venezuelense*, especie capaz de colonizar algunas zonas de páramo abierto, presenta procesos menos importantes de fotoinhibición, siendo en este caso procesos de fotoinhibición dinámica.

Aún no existen estudios en las zonas altiandinas tropicales de mediciones de fotoinhibición en individuos adultos de especies leñosas, tanto de procesos de fotoinhibición por las altas radiaciones como por el efecto combinado entre las altas radiaciones y las bajas temperaturas. Este efecto podría darse bien sea por las temperaturas nocturnas congelantes como bajas temperaturas diurnas, características ambientales típicas en las zonas de alta montaña tropical.

HI PÓTESIS GENERAL

En la alta montaña tropical, la temperatura muestra grandes variaciones diarias, en el día se tienen temperaturas muy elevadas a nivel del suelo y superficies, y en las noches las temperaturas pueden llegar a ser congelantes (Rada et al., 2001). La temperatura, sugerida como responsable directa de las limitaciones ambientales en las plantas del ecotono, ocasionará una disminución progresiva de las tasas de asimilación de CO₂ máxima con la altitud, y medias, así como en las variables morfológicas foliares relacionadas con estas. Dicho proceso se verá afectado también por otros factores ambientales, tales como la alta radiación, las cuales limitarán el desarrollo de las plantas leñosas en mayores altitudes, causadas por el aumento de la radiación con la altitud.

Enfocándonos entonces en el efecto de la temperatura y la radiación sobre la asimilación de CO₂ como una posible respuesta al límite de crecimiento arbóreo, se plantea la necesidad de estudiar las limitaciones de estas variables y su interacción con otros factores.

OBJETIVOS.

Determinar las variaciones altitudinales de variables morfológicas como el Área Foliar (AF) y el Área Foliar Específica (AFE), así como también de las propiedades ópticas de las hojas determinando la absorción, transmisión y reflexión de luz en las cuatro especies del ecotono dentro de un gradiente altotérmico.

Evaluar el efecto de la temperatura sobre la asimilación de CO₂ en cuatro especies del ecotono selva nublada-páramo.

Determinar el intervalo óptimo de temperaturas para la asimilación de CO₂ en especies leñosas del ecotono selva nublada-páramo.

Determinar las variaciones altitudinales de los óptimos y rangos de temperaturas con relación a las tasas asimilación de CO₂ en las cuatro especies del ecotono dentro de un gradiente altotérmico.

Evaluar la presencia de los posibles efectos de la fotoinhibición causados por las bajas temperaturas en especies leñosas del ecotono selva nublada-páramo.

Evaluar los posibles efectos de las altas radiaciones sobre las tasas de transporte de electrones en especies leñosas del ecotono selva nublada-páramo.

MÉTODOS

Para la realización del estudio de la respuesta fotosintética de cuatro especies de plantas leñosas a los cambios térmicos, se trabajó en un grupo de especies distribuidas en un gradiente altitudinal de 400 metros, en la localidad del páramo de San José en la vertiente llanera, entre los 2800 y 3200 m, en la

cuenca del Río Mucutuy, del Estado Mérida. Los muestreos se realizaron en las diferentes posiciones según se presenta en la figura 4.1.

En esta localidad se presenta una vertiente húmeda en las que las condiciones de déficit hídrico tienden a ser bajas con precipitaciones de 1300 mm (vertiente llanera, cuenca del Río Mucutuy (Monasterio y Reyes, 1980).

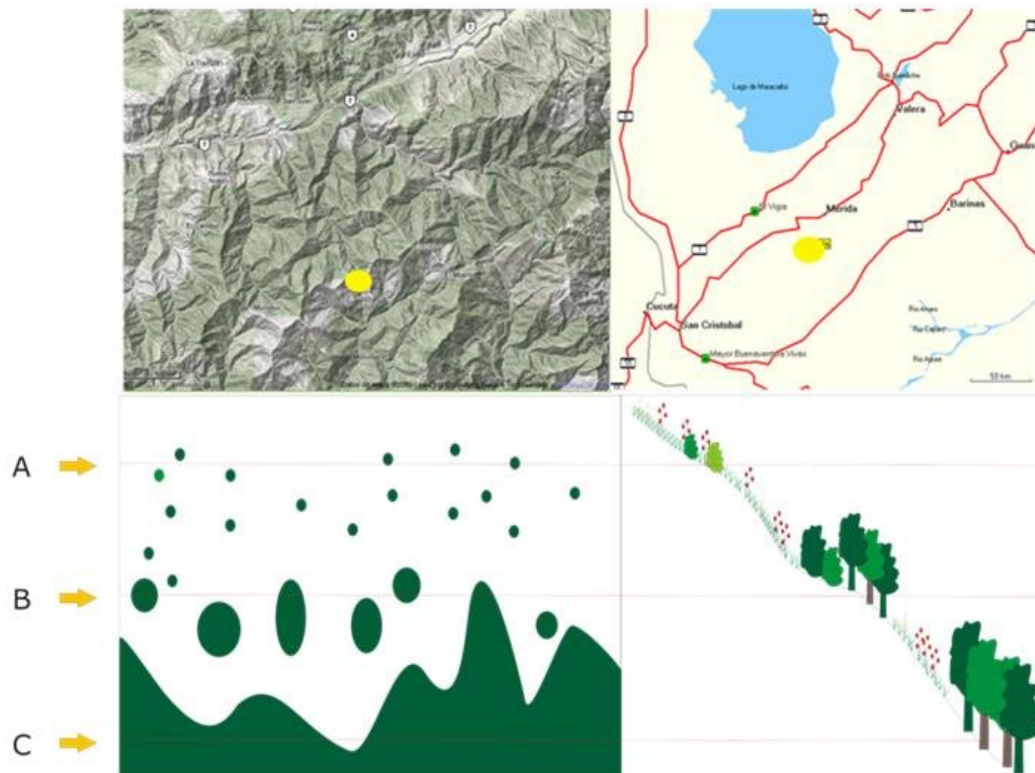


Figura 4.1: Posición y Distribución de los sitios de estudio en el gradiente alto térmico, en el límite arbóreo del área de estudio. (A) Zona de páramo con árboles aislados de *Gynoxys meridana*, y *Diplostephium venezuelense* (3200 msnm), (B) Zona de Pequeños bosquetes principalmente compuesto por individuos de *Libanothamnus neriifolius*, *Diplostephium venezuelense*, *Miconia jhanni* (3000 m), (C) Zona de Bosque continuo con presencia de especies leñosas de gran porte, *Libanothamnus neriifolius*, *Clusia multiflora*, *Drymis granatensis*, entre otras especies.

Las precipitaciones en la vertiente húmeda (zona de estudio) tienden a tener un patrón típicamente llanero, con una estación seca de tres meses o menos y un período de lluvias durante nueve meses o más. Sin embargo, se presenta en horas de la tarde una fuerte nubosidad en la mayor parte del año, dicha nubosidad cubre ambas vertientes de la zona alta de la montaña.

El límite de crecimiento arbóreo del bosque continuo en la zona ocurre entre los 2800 y 3200 m de altitud, con formaciones de bosquetes o lenguas de bosque que se interdigitan con vegetación típicamente paramera.

Especies a estudiar

Las especies estudiadas fueron seleccionadas por su abundancia y su distribución en el gradiente, tanto en la zona de estudios como en otros estudios de la vegetación en el límite de crecimiento arbóreo (Sodja, 2001; Ramírez et al., 2009).

Se escogieron cuatro especies (cuadro 4.1), dos que se encuentran en zonas de páramo abierto, *Gynoxys meridana* Cuatrec. y *Diplostegium venezuelense* Cuatrec., y dos especies de zona de Bosque paramero y/o selva nublada, *Libanothamnus neriifolius* (Sch. Bip. ex Wedd.) Ernst y *Miconia jahnii* Pittier, con la finalidad de comparar las respuestas ecofisiológica en las tasas de asimilación de CO₂ de estas diferentes especies a las diferentes altitudes.

Cuadro 4.1: Lista de especies y lugar de muestreo (altitudes en la cual se realizaron los muestreos) para los estudios de respuesta de la asimilación de CO₂ a la variación térmica.

Especie	Altitud (m)
<i>Diplostegium venezuelense</i>	3200, 3000
<i>Miconia jahnii</i>	3150, 3000
<i>Libanothamnus neriifolius</i>	3150, 3000, 2800
<i>Gynoxys meridana</i>	3200

Determinación de parámetros morfo-anatómicos foliares de base.

Con la finalidad de determinar variables de intercambio de gases en función de la masa foliar y también la variación en la inversión de asimilados necesaria para producir material fotosintético en las distintas especies a las distintas altitudes se realizaron algunas determinaciones de variables morfo-anatómicas foliares (Área foliar, área foliar específica), también se determinaron las propiedades ópticas de las hojas, con la finalidad de determinar la proporción de energía radiante absorbida, reflejada y transmitida en las diferentes especies a las diferentes altitudes.

Las mediciones tanto de las propiedades espectrales como del área foliar y área foliar específicas se realizaron en 20 hojas totalmente expandidas y sin daños apreciables, en las cuatro especies a las altitudes dadas anteriormente, en cuatro individuos por especie y por altitud. Para esto se siguió el protocolo para la determinación del área foliar y área foliar específica estandarizado (Garnier et al., 2001). En este se plantea la rehidratación del material vegetal traído de campo antes de medir el área foliar, ya que se ha determinado que pueden presentarse algunas variaciones en el área foliar medida en material no rehidratado, así como del contenido de agua máximo. El área foliar fue medida mediante la digitalización por medio del programa Irfanview de las hojas con la utilización de un digitalizador Canoscan LiDe 20, a 600 dpi de resolución, y posteriormente analizadas con el Software ImageJ de código abierto. Finalmente este material fue llevado a la estufa por 72 horas a 60 °C para obtener el respectivo peso seco. El área foliar específico se determinó dividiendo el área foliar de cada muestra entre su peso seco.

Con el mismo material, antes de producir la deshidratación, se realizaron mediciones de los parámetros ópticos de las hojas, con la ayuda de una esfera de integración (Li-Cor 1800), en la cual se determinó la absorción, transmisión y reflexión del material foliar.

Se determinaron las diferencias estadísticas entre las muestras por medio de un análisis de varianza realizado con el software Past ®.

Mediciones en campo

Se realizaron mediciones de asimilación de CO₂ en el campo durante la época favorable (octubre 2009), para valores saturantes de densidad de flujo fotónico fotosintético (DFFF) (1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) y mediciones de respiración foliar en la oscuridad. Las mediciones se realizaron con la ayuda de un analizador infrarrojo de gases LCpro (ADC BioScientific, Hoddesdon, U.K.) y con un analizador infrarrojo de gases Ciras 2B (PPSystems, Hitching, UK). Para las mediciones de asimilación a DFFF saturante y respiración foliar en oscuridad se seleccionaron 3 individuos adultos y se seleccionaron 2 hojas expandidas por cada individuo para cada una de las especies presentes en el cuadro 4.1, en cada una de las altitudes propuestas. Las mediciones se realizaron en las primeras horas de la mañana (9 a 11:30 am), con la finalidad de evitar los cierres estomáticos producidos por una disminución del Ψ_1 y/o aumento del déficit de presión de vapor (DPV).

Mediciones de fluorescencia de la clorofila a y fotoinhibición.

EL estudio de los procesos de fotoinhibición y fluorescencia de la clorofila a nos indica como afectan las variables a estudiar la parte fotoquímica del proceso de fijación de energía. La relación entre la fluorescencia máxima (Fm) y la Fluorescencia variable (Fv), dará idea de la disminución o no de la eficiencia máxima de la planta, es decir de su máxima capacidad de fijar energía lumínica dentro del proceso fotosintético, adicionalmente se calcularán otros parámetros relacionados con la capacidad de cada especie en fijar energía radiante en forma de asimilados de CO₂ o de disipar la energía no utilizada.

Para la determinación de la fotoinhibición se realizaron, mediciones de la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (Fv/Fm). Para esto se colectó material en campo, de las cuatro especies a las diferentes altitudes. El material colectado fue acondicionado y sometido a diferentes condiciones ambientales, en primer lugar se realizaron pruebas de efecto de la baja temperatura nocturna sobre la eficiencia máxima en días posteriores, para esto se sometió material a dos condiciones de almacenamiento y preparación de bajas

temperaturas: un tratamiento inicial de temperaturas de $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por dos horas antes de la medición, y un segundo tratamiento testigo de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por dos horas antes de las mediciones, en ambos casos se garantizó la total rehidratación total del material. Para ambos casos las mediciones de Fv/Fm se realizaron a temperatura ambiente entre 18 y $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Fueron realizadas también algunas mediciones de Fv/Fm en material directamente en campo en condiciones de pre-amanecer. En el segundo caso se realizaron finalmente mediciones en material igualmente acondicionado, y almacenado a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, en los cuales se realizaron mediciones a cuatro diferentes temperaturas (5 , 12 , 20 y $30\text{ }^{\circ}\text{C}$).

En el material utilizado para estas mediciones se realizaron también las curvas de transporte de electrones a diferentes niveles de temperatura. Para la realización de las mediciones en el laboratorio se trajeron ramas de aproximadamente 60 cm de largo, las cuales fueron rehidratadas, de forma similar a la preparación del material para la realización de curvas presión volumen, ubicando este material en condiciones de total oscuridad y ambiente saturante de humedad. En estas ramas se cubrieron algunas de las hojas con papel de aluminio con la finalidad de favorecer la recuperación de todos los centros de reacción dentro de estas hojas en las cuales fueron realizadas las mediciones. Las mediciones se realizaron con un equipo de fluorescencia de la clorofila, FSM 1 Hansatech (Hansatech, Norfolk, UK) de laboratorio antes mencionado y las mediciones de campo se realizaron con un equipo portátil de campo PAM 2100 Chl fluorometer (Heinz-Walz, Alemania).

Mediante las mediciones se determinaron también los demás parámetros relacionados con la fluorescencia de la clorofila a, cabe destacar: Eficiencia Cuántica Fotosintética Máxima (Fv/Fm), Eficiencia Cuántica (Yield), Disipación fotoquímica (qP), Disipación No Fotoquímica (qN), Tasa de Transporte de Electrones (ETR).

Los cálculos fueron realizados según las formulas presentadas por Lambers et al. (2008), que se describen a continuación:

- La suma de todas las formas de disipación energética en el foto-sistema II de las hojas se aproxima a uno mediante la siguiente relación:

$$1 = \phi_p + \phi_D + \phi_F \text{ (Ecuación 1)}$$

Donde:

ϕ_p = Disipación cuántica fotosintética

ϕ_D = Disipación por temperatura

ϕ_F = Disipación por fluorescencia

- Si se saturan todos los centros de reacción através de un pulso saturante de luz la disipación fotoquímica se hace prácticamente cero,

$$1 = \phi_{Dm} + \phi_{Fm} \text{ (Ecuación 2)}$$

Donde:

ϕ_{Dm} = Disipación máxima por temperatura

ϕ_{Fm} = Disipación máxima por fluorescencia

- Eficiencia cuántica máxima.

$$\phi_m = \frac{(F_m - F_o)}{F_m} = \frac{F_v}{F_m} \text{ (Ecuación 3)}$$

Donde:

F_m = Fluorescencia máxima

F_o = Fluorescencia basal

F_v = Fluorescencia variable.

- Eficiencia Cuántica del fotosistema II

$$\phi_{II} = \frac{(F_m' - F_o)}{F_m'} = \frac{\Delta F'}{F_m'} \text{ (Ecuación 4)}$$

Donde:

F_m' = Fluorescencia máxima bajo las condiciones de iluminación

F_o = Fluorescencia basal bajo las condiciones de iluminación

ΔF = Fluorescencia variable bajo las condiciones de iluminación.

- Disipación fotoquímica:

$$qP = \frac{(F_m' - F_o')}{(F_m' - F_o')} = \frac{\Delta F}{F_v'} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde:

qP = Disipación fotoquímica

F_o' = Fluorescencia basal bajo condiciones de iluminación

ΔF = Diferencial de fluorescencia

F_v' = Fluorescencia Variable.

- Disipación fotoquímica:

$$qN = 1 - \frac{(F_m' - F_o')}{(F_m - F_o)} = 1 - \frac{F_v'}{F_v} \quad (\text{Ecuación 6})$$

qP = Disipación no fotoquímica

F_o' = Fluorescencia basal bajo condiciones de iluminación

ΔF = Diferencial de fluorescencia

F_v = Fluorescencia Variable bajo luz actínica.

F_v' = Fluorescencia Variable bajo condiciones de iluminación.

- Tasa de Transporte de Electrones.

$$ETR = I * \frac{\Delta F}{F_v'} * abs * \frac{1}{2} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde:

ETR = Tasa de transporte de electrones,

I= Densidad de Flujo Fotónico Fotosintético incidente,

$\Delta F/F_v'$ = Eficiencia Cuántica de Fotosistema II.

abs= Absorbancia foliar.

Curvas de densidad de flujo fotónico fotosintético-asimilación de CO₂.

Se realizaron mediciones de intercambio de gases en condiciones de laboratorio, a temperatura constante y DFFF controlado, con equipos de análisis infrarojo de gases, un equipo LCpro (ADC BioScientific, Hoddesdon, U.K.) y un equipo Ciras 2 (PPSystems, Hitching, UK).

Adicionalmente, se realizaron mediciones de transporte de electrones con un equipo de medición de Fluorescencia de la clorofila a, Hansatech modelo FSM 1 (Hansatech, Norfolk, UK) bajo condiciones controladas de temperatura, humedad relativa, y modificando la DFFF con la ayuda de filtros de luz desde 27 hasta 3300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Con los datos obtenidos por este método y valores de asimilación tomados tanto en campo como en el laboratorio se realizaron regresiones lineales para estimar la asimilación en función de la tasa de transporte de electrones.

Queda claro que los electrones transportados por la planta, y medidos por medio de la utilización de fluorómetro, no van a ser todos utilizados por la planta en la fijación de CO₂. Igualmente se sabe que las plantas necesitan para la fijación de una molécula de CO₂ por lo menos 8 electrones. Igualmente las temperaturas, las limitaciones hídricas u otros factores pueden afectar la utilización de estos electrones fijados en cada uno de los dos fotosistemas de la planta. La estimación realizada por medio de estos ajustes mostrará, sin embargo, el número potencial de electrones posible para la fijación de CO₂. Cualquier otro factor disminuirá la tasa final de fijación de CO₂ por la utilización de los electrones para otras funciones.

Estas regresiones nos permiten estimar las limitaciones fotoquímicas en el proceso de la asimilación de CO₂ causados por bajas temperaturas. Se realizó una comparación entre los métodos para estimar posibles ajustes entre ambos

en la determinación de la asimilación de CO₂ bajo condiciones controladas. Las mediciones de rd fueron realizadas con analizadores de gases, ya que dicho parámetro no puede ser medido con la utilización de técnicas de fluorescencia.

Finalmente, se calcularon las tasas de asimilación de CO₂ máxima en función de la masa foliar, mediante el producto simple entre las tasas de asimilación y el Área Foliar Específica. Esto con la finalidad de comparar las tasas de asimilación en función de la inversión de CO₂ para la fabricación de la hoja. Tal como se sugiere en la literatura, los valores expresados en función de la masa foliar tienden a tener una mejor correlación con otros parámetros morfo-anatómicos y funcionales (Reich et al., 1999).

Efecto de la temperatura foliar sobre las tasas de asimilación de CO₂

Se realizaron, al igual que en el caso de las mediciones de tasas de asimilación de CO₂ vs DFFF descritas anteriormente, dos tipos de mediciones. En primer lugar se realizaron curvas de temperatura foliar-asimilación de CO₂ en condiciones controladas de iluminación, concentración de CO₂ y humedad relativa con un equipo Ciras 2, el cual permitió medir las tasas de asimilación de CO₂ entre 15 y 35 °C. Por los riesgos de condensación en la cámara de análisis o en las celdas infrarrojas, así como por las limitaciones técnicas de los elementos de control de temperatura, no fue posible realizar las mediciones a temperaturas inferiores a 15 °C. Con la finalidad de poder realizar mediciones que permitieran estimar las tasas de asimilación de CO₂ a temperaturas inferiores a 15 °C, cruciales para el análisis propuesto, se realizaron adicionalmente, curvas de transporte de electrones a condiciones variables de DFFF (entre 27 y 3300) y temperatura. Estas mediciones se llevaron a cabo en un sistema de cámaras en las cuales se controlaba la temperatura del aire entre 5 y 38 °C. El transporte de electrones se midió con la ayuda del equipo FSM 1 Hansatech (Hansatech, Norfolk, UK) anteriormente descrito. En dicho sistema se realizaron curvas de DFFF-Asimilación de CO₂ a cuatro diferentes temperaturas (5, 12, 20 y 35 °C), se realizaron tres réplicas por especie y por altitud.

Respiración nocturna foliar

Se realizaron una serie de mediciones de tasas de respiración en *D. venezuelense* a dos altitudes, con la finalidad de tener una aproximación de las pérdidas nocturnas de CO₂ por este proceso. Solo fue posible realizar estas mediciones en esta especie debido a las malas condiciones de campo de las otras tres salidas, que impidieron la realización de estas mediciones por la presencia de lluvias durante la noche. Sin embargo, se tienen mediciones de respiración para todas las especies en condiciones de oscuridad, obtenidos de las diversas curvas de luz. Estos valores no permiten estudiar la variación temporal de las tasas de respiración pero pueden ayudar a determinar parcialmente variaciones altitudinales de las mismas.

Temperatura y radiación en el límite de crecimiento.

Uno de los objetivos de este capítulo era comparar las respuestas de la asimilación de CO₂ ante dos factores ambientales como lo son la temperatura y la radiación, y estimar el efecto de los valores obtenidos en campo sobre estas respuestas. Para la comparación de los valores reales de temperatura y radiación en campo, se utilizaron los valores de estos dos factores medidos en las transectas ubicadas en los alrededores de la estación La Aguada del sistema teleférico de Mérida. La cual consiste en un grupo de tres transectas ubicadas en diferentes orientaciones, donde cada una de estas tiene cuatro altitudes de muestreo dentro de un gradiente de 400 m, en el ecotono Selva páramo.

En cada estación se registraron cada 10 minutos diferentes variables mesoclimáticas, entre las que cabe destacar la temperatura del aire y la radiación incidente, datos que se utilizaron para realizar las comparaciones de los valores limitantes de estos dos factores con valores reales de campo.

Es necesario acotar que las estaciones se encuentran altitudinalmente más elevadas, sin embargo, los valores promedios son similares a los reportados para la zona del Páramo de San José.

Estos parámetros fueron medidos mediante la utilización de micro estaciones Hobo ® de cuatro canales en las que se ubicaron, entre otros, un sensor de temperatura del aire y un sensor de radiación. Los datos utilizados para nuestro análisis fueron los de los meses de mayor contraste, es decir, el mes de febrero (sequía máxima) y el de octubre (máxima precipitación) para dos años distintos.

También fueron realizadas mediciones en dos puntos dentro del gradiente de estudio dentro del bosque en el páramo de San José (2800 y 3000 m). Estas mediciones de temperatura del aire fueron realizadas a 1,5 m con la utilización de un datalogger de dos canales Hobo ®.

Los datos se presentan como la representación de un curso diario promedio en cada uno de estos meses a las diferentes altitudes. También se realizaron los cálculos de la proporción de horas útiles por mes para la realización de la asimilación de CO₂ por las plantas. Para esto se sustrajeron de las horas diurnas totales las horas que cumplían con alguna de las siguientes características: horas con temperaturas inferiores a 5° C y horas con radiaciones superiores a los 2000 μmol m⁻² s⁻¹. Finalmente se calculó la proporción de horas útiles en función de las horas totales diurnas (entre las 6 y las 18 horas).

RESULTADOS

Morfo-anatomía foliar de las especies

En el cuadro 4.2 se pueden ver los resultados de las características morfo-anatómicas de las hojas de las especies estudiadas. Puede notarse la gran variedad en el tamaño foliar para las diferentes especies, así como la variación altitudinal significativamente diferente en *L. neriifolius* ($p > 0,01$). Se puede notar igualmente la variación altitudinal en la otra especie de bosque (*M. jahonii*), quedando *D. venezuelense* invariable con la altitud.

El AFE por su parte presenta diferencias estadísticas en todas las especies ($p > 0,01$) disminuyendo con la altitud para las especies de bosque (*L. neriifolius* y *M. jahnii*) y aumentando para *D. venezuelense*.

En cuanto a las propiedades espectrales, también muestran un patrón de variación altitudinal, con una pequeña disminución de la absorbancia en las especies que se ubican en los sitios más bajos del gradiente. Contrariamente se produce un aumento de la reflectancia en todas las especies a medida que ascendemos en altitud, siendo esta mayor en las dos especies que llegan a colonizar ambientes abiertos (*G. meridana* y *D. venezuelense*).

En todos los casos se presenta una pubescencia abundante que no fue cuantificada, si embargo la misma es más notoria en la especie de menor absorbancia (*G. meridana*), especie que está ubicada en la parte superior del gradiente y que puede llegar a estar presente en zonas abiertas de páramo con frecuencia. En el caso de *D. venezuelense* el indumento es abundante en ambas caras y en el caso de *L. neriifolius* y *M. jahnii*, es más importante y evidente por el envés, pero puede estar presente en el haz en menor grado. Este indumento da una coloración más clara al envés de la hoja en las dos especies de bosque.

Los mayores valores de transmitancia se presentan en la especie *L. neriifolius*, sin que se presenten variaciones altitudinales en ninguna de las especies, y siendo similar en las otras tres especies.

Cuadro 4.2: Variables morfoanatómicas de las cuatro especies a las diferentes altitudes. (Alt: Altitud (m); AF: Área Foliar promedio (cm²); AFE: Área Foliar Específica Promedio (cm²/g); Rf: Reflectancia Relativa (%); Tr: Transmitancia Relativa (%); Ab: Absorbancia Relativa (%)). Se presentan los errores estandar entre paréntesis. Diferencias estadísticas entre las especies y altitudes a las diversas altitudes (Superíndice alfanumérico) Análisis de Varianza de una vía ($p < 0,01$) y una prueba de Tukey entre medias. Se asume que no hay interacción entre especies y altitudes.

Especie	Alt	Af	AFE	Rf	Tr	Ab
<i>Diplostegium venezuelense</i>	3000	2,73 ^a (0,09)	64,07 ^b (0,84)	9,71 ^a (0,31)	2,25 ^b (0,19)	88,05 ^b (0,32)
	3200	2,84 ^a (0,11)	72,53 ^a (1,34)	10,72 ^a (0,39)	2,11 ^b (0,15)	87,18 ^b (0,45)
<i>Gynoxys meridana</i>	3200	18,70 ^b (0,77)	85,48 ^a (0,78)	11,42 ^a (0,81)	1,59 ^b (0,17)	86,99 ^b (0,83)
<i>Libanothamnus neriifolius</i>	2800	195,60 ^f (9,40)	79,77 ^a (4,21)	7,49 ^b (0,43)	3,38 ^a (0,26)	89,12 ^{ab} (0,58)
	3000	172,44 ^e (6,48)	59,28 ^c (1,15)	8,25 ^{ab} (0,23)	4,61 ^a (0,25)	88,40 ^b (0,33)
	3150	130,10 ^d (6,55)	37,40 ^d (2,00)	8,17 ^{ab} (0,22)	3,66 ^a (0,36)	88,17 ^b (0,42)
<i>Miconia jahnii</i>	3000	27,78 ^c (1,46)	66,01 ^b (0,69)	5,58 ^c (0,12)	2,53 ^b (0,16)	91,89 ^a (0,21)
	3150	32,12 ^c (2,54)	58,52 ^c (0,58)	6,87 ^{bc} (0,22)	2,21 ^b (0,19)	90,93 ^a (0,37)

Intercambio de gases

Los valores de intercambio de gases en campo obtenidos para las diferentes especies se presentan en el cuadro 4.3. En el mismo se puede apreciar un aumento de las tasas de asimilación de CO₂ en todas las especies con el aumento de altitud. Sin embargo, este aumento solo es significativo para la especie *L. neriifolius* si comparamos los extremos del gradiente entre los 2800 y 3150 m de altitud. La especie *L. neriifolius* es la que presenta mayores A, en las localidades de mayor altitud aún cuando la temperatura sea la más baja en

esta especie a esta altitud. Es necesario aclarar que los valores presentan diferencias que pueden ser causadas parcialmente por las diferencias en temperaturas foliares en las diferentes altitudes.

En relación a la respiración en la oscuridad, no puede establecerse un patrón claro, referido a la altitud o a las especies. Estos valores no presentan diferencias significativas para las diferentes especies a las diferentes altitudes. En cualquier caso se puede observar una tasa constante en el caso de *D. venezuelense* y un ligero aumento en el caso de *M. jahnii*. Finalmente, un valor máximo a mediana altitud en *L. neriifolius*, donde se produjo la mayor variación térmica.

La disminución observada en los valores de transpiración con la altitud, pueden deberse igualmente a la variación del DPV por la disminución de la temperatura presentada entre las altitudes ($p \leq 0,01$), con lo cual se produciría una disminución del DPV en altitud y por ende notándose una disminución de las tasas de transpiración. Se debe hacer notar que existen diferencias significativas en las temperaturas a las diferentes altitudes.

Respuesta de la Asimilación de CO₂ a Densidad de Flujo Fotónico Fotosintético y la temperatura.

Tal como se planteó en la metodología, se utilizaron dos métodos para estudiar la relación entre la tasa de asimilación de CO₂ y la densidad de flujo fotónico fotosintético (DFFF). En la figura 4.2 se presentan los resultados de las curvas de respuesta de la fotosíntesis a la DFFF bajo los dos métodos de estimación en dos de las especies estudiadas. Se puede apreciar que ambos métodos permiten hacer una estimación muy similar de los parámetros de estas curvas.

Las ventajas que presenta el análisis a través de los estudios de fluorescencia, en comparación con el de mediciones por intercambio de gases, entre las que cabe destacar que al trabajar a bajas temperaturas se evitan los problemas relacionados con la condensación de vapor de agua en los elementos infrarojos de análisis, así como las características técnicas del control de temperatura, factor importante en el estudio de las tasas de asimilación de CO₂ (A), así como

la mayor cantidad de réplicas realizadas, favorecieron la utilización de esta metodología para el análisis de las curvas de DFFF y A.

Cuadro 4.3: Valores de intercambio de gases medidos en campo, entre las 9:00 y 11:00 h, para las cuatro especies a las tres altitudes (Alt). A_{sat} : Asimilación de CO_2 en relación al área foliar ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bajo condiciones de DFFF saturante entre 1000 y 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; A_{mas} : Asimilación de CO_2 en relación a masa ($\text{nmol g}^{-1} \text{s}^{-1}$) de hoja bajo condiciones de DFFF saturante entre 1000 y 1500; R_d : Respiración en la oscuridad ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); G_s : Conductancia estomática a DFFF saturante ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); E: Tasa de transpiración a DFFF saturante ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); T_l : temperatura foliar media ($^{\circ}\text{C}$); T_a : temperatura media del aire ($^{\circ}\text{C}$) al momento de realizar las mediciones. Diferencias estadísticas entre especies y altitudes (Superíndice alfanumérico) grupos de Tukey. Análisis de Kruskal Wallis ($\alpha \leq 0,05$).

Especie	Alt	Asat	Amas	rd	gs	E	Tl	Ta
Diplostephium venezuelense	3000	15,70 ^b (0,67)	99,44 ^a (6,10)	-2,70 ^c (0,46)	443,80 ^a (33,42)	2,54 ^a (0,16)	18,76 ^a (0,23)	19,13 ^a (0,41)
	3200	16,70 ^b (1,15)	121,13 ^a (9,83)	-2,68 ^c (0,32)	315,27 ^b (31,75)	1,51 ^b (0,07)	16,97 ^b (0,35)	16,57 ^b (0,71)
Gynoxys meridana	3200	18,18 ^b (0,75)	147,79 ^a (10,43)	-1,42 ^b (0,24)	432,58 ^a (29,15)	2,01 ^a (0,14)	16,84 ^b (0,35)	17,85 ^{ab} (0,61)
Libanothamnus neriifolius	2800	14,87 ^{bc} (1,64)	118,63 ^a (13,08)	-1,26 ^b (0,44)	353,36 ^{ab} (24,01)	2,33 ^a (0,16)	18,66 ^a (0,75)	19,22 ^a (0,98)
	3000	18,61 ^b (1,06)	108,28 ^b (7,07)	-1,38 ^b (0,43)	416,91 ^a (39,91)	1,98 ^a (0,13)	16,57 ^b (0,28)	16,64 ^b (0,50)
	3150	21,71 ^a (1,19)	79,17 ^c (4,70)	-0,84 ^a (0,20)	526,46 ^a (15,22)	1,72 ^b (0,10)	14,73 ^c (0,40)	14,86 ^c (0,47)
Miconia jahnii	3000	13,23 ^c (0,51)	88,85 ^c (4,67)	-0,30 ^a (0,05)	422,27 ^a (22,22)	2,07 ^a (0,15)	16,93 ^b (0,57)	17,37 ^{ab} (0,44)
	3150	13,97 ^c (0,54)	82,80 ^c (3,50)	-2,41 ^c (0,34)	509,60 ^a (38,14)	1,94 ^a (0,10)	15,94 ^b (0,40)	16,23 ^b (0,50)

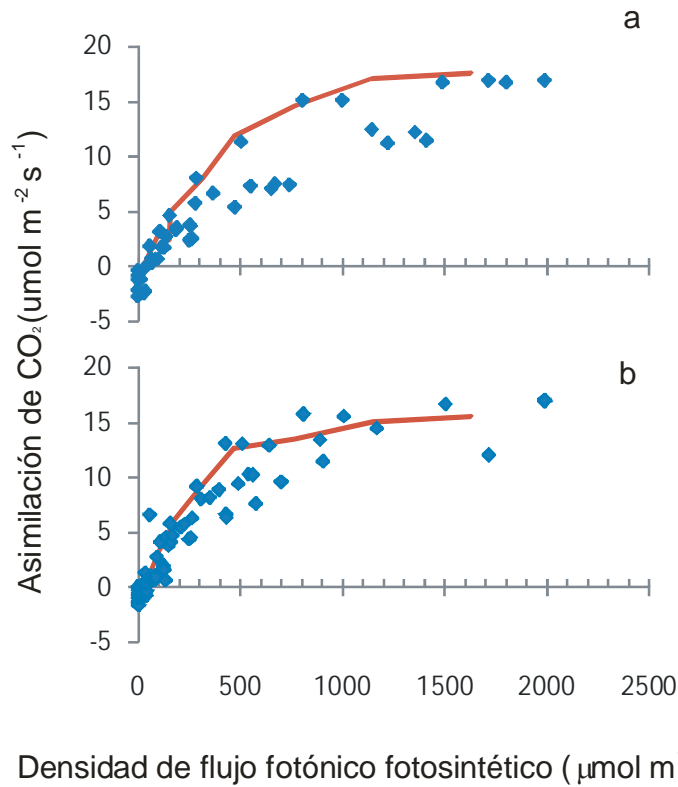


Figura 4.2: Curvas de Asimilación vs densidad de flujo fotónico fotosintético, para las especies (a) *Miconia jahnii* y (b) *Libanothamnus neriifolius*, bajo los dos sistemas de medición. (♦) Mediciones hechas con los analizadores Infrarojos de Gases, (—) Mediciones estimadas con las tasas de transporte de electrones y las ecuaciones obtenidas por regresión lineal (Cuadro 4.4).

En el cuadro 4.5 se presentan los valores obtenidos con las curvas realizadas por la estimación de las tasas de asimilación vía transporte de electrones. Similar a los valores obtenidos en campo, las tasas de asimilación máxima presentan un aumento en función de la altitud, cuando se realiza el análisis en función de la superficie foliar. Los valores del punto de compensación a la luz, así como los valores del punto de saturación, aumentan con la altitud. Sin embargo, al comparar las tasas de asimilación en función de la masa foliar, el patrón se invierte, mostrando en términos generales que las plantas disminuyen su eficiencia de fijación de carbono con la altitud, siendo invariable

en el caso de *D. venezuelense*. Las tasas de respiración en la oscuridad y la eficiencia cuántica no siguen un patrón específico, tal como sucedía con los valores de campo.

Cuadro 4.4: Ecuaciones y ajustes para las regresiones lineales obtenidas entre las tasas de asimilación y las tasas de transporte de electrones para las diferentes especies y altitudes ($p \leq 0,01$, para todos los ajustes).

Especie	Altitud (m)	Ecuación de regresión	R ²
<i>Diplostegium venezuelense</i>	3000	$y = 0,0941x - 0,7342$	0,9246
	3200	$y = 0,1579x - 2,269$	0,9721
<i>Gynoxis meridana</i>	3200	$y = 0,1245x - 1,2948$	0,8945
<i>Libanothamnus neriifolius</i>	2800	$y = 0,1082x - 1,1871$	0,9686
	3000	$y = 0,1273x - 1,0481$	0,8771
	3100	$y = 0,1264x - 1,0879$	0,9879
<i>Miconia jahnii</i>	3000	$y = 0,149x - 1,4643$	0,9008
	3100	$y = 0,1188x - 2,6436$	0,9132

Efecto de la temperatura foliar sobre las tasas de Asimilación de CO₂. En la figura 4.4, se presenta de forma gráfica la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura. Los datos corresponden a la estimación de los valores de la asimilación por medio de las mediciones de transporte de electrones, mediante este método se logró realizar mediciones a temperaturas de hasta 5 °C. Se siguió para esto el mismo protocolo que en el caso anterior, realizando las mediciones de transporte de electrones para luego calcular las tasas de asimilación de CO₂, a través de las ecuaciones de regresión obtenidas de la comparación entre ETR y A (Cuadro 4.4 y figura 4.3), apreciando una respuesta similar bajo los dos métodos de medición.

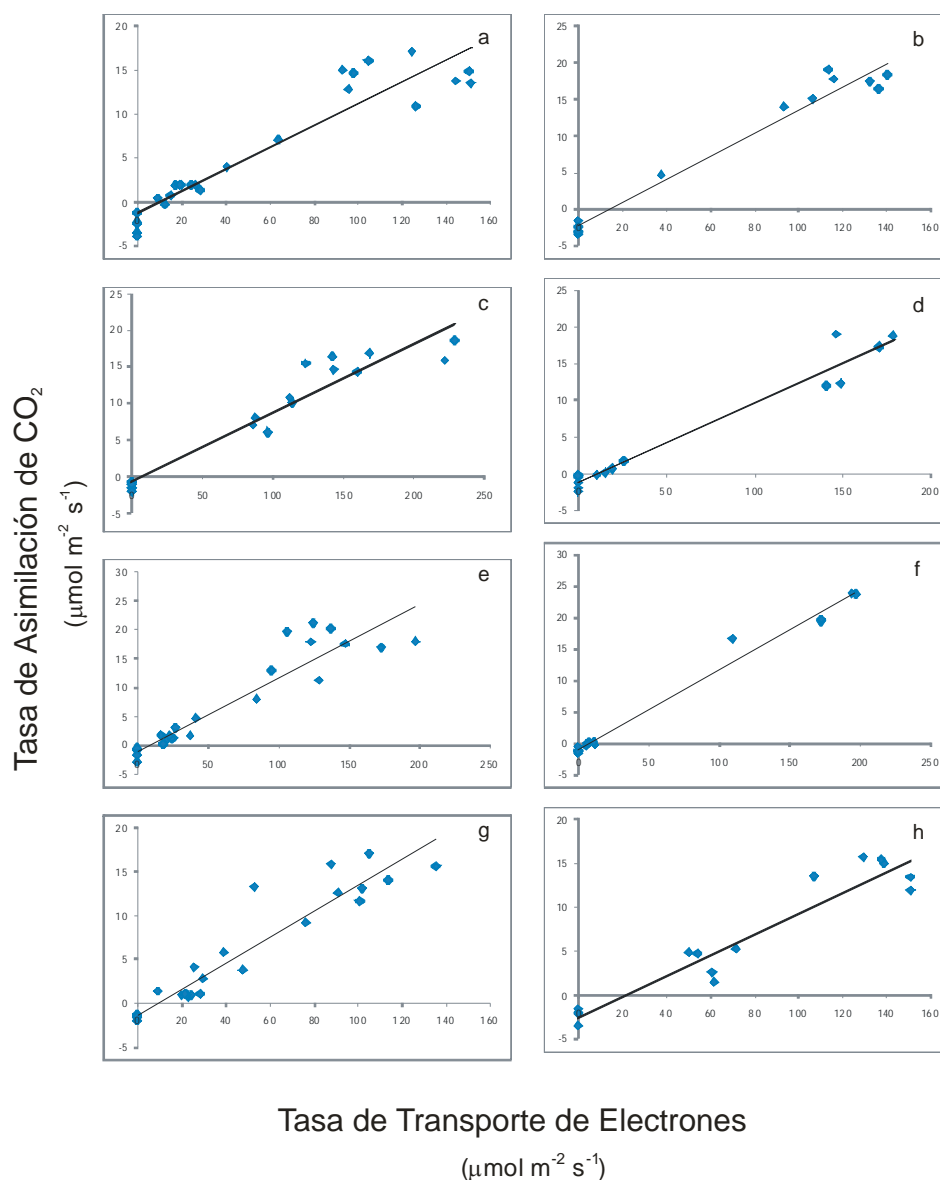


Figura 4.3: Relación entre tasa de transporte de electrones y Asimilación de CO₂ para las cuatros especies a las diferentes altitudes. (a) *Diplostegium venezuelense* a 3000 m y (b) *Diplostegium venezuelense* a 3200 m. (c) *Miconia jahnii* a 3000 m y (d) *Miconia jahnii* a 3150 m. (e) *Gynoxys meridanus* a 3200 m. (f) *Libanothamnus neriifolius* a 2800 m. (g) *Libanothamnus neriifolius* a 3000 m. (h) *Libanothamnus neriifolius* a 3150 m, en el Páramo de San José ($p \leq 0,01$, para todos los ajustes).

Se ajustaron para la estimación de los parámetros de las curvas asimilación vs. temperatura, ecuaciones parabólicas, ajuste más utilizado en este tipo de análisis. Los resultados de estos ajustes se presentan en el Cuadro 4.6 y la Figura 4.4.

Cuadro 4.5: Parámetros de las curvas Asimilación de CO₂ vs Densidad de Flujo Fotónico Fotosintético para las cuatro especies a las diversas altitudes (m) en las que se colectó el material en condiciones de temperatura óptima entre 18 y 22 ° C. A_{max}: Asimilación de CO₂ en condiciones de luz saturante (μmol m⁻² s⁻¹); R_d: Respiración en la oscuridad (μmol m⁻² s⁻¹); EQ:Eficiencia cuántica; PCL: Punto de Compensación a la luz (μmol m⁻² s⁻¹); PSAT: Punto de Saturación a la luz (μmol m⁻² s⁻¹); A_{maxm}: Asimilación máxima en función de la masa foliar (nmol g⁻¹ s⁻¹). Diferencias estadísticas (Superíndice alfanumérico) Análisis de Kruskal Wallis (α ≤ 0,05).

Especie	Alt	Rd	Amax	Amaxm	EQ	PCL	PSAT
<i>Diplostegium venezuelense</i>	3000	-2,21 (0,40)	15,84 ^{bc} (0,84)	101,47 ^c (5,37)	0,041 ^a (0,001)	31,40 ^c (0,25)	597,80 ^b (35,75)
	3200	-2,62 (0,33)	16,79 ^b (0,81)	121,75 ^b (5,89)	0,038 ^a (0,001)	41,23 ^b (4,63)	590,00 ^b (49,3)
<i>Gynoxys meridana</i>	3200	-1,40 (0,23)	17,22 ^{ab} (0,94)	147,22 ^a (8,04)	0,032 ^{ab} (0,003)	27,19 ^c (2,28)	522,00 ^{bc} (32,9)
<i>Libanothamnus neriifolius</i>	2800	-1,25 (0,44)	16,30 ^{bc} (1,40)	130,05 ^b (11,1)	0,029 ^b (0,004)	38,88 ^{bc} (1,97)	672,60 ^a (26,3)
	3000	-1,88 (0,32)	18,04 ^{ab} (1,14)	106,91 ^b (6,75)	0,029 ^b (0,002)	37,16 ^{bc} (2,02)	624,40 ^a (28,7)
	3150	-1,19 (0,29)	20,55 ^a (1,12)	76,86 ^d (4,20)	0,036 ^{ab} (0,003)	41,91 ^b (1,69)	708,60 ^a (16,4)
<i>Miconia jahni</i>	3000	-2,45 (0,53)	13,74 ^c (0,64)	90,7 ^c (14,24)	0,043 ^a (0,003)	35,07 ^{bc} (2,34)	508,00 ^c (39,7)
	3150	-2,55 (0,40)	14,49 ^c (0,61)	84,78 ^c (3,56)	0,030 ^{ab} (0,002)	73,24 ^a (1,17)	552,20 ^{bc} (26,3)

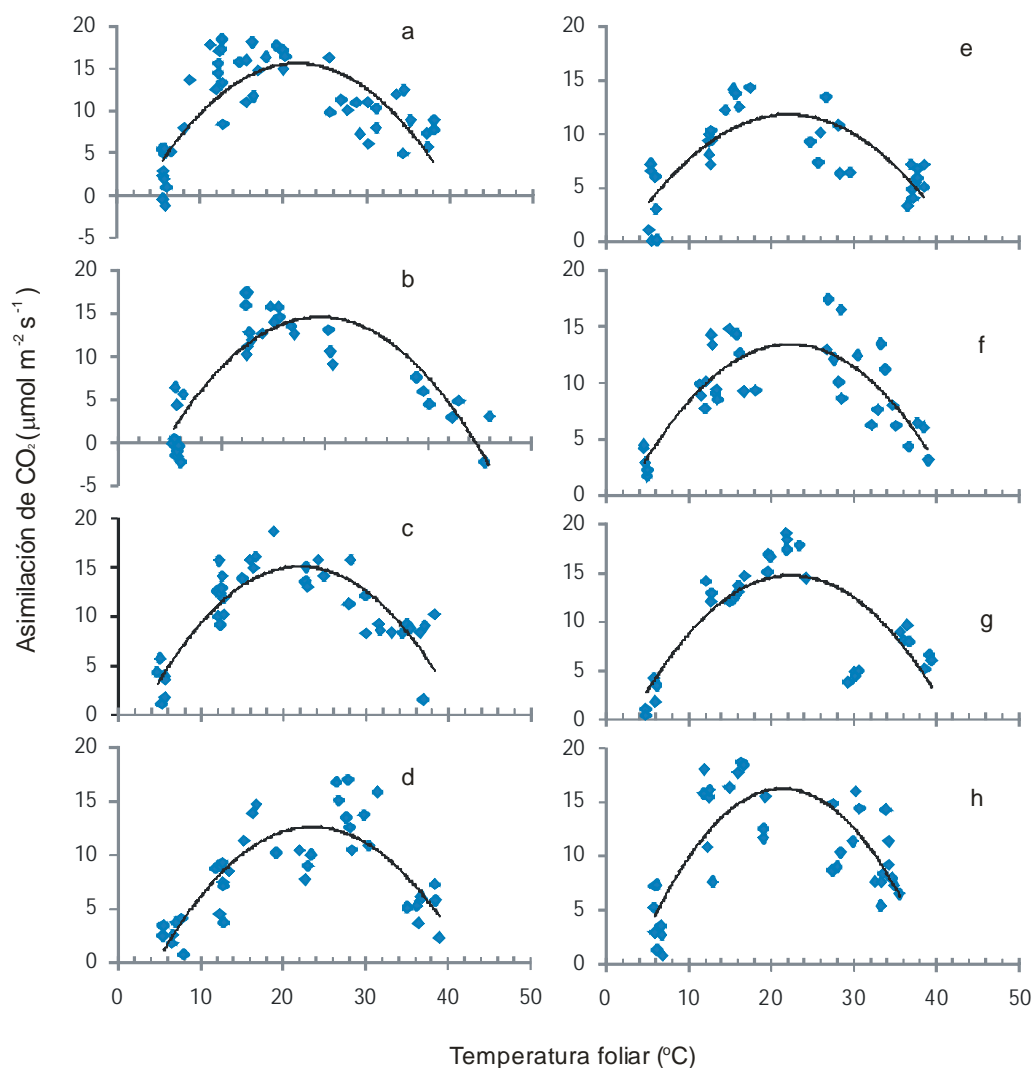


Figura 4.4: Relación entre temperatura foliar y Asimilación para las cuatro especies a las diferentes altitudes. (a) *Diplostegium venezuelense* a 3000 m ($r^2=0,603$; $p<0,01$) y (b) *Diplostegium venezuelense* a 3200 m. ($r^2=0,758$; $p<0,01$) (c) *Miconia jahnii* a 3000 m ($r^2=0,742$; $p<0,01$) (d) *Miconia jahnii* a 3150 m. ($r^2=0,666$; $p<0,01$) (e) *Gynoxys meridanus* a 3200 m. ($r^2=0,595$; $p<0,01$) (f) *Libanothamnus neriifolius* a 2800 m. ($r^2=0,661$; $p<0,01$) (g) *Libanothamnus neriifolius* a 3000 m. ($r^2=0,626$; $p<0,01$) y (h) *Libanothamnus neriifolius* a 3150 m ($r^2=0,578$; $p<0,01$), en el Páramo de San José.

Todas las especies presentan un óptimo para la fotosíntesis en valores cercanos a los 20 °C, con una ligera disminución de las mismas con la altitud. Sin embargo, es notorio que el ajuste parabólico no es el más apropiado, ya que se producen por un lado valores de asimilación mayores a temperaturas más bajas en muchas de las curvas y un límite abrupto a los 5 °C que no puede ser descrito por medio de estas funciones parabólicas.

Todas las especies presentan una amplitud térmica de aproximadamente 20 °C, en los cuales ocurre el 75% de la tasas de asimilación. Con respecto al punto de compensación térmico a baja temperatura, las especies presentan valores cercanos a los 2°C. Sin embargo, en las gráficas se puede apreciar que en la mayoría de los casos se presentan una disminución muy abrupta cercana a los 5 °C.

Cuadro 4.6: Valores de las curvas de Asimilación vs Temperatura en condiciones de DFFF saturante, no inhibitoria. Alt: Altitud (m); T_{Opt} : Temperatura óptima para la asimilación de CO₂ (°C); Amplitud térmica donde se produce el 75% de las tasas máximas de asimilación (°C); PCL min: Punto de compensación a bajas temperaturas; PCL max: Punto de compensación a altas temperaturas.

Especie	Alt	T_{Opt}	Amplitud térmica 75% Asimilación		PCL min	PCL max
Gynoxys meridana	3200	22,1	11,9	32,3	1,8	42,4
Diplostephium venezuelense	3000	21,8	12,3	31,2	2,9	40,7
	3200	19,6	12,1	27,1	4,5	34,7
Libanothamnus neriifolius	2800	22,5	12,5	32,5	2,4	42,6
	3000	22,5	12,8	32,1	3,1	41,8
	3150	21,6	12,7	30,4	3,9	39,3
Miconia jahnii	3150	23,6	14,2	33,0	4,7	42,5
	3000	22,1	12,4	31,8	2,7	41,5

Fluorescencia de la clorofila a y fotoinhibición.

Las mediciones de fluorescencia máxima de la clorofila a se presentan en el cuadro 4.7, en el mismo puede apreciarse que los valores de Fv/Fm se mantienen estables indistintamente de la temperatura de almacenamiento. Este patrón no se mantiene para las distintas temperaturas en las que se realizaron las mediciones de ETR, notándose una disminución en las mediciones realizadas a 5 °C en todas las especies y una disminución en *L. neriifolius* y *M. jahnii* para temperaturas superiores a los 30° C, con un más acentuado efecto en las plantas ubicadas a mayor altitud. Las especies muestran un comportamiento diferencial, siendo *M. jahnii* la especie que presenta los menores valores de Fv/Fm. *D. venezuelense* y *G. meridana* muestran los valores más altos de esta variable.

En el cuadro 4.8 se presentan los valores de fluorescencia de la clorofila a temperaturas (18 y 22 °C) y radiaciones (800 y 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) óptimas para las diferentes especies y altitudes. Las mismas siguen el mismo patrón hasta ahora presentados. Se nota que las plantas se recuperaron en el proceso de rehidratación en la oscuridad, evidenciado en los valores más altos de Fv/Fm. También se observa en estos datos un patrón de variación en los cuales las especies de mayor altitud (*D. venezuelense* y *G. meridana*) presentan los valores más elevados de Fv/Fm. Se presentan también diferencias marcadas altitudinalmente en las dos especies típicamente de bosque (*L. neriifolius* y *M. jahnii*), presentando ambas especies una disminución de Fv/Fm con la altitud.

Los valores de ETR siguen el mismo patrón que el presentado por las tasas de asimilación de CO₂ en función de la masas foliar, disminuyendo la capacidad de las plantas con la altitud en todas las especies. qP y qN se mantienen invariables en todas las especies con la altitud.

Cuadro 4.7: Valores de Fluorescencia de clorofila a máxima (Fv/Fm) para diferentes temperaturas de almacenamiento y de medición (-2 y 10 °C corresponden a temperaturas de almacenamiento y el resto a temperaturas de medición). Se presenta el error estandar entre paréntesis, las diferencias estadísticas entre temperaturas a una misma altitud de la misma especie con los subíndices alfanuméricos. Análisis de Kruskal Wallis ($\alpha \leq 0,05$).

Especie	Alt	FV/FM a diversas Temperaturas (°C)					
		-2	10	5	12	20	35
<i>Diplostegium venezuelense</i>	3000	0,810 ^a (0,005)	0,828 ^a (0,002)	0,780 ^b (0,041)	0,811 ^a (0,008)	0,800 ^a (0,014)	0,808 ^a (0,010)
	3200	0,824 ^a (0,004)	0,81 ^a (0,005)	0,792 ^b (0,011)	0,800 ^a (0,011)	0,785 ^a (0,012)	0,763 ^b (0,020)
<i>Gynoxys meridana</i>	3200	0,814 ^a (0,008)	0,834 ^a (0,002)	0,760 ^b (0,017)	0,800 ^a (0,011)	0,797 ^a (0,004)	0,792 ^a (0,006)
<i>Libanothamnus neriifolius</i>	2800	0,806 ^a (0,005)	0,834 ^a (0,002)	0,762 ^b (0,012)	0,807 ^a (0,016)	0,796 ^a (0,011)	0,761 ^b (0,008)
	3000	0,820 ^a (0,003)	0,812 ^a (0,007)	0,750 ^b (0,009)	0,772 ^a (0,015)	0,778 ^a (0,014)	0,757 ^b (0,009)
	3150	0,798 ^a (0,012)	0,826 ^a (0,006)	0,776 ^b (0,016)	0,797 ^a (0,006)	0,791 ^a (0,008)	0,775 ^b (0,012)
<i>Miconia jahnii</i>	3000	0,816 ^a (0,002)	0,796 ^a (0,007)	0,774 ^b (0,021)	0,793 ^a (0,018)	0,790 ^a (0,003)	0,778 ^b (0,004)
	3150	0,782 ^a (0,013)	0,782 ^a (0,010)	0,728 ^b (0,016)	0,783 ^a (0,016)	0,786 ^a (0,007)	0,772 ^b (0,013)

Los resultados de las mediciones de fluorescencia de la clorofila a en campo se presentan en el Cuadro 4.9, en los mismos pueden apreciarse patrones más claros con respecto a los diferentes parámetros. Los mismos fueron obtenidos con valores saturantes de DFFF (750 y 1500) y temperaturas dentro del rango de los valores aceptables para las diferentes especies (>12°C).

En estos valores de Fv/Fm se nota un disminución con respecto a los obtenidos en laboratorio para todas las especies, consecuencia, posiblemente, de

procesos de cierre de centros receptores por causa de pequeñas DFFF (entre 50 y 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) por la hora de medición o problemas de déficit hídrico leve que suelen ser más importantes con la altitud, tal como se menciona en el capítulo anterior.

Cuadro 4.8: Valores de las curvas de fluorescencia de la clorofila. Alt: Altitud; Fv/Fm: Eficiencia cuántica máxima; ETR: Tasa de transporte de electrones; Yield: Eficiencia cuántica PS II; qP: Disipación fotoquímica; qN: disipación no fotoquímica. Valores obtenidos a 20°C y DFFF entre 900 y 1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Error estandar entre parentesis, significancia estadística en superíndice alfanumérico ($p \leq 0,01$). Anova de una via para Fv/Fm y Kruskal Wallis para ETR.

Especie	Alt	Fv/Fm	Yield	ETR	qP	qN
<i>Diplostephium venezuelense</i>	3000	0,813 ^a (0,004)	0,27 (0,03)	138,44 ^a (5,82)	0,47 (0,04)	0,81 (0,02)
	3200	0,794 ^a (0,005)	0,22 (0,02)	110,15 ^{bc} (3,84)	0,42 (0,03)	0,85 (0,01)
<i>Gynoxys meridana</i>	3200	0,783 ^{ab} (0,006)	0,25 (0,03)	127,18 ^a (6,94)	0,46 (0,05)	0,84 (0,01)
<i>Libanothamnus neriifolius</i>	2800	0,795 ^{ab} (0,006)	0,23 (0,03)	113,43 ^b (6,15)	0,41 (0,05)	0,81 (0,02)
	3000	0,768 ^b (0,008)	0,22 (0,04)	99,22 ^c (3,73)	0,40 (0,05)	0,81 (0,03)
	3150	0,775 ^b (0,003)	0,25 (0,03)	96,58 ^c (6,05)	0,43 (0,05)	0,80 (0,02)
<i>Miconia jahnii</i>	3000	0,783 ^{ab} (0,008)	0,25 (0,06)	111,27 ^b (2,62)	0,38 (0,06)	0,83 (0,01)
	3150	0,759 ^c (0,010)	0,17 (0,03)	107,68 ^c (5,39)	0,41 (0,04)	0,85 (0,01)

Tal como se observa en los resultados de las tasas de asimilación en función de la masas foliar, las ETR presentan una disminución con respecto a la altitud, salvo para la especie *D. venezuelense* en la que se aprecia un aumento de esta tasa. Contrario a lo ocurrido en el laboratorio los datos obtenidos de q_p muestran una variación con respecto a la altitud, posiblemente causada por las variaciones térmicas en las que fueron realizadas las mediciones. Sin embargo para los valores de q_n no se encuentran diferencias.

Cuadro 4.9: Valores de fluorescencia obtenidos en el campo. Alt: Altitud (m);; ETR: Tasa de transporte de electrones; Yield: Eficiencia cuántica; q_p : Disipación fotoquímica; q_n : Disipación no fotoquímica; T: Temperatura foliar (°C) y Fv/Fm: Eficiencia cuántica máxima. Diferencias estadísticas (Superíndice alfanumérico) Análisis de Kruskal Wallis ($\alpha \leq 0,05$).

Especie	Alt	Fv/Fm	ETR	Yield	q_p	q_n	TI
<i>Diplostephium venezuelense</i>	3000	0,793 ^a (0,004)	87,58 ^c (7,44)	0,13 ^c (0,012)	0,13 ^b (0,012)	0,89 (0,015)	14,25 ^b (0,26)
	3200	0,800 ^a (0,003)	118,08 ^b (8,40)	0,31 ^a (0,029)	0,24 ^a (0,022)	0,86 (0,011)	16,03 ^a (0,20)
<i>Gynoxys meridana</i>	3200	0,777 ^b (0,009)	132,33 ^b (7,84)	0,29 ^a (0,031)	0,29 ^a (0,031)	0,89 (0,008)	15,45 ^a (0,34)
<i>Libanothamnus neriifolius</i>	2800	0,754 ^b (0,004)	168,73 ^a (12,74)	0,30 ^a (0,020)	0,30 ^a (0,020)	0,82 (0,005)	13,92 ^b (0,17)
	3000	0,781 ^a (0,010)	116,53 ^b (7,64)	0,19 ^{bc} (0,013)	0,19 ^{ab} (0,013)	0,86 (0,014)	14,90 ^b (0,24)
	3150	0,742 ^{bc} (0,006)	96,00 ^c (12,02)	0,15 ^c (0,019)	0,15 ^b (0,019)	0,81 (0,022)	14,80 ^b (0,17)
<i>Miconia jahnii</i>	3000	0,757 ^b (0,004)	135,70 ^b (8,30)	0,14 ^c (0,013)	0,14 ^b (0,013)	0,75 (0,011)	12,65 ^c (0,11)
	3150	0,732 ^c (0,005)	89,50 ^c (6,65)	0,22 ^b (0,014)	0,22 ^a (0,014)	0,82 (0,023)	15,53 ^a (0,60)

En la figura 4.5 se presentan las tasas de asimilación de CO₂ en función de los dos factores considerados en el análisis (temperatura y DFFF). Se puede notar que existen procesos de fotoinhibición en todas las especies por encima de los 2000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ valores conseguidos en días despejados tanto en la localidad de La Aguada en el Proyecto LEAF, como en la localidad de San José. Se evidencia una disminución en las tasas de asimilación estimada hasta valores negativos en algunos casos. Analizando de forma conjunta los dos factores, se puede notar que todas las especies presentan un proceso de fotoinhibición directamente relacionado con la temperatura, tanto a bajas (no congelantes) como a altas temperatura.

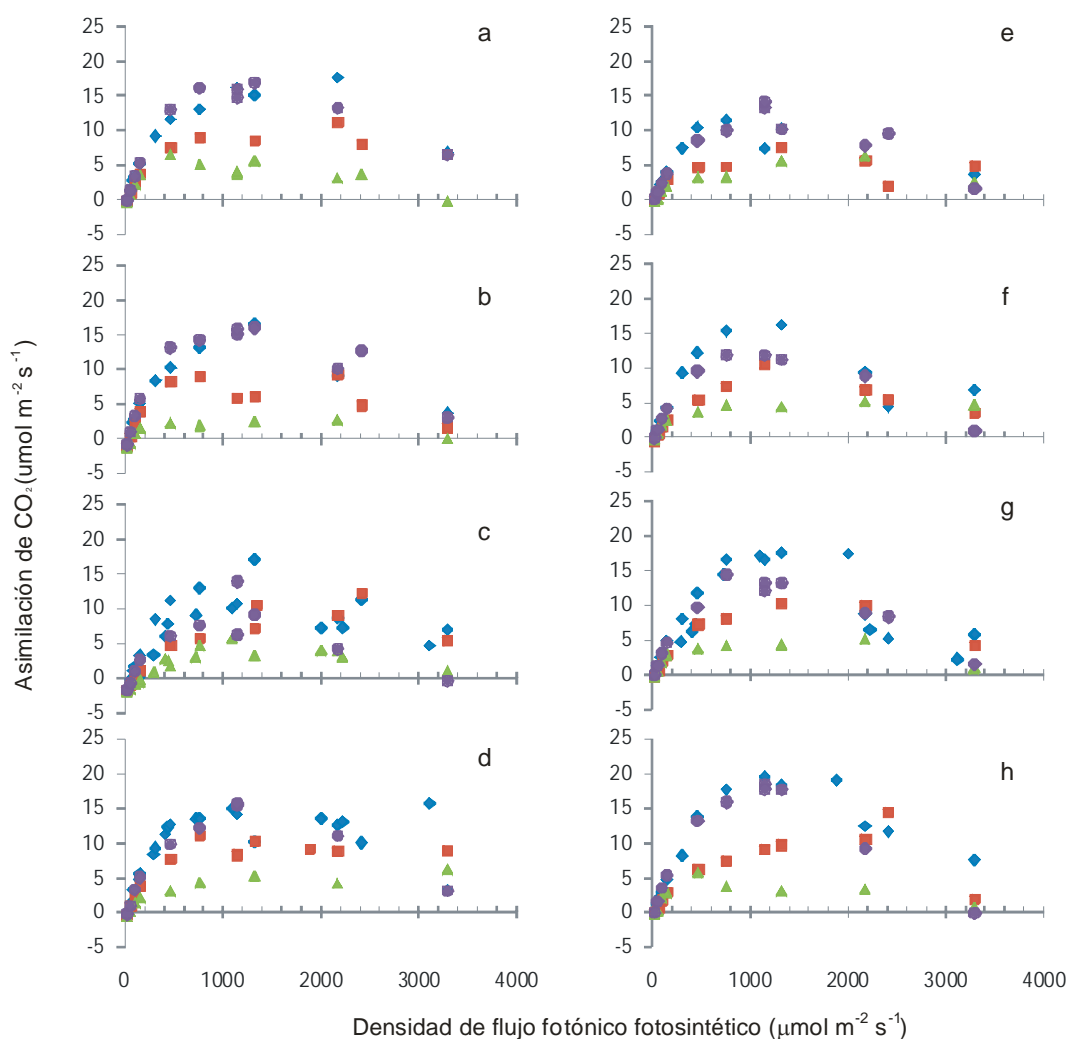


Figura 4.5: Respuesta de la Asimilación de CO_2 calculada por transporte de electrones a diferentes regímenes de luz y temperatura foliar para las cuatro especies a las diferentes altitudes. (a) *Diplostegium venezuelense* a 3000 m y (b) *Diplostegium venezuelense* a 3200 m. (c) *Miconia jahnii* a 3000 m y (d) *Miconia jahnii* a 3150 m. (e) *Gynoxys meridanus* a 3200 m. (f) *Libanothamnus neriifolius* a 2800 m, (g) *Libanothamnus neriifolius* a 3000 m y (h) *Libanothamnus neriifolius* a 3150 m, mediciones realizadas en laboratorio con material colectado en el Páramo de San José. (Δ) 5°C (\bullet) 12°C (\blacklozenge) 20°C (\blacksquare) 30°C .

Respiración nocturna Foliar

En la figura 4.6 se puede apreciar la disminución de la respiración en el transcurso de la noche para *D. venezuelense*, única especie en la que fue posible realizar estas mediciones. La clara disminución apreciada puede deberse a la disminución de la temperatura en horas de la madrugada, o a la disminución en las necesidades de utilización de energía para procesos de reparación de estructuras foliares. Adicionalmente, se aprecia una mayor tasa de respiración en las plantas medidas a mayor altitud, lo cual sugiere que dichas plantas requieren mayor energía para su sobrevivencia.

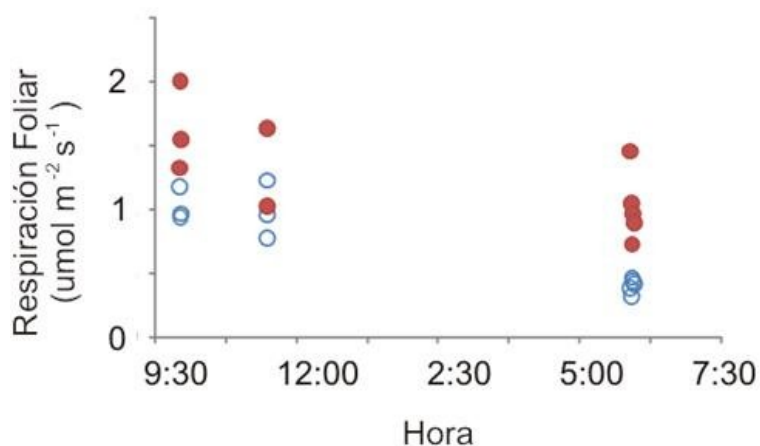


Figura 4.6: Variación de la respiración en *Diplostephium venezuelense* en la estación La Aguada. (○) 3400 y (●) 3500 m.

Temperatura y radiación en el límite de crecimiento.

En el cuadro 4.10 y en la figura 4.7 se observan los valores de la temperatura y la radiación para las diferentes altitudes del gradiente altotérmico estudiado en el marco del proyecto LEAF. Aunque estos valores no fueron obtenidos en el páramo de San José, las especies estudiadas si se encuentran en la estación La Aguada, en el límite de crecimiento arbóreo estudiado en esta otra localidad.

Se evidencia en el patrón de variación térmica y de radiación que ambos factores se encuentran en el límite de tolerancia de las cuatro especies

estudiadas, para el cálculo de las horas efectivas se utilizaron las temperaturas promedio de cada hora en los dos meses, obtenidas durante dos años de medición, y descartando aquellas horas en las que la temperatura era inferior a 5° C, y las radiaciones superiores a 1800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obteniendo como horas efectivas las horas en las cuales se cumplían estas dos condiciones. Queda claro que aún cuando se consideren las horas efectivas, las mismas no están dentro de los óptimos de las especies para la adquisición de CO_2 . Se puede notar en cualquier caso que se produce una disminución de más de un 10 % en las horas efectivas en el mes de febrero si se comparan las dos altitudes extremas.

Cuadro 4.10: Valores promedios (errores estandar), Temperatura promedio del mes de febrero ($^{\circ}\text{C}$)(Tfeb), Densidad de flujo fotónico fotosintético diaria máxima promedio para el mes de febrero ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (DFFFfeb), Horas efectivas porcentuales para el mes de febrero (%) (H%F), Temperatura promedio del mes de octubre ($^{\circ}\text{C}$) (Toct), Densidad de flujo fotónico fotosintético diario máximo promedio para el mes de octubre ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)(DFFFoct), Horas efectivas porcentuales para el mes de octubre (%) (H%O), para las estaciones en las cuatro altitudes de la transecta 2 del Proyecto LEAF, ubicadas en las cercanías de la Estación la Aguada del Sistema Teleférico de Mérida.

Altitud	Tfeb	DFFFfeb	H%F	Toct	DFFFoct	H%O
3250	7,46 (0,12)	1025,82 (74,67)	79,76	7,58 (0,09)	1321,82 (98,42)	88,89
3350	8,15 (0,09)	1241,13 (73,16)	69,09	8,87 (0,05)	1788,24 (74,52)	90,32
3450	7,92 (0,09)	1410,71 (69,75)	64,10	8,77 (0,05)	1823,93 (69,22)	87,27
3550	7,25 (0,08)	1608,41 (77,09)	59,10	7,95 (0,04)	1808,78 (65,49)	86,29

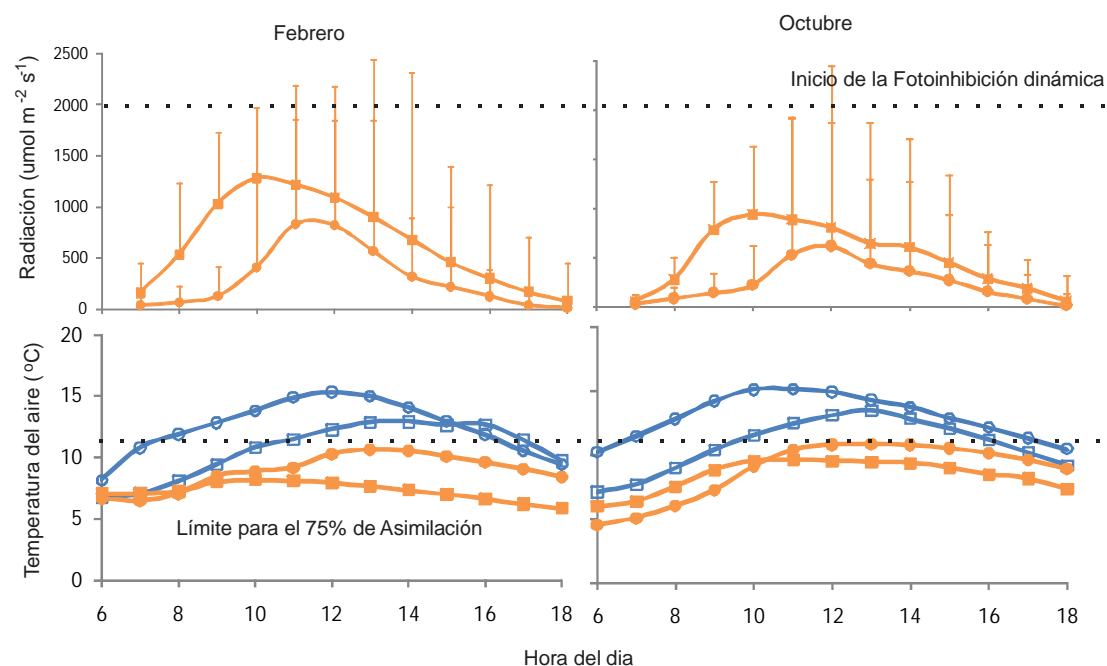


Figura 4.7: Cursos diarios promedios de temperatura (°C) y densidad de flujo fotónico fotosintético ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para el mes más seco (febrero) y el mes más húmedo (octubre) Simbolos cerrados Transecta 2 del Proyecto LEAF ubicadas en las cercanías de la Estación la Aguada del Sistema Teleférico de Mérida Simbolos abiertos localidad de San José del Sur (○) 2800 m de altitud borde de bosque (□) 3100 m de altitud dentro del límite de crecimiento, (▪) 3550 m de altitud paramo abierto (●) 3250 m de altitud del bosque.

DISCUSIÓN

Las especies, en general, presentan una serie de adaptaciones las cuales les permiten mantener condiciones favorables para su subsistencia. En el caso de las especies estudiadas, cabe mencionar entre estas adaptaciones, las variaciones morfo-anatómicas como son el aumento de los valores de reflexión, y la variación del AFE. Esto se corresponde con otras publicaciones

en zonas tropicales y extratropicales (Reich et al., 1992; Reich et al., 1999; Choler, 2005; Lee et al., 2005; Levizou, 2005; Castrillo, 2006; Molina-Montenegro, 2008), en las que se muestra una disminución del AFE con la altitud, así como una modificación de las propiedades del indumento foliar. Trabajos realizados en los Andes venezolanos muestran que los menores valores de AFE se presentan en los estadios tardíos dentro de la sucesión (LLambí et al., 2003), particularmente en especies de rosetas caulescentes, especies leñosas típicas de zonas alti-montanas tropicales, y tal como sugieren muchos autores una de las formas de vida más eficientes en la alta montaña tropical a nivel mundial.

Tal como se presentan los resultados de este trabajo, los valores de AFE tendrán una mayor variación causada por las condiciones ambientales en las que se desarrollan las plantas y la capacidad de estas especies a responder a los cambios ambientales, más que a variaciones causadas por otros factores (estadios sucesionales). En este sentido plantas de hojas más gruesas y pequeñas, como en las especies de los ambientes boscosos, generan una variación mayor de las hojas (*L. neriifolius* y *M. jahnii*), y especies más adaptadas a condiciones más abiertas en el páramo muestran una poca o nula variación altitudinal en este parámetro. Se puede destacar el aumento de AFE con la altitud en *D. venezuelense*, lo que sugiere que el estrés producido a mayores altitudes es compensado por otros mecanismos, es importante mencionar que esta especie, se puede presentar en altitudes superiores a las estudiadas en este trabajo, sería necesario corroborar que a altitudes mayores, donde el estrés térmico y lumínico se ven acentuados esta especie no disminuya su AFE.

Hojas de baja AFE han sido consideradas por varios autores como hojas desarrolladas para condiciones de sol (Boardman, 1977; Bazzaz, 1996; Markesteijn et al., 2007), mientras que hojas más delgadas estarían desarrollándose en ambientes de menor radiación. Esto sugiere que las plantas desarrolladas en ambientes de mayor altitud están expuestas a condiciones de

mayor radiación. Adicionalmente, las hojas modifican también sus propiedades espectrales presentando así una relación inversa entre el desarrollo de las hojas (altas AFE) y la presencia de elementos que disminuyen el efecto de la radiación, expresados en las tasas de reflectancia, que como se dijo anteriormente son causadas aparentemente por la presencia de un indumento, en todas las especies.

La especie *D. venezuelense* no mantiene el patrón de disminución del AFE con la altitud, esto puede estar indicando que la especie se encuentra mejor adaptada a las condiciones de mayor altitud, ya que las condiciones de estrés tiende a disminuir las AFE en las especies ubicadas a plena exposición. Por otro lado, el aumento de la reflectancia podría compensar el aumento de la radiación incidente en las hojas. También es importante acotar que esta especie puede establecerse en zonas superiores a las que se estudiaron en este trabajo. Sería interesante ver si el patrón se sigue manteniendo a mayores altitudes.

Contrario a resultados presentados por autores que han estudiado los procesos de fotoinhibición al frío en zonas templadas (Ball et al., 1991; Germino y Smith, 1999), las mediciones de F_v/F_m realizadas en plantas sometidas a temperaturas congelantes (-2°C) durante dos horas no mostraron diferencia con los datos obtenidos con las otras temperaturas de almacenamiento previo (10°C). Las temperaturas congelantes nocturnas no parecen generar efecto alguno sobre la capacidad fotosintética medida a través de la fluorescencia de la clorofila *a* inmediatamente después de periodos congelantes. Esto sugiere que los procesos de fotoinhibición no tienen relación directa con las temperaturas nocturnas en el caso de las especies estudiadas. Estos resultados son contrarios a los encontrados en plantas de zonas templadas (Germino y Smith, 1999), donde las plantas mantienen procesos de fotoinhibición por varias semanas luego de presentarse las últimas heladas del invierno. Esta diferencia a su vez, sugiere que existe una relación con la falta de períodos de latencia en las plantas de las zonas tropicales, donde deben mantener su aparato fotosintético en buenas condiciones todo el año.

Las plantas leñosas estudiadas en la alta montaña no parecen verse afectadas por las temperaturas nocturnas congelantes, ya que por un lado, como se menciona en el capítulo 2, presentan mecanismos de resistencia al congelamiento, y por otro, sus aparatos fotosintéticos no se ven afectados el día siguiente posterior a las bajas temperaturas nocturnas, reflejado esto en un mantenimiento de la relación F_v/F_m . El proceso reportado por Puentes (2010), quien reporta un proceso de fotoinhibición posiblemente causado por las bajas temperaturas, puede deberse a otros factores ambientales no considerados como el déficit hídrico de las plantas al momento de realizar la mediciones. Los resultados de este estudio, sugieren que no se presentan un efecto directo de las temperaturas congelantes nocturnas sobre los procesos fisiológicos relacionados con F_v/F_m en las plantas estudiadas del ecotono selva-páramo.

Considerando las temperaturas como limitante en el proceso de asimilación de CO_2 , varios autores han sugerido en múltiples estudios que las especies leñosas tienden a acoplar su temperatura foliar a la temperatura del aire (Körner y Cochrane, 1983; Rada et al., 1992; Körner, 1998), eso se puede apreciar en los datos de temperatura de las diferentes localidades cuando se realizaron las mediciones de intercambio de gases en campo, mostrando esto que tanto la temperatura foliar como la del aire se encuentran muy próximas.

Por otro lado, se sabe que las plantas deben mantener un óptimo fotosintético cercano a las temperaturas del ambiente donde se desarrollan. Las especies estudiadas, parecen tener temperaturas óptimas para la fotosíntesis superior ($20\text{ }^\circ\text{C}$) a las temperaturas promedios de los ambientes donde se desarrollan ($12\text{ }^\circ\text{C}$, en la parte alta del gradiente y $16\text{ }^\circ\text{C}$ en la parte baja). Sin embargo, esto puede deberse a la gran amplitud que se presenta en estas especies, manteniendo una alta tasa fotosintética entre los $11\text{ }^\circ\text{C}$ y los $30\text{ }^\circ\text{C}$, lo cual afecta el ajuste parabólico realizado. Es notoria también la caída de la tasa de asimilación de CO_2 por debajo de los

11 °C, similar a lo que plantean Goldstein et al. (1994) en el caso de *P. sericea*.

Adicionalmente, se ha demostrado que la formación del límite continuo de árboles se presenta a una temperatura promedio de entre 5 y 7 °C a nivel mundial (Körner, 1998; Hoch y Körner, 2003; Körner y Paulsen, 2004; Hoch y Körner, 2005) temperaturas encontradas frecuentemente en la parte más alta del ecotono (3550 en La Aguada). Los valores de temperatura óptima de fotosíntesis señalados para las cuatro especies estudiadas son superiores a estos valores promedios y los límites de fijación de CO₂ sugieren que las bajas temperaturas (por debajo de 5 °C) pueden limitar las tasas de asimilación.

Como sugiere Körner (1998), en plantas tropicales se muestra un aumento de las tasas de asimilación de CO₂ con la altitud, lo mismo que se consigue en este estudio, esto siempre que se consideren estas en relación con la superficie foliar y no la masa foliar. Varios autores (Reich et al., 1992, Lusk et al., 2003; Liu et al., 2009) han planteado, sin embargo, que es mejor comparar los parámetros relacionados a la tasa de asimilación de CO₂ en función de la masa foliar y no del área. Reich et al. (1999) consiguieron una mejor correlación al comparar la asimilación en función de su masa foliar con otros parámetros morfo-funcionales, en parte por la mejor relación entre la masa foliar y la cantidad de clorofila presente en las hojas.

En muchos casos pareciera que se utiliza la tasa de asimilación en función del área por la imposibilidad de realizar las medidas basadas en la masas foliar de forma inmediata. Finalmente, la expresión de las tasas de asimilación en función de la masa foliar parece tener una mejor pertinencia cuando se quieren explicar las relaciones de balance, ya que de forma implícita se está introduciendo una relación costo-beneficio.

En nuestro caso la tasa de asimilación con base en la masa foliar presenta una disminución con respecto a la altitud para cada una de las especies estudiadas. Si bien estas especies son capaces de fijar mayores cantidades de CO₂ por

unidad de superficie en unidad de tiempo, en parte debido a la mayor cantidad de material foliar por unidad de superficie, las mismas no son capaces de aumentar la producción de asimilados en función de su biomasa, lo cual finalmente genera mayores costos de producción de biomasa fotosintética y posiblemente de mantenimiento para estos individuos.

En los casos estudiados en este trabajo a pesar de contar con especies que son capaces de colonizar ambientes abiertos de páramo o especies de la selva nublada, todas presentan puntos de compensación a las bajas temperaturas cercano a los 5 °C. Los ajustes parabólicos para la estimación de este punto, generen al igual que en nuestro caso errores importantes en la apreciación de las temperaturas a las cuales las plantas mantienen tasas positivas de asimilación de CO₂. En parte por la amplitud de la respuesta de A a la temperatura. Es necesario, sin embargo, desarrollar técnicas que permitan de forma eficiente realizar mediciones tanto de intercambio de gases como de fluorescencia de la clorofila a temperaturas por debajo de los 5 °C, de forma de constatar estos posibles límites, y poder desarrollar funciones de ajustes más eficientes.

Las plantas estudiadas presentan una disminución en la posibilidad de realizar un transporte de electrones eficiente a medida que la temperatura se acerca a los 5 °C, a los cual se añaden los factores no estudiados en el presente trabajo, que disminuyen la eficiencia de fijación de carbono. Hay que acotar que los cálculos de A via ETR, supone las mejores condiciones posibles, a lo cual podrían influir otro grupo de factores disminuyendo aún más las tasas de A. Tal es el caso de la fotorespiración, o por ejemplo la disminución de los procesos de difusión interna reportado por Terashima et al. (2002), en los cuales se demuestra la disminución de estos procesos con el aumento del espesor de las hojas.

Varios autores (Germino y Smith, 1999; Johnson et al., 2004; Bader et al., 2008; Holtmeier, 2009) plantean que las altas radiaciones pueden tener un efecto negativo en los procesos de fotosíntesis en las plantas de alta montaña,

tanto en zonas tropicales como templadas. Aunque en muchos casos se ha pensado que este efecto puede estar ligado a las bajas temperaturas nocturnas, los datos aquí presentados confirman este efecto negativo en todas las especies estudiadas, y lo separan de posibles efectos por bajas temperaturas, se puede producir efectos inhibitorios de la asimilación de CO₂ a altas radiaciones, aumentando este cuando se presentan temperaturas extremas ya sea bajas o altas. Estos procesos de fotoinhibición son evidentemente dinámicos y no causan aparentemente daño irreparables al sistema captador de energía de las hojas.

Como es evidente, y se presenta para los datos de radiación obtenidos en el gradiente altotérmico en la Estación La Aguada, la posibilidad de ocurrencia de estas altas radiaciones aumenta con la altitud, al disminuir el espesor de la atmosfera. Si bien este aumento de las radiación parece producir modificaciones en la reflectancia, la misma no parece evitar por completo los efectos negativos de la radiación, produciéndose en todas las especies una fotoinhibición a altas radiaciones, estas modificaciones de la reflectancia son similares a la de otros grupos, tal como la pubescencia en la rosetas caulescentes gigantes (Meinzer y Goldstein, 1985; Meinzer et al., 1994b), y en la disminución del tamaño de las hojas en las diversas formas leñosas arbustivas de páramo con la altitud (Arzac, 2008).

El aumento de las tasas de respiración foliar con la altitud implica también un aumento en los costos de mantenimiento del material foliar, lo cual genera un balance de carbono menos favorable. Estas altas tasas de respiración han sido encontradas en especies del límite arbóreo, y son atribuidas a la necesidad de las plantas de reparar y recuperar los daños causados por las condiciones desfavorables (Meinzer et al., 1994a).

El aumento de la radiación altitudinalmente, por encima de los rangos de tolerancia de las plantas, aunado con las bajas temperaturas diurnas, pueden ser causantes parciales de la disminución en la fijación de carbono en estas especies leñosas, disminuyendo así posiblemente el balance final de carbono

en estos individuos. Tal como se presenta en la comparación de las variables ambientales de La Aguada, en meses secos las bajas temperaturas y las altas radiaciones puede llegar a disminuir las horas efectivas de asimilación de CO₂ en un 41 %.

Las adaptaciones presentes en estas especies causan un aumento en los costos de elaboración del material foliar que puede afectar a las plantas con una disminución en el balance de carbono positivo, en el caso de las especies leñosas estudiadas se presenta una disminución del área foliar específica, disminución del área foliar, aumento de la reflectancia entre otros.

Aún cuando no se haya realizado un análisis completo sobre el balance de carbono en este trabajo, se incorporan a este análisis factores importantes del mismo, por un lado se estiman las tasas de asimilación de CO₂ y por otro se cuantifican parte de los gastos de carbono en las plantas, tal como elaboración de material foliar, mantenimiento parcial de este. Algunos autores sugieren que no se han encontrado sitios donde la relación Asimilación/Respiración sea igual a 1 (Bansal y Germino, 2008).

Es necesario aclarar que esto es muy poco probable que ocurra, ya que aunque A sea la única entrada de carbono a las plantas, existen muchas posibles salidas, entre estas cabe mencionar la formación de material vegetal aéreo y subterráneo, el cual sufre diversos procesos de pérdida por herbivoría, mortalidad, daño mecánico entre otros. Adicionalmente se ha sugerido que entre mayor sea la alocación de material en la elaboración de las diversas partes de las plantas, mayores serán los costos de mantenimiento y reposición.

Tal como se presenta en muchos de los trabajos realizados en el límite de crecimiento arboreo, tanto en el trópico como en las zonas templadas, las temperaturas de aparición de este límite se encuentran muy cercanas a los 5°C (Korner y Paulsen, 2004; Holtmeier y Broll, 2007; Holtmeier, 2009), temperatura en la cual se nota una disminución de las tasas de asimilación de CO₂ en este estudio y temperatura en la que se ven ampliados los efectos negativos de la radiación excesiva. Tal como sugieren muchos autores (ver

revisiones de Tranquillini (1979), Körner (1999) y Holtmeier y Broll (2007)), la temperatura es finalmente crucial en la formación de este límite tan conspicuo. Los resultados de este trabajo sugieren que la suma de este factor y las altas radiaciones son los factores abióticos que pueden provocar un balance desfavorable en las especies leñosas y que pueden llegar a imposibilitar el crecimiento en ambientes a mayor altitud. Así mismo, las condiciones en donde se desarrollan las plántulas son más desfavorables que en los individuos adultos estudiados. Estas se verán, probablemente, más afectadas por las variaciones térmicas y las mayores radiaciones, limitando de esta forma las posibilidades de mantener un balance de carbono positivo y en consecuencia también el establecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Khatib, K. y Paulsen, G. M. (1999). High-Temperature Effects on Photosynthetic Processes in Temperate y Tropical Cereals. *Crop Science* 39(1): 119-125.
- Arzac, A. J. (2008). Distribución espacial de formas de vida de plantas en un gradiente altotérmico en Los Andes Tropicales. Departamento de Biología- Facultad de Ciencias, Licenciatura. Mérida-Venezuela: Universidad de Los Andes.
- Bader, M. Y., Rietkerk, M. y Bregt, A. K. (2007). Vegetation Structure y Temperature Regimes of Tropical Alpine Treelines. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 39(3): 353-364.
- Bader, M. Y., Rietkerk, M. y Bregt, A. K. (2008). A Simple Spatial Model Exploring Positive Feedbacks at Tropical Alpine Treelines. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 40(2): 269-278.
- Ball, M. C., Hodges, V. S. y Laughlin, G. P. (1991). Cold-Induced Photoinhibition Limits Regeneration of Snow Gum at Tree-Line. *Functional Ecology* 5(5): 663-668.

- Bansal, S. y Germino, M. (2008). Carbon balance of conifer seedlings at timberline: relative changes in uptake, storage, and utilization. *Oecologia* 158(2): 217-227.
- Bansal, S. y Germino, M. J. (2009). Temporal variation of nonstructural carbohydrates in montane conifers: similarities y differences among developmental stages, species y environmental conditions. *Tree Physiology* 29(4): 559-568.
- Bazzaz, F. A. (1996). Plants in changing environments: linking physiological, populational and community ecology. Cambridge University Press. 320 pp.
- Boardman N. K. (1977). Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 28: 355-377.
- Cavieres, L. A. y Piper, F. (2004). Determinantes ecofisiológicos del límite altitudinal de los árboles. Cabrera M.: Fisiología Ecológica en Plantas. Valparaíso: Ediciones de la Universidad Católica de Valparaíso. 221-234 pp.
- Choler, P. (2005). Consistent Shifts in Alpine Plant Traits along a Mesotopographical Gradient. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 37(4): 444-453.
- Feild, T. S. y Arens, N. C. (2007). The ecophysiology of early angiosperms. *Plant, Cell and Environment* 30(3): 291-309.
- Garnier, E., Shipley, B., Roumet, C. y Laurent, G. (2001). A standardized protocol for the determination of specific leaf area and leaf dry matter content. *Functional Ecology* 15(5): 688-695.
- Germino, M. J. y Smith, W. K. (1999). Sky exposure, crown architecture, y low-temperature photoinhibition in conifer seedlings at alpine treeline. *Plant, Cell and Environment* 22(4): 407-415.

- Hoch, G. y Körner, C. (2003). The carbon charging of pines at the climatic treeline: a global comparison. *Oecologia* 135(1): 10-21.
- Hoch, G. y Korner, C. (2005). Growth, demography and carbon relations of *Polylepis* trees at the world's highest treeline. *Functional Ecology* 19(6): 941-951.
- Holtmeier, F.-K. (2009). Mountain Timberlines. Ecology, Patchiness, y Dynamics Geneva, Switzerland: Springer Science
- Holtmeier, F.-K. y Broll, G. (2005). Sensitivity y response of northern hemisphere altitudinal y polar treelines to environmental change at landscape y local scales. *Global Ecology and Biogeography* 14(5): 395-410.
- Holtmeier, F.-K. y Broll, G. (2007). Treeline advance, driving processes y adverse factor. *Landscape Online* 1: 1-33.
- Johnson, D. M., Germino, M. J. y Smith, W. K. (2004). Abiotic factors limiting photosynthesis in *Abies lasiocarpa* y *Picea engelmannii* seedlings below y above the alpine timberline. *Tree Physiology* 24(4): 377-386.
- Jordan, D. N. y Smith, W. K. (1994). Energy balance analysis of nighttime leaf temperatures y frost formation in a subalpine environment. *Agricultural and Forest Meteorology* 71(3-4): 359-372
- Körner, C. (1998). A re-assessment of high elevation treeline positions y their explanation. *Oecologia* 115(4): 445-459.
- Körner, C. (1999). Alpine plant life, Functional plant ecology of high mountain ecosystems. Berlin. Spriger .
- Körner, C. y Cochrane, P. M. (1985). Stomatal responses and water relations of *Eucalyptus pauciflora* in summer along an elevational gradient. *Oecologia* 66(3): 443-455.
- Korner, C. y Paulsen, J. (2004). A world-wide study of high altitude treeline temperatures. *Journal of Biogeography* 31(5): 713-732.

- Korner, C. y Paulsen, J. (2004). A world-wide study of high altitude treeline temperatures. *Journal of Biogeography* 31(5): 713-732.
- Lambers, H., Chapin, F. S. y Pons, T. (2008). *Plant Physiological Ecology*. New York: Springer.
- Lee, T. D., Reich, P. B. y Bolstad, P. V. (2005). Acclimation of leaf respiration to temperature is rapid y related to specific leaf area, soluble sugars y leaf nitrogen across three temperate deciduous tree species. *Functional Ecology* 19(4): 640-647.
- Meinzer, F. y Goldstein, G. (1985). Some Consequences of Leaf Pubescence in the Andean Giant Rosette Plant *Espeletia Timotensis*. *Ecology* 66(2): 512-520.
- Levizou, E., Drilias, P., Psaras, G. K. y Manetas, Y. (2005). Nondestructive assessment of leaf chemistry and physiology through spectral reflectance measurements may be misleading when changes in trichome density co-occur. *New Phytologist* 165(2): 463-472.
- Liu, F., Zhang, M., Wang, W., Chen, S., Zheng, J., Yang, W., Hu, F. y An, S. (2009). Photosynthesis in relation to leaf nitrogen, phosphorus and specific leaf area of seedlings and saplings in tropical montane rain forests of Hainan Island, south China. *Frontiers of Forestry in China* 4(1): 75-84.
- Llambí, L. D., Fontaine, M., Rada, F., Saugier, B. y Sarmiento, L. (2003). Ecophysiology of Dominant Plant Species during Old-Field Succession in a High Tropical Andean Ecosystem. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 35(4): 447-453.
- Lusk, C. H., Wright, I. y Reich, P. B. (2003). Photosynthetic differences contribute to competitive advantage of evergreen angiosperm trees over evergreen conifers in productive habitats. *New Phytologist* 160(2): 329-336.

- Markesteyn, L., L. Poorter, F. Bongers. (2007). "Light-dependent leaf trait variation in 43 tropical dry forest tree species." *American Journal of Botany*. 94 (4): 515-525.
- Meinzer, F. C., Goldstein, G. y Rada, F. (1994a). Environmental biology of a tropical treeline species *Polylepis sericea*. En: Rundel, P.W., Smith A.P. y F.C. Meinzer *Tropical alpine Environments: Plants form y function*. . Cambridge: Cambridge University Press. pp 129-150
- Meinzer, F. C., Goldstein, G. y Rada, F. (1994b). Paramo microclimate y leaf thermal balance of Andean Giant rosette plants. En : Rundel, P.W., Smith A.P. y F.C. Meinzer *Tropical alpine Environments: Plants form y function*. . Cambridge: Cambridge University Press. pp. 45-59.
- Molina-Montenegro, M. A. (2008). Variación de la pubescencia foliar en plantas y sus implicaciones funcionales a lo largo de gradientes altitudinales. *Ecosistemas* 17 (1): 146-154.
- Monasterio, M. y Reyes, S. (1980). Diversidad ambiental variación de la vegetación en los paramos de los Andes Venezolanos. En Monasterio: *Estudios Ecológicos en los Paramos Andinos, Mérida-Venezuela*. Universidad de los Andes. 47-91.
- Pastenes, C. y Horton, P. (1996). Effect of High Temperature on Photosynthesis in Beans (I. Oxygen Evolution y Chlorophyll Fluorescence). *Plant Physiology*. 112(3): 1245-1251.
- Piper, F., Cavieres, L., Reyes-Díaz, M. y Corcuera, L. (2006). Carbon sink limitation y frost tolerance control performance of the tree *Kageneckia angustifolia* D. Don (Rosaceae) at the treeline in central Chile. *Plant Ecology* 185(1): 29-39.
- Rada, F., Azócar, A., Briceño, B., González, J. y García-Núñez, C. (1996). Carbon y water balance in *Polylepis sericea*, a tropical treeline species. *Trees - Structure and Function* 10(4): 218-222.

- Rada, F., Azócar, A., González, J., Briceño, B. y R., Jaimez. (1992). Net photosynthesis-leaf temperature relations in plant species with different height along an altitudinal gradient. *Acta Oecologica* 13: 535-542.
- Rada, F., Garcia-Nunez, C., Boero, C., Gallardo, M., Hilal, M., Gonzalez, J., Prado, F., Liberman-Cruz, M. y Azocar, A. (2001). Low-temperature resistance in *Polylepis tarapacana*, a tree growing at the highest altitudes in the world. *Plant, Cell and Environment* 24(3): 377-381.
- Rada, F., García-Núñez, C. y Rangel, S. (2009). Low temperature resistance in saplings and ramets of *Polylepis sericea* in the Venezuelan Andes. *Acta Oecologica* 35(5): 610-613.
- Ramírez, L. A., Llambí, L. D., Schwarzkopf, T., Gámez, E. y Márquez N. (2009) Vegetation structure along the forest-Páramo transition belt in the Sierra Nevada de Mérida: Implication for understanding treeline dynamics. *Ecotropicos*. 22 (2): 83-98.
- Reich, P. B., Ellsworth, D. S., Walters, M. B., Vose, J. M., Gresham, C., Volin, J. C. y Bowman, W. D. (1999). Generality of leaf trait relationships: A test across six biomes. *Ecology* 80(6): 1955-1969.
- Reich, P. B., Ellsworth, D. S., Walters, M. B., Vose, J. M., Gresham, C., Volin, J. C. y Bowman, W. D. (1999). Generality of leaf trait relationships: A test across six biomes. *Ecology* 80(6): 1955-1969.
- Reich, P. B., Walters, M. B. y Ellsworth, D. S. (1992). Leaf Life-Span in Relation to Leaf, Plant, and Stand Characteristics among Diverse Ecosystems. *Ecological Monographs* 62(3): 365-392.
- Sodja, I. (2001). Estudio Florístico del Cerro Pozo Negro, Páramo de San José (Mérida-Venezuela). Departamento de Biología. Facultad de Ciencias, Licenciatura en biología Mérida, Venezuela. Universidad de Los Andes. 165 pp.
- Stevens, G. C. y Fox, J. F. (1991). The Causes of Treeline. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22(1): 177-191.

- Terashima, I., Araya, T., Miyazawa, S.-I., Sone, K. y Yano, S. (2005). Construction and Maintenance of the Optimal Photosynthetic Systems of the Leaf, Herbaceous Plant and Tree: an Eco-developmental Treatise. *Annals of Botany* 95(3): 507-519.
- Tranquillini, W. (1979). *Physiological Ecology of the Alpine Timberline. Tree existence at high altitudes with Special reference to the European Alps.* Berlin: Springer-Verlag.
- Wodzicki, T. J. 2001. Natural factors affecting wood structure. *Wood Science and Technology* 35: 5-26.
- Wolf, S., Olesinski, A. A., Rudich, J. y Marani, A. (1990). Effect of High Temperature on Photosynthesis in Potatoes. *Annals of Botany* 65(2): 179-185.

CAPITULO 5. CONSIDERACIONES FINALES.

El límite de crecimiento arbóreo, más que un ambiente estático, es una de las zonas de mayor dinámica en la alta montaña tropical. Tal como lo señalan estudios palinológicos realizados en estos ambientes (Tinner y Theurillat, 2003; Heiri et al., 2006; Holtmeier y Broll, 2007; Wang et al., 2005), estos ambientes muestran fluctuaciones importantes del límite máximo a lo largo de la historia. Dicha dinámica ha hecho que estas zonas sean propicias para estudiar los posibles cambios en la vegetación a causa de las modificaciones climáticas actuales.

Las condiciones limitantes actuales.

Tal como se plantea en el capítulo 1, existen muchas hipótesis que tratan de explicar la presencia del límite de crecimiento a cierta altitud y latitud. Estas hipótesis pueden tener validaciones locales sobre el efecto de cada factor ambiental en la formación y mantenimiento del límite. Sin embargo, no existe un consenso sobre cuáles de estas hipótesis pueden tener una validez a nivel global.

Una de las explicaciones sobre la existencia del límite de crecimiento arbóreo es que efectivamente que las especies leñosas poseen los mecanismos para resistir las condiciones presentes actualmente en el límite, este límite en este sentido, más que ser respuesta directa de los factores climáticos actuales, es respuesta a eventos climáticos pasados, en particular la pequeña edad de hielo hace aproximadamente 250 años (Holtmeier, 2009), y las especies no han podido colonizar nuevamente ambientes más altos por falta de tiempo. También atribuyen este límite a efectos posteriores vinculados a la intervención humana en estas zonas (Halloy y Mark, 2003; Holtmeier y Broll, 2007; Holtmeier, 2009). Sin embargo, en el tiempo reciente, en los más de doscientos años de estudios del límite en las zonas templadas, poco ha sido el avance encontrado de la vegetación leñosa sobre la vegetación alpina, y no fue

sino hasta los cambios climáticos actuales en los que se ha presenciado un movimiento de las masas boscosas en altitud. Esto indica que si bien la formación inicial de este límite pueda ser causada por fenómenos pasados, el mantenimiento del mismo se debe a las condiciones actuales.

Por lo tanto, debemos concentrarnos en las diferentes hipótesis planteadas anteriormente, las cuales consideran diferentes aspectos relacionados a las características ambientales de esta frontera arbórea y la manera en que las diferentes especies afrontan estas limitaciones impuestas por el ambiente. Mucho se ha especulado sobre la influencia de las temperaturas congelantes a nivel global (Tranquillini, 1979; Körner, 1998; Holtmeier y Broll, 2005). Sin embargo, se ha ido descartando la hipótesis de que las especies leñosas carezcan de mecanismos que les permitan colonizar ambientes donde las temperaturas lleguen a ser congelantes. En las zonas templadas y boreales dichos mecanismos han sido demostrados desde hace décadas en muchas especies, y solo temperaturas extremas podrían eventualmente producir daño en poblaciones enteras a esas latitudes y formar el límite como tal, esto parece ser muy poco probables, a las altitudes donde se forma el actual límite arbóreo.

En las zonas tropicales, se demuestra en el capítulo 2 que muchas especies leñosas presentan mecanismos de resistencia al congelamiento que les permitiría llegar cientos de metros por encima de su límite actual de distribución, lo que descarta el congelamiento como factor formador del límite de crecimiento arbóreo. Esto no descarta que algunas especies se encuentren actualmente en su límite de tolerancia a este factor, sin embargo no determinaría el límite de crecimiento para las especies leñosas en forma continua. Los datos de temperatura, obtenidos dentro del proyecto LEAF, muestran que la ocurrencia de eventos de congelamiento son muy poco frecuentes y solo se registraron en los tres años de análisis 20 días con temperaturas inferiores a los cero grados centígrados, y las temperaturas mínimas absolutas registradas para todo el gradiente, nunca estuvieron por

debajo de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura muy superior a la menor de las temperaturas de resistencia al congelamiento.

Las condiciones de déficit hídrico han sido poco consideradas en ambientes de alta montaña tropical como factor crucial para la formación del límite de crecimiento arbóreo, aún cuando se ha reportado su importancia para los ambientes de páramo como factor limitante de las plantas en general (Monasterio, 1980).

Como sugieren algunos autores (Sperry et al., 1998; Brodribb y Hill, 1999; Comstock y Sperry, 2000; Meinzer, 2002; Vilagrosa et al., 2003), las plantas leñosas por su forma de crecimiento se encuentran en mayor riesgo de sufrir la pérdida de la conductividad hidráulica por cavitación que otras formas de crecimiento. Esto debido a que los árboles deben realizar un transporte de agua más largo, y la formación de embolismos puede producirse por procesos de congelamiento/descongelamiento o por procesos de déficit hídricos severos. En ambos casos la columna de agua del xilema puede romperse e impedir el transporte de agua, en el primero por la formación de burbujas de aire contenidas en el agua en el momento de congelarse, en el segundo por una tensión excesiva sobre la columna de agua que produce la entrada de aire a la misma.

Una de las posibles limitantes para el desarrollo en altitud del límite de crecimiento arbóreo ha sido la posible cavitación producida por los procesos de congelamiento y descongelamiento (Cavender-Bares y Holbrook, 2001; Cochard et al., 2007). Sin embargo, estos procesos tienden a ser poco probables en el límite de crecimiento arbóreo en las zonas tropicales, primero por la poca presencia de heladas en el límite y en segundo porque existe en las plantas la capacidad de recuperar el xilema embolizado (Holbrook y Zwieniecki, 1999). Se hace necesario realizar mediciones que corroboren esto en las especies de la alta montaña tropical.

Por otra parte, las altas demandas evaporativas podrían tener un efecto similar. Sin embargo, las plantas leñosas presentan también mecanismos que limitan el efecto de las altas demandas evaporativas, y que limitan el descenso del potencial hídrico foliar. En el caso de las especies estudiadas se presenta un cierre estomático a altos potenciales hídricos, similar a las respuestas presentadas por las rosetas gigantes en zonas más altas (Goldstein et al., 1984; Goldstein et al., 1989), lo que evitaría que se produzcan procesos de embolismos inducidos por potenciales hídricos muy negativos.

Estas adaptaciones antes mencionadas que presentan las especies leñosas estudiadas permiten sugerir que el déficit hídrico no es causante directo en la formación del límite arbóreo. Sin embargo, tal como se plantea en el capítulo 3, y en concordancia con otros autores, los procesos de déficit hídrico, aunque eventualmente importantes, son de efecto indirecto sobre la vegetación leñosa establecida, limitando en momentos particulares del año las posibilidades de fijación de CO₂ por las plantas.

Todas las especies muestran, en este sentido, adaptaciones que les permiten reducir el efecto del déficit hídrico diario, como son una reducción del área foliar y así la disminución de la superficie transpirante, cierre estomático a mediodía señalados por otros autores (Cavieres et al., 2000, Giraldo, 2009), y la presencia, en los tres casos estudiados, de médulas de almacenamiento de agua, de mayor importancia en *L. neriifolius*. Todas estas adaptaciones, pueden a su vez, causar un efecto negativo sobre el balance de carbono, ya que por un lado disminuyen la adquisición de CO₂, y por otro aumentan los costos de producción del material vegetal, tanto fotosintético como de almacenamiento de agua. Tal como se ha planteado con frecuencia en el pasado, al limitar las pérdidas de agua se limita también el aprovechamiento de la asimilación de CO₂.

Se plantea desde el inicio de los estudios del límite de crecimiento arbóreo que la temperatura juega un papel crucial en su formación y mantenimiento. En

líneas generales, se acepta que la temperatura limita procesos metabólicos de las plantas, ya sea reduciendo el balance de carbono o las funciones de crecimiento celular (Tranquillini, 1979; Körner, 1998; Lambers et al., 2008; Holtmeier, 2009).

Según la hipótesis presentada por Körner (1998), la baja temperatura afectaría los procesos metabólicos de crecimiento, esta limitación se produce a temperaturas por debajo de los 5 °C, lo cual según este autor se ve claramente en la formación de asimilados no estructurales en las zonas de límite de crecimiento arbóreo, este efecto es en todo caso según este autor mas importante que el efecto de la temperatura sobre el balance de carbono.

Más recientemente se muestra que la variación entre asimilados estructurales varia de forma estacional más que dentro de un gradiente altitudinal (Bansal y Germino, 2009). Como la mayoría de los trabajos anteriores realizaban estas comparaciones de forma puntual, estas diferencias estacionales podrían explicar las incongruencias encontradas en diversos estudios sobre estos asimilados no estructurales. Por otra parte, para las comparaciones realizadas en los diversos estudios sobre el balance de carbono, se estima este balance por un aumento de las tasas de asimilación máxima en relación con el área foliar, sin considerar que existen variaciones bien reportadas del Área Foliar Específica. Si, como en nuestro caso, comparamos las tasas de asimilación en función de la masa foliar, queda claro que se produce una disminución de estas tasas con la altitud. Tal como lo sugieren varios trabajos (Reich et al., 1992; Reich et al., 1999), la asimilación en función de la masa tiene una mejor correlación con otros parámetros, afines con los costos de inversión del CO₂ asimilado, que la relación tradicionalmente utilizada en función del área. Se puede decir, adicionalmente, que esta comparación genera una mejor aproximación a la relación costo beneficio, ya que la fijación de carbono estará dada por la capacidad anterior de fijarlo y de reinvertirlo en tejido fotosintético.

Bajo la misma perspectiva, se ha sugerido que en términos generales las plantas de mayor altitud generan hojas más gruesas o de menor superficie foliar (Choler, 2005; Luo et al., 2005; Zheng y Shangguan, 2007), lo que genera en cualquier caso mayores costos energéticos para su producción, y posiblemente mayores gastos para el mantenimiento, tal como lo señalan Reich et al. (1995), en las cuales estos autores comentan que las hojas provenientes de mayor altitud tienden a tener mayores tasas de respiración. Todo esto va en detrimento del balance de carbono, ya muy comprometido en las especies leñosas por su baja relación entre biomasa fotosintética y no fotosintética.

Las altas radiaciones presentes en las zonas de alta montaña causan efectos negativos en las tasas de asimilación de CO₂ que pudiesen afectar a su vez el balance de carbono de las plantas tal como sugieren algunos trabajos recientes (Germino y Smith, 1999; Bader et al., 2007). Como se demostró en el capítulo 4, este efecto se hace más severo cuando se combina con bajas temperaturas, presentándose un efecto muy fuerte de fotoinhibición a temperaturas cercanas a los 5 °C en todas las especies y un efecto negativo menos importante a temperaturas cercanas a los 12 °C, este último mas evidente en las especies típicas de bosque (*M. jahnii* y *L. neriifolius*, temperaturas como se pudo observar muy frecuentes en estos ambientes de alta montaña durante cualquier día del año.

Estos factores (bajas temperaturas y altas radiaciones) se evidencian también en las otras formas de vida presentes en el páramo, con el desarrollo de diversas estrategias, como es el caso de la forma de roseta gigante. En la distribución de las formas de vida estudiadas por Arzac (2008), en las cercanías de la estación La Aguada, se nota una disminución de las áreas foliares de los arbustos con la altitud, reflejada en la dominancia de formas de vida de hojas cada vez más pequeñas. En las plantas del ecotono, estos efectos se reflejan en algunas características foliares, como la disminución de la absorbancia a medida que ascendemos en altitud, disminución parece ser

causada en gran parte por el aumento de las pilosidades de las mismas y por otro lado la disminución del área foliar específica. Las plantas igualmente producen movimientos de orientación de sus hojas disminuyendo la exposición a la luz y aumentando la reflectancia. Todas las especies estudiadas son mucho más pubescentes por el envés que por el haz lo cual aumenta la reflectancia de la luz. En el caso de *M. jahnii* las hojas se involutan, mostrando así una cara cubierta de indumento ferrugineo muy denso de alta reflectancia. Varios son los efectos negativos de estas adaptaciones sobre el balance de carbono de las plantas. Por un lado se disminuye la temperatura foliar, por una disminución de la absorción de radiación, por otro lado se aumenta la capa límite de la hoja dificultado de esta manera el libre intercambio de CO₂ con el aire.

Las plantas finalmente deben realizar el mejor ajuste que les permita, por un lado, mantener una temperatura aceptable para la realización de la fotosíntesis y por el otro, niveles de radiación lo suficientemente bajos para evitar los procesos de fotoinhibición.

La presencia de mecanismos de disminución de la absorbancia de la radiación han sido descritos para especies del grupo Espeletinae en los Andes venezolanos (Meinzer et al., 1994). En modelos hechos se observa que el efecto de la disminución de la absorbancia en este caso es menor que las limitaciones de disipación por la disminución de la capa límite. Por otro lado se ha señalado que dicho factor aumenta con la altitud (Meinzer y Goldstein, 1985). Goldstein et al. (1989) sugieren que dicho aumento en la reflectancia de las hojas genera un alto costo por la disminución de la asimilación de CO₂.

Aunque siempre se ha considerado la temperatura per se como el factor ambiental responsable de la aparición del límite de crecimiento nivel global, por la relación de disminución de la temperatura con los aumentos en la altitud o latitud, la interacción entre el efecto de las altas radiaciones y las bajas temperaturas podría dar explicación a la depresión altitudinal del límite de crecimiento en las zonas tropicales, esta comparada con los máximos

altitudinales que se han registrado a 30° Norte o Sur en las zonas subtropicales (figura 1.2) presentado por Troll en 1948 (citado por Holtmeier 2009). Las zonas tropicales presentan por un lado las mayores radiaciones y por el otro una mayor frecuencia de días fríos, los cuales se presentan con mucha frecuencia en condiciones de luz saturante, a diferencia de las zonas templadas donde las altas radiaciones ocurren en los días de verano cuando los días fríos se hacen poco frecuentes. Los óptimos de crecimiento del límite en tal sentido se presentarían donde las radiaciones son lo suficientemente altas para generar un balance positivo y donde la estacionalidad térmica sea lo suficientemente marcada como para generar momentos de temperaturas y radiaciones simultáneamente favorables.

Por otro lado, en las altas montañas tropicales, la presencia de fuertes nubosidades en horas de la tarde tiende a ser muy frecuente, lo cual disminuye la radiación a la que están sometidas las plantas, tal como reportan Cavieres et al. (2000). Esto puede causar una disminución en la formación de asimilados y afectar aún más las posibilidades de un balance favorable de carbono para estas plantas. Los resultados de este trabajo sugieren que posiblemente la suma de factores negativos, principalmente bajas temperaturas y altas radiaciones, sean responsables de la formación del límite de crecimiento arbóreo, afectando principalmente las tasas de asimilación de CO₂ que afectarían el balance de carbono de las plantas leñosas las cuales tienen mayores costos de producción y mantenimiento de sus tejidos vegetales. Esta hipótesis fue sugerida desde hace décadas por múltiples autores (Tranquillini, 1979; Rada et al., 1996; Wieser, 1997; Cavieres et al., 2000; Cairns, 2005; Aerts et al., 2006), para el límite arbóreo a nivel global.

Finalmente, es necesario analizar en detalle el efecto de todos estos factores limitantes sobre el establecimiento de las plántulas de especies leñosas, y corroborar así lo planteado por otros autores. Estos sugieren que el establecimiento es la fase crucial en el desarrollo de este límite, y que las condiciones ambientales dificultan el establecimiento de nuevas plántulas en

los ambientes de alta montaña (Akhalkatsi et al., 2006; Bader et al., 2007; Germino et al., 2002; Holtmeier y Broll, 2007; Malanson, 1997; Shrestha et al., 2007; Stevens y Fox, 1991).

Lo conspicuo de los diferentes límites de crecimiento arbóreo en el mundo, sugieren que las causas de los mismos son similares, lo cual indica que la formación de los diferentes límites leñosos en el mundo se deben a la suma de factores que generan limitaciones en el balance de carbono en esta forma de crecimiento. Es decir, en estos ambientes de alta montaña, la combinación de altas radiaciones y bajas temperaturas es crucial; en ambientes secos la combinación de baja disponibilidad de agua, altas temperaturas y altas radiaciones serían igualmente cruciales, sin embargo, esto necesita ser estudiado con más detalle.

Lineamientos futuros.

Todos los procesos antes descritos que limitan el desarrollo de las plantas estudiadas se hacen mucho más severos a medida que nos acercamos al suelo. Por un lado las temperaturas diurnas son más altas, causando procesos de inhibición por calor, ya que en zonas abiertas de páramo las temperaturas a nivel del suelo podrían superar los 30 °C y estas a su vez mayores demandas evaporativas. Por otra parte, las temperaturas en horas de la mañana son más bajas aumentando las limitaciones por fotoinhibición a bajas temperaturas.

Quedan muchas interrogantes sobre qué ocurre con las plántulas de las especies leñosas que logran establecerse en las zonas abiertas de páramo, el efecto del estrés térmico sobre la supervivencia, y el efecto del estrés hídrico sobre los procesos de establecimiento. En las plantas de *L. neriifolius* (Giraldo, 2009) queda claro que el déficit hídrico puede restringir de forma severa su balance de carbono en las épocas menos favorables. Posiblemente años excesivamente secos podrían causar la desaparición de los individuos de regeneración por desecamiento o un balance negativo de carbono.

La hipótesis del establecimiento sugiere también la necesidad forzosa de contar con especies que puedan generar un efecto de facilitación, que limiten los efectos negativos de las altas radiaciones (Akhalkatsi et al., 2006; Anthelme et al., 2007; Bader et al., 2008; Michalet et al., 2003; Pagés y Michalet, 2006; Bansal y Germino, 2009; Germino et al., 2002; Johnson et al., 2004). En estudios recientes se ha demostrado que los cambios climáticos han generado avances de las masas forestales hacia zonas más altas, tanto en las zonas templadas como en el trópico. En los Andes venezolanos se demostró que este avance de las plantas leñosas en la zona del Parque Sierra Nevada de Mérida se dio en detrimento del arbustal-paramero y no del páramo abierto (Santaella, 2007), evidenciando de esta forma las necesidades de procesos de facilitación por parte de las especies leñosas.

Igualmente es necesario estudiar con detalle, todos los aspectos relacionados con la biología reproductiva de las diversas especies, así como de estudios detallados de la ecología de la semilla de las mismas, con la finalidad de estudiar mejor la capacidad de producción de propágulos fértiles, y así la capacidad de las plantas de producir un avance en el límite de crecimiento arbóreo, la carencia de estudios de este tipo ha inducido en muchas localidades a nivel mundial la utilización de especies foráneas de rápido crecimiento en los proyectos de reforestación.

Igualmente estudios recientes muestran un aumento de la aparición de individuos de formas arbóreas asociadas a sitios de mayor presencia de arbustos en los páramos abiertos (Arzac, 2008). Esto aumenta la pertinencia de procesos de facilitación en la vegetación leñosa altimontana en los trópicos, similar a lo presentado por varios autores en las zonas de alta montaña templada. Sin embargo, son muy pocos los estudios realizados en la actualidad que traten de interpretar los procesos de facilitación que puedan presentarse en las zonas de alta montaña tropical, y menos aún en la zona de ecotono. Destaca el trabajo realizado por Puentes (2010), en el cual aún cuando no se estudiaron los procesos de facilitación, se presentan un grupo de especies

asociadas positivamente con los individuos juveniles de *D. venezuelense* estableciéndose en zonas de páramo abierto, lo cual induce a pensar que puedan existir procesos de facilitación. Estos estudios deben profundizarse para logran entender mejor estos posible procesos. Es necesario entonces, establecer ensayos sobre el efecto directo de las plantas arbustivas sobre las plantas leñosas de mayor porte, para poder generar mejores predicciones sobre las posibilidades de colonización de las especies leñosas sobre los páramos andinos.

Existen evidencias que muestran que en las zonas de alta montaña tropical, la vegetación arbustiva es una fuente de leña importante, tanto en la actualidad como en el pasado. De igual forma el pastoreo genera dificultades a las plantas arbustivas para su establecimiento lo cual afecta la dinámica de estos ambientes; favoreciendo el mantenimiento de páramos poco arbustivos que limitan el desarrollo de las zonas de bosques pre-parameros. Esto ha sido utilizado como explicación de lo abrupto de algunos límites en las zonas tropicales (Bader et al., 2008), pero en términos generales existen pocos estudios que cuantifiquen esta utilización.

Aún cuando existan todos estos procesos de acción antrópica, la formación del límite de crecimiento arbóreo es respuesta directa a factores naturales, que se ven amplificadas por la acción del hombre. Finalmente, los resultados de este trabajo dejan claro que la combinación de bajas temperaturas y altas radiaciones pueden afectar el balance de carbono de las especies leñosas en la alta montaña tropical, retomando este balance como posible explicación natural al mantenimiento actual del límite de crecimiento.

El cambio climático.

Tal como sugieren estudios palinológicos (Van der Hammen, 1979; Tinner y Theurillat, 2003; Hooghiemstra y Van der Hammen, 2004), en los periodos glaciares e interglaciares, las variaciones térmicas causaron cambios importantes en la distribución de las especies leñosas. Aún cuando los

procesos de enfriamiento y calentamiento en estos períodos fue muy lento permitiendo un ascenso gradual de la vegetación en los periodos cálidos. Estos estudios muestran la gran dinámica esperada en estas zonas de transición entre dos ecosistemas tan contrastantes en las cuales el reemplazo de especies ha sido un hecho.

Aún cuando queda claro que el aumento de las temperaturas debería conllevar consigo a una movilización del límite de crecimiento, este dependerá de la interacción de muchos otros factores, tales como la disponibilidad de agua, la disminución de la presión antrópica sobre los páramos, y la posibilidad de que aumenten los efectos producidos por patógenos, actualmente controlados por las bajas temperaturas invernales. Tal como ha sucedido en zonas templadas, en las que la desaparición de temperaturas extremadamente bajas ha favorecido la proliferación de hongos y enfermedades, limitando el desarrollo de las especies leñosas y produciendo en algunos casos el retroceso de la frontera arbórea (Holtmeier, 2009).

Tal como se comentó con anterioridad, en el caso de los páramos el avance de la frontera boscosa parece estar vinculada con la presencia de plantas arbustivas en el páramo. El cambio climático mundial actual predice el aumento de las temperaturas hasta en 6°C. Este aumento podría mejorar las condiciones limitantes para el balance de carbono por medio de un aumento del tiempo de fijación de CO₂. Sin embargo, uno de los problemas aparentemente importantes se seguiría presentado, este se refiere a las altas radiaciones, con lo que sería necesaria la presencia de individuos facilitadores para posibilitar la colonización de los ambientes a mayor altitud.

Por otro lado, muchos de los filtros propuestos que tienen que ver con los factores de dispersión y establecimiento de nuevas plántulas poco se han estudiado. Aún hoy en día se conoce muy poco sobre la ecología de las semillas de las especies que se encuentran en estos ambientes. Esto impide poder realizar predicciones sobre los posibles propágulos de nuevos ambientes

de bosques. La mayoría de los modelos de predicción del avance de la vegetación en las zonas de límite de crecimiento arbóreo (Cairns, 2005; Arzac, 2008, por ejemplo) carecen de la información básica necesaria para poder realizar estas predicciones con buena precisión. En muchos casos, el entendimiento de los factores ambientales y su efecto sobre la vegetación leñosa no están claros, por lo que se terminan presentando modelos simplistas sin buenas bases ecofisiológicas.

Se mantienen entonces las interrogantes de que va a pasar con el límite arbóreo y los cambios climáticos ¿Serán más importantes los procesos de aumento de temperatura, o los de disponibilidad de agua? ¿Cambiará la dinámica entre plantas y patógenos en estos ambientes? Sabiendo que las radiaciones no deben variar en extremo, ¿Qué va a pasar con las especies leñosas?

Bibliografía.

Aerts, R., Cornelissen, J. y Dorrepaal, E. (2006). Plant Performance in a Warmer World: General Responses of Plants from Cold, Northern Biomes and the Importance of Winter and Spring Events. *Plant Ecology* 182(1): 65-77.

Akhalkatsi, M., Abdaladze, O., Nakhutsrishvili, G. y Smith, W. K. (2006). Facilitation of Seedling Microsites by *Rhododendron Caucasicum* Extends the *Betula Litwinowii* Alpine Treeline, Caucasus Mountains, Republic of Georgia. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 38(4): 481-488.

Anthelme, F., Villaret, J.-C. y Brun, J.-J. (2007). Shrub encroachment in the Alps gives rise to the convergence of sub-alpine communities on a regional scale. *Journal of Vegetation Science* 18(3): 355-362.

- Arzac, A. J. (2008). Distribución espacial de formas de vida de plantas en un gradiente altotérmico en Los Andes Tropicales. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias, Licenciatura en biología Mérida, Venezuela. Universidad de Los Andes. 122 pp.
- Bader, M. Y., Rietkerk, M. y Bregt, A. K. (2007). Vegetation Structure and Temperature Regimes of Tropical Alpine Treelines. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 39(3): 353-364.
- Bader, M., Rietkerk, M. y Bregt, A. (2008). A Simple Spatial Model Exploring Positive Feedbacks at Tropical Alpine Treelines. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 40(2): 269-278.
- Bansal, S. y Germino, M. J. (2009). Temporal variation of nonstructural carbohydrates in montane conifers: similarities and differences among developmental stages, species and environmental conditions. *Tree Physiology* 29(4): 559-568.
- Brodribb, T. y Hill, R. S. (1999). The importance of xylem constraints in the distribution of conifer species. *New Phytologist* 143(2): 365-372.
- Cairns, D. M. (2005). Simulating carbon balance at treeline for krummholz and dwarf tree growth forms. *Ecological Modelling* 187(2-3): 314-328.
- Cavender-Bares, J. y Holbrook, N. M. (2001). Hydraulic properties and freezing-induced cavitation in sympatric evergreen and deciduous oaks with contrasting habitats. *Plant, Cell & Environment* 24(12): 1243-1256.
- Cavieres, L. A., Rada, F., Azócar, A., García-Núñez, C. y Cabrera, H. M. (2000). Gas exchange and low temperature resistance in two tropical high mountain tree species from the Venezuelan Andes. *Acta Oecologica* 21(3): 203-211.

- Choler, P. (2005). Consistent Shifts in Alpine Plant Traits along a Mesotopographical Gradient. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 37(4): 444-453.
- Cochard, H., Barigah, T., Herbert, E. y Caupin, F. (2007). Cavitation in plants at low temperature: is sap transport limited by the tensile strength of water as expected from Briggs? Z-tube experiment? *New Phytologist* 173(3): 571-575.
- Comstock, J. P. y Sperry, J. S. (2000). Tansley Review No. 119. Theoretical considerations of optimal conduit length for water transport in vascular plants. *New Phytologist* 148(2): 195-218.
- Germino, M. J. y Smith, W. K. (1999). Sky exposure, crown architecture, and low-temperature photoinhibition in conifer seedlings at alpine treeline. *Plant, Cell & Environment* 22(4): 407-415.
- Germino, M., Smith, W. y Resor, A. (2002). Conifer seedling distribution and survival in an alpine-treeline ecotone. *Plant Ecology* 162(2): 157-168.
- Giraldo, P. (2009). El papel de la médula en las relaciones hídricas de dos especies de la subtribu Espeletinae. *Libanothannus neriifolius* Ernst. y *Carramboa tachirensis* (Aristeg) Cuatrec. Instituto de Ciencias Ambientales y Ecológicas Facultad de Ciencias, Mérida, Venezuela: Universidad de Los Andes.
- Goldstein, G., Meinzer, F. y Monasterio, M. (1984). The role of capacitance in the water balance of Andean giant rosette species. *Plant, Cell & Environment* 7(3): 179-186.
- Goldstein, G., Rada, F., Canales, M. O. y Zabala, O. (1989). Leaf gas exchange of two giant rosette species. *Oecologia Plantarum* 10: 359-370.

- Halloy, S. R. P. y Mark, A. F. (2003). Climate-Change Effects on Alpine Plant Biodiversity: A New Zealand Perspective on Quantifying the Threat. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 35(2): 248-254.
- Heiri, C., Bugmann, H., Tinner, W., Heiri, O. y Lischke, H. (2006). A model-based reconstruction of Holocene treeline dynamics in the Central Swiss Alps. *Journal of Ecology* 94(1): 206-216.
- Holbrook, N. M. y Zwieniecki, M. A. (1999). Embolism Repair and Xylem Tension: Do We Need a Miracle? *Plant Physiology* 120(1): 7-10.
- Holtmeier, F.-K. y Broll, G. (2005). Sensitivity and response of northern hemisphere altitudinal and polar treelines to environmental change at landscape and local scales. *Global Ecology and Biogeography* 14(5): 395-410.
- Holtmeier, F.-K. y Broll, G. (2007). Treeline advance, driving processes and adverse factor. *Landscape Online* 1: 1-33.
- Holtmeier, F.-K. (2009). *Mountain Timberlines. Ecology, Patchiness, and Dynamics* Geneva, Switzerland: Springer Science
- Johnson, D. M., Germino, M. J. y Smith, W. K. (2004). Abiotic factors limiting photosynthesis in *Abies lasiocarpa* and *Picea engelmannii* seedlings below and above the alpine timberline. *Tree Physiology* 24(4): 377-386.
- Körner, C. (1998). A re-assessment of high elevation treeline positions and their explanation. *Oecologia* 115(4): 445-459.
- Lambers, H., Chapin, F. S. y Pons, T. (2008). *Plant Physiological Ecology*. New York: Springer.
- Luo, T., Luo, J. y Pan, Y. (2005). Leaf traits and associated ecosystem characteristics across subtropical and timberline forests in the Gongga Mountains, Eastern Tibetan Plateau. *Oecologia* 142(2): 261-273.

- Malanson, G. (1997). Effects of feedbacks and seed rain on ecotone patterns. *Landscape Ecology* 12(1): 27-38.
- Meinzer, F. C. y Goldstein, G. (1985). Some consequences of leaf pubescence in the Andean giant rosette plant *Espeletia timotensis*. *Ecology* 66: 512-520.
- Meinzer, F. C. (2002). Co-ordination of vapour and liquid phase water transport properties in plants. *Plant, Cell & Environment* 25(2): 265-274.
- Meinzer, F. C., Goldstein, G. y Rada, F. (1994). Paramo microclimate and leaf thermal balance of Andean Giant rosette plants. In *Tropical Alpine Environments. Plant form and function*, 45-59 (Eds P. W. Rundel, A. P. Smith and F. C. Meinzer). Cambridge: Cambridge University Press.
- Michalet, R., Rolland, C., Joud, D., Gafta, D. y Callaway, R. M. (2003). Associations between canopy and understory species increase along a rainshadow gradient in the Alps: habitat heterogeneity or facilitation? *Plant Ecology* 165(2): 145-160.
- Monasterio, M. (1980). Las formaciones vegetales de los Páramos de Venezuela. En *Monasterio: Estudios ecológicos en los páramos andinos*, . Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela. pp 93-158
- Pagés, J.-P. y Michalet, R. (2006). Contrasted Responses of Two Understorey Species to Direct and Indirect Effects of a Canopy Gap. *Plant Ecology* 187(2): 179-187.
- Rada, F., Azócar, A., Briceño, B., González, J. y García-Núñez, C. (1996). Carbon and water balance in *Polylepis sericea*, a tropical treeline species. *Trees - Structure and Function* 10(4): 218-222.

- Reich, P. B., Ellsworth, D. S., Walters, M. B., Vose, J. M., Gresham, C., Volin, J. C. y Bowman, W. D. (1999). Generality of leaf trait relationships: a test across six biomes. *Ecology* 80(6): 1955-1969.
- Reich, P. B., Walters, M. B. y Ellsworth, D. S. (1992). Leaf Life-Span in Relation to Leaf, Plant, and Stand Characteristics among Diverse Ecosystems. *Ecological Monographs* 62(3): 365-392.
- Santaella, W. A. (2007). Análisis del cambio del paisaje en la línea de selva nublada – páramo, La Aguada, Mérida. Facultad de Humanidades, Licenciatura en Estudios Ambientales Cabudare-Venezuela. Universidad de Yacambú.
- Shrestha, B. B., Ghimire, B., Lekhak, H. D. y Jha, P. K. (2007). Regeneration of Treeline Birch (*Betula utilis* D. Don) Forest in a Trans-Himalayan Dry Valley in Central Nepal. *Mountain Research and Development* 27(3): 259-267.
- Sperry, J. S., Adler, F. R., Campbell, G. S. y Comstock, J. P. (1998). Limitation of plant water use by rhizosphere and xylem conductance: results from a model. *Plant, Cell & Environment* 21(4): 347-359.
- Stevens, G. C. y Fox, J. F. (1991). The Causes of Treeline. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22(1): 177-191.
- Tinner, W. y Theurillat, J.-P. (2003). Uppermost Limit, Extent, and Fluctuations of the Timberline and Treeline Ecocline in the Swiss Central Alps during the Past 11,500 Years. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 35(2): 158-169.
- Tranquillini, W. (1979). *Physiological Ecology of the Alpine Timberline. Tree existence at high altitudes with Special reference to the European Alps.* Berlin: Springer-Verlag.

- Vilagrosa, A., Bellot, J., Vallejo, V. R. y Gil-Pelegrin, E. (2003). Cavitation, stomatal conductance, and leaf dieback in seedlings of two co-occurring Mediterranean shrubs during an intense drought. *Journal of Experimental Botany*. 54(390): 2015-2024.
- Wang, T., Ren, H. y Ma, K. (2005). Climatic signals in tree ring of *Picea schrenkiana* along an altitudinal gradient in the central Tianshan Mountains, northwestern China. *Trees - Structure and Function* 19(6): 736-742.
- Wieser, G. (1997). Carbon dioxide gas exchange of cembran pine (*Pinus cembra*) at the alpine timberline during winter. *Tree Physiology* 17: 473-477.
- Zheng, S. y Shangguan, Z. (2007). Spatial patterns of leaf nutrient traits of the plants in the Loess Plateau of China. *Trees - Structure and Function* 21(3): 357-370.

Anexos

ANEXO 1. ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE TASAS DE ENFRIAMIENTO Y MEDICIÓN DE LA RESISTENCIA AL CONGELAMIENTO EN ESPECIES DE PÁRAMO.

INTRODUCCIÓN.

Uno de los factores determinantes en la distribución de la vegetación a nivel mundial es la temperatura. De hecho dos terceras partes del planeta están sujetas, durante alguna parte del año, a temperaturas por debajo de 0 °C (Beck et al., 2004). Por lo tanto, la resistencia al congelamiento representa una de las adaptaciones de mayor importancia para la sobrevivencia de las especies vegetales.

Aunado a estas consideraciones, el efecto del congelamiento sobre las células vegetales es muy variado y va desde pérdida de la fluidez de las bio-membranas, hasta deshidratación total o parcial de las mismas, entre otros muchos efectos (Levitt, 1980). Las adaptaciones de las plantas a la resistencia a este tipo de limitación se han caracterizado por presentar dos mecanismos distintos, por un lado, las plantas pueden permitir el congelamiento de los espacios extracelulares, considerándose entonces plantas tolerantes. En el otro mecanismo, y por el otro, las plantas evitan someterse a procesos de congelamiento, ya sea evitando la presencia de tejidos en los períodos desfavorables (cambios fenológicos) o evitando la formación de hielo en los tejidos vivos (sobre enfriamiento o ajustes osmóticos), con la aparición de varios mecanismos para lograrlo, ya sea por la presencia de crioprotectores, la síntesis y acumulación de sustancia de bajo peso molecular (Nanjo et al., 1999) o alto peso molecular (Steponkus et al., 1998). Para las zonas de alta montaña tropical es el sobre-enfriamiento el mecanismo de evasión preponderante.

Son muchas las variables que determinan el punto en el que se inicia la formación de hielo en tejidos bajo experimentación (Rada et al., 1987; Beck et

al., 2004). Existen diversos factores que afectan de forma directa la aplicación de estos experimentos, entre los cuales cabe mencionar el potencial hídrico foliar (Goldstein et al., 1985; Rada et al., 1987), el tamaño de las células (Azocar, 2006), el tamaño del material (Yoshida, 1984), entre otros factores.

La respuesta al congelamiento no es uniforme en el tiempo, y depende de la capacidad de aclimatación de las plantas en el tiempo. En las zonas templadas las variaciones estacionales producen modificaciones en la resistencia al congelamiento, observándose en casos como el de *Pinus sylvestris* L., un aumento de la resistencia al congelamiento en los meses de invierno. Esta especie pasa de resistir temperaturas de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ en meses de verano a temperaturas por debajo de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en meses de invierno (Beck et al., 2004). Los autores sugieren que en estos ambientes se produce un endurecimiento por varios factores, entre los que cabe destacar la aparición de temperaturas congelantes cercanas a los cero grados y cambios en el fotoperiodo.

Los ambientes de alta montaña tropical son muy propicios para estudiar el efecto del congelamiento sobre las plantas, ya que, dichos procesos de congelamiento se pueden producir en cualquier momento del año. Esto favorece, por un lado, la presencia de mecanismos de resistencia al congelamiento durante todo el año y que dichos mecanismos no varíen anualmente de forma sustancial.

Existen en la actualidad pocos datos sobre las tasas reales de enfriamiento en ambientes de alta montaña tropical, sin embargo, el descenso de la temperatura en estos ambientes pueden darse de forma muy violenta, en la que seguramente se superen los $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{h}$. Monasterio (1980), en mediciones diarias de temperaturas, muestra una variación de hasta $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nivel del suelo en la localidad de Piedras Blancas en Venezuela a 4000 m de altitud. Tomando en cuenta sólo estos valores se puede calcular una tasa de más de $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{h}$ considerando que el enfriamiento sea lineal durante todo el día. Sin embargo, las tasas son variables con máximos tanto al ponerse el sol, como

justo antes del amanecer, estas tasas son más severas en épocas secas cuando las noches permanecen completamente despejadas.

Algunos autores sugieren que estos procesos de congelamiento son sensibles a la tasa en la cual se produce el enfriamiento. Sin embargo, son muy variables las tasas utilizadas en los trabajos realizados sobre este tema, y han sido poco estudiados los efectos de las tasas empleadas hasta ahora. Se plantea, sin embargo, que las tasas rápidas de enfriamiento favorecen la formación de hielo intracelular (Finkle et al., 1974). En los diversos ensayos en la literatura las tasas más utilizadas van desde 2 °C/h a 20 °C/h (Yoshida, 1984; Goldstein et al., 1985; Rada et al., 2001). Por esta razón, se hace necesario analizar dicho efecto para proponer protocolos estandarizados para la determinación del daño por congelamiento en tejidos vegetales.

Aún cuando el congelamiento es sumamente importante en las zonas de alta montaña, no existe en la actualidad un verdadero consenso sobre el protocolo a utilizar para medir la resistencia de las plantas al mismo. En este trabajo nos proponemos estudiar el efecto de las tasas de enfriamiento de tejidos vegetales más utilizadas en la literatura, entre 2°C y 25 °C por hora, así como estandarizar un protocolo de medición de la temperatura de congelamiento y la temperatura de daño en especie de alta montaña tropical.

Metodología

Las pruebas se realizaron en dos especies ampliamente estudiadas, pertenecientes a la misma familia, con estrategias completamente diferentes en cuanto a la resistencia a las temperaturas congelantes nocturnas, estas son: *Coespeletia timotensis*, especie de roseta caulescente que crece en el páramo alti-andino reportada como evasora,, es decir, no tiene la capacidad de sobrevivir al congelamiento de ninguno de sus tejidos (Rada et al., 1985). Esta evasión la logra a través de una importante capacidad de sobreenfriar hasta temperaturas muy por debajo del punto de congelamiento del agua. La otra especie es *Senecio formosus*, hierba erecta ampliamente distribuida en los

páramos andinos y alti-andinos, reportada como tolerante al congelamiento (Squeo et al., 1991). Es decir, la misma resiste la formación de hielo extracelular.

Determinación del punto de congelamiento

Plantas enteras de *S. formosus* y hojas de *C. timotensis* se colectaron en la localidad de Piedras Blancas a una altitud de 4200 m,. Este material fue rehidratado durante un período de 12 horas en la obscuridad a una temperatura de 5 °C, de forma de permitir la saturación completa del mismo. Esto se realiza con la finalidad de evitar variaciones en el punto donde se inicia la formación de hielo, ya que se ha demostrado por la relación inversa que existe entre el potencial hídrico foliar y la temperatura a la que se inicia la nucleación del hielo (Goldstein et al., 1985; Rada et al., 1987).

Se tomó el potencial hídrico foliar en cada una de las hojas a ser utilizadas para los procesos de congelamiento antes de comenzar el experimento, esto se realizó utilizando una bomba de Scholander. Dado que no se pudieron realizar las mediciones en las hojas enteras a causa del tamaño de las mismas, se realizaron los experimentos en una porción de hoja de aproximadamente 5 mm de ancho por 35 mm de largo, en sentido transversal a la hoja. Estas muestras fueron cortadas una vez confirmado la total saturación de las hojas. Con la finalidad de evitar la formación de hielo sobre la superficie de la hoja se descartó la porción del material que se encontraba sumergido en el agua para la rehidratación del mismo.

Las muestras se introdujeron inmediatamente después de cortadas en un tubo de ensayo de 1,5 cm de diámetro. Estos tubos se sellaron con un tapón hermético provisto de un termopar (tipo T, cobre-constantan) conectado a un sistema de adquisición de datos para el registro continuo de la temperatura del tejido vegetal dentro del tubo; se colocaron 8 muestras en cada ensayo.

Los tubos de ensayo fueron colocados dentro de un baño refrigerado en una solución de etanol-agua en una proporción 2 a 1. Una vez colocados todos los tubos dentro de la solución, se esperó la estabilización inicial de la temperatura dentro de los tubos y se bajó la temperatura a una tasa constante, hasta conseguir las exotermas en todos los tubos.

Se realizaron tres series por cada una de las tres tasas de enfriamiento (2 °C/h, 10 °C/h y 25 °C/h) utilizadas, con cuatro replicas por especie, por serie.

Determinación de daño en el tejido foliar.

Se utilizó la metodología del lavado iónico, o de conductividad eléctrica (Dexter et al., 1930; Linden, 2002), la cual consiste en realizar mediciones de conductividad de agua pura con muestras de tejido vegetal.

Para la estimación de la temperatura de daño en el tejido vegetal se tomaron muestras de la misma forma a la metodología de determinación del punto de congelamiento. Estas muestras se colocaron en el baño refrigerante, e igualmente que en el caso anterior se esperó la estabilización de la temperatura y se procedió a enfriar el mismo a tasas constante (2°C/h, 10° C/h y 25° C/h).

Para la realización de las mediciones de conductividad eléctrica se tomaron muestras cada 5 °C, a saber: 5, 0, -5, -10, -15, -20, -25 °C. Estas muestras fueron extraídas del baño una vez alcanzada la temperatura deseada, y dejadas sobre una gradilla para permitir un calentamiento a tasa constante.

A fin de evitar la liberación desigual de electrolitos, fueron introducidas en el agua desionizadas (MQ) al concluir la serie de congelamiento, luego de alcanzar la temperatura ambiente, a una tasa de calentamiento de 5 °C/h. Para tal fin, fueron retiradas de los tubos y colocadas en envases estériles contentivos del agua desionizadas. Las muestras fueron colocadas en la oscuridad y a una temperatura de 5°C, para evitar su contaminación y la proliferación de bacterias presentes en el tejido vegetal. Luego de 72 horas se

midió la conductividad eléctrica de la solución en micro Siemens (μS), con la ayuda de un conductímetro marca Extech (EC500 Waterproof ExStik Conductivity/TDS/Salinity Meter).

Con la finalidad de producir la lisis total del tejido vegetal y la liberación de todos los electrolitos, luego de realizadas todas las mediciones, se congeló cada muestra en nitrógeno líquido (-196°C). El material fue reintroducido en los respectivos envases sin retirar la solución y llevados a las condiciones de oscuridad y temperaturas antes mencionadas. Se midió finalmente la conductividad eléctrica con el mismo instrumento, luego de un período de reposos de 72 horas. La proporción de tejido dañado se calculó mediante la relación de electrolitos disueltos en el agua de la muestra, antes y después del congelamiento en nitrógeno líquido.

Para estimar el punto de congelamiento en condiciones de laboratorio del agua pura, se realizó una serie de experimentos con agua pura en los mismos tubos de ensayo, en cada una de las tasas de enfriamiento previamente mencionados, bajo el mismo protocolo seguido para las muestras de tejido vegetal.

Como el proceso de congelamiento en la especie *C. timotensis* es un proceso violento, en parte debido a que la planta evita que el proceso ocurra disminuyendo con esta estrategia el punto de congelamiento; y por otro lado, que la precisión empleada en la determinación del daño en estos ensayos es de 5°C , se planteó una serie de ensayos con el propósito de medir si el daño ocurre o no a la temperatura de congelamiento en *C. timotensis*.

En este ensayo se realizó la preparación del material de la misma manera que para las determinaciones de congelamiento. Se utilizó material plenamente rehidratado que fue colocado en los tubos de ensayo con los termopares tipo t antes mencionados. Se realizó el registro continuo de la temperatura de las muestras, se extrajeron del baño simultáneamente, y a una misma temperatura, muestras congeladas y no congeladas, basados en diferencias

mínimas en el punto de congelamiento de estas. Las muestras extraídas en pares del baño refrigerante, fueron introducidas en agua desionizada para realizar las mediciones de liberación de electrolitos. Se realizaron en estas muestras las determinaciones de daño tal como en los casos anteriores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Las temperaturas de congelamiento no muestran diferencias significativas entre las distintas tasas de enfriamiento aplicadas. Los valores de temperatura de congelamiento y daño se presentan en el cuadro A1.1. Estos resultados concuerdan con los valores obtenidos por otros autores para estas especies, tanto en los valores de temperatura de daño como de congelamiento (Goldstein et al., 1985; Squeo et al., 1991; Azocar, 2006).

Cuadro A1.1. Promedio de temperaturas de congelamiento y daño para *Coespeletia timotensis* y *Senecio formosus* a tres diferentes tasas de enfriamiento. (n=16). Errores estándar entre paréntesis.

Especie	Tasa de enfriamiento					
	2 °C/H		10 °C/H		25 °C/H	
	Congel.	Daño	Congel.	Daño	Congel.	Daño
<i>C. timotensis</i>	-10,19 (1,30)	-8,45 (2,35)	-9,88 (1,06)	-8,15 (2,15)	-10,04 (1,24)	-8,77 (1,98)
<i>S. formosus</i>	-4,92 (0,80)	-8,63 (0,87)	-4,86 (0,78)	-8,71 (0,57)	-4,71 (0,92)	-8,72 (0,82)
<i>Agua MQ</i>	-4,98 (1,03)	*	-5,08 (0,87)	*	-5,13 (0,87)	*

Las especies presentan estrategias bien diferentes para resistir al estrés térmico. Por un lado, *C. timotensis* muestra un proceso de sobre-enfriamiento importante evitando el congelamiento hasta temperaturas aproximadas de -10

°C, y por el otro, *S. formosus* favorece un congelamiento temprano, tolerando cierto grado de congelamiento extra celular.

La especie evasora (*C. timotensis*) muestra un comportamiento similar al reportado en otras publicaciones (Goldstein et al., 1985; Rada et al., 1985) con una temperatura de congelamiento y daño muy próximas (no se presentan diferencias significativas), esta respuesta induce a pensar que el congelamiento es responsable del daño en esta especie. La precisión utilizada en estos experimentos de 5°C, hace que en este caso en particular se estimen temperaturas de daño por debajo de las temperaturas de congelamiento, ya que el 100% del daño se presenta a -10°C en la mayoría de los casos, y la estimación del 50 % de daño se obtiene por interpolación lineal entre el daño a - 5°C y el daño a -10°C.

En los ensayos realizados para determinar si el daño ocurre o no a la temperatura de congelamiento se determinó para *C. timotensis* que el daño ocurre de forma repentina y no de forma gradual como sugiere el método de determinación de daño, al calcular el 50% de daño en el tejido vegetal. Esto confirma que para esta especie el daño se produce una vez congelado el tejido vegetal. Para las especies evasoras es finalmente más exacto utilizar la temperatura de congelamiento como temperatura de daño.

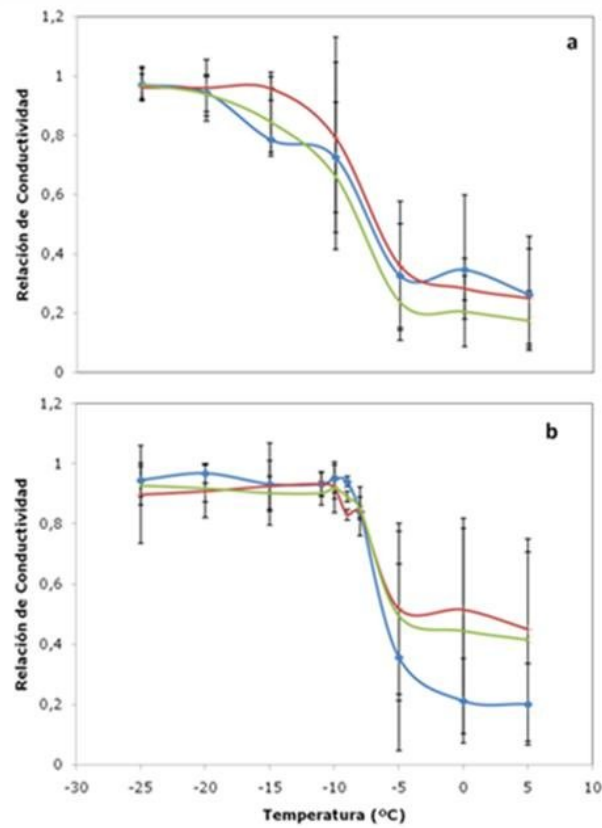


Figura A1.1: Conductividad eléctrica relativa vs Temperatura a tres diferentes tasas de enfriamiento para las dos especies. (a) *Coespeletia timotensis* (b) *Senecio formosus* (●) 2°C/h, (+) 10°C/h, (x) 25 °C/h

Entre los efectos que pueden cambiar la temperatura de congelamiento en las diversas especies se tienen el potencial hídrico foliar, razón por la que se propone la rehidratación total de las plantas antes de realizar los ensayos. Esto nos hace suponer que en los ensayo para *C. timotensis* que presentan valores ligeramente inferiores a los encontrados en nuestros ensayos no se realizó el control del potencial hídrico foliar (Rada et al., 1985) y dicho material pudo encontrarse en condiciones de ligera deshidratación.

Otro factor que podría afectar éstas mediciones es la procedencia del material, ya que como se sugiere en la literatura (George et al., 1977), las especies

tienden a aumentar la capacidad de resistencia al congelamiento en lugares donde dichos procesos son más severos y frecuentes.

En el caso de *S. formosus*, el daño también ocurre de forma abrupta, y pareciese producirse una segunda exoterma muy leve cercana a esta temperatura de daño. En algunos casos, similar a los propuestos por Squeo (1991), en las cuales se presentan exotermas cercanas al punto de congelamiento, lo cual sugeriría que el daño en estos tejidos ocurre por congelamiento intracelular. Sin embargo, dichas exotermas son poco medibles posiblemente causado por el ruido que genera el hielo extracelular.

A diferencia de lo que se piensa, las tasas de enfriamiento no generan ningún efecto en el proceso de congelamiento y daño en tejidos vegetales entre los 2 y los 25 °C/h, tal como se sugiere en los pocos trabajos publicados en la literatura (Kaku et al., 1980). Posiblemente tasas mayores a las utilizadas en este trabajo pudieran presentar alguna variación en la medición de la resistencia al congelamiento en las plantas.

BIBLIOGRAFÍA.

Azocar, C. J. (2006). Relación entre anatomía foliar, forma de vida y mecanismos de resistencia a temperaturas congelantes en diferentes especies en el Páramo de Piedras Blancas. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias, Licenciatura en biología Mérida, Venezuela. Universidad de Los Andes. 64 pp.

Beck, E., Heim, R. & Hansen, J. (2004). Plant resistance to cold stress: Mechanisms & environmental signals triggering frost hardening & dehardening. *Journal of Biosciences* 29(4): 449-459.

Dexter, S. T., Tottingham, W. E. & Graber, L. F. (1930). Preliminary results in measuring the hardiness of plants. *Plant Physiology*. 5(2): 215-223.

- Finkle, et al B.J., Pereira, E B., & Brown, M. S. (1974). Freezing of Nonwoody Plant Tissues I. Effect of rate of cooling on damage to frozen beet root sections. *Plant Physiology* 53, 705-708.
- George, M. F., Hong, S. G. & Burke, M. J. (1977). Cold Hardiness & Deep Supercooling of Hardwoods: Its Occurrence in Provenance Collections of Red Oak, Yellow Birch, Black Walnut, & Black Cherry. *Ecology* 58(3): 674-680.
- Goldstein, G., Rada, F. & Azocar, A. (1985). Cold hardiness & supercooling along an altitudinal gradient in andean giant rosette species. *Oecologia* 68(1): 147-152.
- Kaku, S., Iwaya, M. & Kunishige, M. (1980). Supercooling ability of *Rhododendron* flower buds in relation to cooling rate & cold hardiness. *Plant Cell Physiology* 21(7): 1205-1216.
- Levitt, J. (Ed) (1980). Responses of plant to environmental stresses. New York: Academic Press.
- Linden, L. (2002). Measuring cold hardiness in woody plants. In Department of Applied Biology, 57 Helsinki: University of Helsinki.
- Monasterio, M. (1980). Las formaciones vegetales de los Páramos de Venezuela. En Monasterio Estudios ecológicos en los páramos andinos, 93-158 Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela .
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (1999). Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing & salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 461(3): 205-210.
- Rada, F., Garcia-Nunez, C., Boero, C., Gallardo, M., Hilal, M., Gonzalez, J., Prado, F., Liberman-Cruz, M. & Azocar, A. (2001). Low-temperature

- resistance in *Polylepis tarapacana*, a tree growing at the highest altitudes in the world. *Plant, Cell & Environment* 24(3): 377-381.
- Rada, F., Goldstein, G., Azocar, A. & Meinzer, F. (1985). Freezing avoidance in Andean giant rosette plants. *Plant, Cell & Environment* 8(7): 501-507.
- Rada, F., Goldstein, G., Azocar, A. & Torres, F. (1987). Supercooling along an Altitudinal Gradient in *Espeletia schultzii*, a Caulescent Giant Rosette Species. *Journal of Experimental Botany* 38(3): 491-497.
- Squeo, F. A., Rada, F., Azocar, A. & Goldstein, G. (1991). Freezing tolerance & avoidance in high tropical Andean plants: Is it equally represented in species with different plant height? *Oecologia* 86(3): 378-382.
- Steponkus, P. L., Uemura, M., Joseph, R. A., Gilmour, S. J. & Thomashow, M. F. (1998). Mode of action of the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(24): 14570-14575.
- Yoshida, S. (1984). Studies on Freezing Injury of Plant Cells: I. Relation between Thermotropic Properties of Isolated Plasma Membrane Vesicles & Freezing Injury. *Plant Physiology* 75(1): 38-42.

Anexo 2: Método alternativo para la realización de curvas presión volumen.

INTRODUCCIÓN.

Las curvas presión volumen son una herramienta muy utilizada para examinar los componentes del potencial hídrico en relación con el contenido de agua foliar (Schulte y Hinckley, 1985). Los aspectos teóricos de este método fueron ampliamente discutidos y desarrollados entre los años 60 y 80 (Scholander, et al., 1964; Tyree y Hammel, 1972; He, et al., 2007).

Básicamente, las curvas se analizan gráficamente mediante la representación del agua extraída relativa o absoluta (cm^3 , g, mg, etc) y el recíproco del potencial hídrico foliar, en un seguimiento de deshidratación de material foliar y un cálculo de contenido de agua al finalizar. En estas curvas se tienen dos zonas claramente diferenciadas, una inicial exponencial y otra claramente lineal (Tyree y Hammel 1972; He, et al., 2007). De las dos funciones de ajuste se obtienen a su vez, el potencial osmótico de saturación, el potencial osmótico en el punto de pérdida de turgor, el contenido relativo de agua en el punto de pérdida de turgor y el módulo de elasticidad máximo (figura A2.1) (Tyree y Hammel, 1972; Lenz, et al., 2006; He, et al., 2007). Clásicamente la obtención de los datos se hace mediante el uso de la bomba de presión, bajo dos modalidades, una de transpiración libre (Tyree y Hammel, 1972), en el cual se deja transpirar el órgano vegetal en condiciones ambientales, y la otra de extracción de savia (Talbot, et al., 1975), en la cual se presuriza el material y se pesa la savia extraída. En ambos métodos se realizan todas las mediciones de cada curva en una hoja o rama individual, la cual se presuriza y despresuriza de forma constante durante el seguimiento del proceso de deshidratación (Schoalander, et al., 1964; Tyree y Hammel, 1972). El proceso de compresión-descompresión, en muchos casos puede causar daño en los vasos, la cavitación de los mismos si el mismo se realiza de forma muy violenta, finalmente la extracción de resinas u otros compuestos acuosos pueden causar errores en las mediciones, que afectan de manera directa cualquier estimación realizada con estos datos.

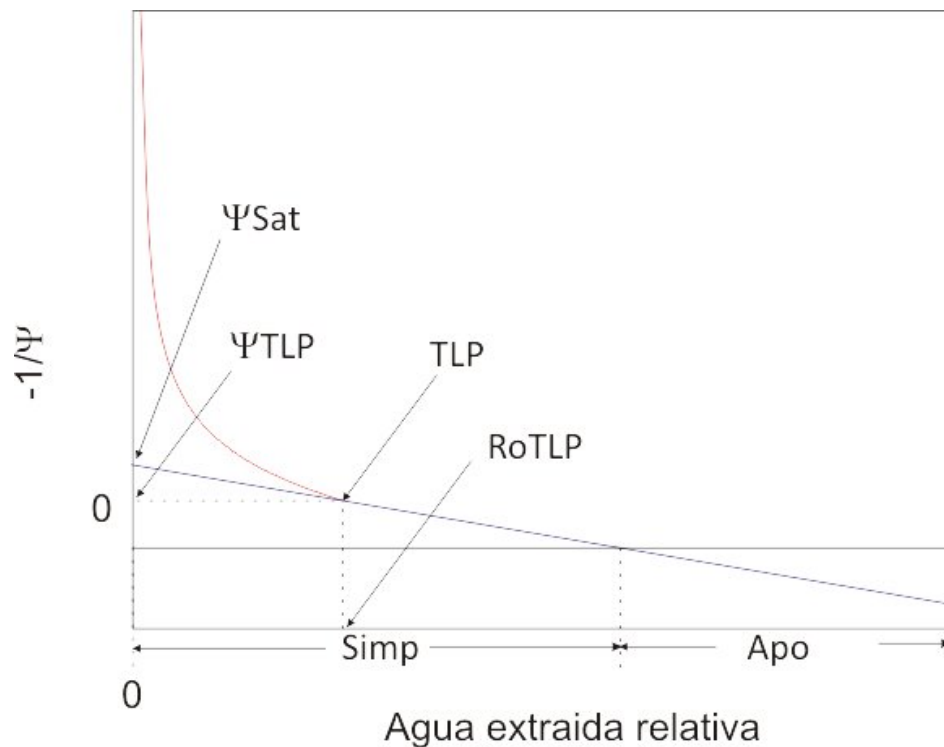


Figura A2.1: Curva presión volumen típica, con sus componentes. Ψ_{sat} : Potencial osmótico a saturación; Ψ_{TLP} : Potencial osmótico en el punto de pérdida de turgor; TLP: Punto de pérdida de turgor; Ro_{TLP} : Agua extraída en el punto de pérdida de turgor; Simp: Agua simplásmica; Apo: Agua Apoplástica.

Tal como se plantea anteriormente, el proceso de deshidratación ocurre en dos fases, en un primer momento (antes del punto de pérdida de turgor), pequeños cambios en el contenido de agua, causan grandes cambios en el potencial hídrico del material. Esto ocurre de forma rápida en el tiempo, lo que ocasiona en muchos casos que se pierdan datos básicos e importantes en la zona no lineal de la curva y se generan errores en cálculo del módulo de elasticidad máximo, y punto de pérdida de turgor. Mediante el método clásico de perderse estos puntos los mismos no pueden obtenerse nuevamente, salvo que se realice una nueva curva presión volumen, lo que conlleva a la pérdida de todo el experimento. En un segundo momento (luego del punto de pérdida de turgor), el proceso se hace lento y generalmente se obtienen muchas mediciones poco variables. Esto hace que el proceso general de la construcción de las curvas sea un proceso

lento y tedioso, limitando las posibilidades de realizar replicaciones en hojas de diversas plantas un mismo día.

En el método gráfico tradicional la apreciación del usuario es crucial en la determinación de las zonas de la curva, principalmente en la determinación de los puntos de la parte lineal, y no permite realizar estimaciones estadísticas sobre el ajuste realizado. Con la finalidad de corregir parcialmente este problema, se han hecho varios programas en diversos lenguajes de programación que permiten hacer algunos ajustes con una menor injerencia del investigador (Schulte y Hinckley 1985, Ranney y Davidson 1992, He, et al., 2007). Sin embargo, dichos programas no permiten la utilización de material proveniente de diversas hojas y no siempre funciona, lo que hace necesario un análisis automatizado, y se tenga un ajuste estadísticamente más fiable.

En este trabajo más que cambiar los aspectos teóricos de este método, se propone realizar un ajuste al método práctico de obtención de datos, así como de su procesamiento con la ayuda de un programa que permita interpretar los datos de forma más objetiva.

MÉTODO.

Colección y preparación del material.

Para la evaluación y diseño de este método se trabajó exclusivamente con material de especies leñosas, lo cual no limita el uso a esta forma de crecimiento. Al tratarse de especies leñosas, el material traído al laboratorio generalmente es una rama, en el caso de plantas juveniles o pequeñas se trabajaría con individuos completos. En cualquiera de los dos casos, las muestras son sometidas de forma integral a procesos de rehidratación.

Tal como explica la teoría de la tensión cohesión (Dixon y Joly, 1894 citado por Tyree, 2007), ampliamente aceptada, las plantas o partes de ellas en condiciones estables mantienen un estatus hídrico similar, es decir, que se mantendrá el mismo potencial hídrico en todo el órgano vegetal si no existen procesos de transporte de agua (transpiración, conducción hidráulica), por tanto se establece que en una rama se pueda medir en

cualquier punto de ella el potencial hídrico y este será el mismo para cualquier otra parte de la misma. Las múltiples hojas al encontrarse en condiciones de oscuridad y saturación atmosférica de agua, se encuentran por tanto en estado estable y al mismo potencial hídrico foliar. Por lo que puede medirse inicialmente el potencial de solo una hoja para saber si se encuentra o no saturada toda la muestra.

Para la colección del material vegetal, se deben tomar dos precauciones generales, que no se produzca la cavitación en campo al momento de cortar las ramas, por lo que se hace necesario en algunos casos extremos (Zonas secas en días despejados) cortar la rama directamente bajo agua. En segundo lugar, limitar la transpiración en el momento del transporte, lo cual se puede hacer, cubriendo las ramas con material hermético oscuro, generalmente bolsas plásticas negras, en caso de ambientes fríos y húmedos el material puede ser transportado en bolsas plásticas dentro de contenedores térmicos.

Una vez en el laboratorio, el material fue colocado en envases con agua y cortado nuevamente bajo el agua, para eliminar posibles burbujas de aire, o restos de tierra o material orgánico. Este fue finalmente cubierto con una bolsa plástica negra y llevado a una cámara de condiciones controladas, en la cual el material pasó entre 12 y 24 horas a baja temperatura, 4 °C para aquellas especies que no sean sensibles al frío, o superior para plantas sensibles al frío. Adicionalmente se debe garantizar la total oscuridad, estas dos condiciones son fundamentales para lograr una buena rehidratación del material vegetal y evitar la transpiración del mismo.

Realización de las mediciones.

Antes de comenzar la experimentación se comprueba la total rehidratación con el uso de la bomba de presión. Se midió el potencial de una hoja, y se pesa para obtener el peso de saturación de la misma.

Para obtener los puntos de la curva se pesan otro grupo de hojas (saturadas) para tener el peso de saturación, se dejan deshidratar de forma diferencial cada una de ellas, para medir el Ψ a cada hoja y se realiza la determinación del peso a ese Ψ cada hoja representará un punto en la

realización de la curva. Se realizan un total de 25 o más mediciones para obtener la curva.

El material restante debe ser puesto en condiciones saturantes para evitar su deshidratación, en caso de necesitar nuevas hojas.

De ser necesario, en caso de una deshidratación muy violenta o daño de material, se toman de nuevo hojas para realizar otros puntos de la curva, con la finalidad de obtener los valores faltantes.

Se seca el material a 60 °C por 72 horas o hasta tener peso constante, para obtener el peso seco de cada hoja. Con los tres pesos y el potencial hídrico por cada hoja, se realizan los cálculos del inverso del potencial y su respectivo contenido de agua extraída, por medio de la ecuación:

$$R_o = \frac{(P_{sat} - P_{pot})}{(P_{sat} - P_{sec})}$$

Donde: R_o = Agua Extraída relativa, P_{sat} = Peso de Saturación; P_{pot} = Peso en el potencial; P_{sec} = Peso seco.

Rutina de análisis.

Los datos son analizados con un programa realizado en SciLAB ®, en el cual los mismos se introducen en dos columnas separadas por espacios, la primera de ellas se refiere al contenido de agua extraída, en valores relativos y la segunda el recíproco del potencial hídrico en mega pascales (figura A2.2).

Para el análisis de los datos, se procede a ordenarlos en función del contenido de agua extraída de menor a mayor, secuencialmente se ajusta una regresión lineal a los datos, y se estiman los parámetros de la ecuación de la recta, obteniendo así el punto de cambio entre la fase lineal y exponencial del ajuste. La expresión de la parte lineal, obtenida por mínimos cuadrados, nos permite calcular los valores de potencial de presión

de la parte no lineal del ajuste, y realizar luego de esto el ajuste por mínimo cuadro de la función exponencial

$$\Psi = C1 * \exp(-ap * x)$$

Donde Y es el potencial de presión, C1: el valor de potencial de presión en máxima saturación y ap: la curvatura de la función.

Se calculan posteriormente los parámetros de las curvas presión volumen por medio de la comparación de las dos funciones, tal como se aplica en el método tradicional (Tyree y Hammel, 1972).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Mediante este método se puede tomar cualquier punto de la curva en cualquier momento, siempre que se mantenga el material vegetal original en condiciones estables y saturantes. También se puede trabajar cada curva con material proveniente de varias plantas, dando una mayor representatividad al análisis. Cuando se aplica este principio debe garantizarse la saturación de todas las muestras a procesar, por lo que se hace necesario medir el potencial hídrico de todas las ramas.

Al igual que en el método tradicional las dos partes de la curva son fácilmente apreciables en el gráfico (figura A2.2), sin embargo, si comparamos con el método tradicional se nota una mayor dispersión de los puntos (figura A2.3) lo cual viene dado por las diferencias intra-específicas de las componentes del potencial hídrico entre diversos individuos y diversas hojas de un mismo individuo, por variaciones en edad, condiciones de desarrollo, etc. Esta variación nos permite tener una visión más global del comportamiento de las especie y hacer mejores inferencias en cuanto a la respuesta de las plantas a diferentes condiciones.

El método se presenta bastante robusto y práctico para la realización de curvas de este tipo, además de ser más rápida su replicación y permitir realizar curvas en casos donde no puede aplicarse la técnica tradicional. Es un método más preciso para plantas con presencia de secreciones o resinas ya que al aplicar solo una vez la compresión se limita la extracción de este tipo de compuestos.

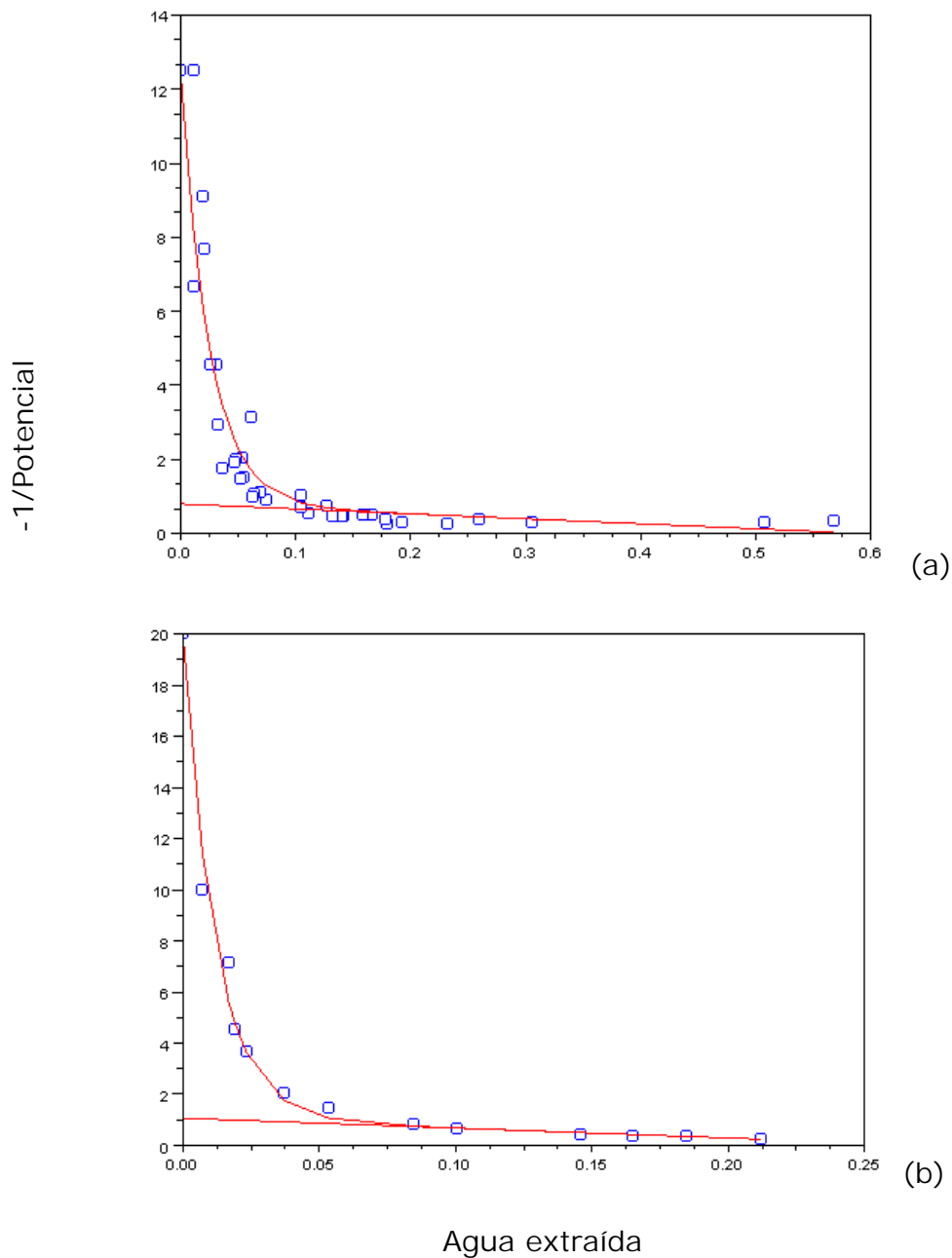


Figura A2.3: Comparación de Curvas Presión-Volumen realizadas con los dos métodos para *Pinus pinaster*. (a) Método propuesto (b) Método tradicional.

El programa final permite adicionalmente, a la estimación de los parámetros la visualización de la curva y de sus ajustes, de forma de poder eliminar datos errados. Pueden realizarse también mediciones adicionales en días posteriores para completar una curva, siempre que las condiciones de colección y almacenamiento se mantengan estables.

Cuadro A2.1: Parámetros estimados para *Pinus pinaster* bajo los dos métodos en estudio. R_o : Contenido de agua en el punto de pérdida de turgor; Ψ_{tip} : Potencial osmótico en el Punto de pérdida de turgor; Ψ_{sat} : Potencial osmótico de saturación; A_{Simp} : Fracción de agua simplásmica; E_{max} : Módulo de elasticidad máximo.

	Nuevo Método	Método Tradicional
R_o	0,14746092	0,10332032
Ψ_{TLP}	-1,57481294	-1,25563226
Ψ_{Sat}	-0,72122536	-0,82359812
A_{Simp}	0,32357344	0,29368718
E_{max}	3,95895302	3,70680684

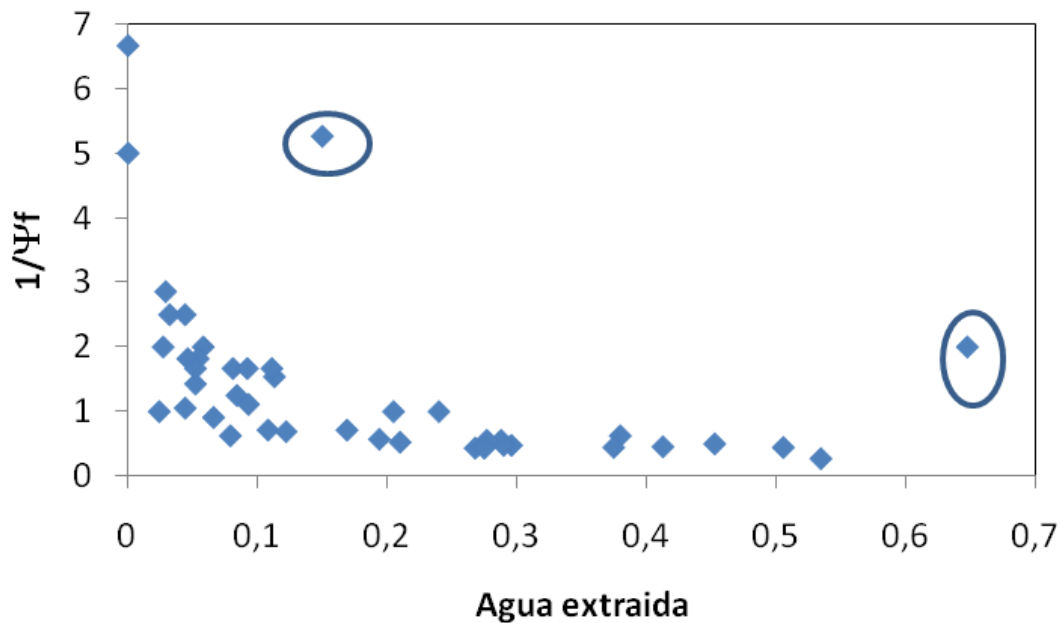


Figura A2.4: Curva presión volumen para *Diplostephyum venezuelense* a 3400 m de altitud. Se señalan dos puntos cuyos pesos iniciales no fueron tomados en plena saturación.

BIBLIOGRAFÍA.

- Dixon H.H y J. Joly. (1894) On the ascent of sap. Philosophical Transactions of The Royal Society of London. Series B. 186: 563-576.
- He, X., Cong, P., Gao, Y., Lu, J., Wang, H., Xue, P. y Zhang, X. (2007). Drought resistance of four grasses using pressure-volume curve. *Frontiers of Biology in China* 2(4): 425-430.
- Lenz, T. I., Wright, I. J. y Westoby, M. (2006). Interrelations among pressure-volume curve traits across species y water availability gradients. *Physiologia Plantarum* 127(3): 423-433.
- Ranney, T. G. y Davidson, D. (1992). Analysis of Pressure-volume Data Using Segmented, Nonlinear Regression Algorithms. *HortScience* 27(3): 275-.
- Scholander, P. F., Hammel, H. T., Hemmingsen, E. A. y Bradstreet, E. D. (1964). Hydrostatic pressure y osmotic potential in leaves of mangroves y some other plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 52(1): 119-125.
- Schulte, P. J. y Hinckley, T. M. (1985). A Comparison of Pressure-Volume Curve Data Analysis Techniques. *Journal of Experimental Botany* 36(10): 1590-1602.
- Talbot, A. J. B., Tyree, M. B. y Dainty, J. (1975). Some notes concerning the measurement of water potentials of leaf tissue with specific reference to *Tsuga canadensis* y *Picea abies*. *Canadian Journal of Botany* 53: 784-788.
- Tyree, M. T. y Hammel, H. T. (1972). The Measurement of the Turgor Pressure y the Water Relations of Plants by the Pressure-bomb Technique. *Journal of Experimental Botany* 23(1): 267-282.
- Tyree, M.T. (2007). Water relations and hydraulic architecture. En Pugnaire F. I. y F. Valladares *Functional Plant Ecology* 2^{da} Edición. Ed.: Taylor & Francis Group Boca Raton, Florida. pp 175- 211.

PROGRAMA.

```
If
clear
X=[0 33.33333333
0.010455105 14.28571429];
[m,n]=size(X);
Xo=[];
for i=1:m;
[p,k]=max(X(:,1));
xo=[p X(k,2)];
Xo={Xo;xo};
X(k,1)=0;
end;
plot(Xo(:,1),Xo(:,2),'o');
Teta=[];
for i=1:m-4;
x1=Xo(1:i+4,1);
x2=ones(max(size(x1)),1);
phi=[x1 x2];
y1=Xo(1:i+4,2);
teta=pinv(phi)*y1;
Teta={Teta teta};
a1(i)=sum(Teta(1,:))/i;
b1(i)=sum(Teta(2,:))/i;
emax=max(abs(y1-phi*teta));
end
mt=max(size(Teta));
da1=a1(2:mt)-a1(1:mt-1);
db1=b1(2:mt)-b1(1:mt-1);
da=Teta(1,2:mt)-Teta(1,1:mt-1);
j=mt;
i=m-4;
while a1(j)/a1(j-1)>1.1;i=i-1;j=j-1; end
a=a1(j);
b=b1(j);
aex=Xo(:,1);
pot=a*aex+b;
plot(aex,pot,'red')
i=i-1;
for j=1:m,
Xp(j)=Xo(j,2)-(a*Xo(j,1)+b); aext(j)=Xo(j,1);
end
Xp1=Xp(1:m);
aext1=aext(1:m);
inti=10;
ints=40;
c1=max(Xp1);
for k=10:1:130;
E1=Xp1-c1*exp(-k*aext1);
Er(k)=E1*E1;
end;
[c,ko]=min(Er(10:130));
ap=ko+10;
Xp1s=c1*exp(-ap*aext1)+a*aext1+b;
inti=0;ints=1;
pre=.005;
for n=1:10;
x=(inti+ints)/2;
e=c1*exp(-ap*x)-pre;
if e>0 then inti=x; else ints=x; end;
end;
plot(aext1, Xp1s,'red');
Ro=x;
psiTLP=-1/(a*Ro+b);
psipi=-1/b;
pas=-b/a;
epsmax=(1/c1*ap);
sol=[Ro,psiTLP,psipi,pas,epsmax]
```