



GRADO EN BIOLOGÍA
Curso Académico 2022/23
Trabajo de Fin de Grado

**EVALUANDO CAMBIO EVOLUTIVO RÁPIDO EN UNA
PLANTA ESPECIALISTA EN YESO MEDIANTE UN
EXPERIMENTO DE RESURRECCIÓN**

Autor: Diego Martínez Calvo

Directores: Silvia Matesanz García y Mario Blanco Sánchez

Índice

1. Resumen	3
2. Introducción.....	4
3. Materiales y métodos.....	7
3.1. Descripción de la especie	7
3.2. Población de estudio y establecimiento de la generación ancestral y descendiente	7
3.3. Diseño experimental.....	9
3.4. Medición de rasgos funcionales y toma de datos	11
3.5. Análisis estadísticos	13
4. Resultados	13
5. Discusión.....	15
6. Conclusiones	18
7. Líneas futuras de investigación	19
8. Agradecimientos.....	19
9. Bibliografía.....	20

1. Resumen

El aumento de la aridez y las sequías como consecuencia de las alteraciones producidas por el cambio climático provocan una presión selectiva, sobre todo para las poblaciones de especies con requerimientos edáficos específicos. Los gipsófitos son un ejemplo, ya que crecen únicamente en suelos de yeso propios de ambientes áridos, donde la disponibilidad hídrica es limitante. Para hacer frente a los efectos del cambio climático, las plantas pueden presentar diferentes respuestas como son la migración, la plasticidad fenotípica y la evolución adaptativa. Sin embargo, la fragmentación de los hábitats de yeso y la escasa capacidad de dispersiva de los gipsófitos dificulta la migración hacia ambientes más favorables. Por lo tanto, para predecir la persistencia de estas especies es clave evaluar los patrones de plasticidad fenotípica y la capacidad de evolución adaptativa rápida en respuesta al cambio climático. Para ello se realizó un experimento de resurrección de una población de *Lepidium subulatum*, considerado el gipsófito ibérico por excelencia. Este consistió en someter a dos generaciones de una población (Ontígola) de *L. subulatum*, una ancestral (1964) y los descendientes (2018), a dos tratamientos de riego contrastados (alta disponibilidad hídrica y sequía) que simulan condiciones ambientales diferentes. En todos los individuos experimentales (N=500), caracterizamos una amplia batería de rasgos clave en respuesta a la sequía, incluyendo la biomasa reproductiva, el contenido de materia seca de la hoja (LDMC), la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (F_v/F_m), la tasa de crecimiento relativo (RGR) y rasgos de fenología reproductiva (inicio de floración y fructificación). Nuestros resultados muestran respuestas plásticas frente a la sequía. Aunque algunas de estas fueron pasivas, es decir, causadas por la limitación de recursos, otras fueron adaptativas, ya que proporcionaron una ventaja frente al estrés hídrico. Tanto los resultados de evolución adaptativa como los de plasticidad diferencial sugieren que se ha favorecido una estrategia adquisitiva que permite captar más recursos cuando las condiciones son favorables. Nuestro estudio evidencia que ha ocurrido evolución rápida en rasgos y su plasticidad en esta población de *Lepidium subulatum*, lo que tiene importantes implicaciones ecológicas y evolutivas en el actual contexto de cambio climático.

2. Introducción

Las plantas están sufriendo los efectos del cambio climático ligado a la acción antrópica. La temperatura media de la Tierra es ahora 1,1 °C mayor que a finales del siglo XIX, antes de la industrialización, y la última década (2011-2020) fue la más cálida registrada (ONU, 2023). Según las previsiones climáticas, se espera un acusado aumento de las temperaturas y un descenso notable de las precipitaciones, lo que se traduce en grandes sequías y un aumento de la aridez especialmente en periodos estivales (Rosa et al., 2018; Kim et al., 2019). En concreto, la región mediterránea es una de las zonas más vulnerables y afectadas por el cambio climático, viéndose un aumento de 1,5°C en relación con el periodo preindustrial y un descenso acusado de las precipitaciones en los últimos años (Cramer et al., 2018). Esto agravará los problemas medioambientales que ya existen en esta región (Giorgi y Lionello, 2008; Bladé y Castro-Díez, 2010), lo que puede tener grandes efectos sobre las especies que habitan en ella (Lesica y Kittelson, 2010). Estas alteraciones producidas por el cambio climático están provocando una presión sobre las especies y las comunidades vegetales, por ejemplo, modificando la duración e inicio de la estación de crecimiento, su fenología, la distribución de las especies y el tamaño de sus poblaciones (Gitay et al., 2002). Por ello, comprender las respuestas de las poblaciones de plantas frente al cambio climático es clave para predecir su persistencia futura.

Actualmente, uno de los principales objetivos de la ecología evolutiva es comprender cómo las distintas poblaciones podrán lidiar y persistir en las condiciones ambientales que trae consigo el cambio climático (Bellard et al., 2012). Para hacer frente a los efectos del cambio climático, las plantas pueden presentar diferentes respuestas como son la migración, la plasticidad fenotípica y la evolución adaptativa. Estos no son procesos exclusivos, sino que pueden ocurrir al mismo tiempo (Merilä, 2015). Una de las principales respuestas al cambio climático es la migración hacia hábitats climáticamente menos restrictivos (Jump y Peñuelas, 2005). Numerosos estudios han documentado la migración en altitud y latitud de diferentes especies y poblaciones (Huntley, 1991; Brunet y Von Oheimb, 1998; Lenoir y Svenning, 2015). No obstante, esta migración no siempre es posible. En concreto, la migración de especies con baja capacidad dispersiva, que cuentan con distribuciones fragmentadas y con alta especificidad edáfica puede verse muy limitada (Shaw y Etterson, 2012; Blanco-Sánchez et al., 2021; Blanco-Sánchez et al., 2023). Un ejemplo son los gipsófitos estrictos, es decir, plantas que crecen únicamente en sustratos de yeso, como es el caso de *Lepidium subulatum*. La fragmentación que sufren los hábitats de yeso (Mota et al., 2011; Matesanz et al., 2019), junto con la baja capacidad de dispersión que presentan estas especies (Blanco-Sánchez et al., 2021) dificulta su migración. Además, los sustratos de yeso se localizan en zonas áridas, por lo que la disponibilidad hídrica es limitante. Los gipsófitos poseen adaptaciones a estos ambientes estresantes, presentan hojas esclerófilas (minimizan la pérdida de agua), y algunos de ellos un dimorfismo estacional de sus hojas (Palacio y Montserrat-Martí, 2007; Mota et al., 2011; Escudero et al., 2015). Debido a la dificultad de *Lepidium subulatum* de responder al cambio climático mediante migración hacia hábitats favorables (Blanco-Sánchez et al., 2021), los

procesos evolutivos *in situ* (evolución adaptativa y plasticidad fenotípica) son clave para su supervivencia y persistencia (Gómez-Mestre y Jovani, 2013; Franks et al., 2014).

La evolución adaptativa es un proceso que permite a las poblaciones hacer frente a las nuevas presiones selectivas que surgen ante cambios en las condiciones ambientales, como aquellas producidas por el cambio climático (Hoffmann y Sgró, 2011; Blanco-Sánchez et al., 2023). La adaptación genética resulta de cambios en las frecuencias alélicas de las poblaciones debido a la acción de la selección natural durante varias generaciones (Aurelle et al., 2022). Debido a las alteraciones ambientales fruto del cambio climático, las poblaciones pueden evolucionar por selección natural si la eficacia biológica y los rasgos tienen variación genética dentro de las poblaciones, y ambas presentan una relación significativa (Etterson, 2004). Por tanto, la evolución de un rasgo determinado se limitará si no hay variación genética cuantitativa, o si existen correlaciones genéticas entre rasgos adaptativos, y la dirección de esta correlación no coincide con la dirección de selección natural (Blanco-Sánchez et al., 2023). La expresión de la diversidad genética cuantitativa está ligada al ambiente en el que se encuentran, por lo tanto, para predecir correctamente la trayectoria evolutiva de una población de plantas, es esencial examinarlas en ambientes que reflejen las condiciones predichas por el cambio climático (Chevin y Hoffmann, 2017; Blanco-Sánchez et al., 2023). Antes se pensaba que la evolución adaptativa era un proceso muy lento que ocurría en muchas generaciones. Sin embargo, numerosas investigaciones en poblaciones de plantas han demostrado que puede ocurrir rápidamente en respuesta a estas nuevas presiones selectivas (Franks et al., 2007; Giménez-Benavides et al., 2007; Hoffmann y Sgró, 2011; Shaw y Etterson, 2012; Matesanz y Valladares, 2014).

La plasticidad fenotípica es la capacidad de un genotipo para producir fenotipos funcionalmente distintos en ambientes diferentes y permite amortiguar los cambios ambientales rápidos (Sultan 1995; Pigliucci 2001; Matesanz et al., 2020). La plasticidad es un rasgo que puede evolucionar por selección natural, y la evolución de las respuestas plásticas adaptativas puede ser crucial para la supervivencia de las poblaciones vegetales en futuras condiciones ambientales (Matesanz et al., 2010; Chevin y Hoffmann, 2017; Blanco-Sánchez et al., 2023). Comprender cómo los organismos soportan los cambios ambientales es fundamental y para esto es necesario estudiar la plasticidad fenotípica (Valladares et al., 2014).

El uso de experimentos de jardín común donde se someten a individuos que presentan estructura familiar a las mismas condiciones nos permite separar la componente genética y ambiental de la expresión fenotípica, y, por tanto, cuantificar la presencia de diferenciación genética (Franks et al., 2014). Además, cuando los experimentos de jardín común presentan diferentes condiciones ambientales, nos permiten evaluar los patrones de plasticidad fenotípica, es decir, cómo es el cambio fenotípico entre ambientes y si dicho cambio fenotípico es diferente entre familias maternas, poblaciones o generaciones (Ramírez-Valiente et al., 2022). Evidentemente, la evolución adaptativa y la plasticidad no son

mecanismos alternativos, sino que son procesos interrelacionados para hacer frente a los cambios ambientales. Tanto estudios teóricos (Sultan y Spencer, 2002), como empíricos (Baythavong, 2011) predicen que la escala de variación espaciotemporal en las condiciones abióticas puede influir significativamente en si la selección favorece la plasticidad, la evolución adaptativa o una combinación de ambas (Matesanz et al., 2020).

Una aproximación experimental muy interesante para comprender si ha habido evolución contemporánea y hacer previsiones de las trayectorias evolutivas que seguirán las poblaciones en el futuro, son los experimentos de resurrección. Estos consisten en revivir antepasados a partir de semillas almacenadas y compararlos con sus descendientes en condiciones comunes, lo que permite detectar y caracterizar la ocurrencia de evolución contemporánea (Franks et al., 2018). Si al comparar las dos generaciones obtenemos que son diferentes y estas diferencias están vinculadas al cambio climático, entonces se podría considerar evidencia de evolución contemporánea. No obstante, en los experimentos de resurrección podemos encontrarnos un problema llamado “fracción invisible” (Weis, 2018). La mortalidad o muestreo de semillas aleatorio puede seleccionar preferentemente aquellas con características favorables para la supervivencia durante el almacenamiento y germinación, lo que puede diferir del genotipo medio ancestral y sesgar la estimación del cambio evolutivo. Puede afectar cualquier factor que cause diferencias entre la generación ancestral y los descendientes (Weis, 2018). Existen maneras de limitar estos problemas de “fracción invisible” mediante aproximaciones experimentales robustas.

En este trabajo, realizamos un experimento de jardín común en el que comparamos propágulos (semillas) recolectados en la misma población de *Lepidium subulatum* en dos momentos separados más de 50 años para evaluar el cambio fenotípico ocurrido a lo largo del tiempo. Estas generaciones, ancestros y descendientes recolectados en 1964 y 2018, respectivamente, fueron sometidas a dos tratamientos de disponibilidad hídrica realistas y contrastados (sequía y alta disponibilidad hídrica), permitiéndonos evaluar la presencia de evolución contemporánea de los rasgos y los patrones de plasticidad de dichos rasgos entre las dos generaciones. Este tipo de experimentos son de gran utilidad para detectar evolución rápida tanto de rasgos funcionales como de plasticidad en respuesta a las diferentes presiones selectivas, por ejemplo, a aquellas que ejercen las nuevas condiciones climáticas impuestas por el cambio climático y ligadas a la acción humana. También nos ayudan a hacer predicciones de trayectorias evolutivas de las especies en el futuro (Franks et al., 2018). Esto se alinea perfectamente con los objetivos de desarrollo sostenible, en concreto con el ODS 13 “acción por el clima”, que evalúa las consecuencias del cambio climático y trata de tomar medidas para combatirlo. Por lo tanto, nuestro estudio trata de responder a las siguientes preguntas: 1) ¿Ha habido evolución rápida de los rasgos funcionales como respuesta a las alteraciones ambientales producidas por el cambio climático?; 2) ¿Cómo son los patrones de plasticidad de los rasgos?; 3) ¿Estos patrones de plasticidad varían entre las dos generaciones? Nuestra hipótesis es que habrá diferencias fenotípicas de base

genética en rasgos clave para la respuesta a la sequía y en los patrones de plasticidad entre las dos generaciones (1964 y 2018) de *Lepidium subulatum* debido a adaptación rápida asociada al aumento de aridez producidos por el cambio climático.

3. Materiales y métodos

3.1. Descripción de la especie

Lepidium subulatum L. es una especie de la familia Brassicaceae endémica de la mitad este de la Península Ibérica y del norte de África (Marruecos y Argelia) (Matesanz et al., 2020). Es un gipsófito estricto, es decir, una planta que solo crece en suelos de yeso (Meyer, 1986). Se restringe a matorrales del interior sobre suelos yesosos a una altitud de 100 a 600 (1100) metros. Es muy dominante dentro de estas comunidades, y por ello es considerado el gipsófito ibérico por excelencia (Matesanz et al., 2015; Mota et al., 2011). Es un arbusto perenne de vida media (hasta 26 años) (Eugenio et al., 2012) que puede alcanzar una altura de 60 cm, muy ramificado desde la base, con tallos leñosos (Hernández Bermejo y Clemente, 1993). Presenta dimorfismo foliar estacional, con dos tipos de hojas lineariformes que se van estrechando paulatinamente hasta acabar en un ápice fino y punzante: grandes hojas dolicoblásticas presentes sobre todo en primavera, y hojas braquiblásticas más pequeñas que están principalmente presentes en otoño e invierno (Palacio y Montserrat-Martí, 2007). Es una especie principalmente autoincompatible (Blanco-Sánchez et al., 2021; Matesanz et al., 2018), siendo polinizada por un diverso grupo de insectos generalistas (Santamaría et al., 2018). Presenta una fenología reproductiva temprana respecto a otros gipsófitos, de marzo a julio. Muestra inflorescencias terminales en racimos corimbiformes, que pasan a ser alargados cuando fructifican, y flores pediceladas con sépalos glabros de margen blanquecino, pétalos blancos y anteras amarillas (Matesanz et al., 2015; Hernández Bermejo & Clemente, 1993) (Figura 1B). Los frutos son ovados, aquillados, ligeramente alados, y contienen semillas cubiertas por una capa mucilaginoso que les facilita la adhesión y germinación en suelos de yeso (Mota et al., 2011).

3.2. Población de estudio y establecimiento de la generación ancestral y descendiente

Nuestro estudio se llevó a cabo en Ontígola (39°59'22.0"N / 3°35'13.8"W), coincidiendo con la zona central del rango de distribución de *Lepidium subulatum* (Figura 1A). Esta población presenta una temperatura media anual de 15,52°C y una precipitación media anual de 399,14 mm (datos climáticos extraídos de CHELSA timeseries; Karger et al., 2017). Para esta población, obtuvimos semillas de dos años diferentes, 1964 y 2018. Las semillas de 1964 se consiguieron a partir del banco de germoplasma de la Universidad Politécnica de Madrid. Proporcionaron 300 semillas, las cuales no estaban separadas siguiendo una estructura familiar, pero procedían de varios individuos. En 2018, se recogieron las

semillas de 22 plantas maternas en condiciones naturales en la misma localidad. Para homogeneizar las condiciones de partida entre generaciones, tal y como se hizo en la muestra de las semillas de 1964, en el laboratorio combinamos las semillas recogidas de las diferentes plantas maternas.



Figura 1. A) Mapa de la Península Ibérica con la población de *Lepidium subulatum* muestreada para este estudio. B) Individuo de *L. subulatum* en época de floración.

En agosto de 2018, las semillas obtenidas de los diferentes años fueron sembradas en macetas de medio litro en el invernadero del Laboratorio de Cultivo de Organismos (CULTIVE) en la Universidad Rey Juan Carlos (Móstoles, Comunidad de Madrid, España). En octubre de 2018, se trasplantaron de manera individual a macetas de 6 litros y se sacaron a condiciones comunes en el exterior. El sustrato utilizado se obtuvo de una cantera de yeso cercana (Yesos ibéricos-Algiss, Valdemoro, España), lo que dotó al experimento de un mayor realismo. A partir de las semillas sembradas, obtuvimos 50 plantas de 1964 y 60 de 2018. Para cuantificar la presencia de diferenciación en la composición y en la diversidad genética entre generaciones, de cada una de las plantas se recogieron hojas, y fueron genotipadas usando microsatélites nucleares específicos de esta especie (Martínez-Nieto et al., 2012). Información detallada acerca del proceso de extracción de ADN, su amplificación y el genotipado de los individuos puede encontrarse en Blanco-Sánchez et al., 2021. Los individuos genotipados mostraron valores de diversidad y composición genética similares entre ambas generaciones, lo que indica la falta de problemas asociados a la “fracción invisible” y que, por tanto, las diferencias entre generaciones son debidas a procesos de evolución contemporánea. A partir de estos individuos, se seleccionaron 25 madres experimentales de cada año, maximizando la diversidad genética dentro de cada generación. Con el fin de obtener individuos adultos y reproductivos, los individuos estuvieron creciendo durante dos años en condiciones comunes de alta disponibilidad hídrica en CULTIVE.

Pasados los dos años, los individuos se separaron espacialmente en dos localidades de la Comunidad de Madrid con condiciones climáticas similares. Las del año 1964 se trasladaron a Getafe y las de 2018 a Sevilla la Nueva, con el fin de evitar que se cruzaran las generaciones. De esta forma se minimizan también los efectos maternos que pueden surgir potencialmente debido a las condiciones ambientales diferentes que experimentan las plantas en el campo en el momento de la producción de las semillas. Para obtener individuos experimentales con estructura familiar, dejamos que se polinizaran entre los individuos pertenecientes a una misma generación. De cada una de las plantas maternas, se recogieron sus semillas a principios de junio de 2020. Posteriormente, las semillas recolectadas se sembraron a principios de agosto de 2020, de nuevo utilizando macetas de medio litro en el invernadero de CULTIVE. Se obtuvo un tamaño experimental de 500 plantas, que se consiguieron a partir de 2 generaciones x 25 familias maternas x 10 medio hermanas de cada familia materna. Las plantas procedentes de cada familia materna fueron consideradas medio hermanas ya que esta especie raramente se autopoliniza (Matesanz et al., 2018), y conocemos la identidad de la planta materna, pero desconocemos la identidad paterna. A mediados de octubre de 2020 las plantas se sacaron al exterior a un jardín común en la zona de aclimatación de CULTIVE, y a principios de febrero de 2021 se realizaron los últimos trasplantes y se quedó una planta en cada maceta. De nuevo se utilizó como sustrato yeso procedente de una cantera cercana (Yesos ibéricos-Algiss, Valdemoro, España). Los individuos se dejaron crecer durante dos años hasta que comenzaron los tratamientos experimentales.

3.3. Diseño experimental

El experimento de resurrección se realizó en el invernadero del Laboratorio de Cultivo de Organismos (CULTIVE) en la Universidad Rey Juan Carlos (Móstoles, Comunidad de Madrid, España). Para evaluar la plasticidad fenotípica en rasgos relacionados con la respuesta a la sequía, se realizó un experimento de jardín común con dos tratamientos de riego contrastados que simulaban diferentes ambientes, sequía y alta disponibilidad hídrica. Se llevó a cabo durante la segunda temporada de crecimiento de las plantas para maximizar el número de individuos adultos y reproductivos.

A finales de febrero de 2022, los individuos experimentales fueron sometidos a dos tratamientos de disponibilidad hídrica contrastada: sequía (Figura 2A) y alta disponibilidad hídrica (Figura 2B). En el tratamiento de alta disponibilidad hídrica las plantas se mantuvieron en macetas cuyo suelo se encontraba a capacidad de campo, en torno al 30-25% de contenido de agua en el suelo aproximadamente. Este tratamiento simula años de altas precipitaciones y/o periodos donde la disponibilidad hídrica del suelo es elevada, como comienzos de primavera. En el tratamiento de sequía el contenido de agua del suelo se mantuvo a la mitad, en torno al 14%, simulando años con precipitaciones por debajo de la media y/o periodos donde la disponibilidad hídrica es baja, como finales de primavera o principios de verano. Se prevé que las condiciones simuladas en este tratamiento son y

serán cada vez más frecuentes en la región mediterránea. Se asignaron la mitad de las plantas (N = 250) a cada tratamiento de disponibilidad hídrica, en los cuales todas las familias maternas de cada generación quedarán representadas, asignando cinco medio hermanas de cada familia a cada tratamiento.

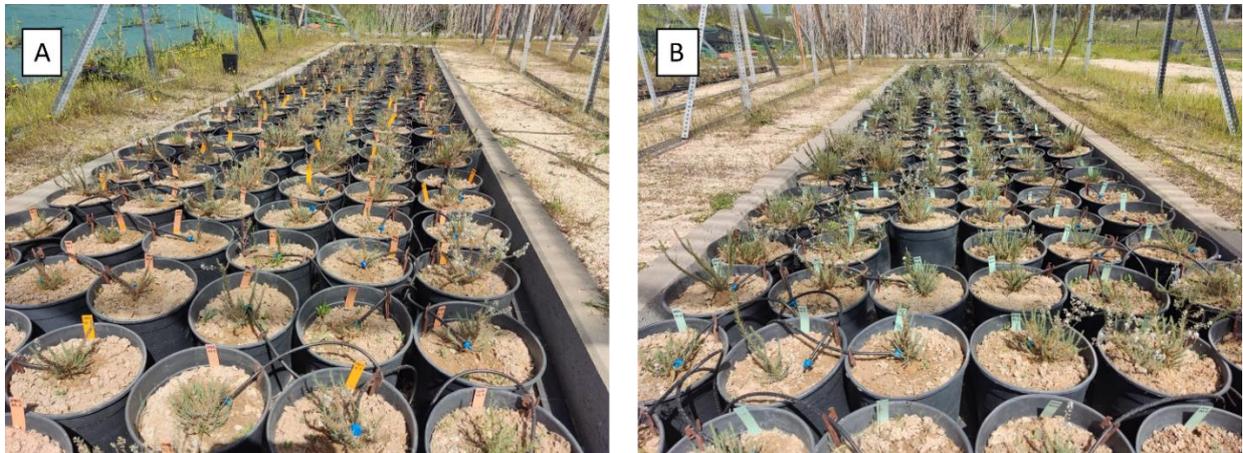


Figura 2. A) Individuos de *Lepidium subulatum* sometidos a tratamiento de sequía. B) Individuos de *L. subulatum* sometidos a tratamiento de alta disponibilidad hídrica.

Se colocaron todas las plantas en cuatro bancales bajo estructuras de exclusión de lluvia (Figura 3) fabricadas con policarbonato transparente (Rooflite, Wetherill Park, Australia), con una inclinación de 10° para evitar que el agua se acumulara. De esta manera, se excluyó la precipitación natural y se asegura el suministro controlado de agua mediante un sistema de riego por goteo individualizado para cada maceta mediante goteros autocompensantes (Rainbird XB-05 PC; Rainbird Iberica, Comunidad de Madrid, España). Para comprobar que las condiciones ambientales bajo las estructuras y fuera de ellas fueran prácticamente iguales, se instalaron sensores de humedad relativa, temperatura y radiación, debajo de estas estructuras y en el exterior. Se realizaron controles periódicos del contenido de agua del suelo cada 3 – 4 días, utilizando un sensor ML3 acoplado a un medidor de humedad HH2 Moisture Meter (Delta-T devices, Cambridge, UK). Esta medición se realizó de manera aleatoria en 12 – 15 macetas por tratamiento a lo largo de todo el experimento. El experimento finalizó después de aproximadamente 3 meses desde la implementación de los tratamientos, cuando las plantas del tratamiento de alta disponibilidad hídrica empezaron a senescer.



Figura 3. Individuos experimentales creciendo en bancales con estructuras de exclusión de lluvia.

3.4. Medición de rasgos funcionales y toma de datos

A lo largo del experimento, medimos una amplia batería de rasgos funcionales, relacionados con la morfología foliar, la fisiología, la fenología, la tasa de adquisición de recursos y la eficacia biológica (*fitness* reproductivo) de los individuos experimentales.

Contenido en materia seca de la hoja (LDMC)— Para calcular el LDMC hay que dividir el peso seco entre el peso fresco foliar, y nos aporta información de cómo de esclerófilas son las hojas (Vile et al., 2005). Entre el 6 y el 10 de junio de 2022, se recogieron 8 hojas de cada una de las plantas en sobre de plástico previamente identificado, junto con un papel y un poco de agua para que mantuvieran la humedad. Las hojas fueron muestreadas al azar de la zona central de diferentes ramas, siempre escogiendo hojas bien formadas y completamente extendidas. Después de la recogida, fueron introducidas en frío y oscuridad durante ~12 horas en nevera, para asegurar su completa hidratación. Posteriormente se sacaron de la nevera, se les quitó el exceso de humedad con un papel de filtro y se pesaron todas juntas en una microbalanza Mettler Toledo MX5 (precisión de 1 μ g; Mettler Toledo, Columbus, OH, USA). Una vez obtenido el peso saturado de las hojas de todas las plantas, se depositaron en sobres de papel, que se introdujeron en la estufa durante 48 horas a 60 °C. Pasado este tiempo se sacaron de la estufa y se pesaron, obteniendo el peso seco de las hojas.

Eficiencia fotoquímica del fotosistema II (F_v/F_m)— Se tomaron las medidas de la eficiencia fotosintética (F_v/F_m) gracias a la fluorescencia de la clorofila mediante un fluorímetro modelo Handy PEA+ (Hansatech, Reino Unido). Para realizar la medida, debemos relajar los fotosistemas de la planta inhibiendo la radiación que reciben las hojas de la zona central de una rama con ayuda de una pinza. Se

mantuvo la pinza durante 30 minutos, y pasados estos sometimos a estas hojas a un pulso de luz saturante haciendo que los fotosistemas se exciten. Estas medidas se tomaron el 1 y 2 de junio de 2022, entre las 12:30 y las 16:30 horas en todas las plantas, ya que es el momento del día con mayor radiación. La eficiencia fotoquímica se calcula como:

$$F_v/F_m = \frac{F_m - F_o}{F_m}$$

donde F_m corresponde a la fluorescencia máxima, F_o la mínima y F_v a la emisión variable de fluorescencia ($F_v = F_m - F_o$).

Fenología (inicio de floración y de fructificación)— A lo largo del experimento, se evaluó cada 2-3 días en todas las plantas ($N = 500$) la presencia de flores abiertas y de frutos completamente formados. A partir de estos datos, y teniendo en cuenta el número de días transcurridos desde el inicio del experimento, calculamos el número de días hasta el comienzo de la floración y la fructificación en cada planta. Todos los censos los realizó el mismo observador a fin de evitar sesgos.

Tasa de crecimiento relativo (RGR)— Es una medida que refleja la acumulación de biomasa. Comparando el volumen inicial y final de la planta podemos determinar cuánto ha crecido durante el tratamiento. Se calcula como:

$$RGR = \frac{\ln(V_F - V_0)}{N^\circ \text{ de días en tratamiento}}$$

Donde V_F corresponde al volumen final de la planta y V_0 al volumen que tenía la planta al inicio del tratamiento.

Los volúmenes V_F y V_0 se calculan como:

$$V = \frac{2}{3} \pi h r_1 r_2$$

Se tomaron las medidas de la altura de la planta (longitud del tallo primario, h), del diámetro máximo y del diámetro perpendicular al diámetro máximo (a partir de los cuales calculamos sus radios, r_1 y r_2), tanto al inicio como al final del experimento de jardín común.

Éxito reproductivo: Como componente de eficacia biológica (*fitness*) reproductiva, evaluamos la biomasa reproductiva total de cada planta. Al finalizar el experimento (entre el 6 y el 10 de junio de 2022), se recogieron las inflorescencias maduras de todos los individuos experimentales. Dichas inflorescencias se introdujeron en sobres de papel, y posteriormente se pesaron en una microbalanza Mettler Toledo MX5 (precisión de $1\mu\text{g}$; Mettler Toledo, Columbus, OH, USA).

3.5. Análisis estadísticos

Para evaluar el efecto del tratamiento de disponibilidad hídrica sobre la expresión fenotípica (plasticidad fenotípica) y la presencia de diferenciación genética entre generaciones, se realizaron modelos lineales mixtos con máxima verosimilitud restringida (REML). Los análisis se llevaron a cabo con el software estadístico R (R Core Team, 2023) utilizando la función lmer (paquete lme4; Bates et al., 2015). Dentro del modelo se incluyeron como factores fijos “Año” (con las dos generaciones, 1964 y 2018), “Tratamiento” (sequía y alta disponibilidad hídrica) y la interacción entre ambos. Como factor aleatorio se añadió la identidad de la familia materna. Para obtener la significación de los factores fijos, se usó la función Anova (paquete car; Fox & Weisberg, 2011), con suma de cuadrados tipo III y utilizando la aproximación de Kenward-Roger para estimar los grados de libertad (Kenward & Roger, 1997). Si observamos un efecto significativo del factor “Año”, existe variación genética entre generaciones para los diferentes rasgos; es decir, evidencia de cambio evolutivo. Cuando es significativo el factor “Tratamiento”, existe variación fenotípica entre tratamientos, es decir, plasticidad fenotípica; mientras que si la interacción “Año × Tratamiento” es significativa, se encuentra evidencia de plasticidad diferencial entre las diferentes generaciones, o cambio evolutivo en la respuesta plástica. Para cada modelo, el R^2 marginal, que representa la varianza explicada por los factores fijos, y el R^2 condicional, que representa la varianza explicada tanto por los factores fijos como los aleatorios, se calculó usando la función r.squaredGLMM (paquete MuMIn; Barton, 2016).

4. Resultados

Observamos diferenciación genética entre generaciones (efecto “Año” significativo en Tabla 1) para el inicio de fructificación y la tasa de crecimiento relativo (RGR). En concreto, los individuos experimentales de la generación de 2018 presentaron un RGR 36% mayor que la generación de 1964. Sin embargo, los individuos experimentales de la generación de 1964 presentaron un 5% mayor de inicio de fructificación que la generación de 2018.

Encontramos diferenciación significativa en la respuesta plástica entre generaciones para los rasgos LDMC y F_v/F_m , y marginalmente significativa para la biomasa reproductiva (efecto “Año × Tratamiento”, Tabla 1). El tratamiento de sequía aumentó el rasgo de LDMC un 5% en la generación de 1964 y un 10% en la generación de 2018 en relación con el tratamiento de alta disponibilidad hídrica (Figura 4E). El tratamiento de sequía redujo el rasgo de eficiencia fotoquímica del fotosistema II (F_v/F_m) un 12% en la generación de 1964 y un 20% en la generación de 2018 en relación con el tratamiento de alta disponibilidad hídrica (Figura 4A). Además, en el caso del rasgo de biomasa reproductiva observamos diferencias significativas entre generaciones sólo en el tratamiento de alto riego.

Finalmente, la expresión fenotípica de todos los rasgos estudiados (biomasa reproductiva, LDMC, F_v/F_m y tasa de crecimiento relativo (RGR), a excepción de los rasgos fenológicos (inicio de floración y de fructificación), se vieron afectados significativamente por el tratamiento de disponibilidad hídrica (efecto “Tratamiento” significativo en Tabla 1). Para el rasgo LDMC, el promedio del tratamiento de sequía fue un 8% mayor que el de alta disponibilidad hídrica (Figura 4E). En relación con el rasgo eficiencia fotoquímica del fotosistema II (F_v/F_m), el promedio fue un 16% menor en el tratamiento de sequía frente al de alta disponibilidad hídrica (Figura 4A). Además, el tratamiento de sequía redujo la biomasa reproductiva en un 56% en relación con el tratamiento de alta disponibilidad hídrica (Figura 4F). Para el rasgo tasa de crecimiento relativo (RGR), el promedio del tratamiento de sequía fue un 46% menor que el de alta disponibilidad hídrica (Figura 4D).

Para todos los rasgos a excepción del F_v/F_m , nuestros modelos mostraron un valor de R^2_c mayor que R^2_m , lo que indica variación familiar significativa dentro de cada generación para los rasgos evaluados.

Tabla 1. Resultados de los modelos lineales mixtos donde se presentan los efectos del año, tratamiento y la interacción entre año y tratamiento sobre los diferentes rasgos. El estadístico F y el P-valor se muestran para cada uno de los rasgos. El P-valor de los términos significativos y marginalmente significativos se muestran en negrita y en cursiva, respectivamente. R^2_m = marginal; y R^2_c = condicional.

Rasgo	Año		Tratamiento		Año x Tratamiento		R^2_m	R^2_c
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>		
Biomasa reproductiva	2.532	0.119	18.513	<0.001	2.757	<i>0.098</i>	0.074	0.094
LDMC	1.558	0.218	82.619	<0.001	9.202	0.003	0.158	0.208
F_v/F_m	0.877	0.354	102.269	<0.001	6.427	0.012	0.185	0.185
Inicio de floración	0.573	0.453	3.611	<i>0.059</i>	0.045	0.831	0.014	0.135
Inicio de fructificación	6.881	0.012	2.461	0.118	0.00006	0.993	0.043	0.145
Tasa de crecimiento relativo (RGR)	9.117	0.004	74.127	<0.001	1.289	0.257	0.153	0.253

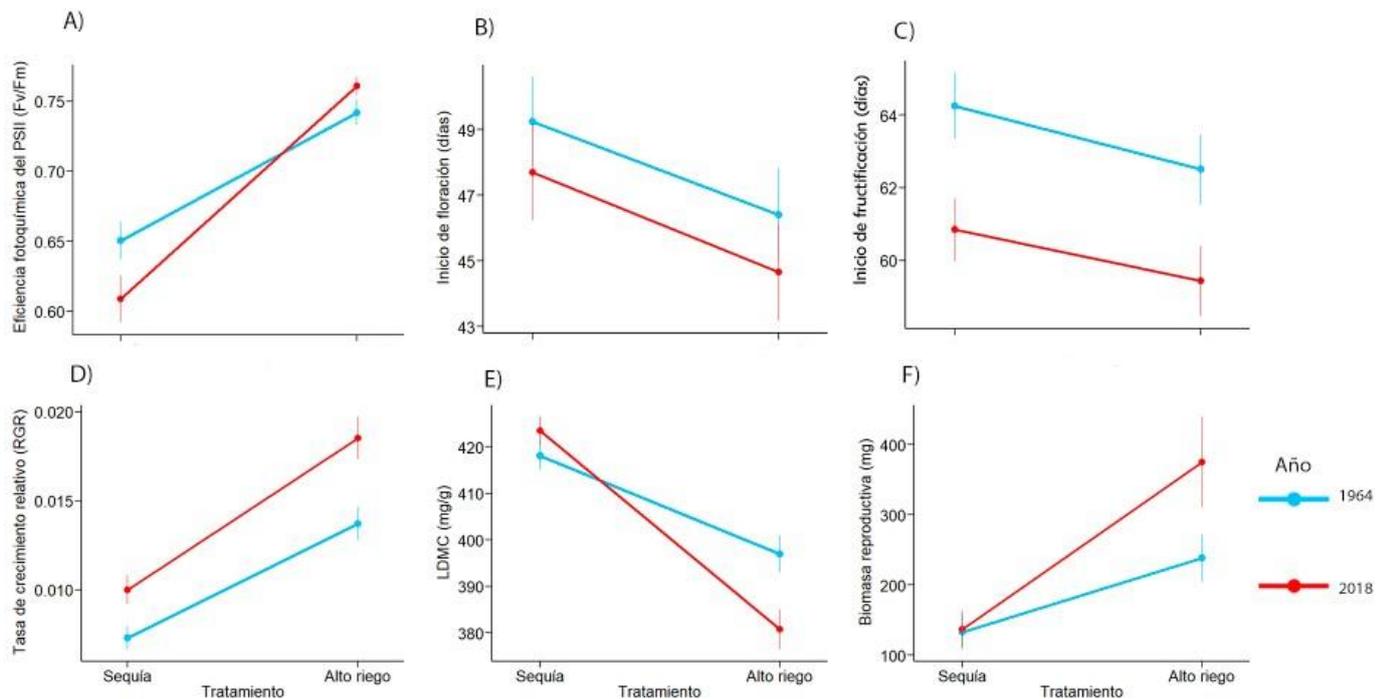


Figura 4. Diferencias entre generaciones (años) en los rasgos estudiados en cada uno de los tratamientos. A) Eficiencia fotoquímica del PSII, B) Inicio de floración, C) Inicio de fructificación, D) Tasa de crecimiento relativo, E) LDMC, F) Biomasa reproductiva. Las líneas muestran la norma de reacción de las generaciones (es decir, el cambio fenotípico entre tratamientos) para cada uno de los rasgos. En cada tratamiento, se representa la media del rasgo de los individuos de un año y su error estándar.

5. Discusión

Los resultados de nuestro estudio mostraron cambio evolutivo rápido en varios rasgos ecofisiológicos y en la plasticidad de estos rasgos en respuesta a la sequía en una población de *Lepidium subulatum*. Las diferentes respuestas evolutivas pueden afectar a la supervivencia de la especie en un contexto de cambio climático.

El estudio evidencia la presencia de evolución contemporánea en rasgos funcionales claves. Concretamente, observamos diferencias significativas entre las generaciones recolectadas con más de 50 años de separación en el rasgo inicio de fructificación, presentando las plantas de 2018 una fenología más adelantada. La fenología temprana está asociada con un mayor éxito reproductivo individual, que está vinculado a una estrategia de adquisición de recursos (Blanco-Sánchez et al., 2022). Nuestros resultados sugieren que la selección reciente ha favorecido a las plantas con una fenología adelantada, al igual que se ha visto en numerosos estudios (Munguía-Rosas et al. 2011; Shavrukov et al., 2017; Welles y Funk, 2021; Blanco-Sánchez et al., 2023). También vemos diferencias significativas entre

generaciones en la tasa de crecimiento relativa (RGR), siendo mayor en las plantas de 2018. Esto indica que la selección natural ha actuado también sobre este rasgo, favoreciendo los genotipos capaces de presentar mayores tasas de crecimiento relativo (RGR), ya que es posible que estos genotipos también presenten otros rasgos que les permiten tener una estrategia más adquisitiva, como el adelanto de la fructificación para escapar de la sequía mencionado previamente y visto también en otros gipsófitos (Blanco-Sánchez et al., 2023). Esta estrategia adquisitiva se ha discutido como adaptativa en los gipsófitos (Blanco-Sánchez et al., 2022) y otras especies mediterráneas (Franks, 2014) ya que les permite un desarrollo rápido antes de periodos estivales más limitantes. Los resultados sugieren que ha habido evolución rápida en el inicio de fruto y en la tasa de crecimiento relativo (RGR) frente a la sequía. Se ha visto en otros estudios cómo en condiciones de sequía, la aparición del fruto depende de la tasa de adquisición de recursos, que se relaciona con la tasa de crecimiento relativo (RGR) (Segrestin et al., 2020; Welles y Funk, 2021), ya que organismos más adquisitivos pueden finalizar sus ciclos de vida antes y evitar los periodos más extremos (Blanco-Sánchez et al., 2023). Cabe destacar que la evolución de una estrategia más adquisitiva entre generaciones no es contradictoria con las respuestas más conservadoras que vemos entre los tratamientos. Es decir, entre generaciones se ha seleccionado una estrategia adquisitiva, pero el tratamiento de sequía induce respuestas plásticas más conservadoras, que evitan la pérdida de agua.

Observamos una interacción marginalmente significativa “Año × Tratamiento” para el rasgo biomasa reproductiva, lo que nos indica que, para este rasgo, las generaciones responden de manera diferencial a la sequía, es decir, presentan plasticidad diferencial. Este resultado constituye evidencia de cambio evolutivo en la capacidad de respuesta a la sequía entre generaciones. Mientras que las dos generaciones no muestran diferencias en su biomasa reproductiva en condiciones de sequía, en condiciones de alta disponibilidad hídrica, los individuos de 2018 presentaron mayor éxito reproductivo. Lo observado concuerda con nuestro planteamiento inicial, aunque también se pensaba que las de 2018 también tendrían mayor biomasa reproductiva en sequía, esto puede ser debido a que las condiciones restrictivas de la sequía pueden limitar la expresión de variación fenotípica, lo que ha podido evitar la evolución de este rasgo bajo estas condiciones. Esto sugiere que se han seleccionado genotipos más oportunistas y con una mayor capacidad de uso de recursos, que son capaces de generar gran cantidad de biomasa reproductiva cuando las condiciones ambientales son buenas. Esto es clave en sistemas de yeso mediterráneos, debido a que presentan gran heterogeneidad interanual en las condiciones ambientales (Escolar et al., 2015; Escudero et al., 2015; Matesanz et al., 2020). Por lo tanto, estos genotipos serán capaces de aumentar su reproducción en los años con pulsos de recursos mayores. En el estudio de Ayma-Romay (2021) se demuestra que las especies esclerófilas suelen presentar una estrategia conservadora coordinada para el uso de recursos, sin embargo, en ambientes mediterráneos, marcados con una fuerte estacionalidad y precipitaciones poco predecibles, las especies esclerófilas pueden mostrar una estrategia oportunista que permite adquirir los recursos (agua y nutrientes) en los

primeros eventos de lluvia o durante largos periodos. Nuestros resultados muestran que ha habido una evolución de la plasticidad entre generaciones, seleccionándose aquellos genotipos capaces de usar más recursos cuando están disponibles. Esta mayor biomasa reproductiva viene acompañada de un mayor F_v/F_m y un menor LDMC, apoyando que se ha seleccionado una estrategia más adquisitiva y oportuna para captar más recursos cuando son más abundantes, y concordando también con lo observado de evolución adaptativa en los rasgos.

Además, nuestros resultados muestran la existencia de respuestas plásticas significativas (diferencias en la expresión fenotípica entre tratamientos) en respuesta a la sequía en los rasgos biomasa reproductiva, LDMC, F_v/F_m y tasa de crecimiento relativo (RGR). Sin embargo, no todas las respuestas plásticas son adaptativas, sino que existen muchas respuestas pasivas que provocan diferencias en los fenotipos debidas a reducciones en el crecimiento ocasionadas por la limitación de recursos (Dorn et al., 2000; Van Kleunen et al., 2000; Van Kleunen & Fischer, 2005).

El estrés hídrico afecta a la capacidad fotosintética de la planta, que se puede observar en la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (F_v/F_m). Una disminución en el F_v/F_m puede indicar que la capacidad fotosintética de la planta se ve reducida debido a la acción fotoprotectora que trata de disipar el exceso de radiación, principalmente en forma de calor y en menor grado reemitida como fluorescencia (reducción reversible del F_v/F_m), en este caso se consideraría una respuesta plástica adaptativa, ya que otorgaría una ventaja a los individuos. Sin embargo, otros autores han discutido que la reducción del F_v/F_m puede deberse a la limitación de recursos, ocasionando daños permanentes en el complejo del centro de reacción PSII (reducción crónica del F_v/F_m), lo que provoca un rendimiento mínimo de fluorescencia de la clorofila (Bukhov & Carpentier, 2004; Tezara et al. 2005; Prieto et al., 2009; Jiménez-Suancha et al., 2015). En casos de sequía severa, la fotosíntesis puede llegar a ser inhibida, lo que causa una disminución en la asimilación de recursos y el crecimiento (Farquhar, Wong, et al., 1989; Prieto et al., 2009), así como en la eficiencia en el uso del agua (Jiménez-Suancha et al., 2015), lo que afecta a la tasa de crecimiento relativa (RGR).

Nuestros resultados mostraron una disminución en la biomasa reproductiva en condiciones de sequía. Las plantas invierten gran cantidad de recursos en su reproducción (Case y Ashman, 2005; Karlsson y Méndez, 2005), por lo que tienden a disminuir la asignación de biomasa a las partes reproductivas en condiciones adversas (Farooq et al., 2009; Farooq et al., 2012; Eziz et al., 2017). Este ajuste en la asignación de recursos puede ser un mecanismo para maximizar la supervivencia de la planta (Camargo y Rodríguez, 2006; Aragón et al., 2008). Como se ha visto en otros estudios, existen especies que aumentan o disminuyen su biomasa reproductiva en función de la cantidad de recursos disponible, lo que puede afectar a su supervivencia y a su capacidad de reproducción futura (Obeso, 2002). Sin embargo, vemos una respuesta plástica muy importante y que es claramente adaptativa como es presentar hojas más esclerófilas (mayores valores de LDMC). La regulación de la evaporación de agua

a través de las hojas puede manifestarse mediante un aumento en la cantidad de materia seca en las hojas (LDMC) (Buckland et al. 1997; Voltaire 2008; Poorter et al. 2009). Estas hojas más esclerófilas presentan mayor inversión en tejidos estructurales que permiten minimizar la pérdida de agua y mantener la turgencia de las hojas bajo estrés por sequía (Niinemets 2001; Chaves et al. 2002; Jung et al., 2014). Como se ha visto en otros estudios, valores altos de LDMC indican un mayor grosor de las hojas y paredes celulares rígidas, que está relacionado con resistir a la sequía (de la Riva et al., 2016), mantener la turgencia y minimizar el daño celular en condiciones de sequía extrema (Monson y Smith 1982; Markesteijn et al., 2010; Bongers et al., 2017). Nuestro estudio manifiesta la presencia de evolución, posiblemente adaptativa y rápida entre generaciones tanto en rasgos como en su plasticidad, lo que nos ayuda a comprender cómo son las respuestas adaptativas de esta especie frente al cambio climático.

6. Conclusiones

Las conclusiones generales extraídas de este estudio son las siguientes:

- Observamos evolución adaptativa para los rasgos inicio de fructificación y tasa de crecimiento relativo (RGR). Se ha producido una selección de genotipos que presentan un inicio de fructificación adelantado y una mayor tasa de crecimiento relativo (RGR), lo que sugiere que se ha favorecido una estrategia adquisitiva.
- Existe plasticidad diferencial entre generaciones. En condiciones de sequía no se observaron diferencias entre generaciones, pero en condiciones de alta disponibilidad hídrica, los individuos de 2018 mostraron una biomasa reproductiva y F_v/F_m mayor, y un LDMC menor. Esto muestra la evolución de respuestas plásticas más adquisitivas, que permiten adquirir más recursos cuando las condiciones ambientales son buenas.
- Existen respuestas plásticas frente a la sequía. Estas pueden ser pasivas, causadas por una limitación de los recursos, como presentar menor biomasa reproductiva, menor tasa de crecimiento relativo (RGR) y menor capacidad fotosintética (F_v/F_m) o adaptativas como presentar hojas más esclerófilas (valores mayores de LDMC), que proporciona una ventaja para resistir en periodos de estrés hídrico.
- Nuestros resultados muestran que ha ocurrido evolución rápida en rasgos y su plasticidad en *Lepidium subulatum*, lo que tiene unas implicaciones ecológicas y evolutivas muy importantes para la especie.

7. Líneas futuras de investigación

Futuros trabajos de investigación relacionados con este trabajo fin de grado que se podrían realizar serían los siguientes:

- Evaluar el cambio evolutivo rápido en otras poblaciones de *Lepidium subulatum* realizando de nuevo experimentos de resurrección. De esta forma se podrían comparar las respuestas evolutivas en función de la localización de las poblaciones.
- Evaluar la plasticidad de distintas poblaciones de *Lepidium subulatum* mediante un experimento donde se sometan a diferentes estreses que pueden sufrir en condiciones naturales, como la competencia o el aumento de las temperaturas.
- Realizar un experimento de resurrección en otras especies de gipsófitos, como por ejemplo *Helianthemum squamatum*, para evaluar el cambio evolutivo rápido en otras especies.

8. Agradecimientos

Tras la realización de este trabajo de fin de grado quiero agradecer a mis directores, Silvia Matesanz y Mario Blanco, y a Marina Ramos, que me hayan ayudado en todo lo que he necesitado desde el principio. Gracias por mostrarme vuestra confianza y guiarme desde que comencé la experimentación en el invernadero, pasando por el procesamiento de los datos en el laboratorio y hasta el momento de terminar de escribir este trabajo. Gracias a todos los compañeros de la carrera y todas las personas del Área de Biodiversidad y Conservación y de CULTIVE que han ayudado en alguna etapa del estudio. Por último, me gustaría dar las gracias a todos mis amigos y familiares que han estado a mi lado apoyándome durante los cuatro años de carrera y que sin ellos no lo podría haber logrado.

9. Bibliografía

- Aragón, C. F., Escudero, A., & Valladares, F. (2008). Stress-induced dynamic adjustments of reproduction differentially affect fitness components of a semi-arid plant. *Journal of Ecology*, *96*, 222-229.
- Aurelle, D., Thomas, S., Albert, C., Bally, M., Bondeau, A., Boudouresque, C. F., ... & Fady, B. (2022). Biodiversity, climate change, and adaptation in the Mediterranean. *Ecosphere*, *13*, e3915.
- Ayma Romay, A. I., & Bown, H. E. (2021). Coordinación de estrategias de uso de los recursos de especies leñosas del matorral de Chile: Relaciones entre rasgos funcionales de copa, hoja, tallo, raíz y fenología. *Bosque (Valdivia)*, *42*, 295-310.
- Barton K. MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1.15.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. M., & Walker, S. C. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, *67*.
- Baythavong, B. S. (2011). Linking the spatial scale of environmental variation and the evolution of phenotypic plasticity: selection favors adaptive plasticity in fine-grained environments. *The American Naturalist*, *178*, 75-87.
- Bellard, C., Bertelsmeier, C., Leadley, P., Thuiller, W., & Courchamp, F. (2012). Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology letters*, *15*, 365-377.
- Bladé, I., Castro-Díez, Y., Errasti, M. J., Fernández, J., Fortuny, D., Frías, M. D., ... & Rodríguez-Puebla, S. M. (2010). Capítulo 21 Tendencias atmosféricas en la Península Ibérica durante el periodo instrumental en el contexto de la variabilidad natural. *Clima en España: pasado, presente y futuro*, *25*.
- Blanco-Sánchez, M., Moore, M. J., Ramos-Muñoz, M., Pías, B., García-Fernández, A., Prieto, M., ... & Matesanz, S. (2021). Phylogeography of a gypsum endemic plant across its entire distribution range in the western Mediterranean. *American Journal of Botany*, *108*, 443-460.
- Blanco-Sánchez, M., Ramos-Muñoz, M., Pías, B., Ramírez-Valiente, J. A., Díaz-Guerra, L., Escudero, A., & Matesanz, S. (2022). Natural selection favours drought escape and an acquisitive resource-use strategy in semi-arid Mediterranean shrubs. *Functional Ecology*, *36*, 2289-2302.
- Blanco-Sánchez, M., Franks, S. J., Ramos-Muñoz, M., Pías, B., Ramírez-Valiente, J. A., Escudero, A., & Matesanz, S. (2023). Contrasting adaptive trait variation in response to drought in two Mediterranean shrubs. *Environmental and Experimental Botany*, *208*, 105253.

- Bongers, F. J., Olmo, M., Lopez-Iglesias, B., Anten, N. P. R., & Villar, R. J. P. B. (2017). Drought responses, phenotypic plasticity and survival of Mediterranean species in two different microclimatic sites. *Plant Biology*, *19*, 386-395.
- Brunet, J., & Von Oheimb, G. (1998). Migration of vascular plants to secondary woodlands in southern Sweden. *Journal of ecology*, *86*, 429-438.
- Buckland, S. M., Grime, J. P., Hodgson, J. G., & Thompson, K. (1997). A comparison of plant responses to the extreme drought of 1995 in northern England. *Journal of Ecology*, 875-882.
- Bukhov, N. G., & Carpentier, R. (2004). Effects of water stress on the photosynthetic efficiency of plants. In *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis* (pp. 623-635). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Camargo Rodríguez, I. D., & Rodríguez López, N. (2006). Nuevas perspectivas para el estudio de la asignación de biomasa y su relación con el funcionamiento de plantas en ecosistemas neotropicales. *Acta Biológica Colombiana*, *11*, 75-87.
- Case, A. L., & Ashman, T. L. (2005). Sex-specific physiology and its implications for the cost of reproduction. In *Reproductive allocation in plants* (pp. 129-157). Academic Press.
- Chaves, M. M., Pereira, J. S., Maroco, J., Rodrigues, M. L., Ricardo, C. P. P., Osório, M. L., ... & Pinheiro, C. (2002). How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of botany*, *89*, 907-916.
- Chevin, L. M., & Hoffmann, A. A. (2017). Evolution of phenotypic plasticity in extreme environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *372*, 20160138.
- Cramer, W., Guiot, J., Fader, M., Garrabou, J., Gattuso, J. P., Iglesias, A., ... & Xoplaki, E. (2018). Climate change and interconnected risks to sustainable development in the Mediterranean. *Nature Climate Change*, *8*, 972-980.
- de la Riva, E. G., Tosto, A., Pérez-Ramos, I. M., Navarro-Fernández, C. M., Olmo, M., Anten, N. P., ... & Villar, R. (2016). A plant economics spectrum in Mediterranean forests along environmental gradients: is there coordination among leaf, stem and root traits?. *Journal of Vegetation Science*, *27*, 187-199.
- Dorn, L. A., Pyle, E. H., & Schmitt, J. (2000). Plasticity to light cues and resources in *Arabidopsis thaliana*: testing for adaptive value and costs. *Evolution*, *54*, 1982-1994.

- Escolar, C., Maestre, F. T., & Rey, A. (2015). Biocrusts modulate warming and rainfall exclusion effects on soil respiration in a semi-arid grassland. *Soil Biology and Biochemistry*, *80*, 9-17.
- Escudero, A., Palacio, S., Maestre, F. T., & Luzuriaga, A. L. (2015). Plant life on gypsum: a review of its multiple facets. *Biological Reviews*, *90*, 1-18.
- Etterson, J. R. (2004). Evolutionary potential of *Chamaecrista fasciculata* in relation to climate change. I. Clinal patterns of selection along an environmental gradient in the Great Plains. *Evolution*, *58*, 1446-1456.
- Eugenio, M., Olano, J. M., Ferrandis, P., Martínez-Duro, E., & Escudero, A. (2012). Population structure of two dominant gypsophyte shrubs through a secondary plant succession. *Journal of Arid Environments*, *76*, 30-35.
- Eziz, A., Yan, Z., Tian, D., Han, W., Tang, Z., & Fang, J. (2017). Drought effect on plant biomass allocation: A meta-analysis. *Ecology and evolution*, *7*, 11002-11010.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N. S. M. A., Fujita, D. B. S. M. A., & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Sustainable agriculture*, 153-188.
- Farooq, M., Hussain, M., Wahid, A., & Siddique, K. H. M. (2012). Drought stress in plants: an overview. *Plant responses to drought stress: From morphological to molecular features*, 1-33.
- Farquhar, G. D., Wong, S. C., Evans, J. R., & Hubick, K. T. (1989). Photosynthesis and gas exchange. *Plants under stress. Cambridge University Press, Cambridge*, *39*, 47-69.
- Fox, J., & Weisberg, S. (2011). An {R} companion to applied regression (2nd edn). Thousand Oaks, CA: Sage.
- Franks, S. J., Sim, S., & Weis, A. E. (2007). Rapid evolution of flowering time by an annual plant in response to a climate fluctuation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*, 1278-1282.
- Franks, S. J., Weber, J. J., & Aitken, S. N. (2014). Evolutionary and plastic responses to climate change in terrestrial plant populations. *Evolutionary Applications*, *7*, 123–139.
- Franks, S. J., Hamann, E., & Weis, A. E. (2018). Using the resurrection approach to understand contemporary evolution in changing environments. *Evolutionary Applications*, *11*, 17-28.

- García, S. M., Ramos-Muñoz, M., Blanco-Sánchez, M., García-Fernández, A., Sánchez, A. M., & Escudero, A. (2019). Migración, variabilidad genética y plasticidad fenotípica en especies de yesos y su papel en la respuesta al cambio climático. *Ecosistemas*, 28, 48-59.
- Giménez-Benavides, L., Escudero, A., & Iriondo, J. M. (2007). Reproductive limits of a late-flowering high-mountain Mediterranean plant along an elevational climate gradient. *New Phytologist*, 173, 367-382.
- Giorgi, F., & Lionello, P. (2008). Climate change projections for the Mediterranean region. *Global and planetary change*, 63, 90-104.
- Gitay, H., Suárez, A., Watson, R., & Dokken, T. J. (2002). Cambio climático y biodiversidad. *Documento técnico V del IPCC*.
- Gomez-Mestre, I., & Jovani, R. (2013). A heuristic model on the role of plasticity in adaptive evolution: plasticity increases adaptation, population viability and genetic variation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280, 20131869.
- Hernández Bermejo, J. E., & Clemente, M. (1993). *Lepidium* (L.) R. Br. *Flora Iberica*, 4, 311– 327.
- Hoffmann, A. A., & Sgrò, C. M. (2011). Climate change and evolutionary adaptation. *Nature*, 470, 479-485.
- Huntley, B. (1991). How plants respond to climate change: migration rates, individualism and the consequences for plant communities. *Annals of Botany*, 15-22.
- Jiménez-Suancha, S. C., Alvarado S, O. H., & Balaguera-López, H. E. (2015). Fluorescence as an indicator of stress in *Helianthus annuus* L. A review. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9, 149-160.
- Jump, A. S., & Peñuelas, J. (2005). Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecology letters*, 8, 1010-1020.
- Jung, V., Albert, C. H., Violle, C., Kunstler, G., Loucougaray, G., & Spiegelberger, T. (2014). Intraspecific trait variability mediates the response of subalpine grassland communities to extreme drought events. *Journal of ecology*, 102, 45-53.
- Karger, D.N., Conrad, O., Böhner, J., Kawohl, T., Kreft, H., Soria-Auza, R.W., Zimmermann, N.E., Linder, H.P., Kessler, M., 2017. Climatologies at high resolution for the earth's land surface areas. *Sci. Data* 4, 1–20.

- Karlsson, P. S., & Méndez, M. (2005). The resource economy of plant reproduction. In *Reproductive allocation in plants* (pp. 1-49). Academic Press.
- Kenward, M. G., & Roger, J. H. (1997). Small Sample Inference for Fixed Effects from Restricted Maximum Likelihood. International Biometric Society Stable URL : <https://www.jstor.org/stable/2533558>. *Biometrics*, 53, 983–997.
- Kim, G. U., Seo, K. H., & Chen, D. (2019). Climate change over the Mediterranean and current destruction of marine ecosystem. *Scientific Reports*, 9, 18813.
- Kleunen, V., & Schmid. (2000). Clonal integration in *Ranunculus reptans*: by-product or adaptation?. *Journal of Evolutionary Biology*, 13, 237-248.
- Lenoir, J., & Svenning, J. C. (2015). Climate-related range shifts—a global multidimensional synthesis and new research directions. *Ecography*, 38, 15-28.
- Lesica, P., & Kittelson, P. M. (2010). Precipitation and temperature are associated with advanced flowering phenology in a semi-arid grassland. *Journal of Arid Environments*, 74, 1013-1017.
- Markesteyn, L., Poorter, L., Paz, H., Sack, L., & Bongers, F. (2011). Ecological differentiation in xylem cavitation resistance is associated with stem and leaf structural traits. *Plant, Cell & Environment*, 34, 137-148.
- Matesanz, S., & Valladares, F. (2014). Ecological and evolutionary responses of Mediterranean plants to global change. *Environmental and Experimental botany*, 103, 53-67.
- Matesanz, S., Gianoli, E., & Valladares, F. (2010). Global change and the evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1206, 35-55.
- Matesanz, S., Gómez-Fernández, A., Alcocer, I., & Escudero, A. (2015). Fragment size does not matter when you are well connected: effects of fragmentation on fitness of coexisting gypsophiles. *Plant Biology*, 17, 1047-1056.
- Matesanz, S., García-Fernández, A., Limón-Yelmo, A., Gómez-Fernández, A., & Escudero, A. (2018). Comparative landscape genetics of gypsum specialists with naturally-patchy distributions reveal their resilience to anthropogenic fragmentation. *Perspectives in plant ecology, evolution and systematics*, 34, 1-9.
- Matesanz, S., Ramos-Muñoz, M., Blanco-Sánchez, M., & Escudero, A. (2020). High differentiation in functional traits but similar phenotypic plasticity in populations of a soil specialist along a climatic gradient. *Annals of Botany*, 125, 969-980.

- Merilä, J. (2015). Perplexing effects of phenotypic plasticity. *Nature*, *525*, 326-327.
- Meyer, S. E. (1986). The ecology of gypsophile endemism in the eastern Mojave Desert. *Ecology*, *67*, 1303-1313.
- Monson, R. K., & Smith, S. D. (1982). Seasonal water potential components of Sonoran Desert plants. *Ecology*, *63*, 113-123.
- Mota, J. F., Sánchez-Gómez, P., & Guirado, J. S. (2011). Diversidad vegetal de las yeseras ibéricas. *El reto de los archipiélagos edáficos para la biología de la conservación. ADIF-Mediterráneo Asesores Consultores, Almería*.
- Munguía-Rosas, M. A., Ollerton, J., Parra-Tabla, V., & De-Nova, J. A. (2011). Meta-analysis of phenotypic selection on flowering phenology suggests that early flowering plants are favoured. *Ecology letters*, *14*, 511-521.
- Niinemets, Ü. (2001). Global-scale climatic controls of leaf dry mass per area, density, and thickness in trees and shrubs. *Ecology*, *82*, 453-469.
- Obeso, J. R. (2002). The costs of reproduction in plants. *New phytologist*, *155*, 321-348.
- Palacio, S., & Montserrat-Martí, G. (2007). Above and belowground phenology of four Mediterranean sub-shrubs. Preliminary results on root–shoot competition. *Journal of Arid Environments*, *68*, 522-533.
- Pigliucci, M. (2001). *Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture*. JHU Press.
- Poorter, H., Niinemets, Ü., Poorter, L., Wright, I. J., & Villar, R. (2009). Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New phytologist*, *182*, 565-588.
- Prieto, P., Penuelas, J., Llusia, J., Asensio, D., & Estiarte, M. (2009). Effects of long-term experimental night-time warming and drought on photosynthesis, F_v/F_m and stomatal conductance in the dominant species of a Mediterranean shrubland. *Acta Physiologiae Plantarum*, *31*, 729-739.
- R Core Team. (2023). R: A Language and Environment for statistical computing. R Foundation for Statistical computing. <https://www.r-project.org/>
- Ramírez-Valiente, J. A., Santos del Blanco, L., Alía, R., Robledo-Arnuncio, J. J., & Climent, J. (2022). Adaptation of Mediterranean forest species to climate: Lessons from common garden experiments. *Journal of Ecology*, *110*, 1022-1042.

- Rosa Cánovas, J. J., Turco, M., Jerez, S., & Montávez Gómez, J. P. (2018). Estudio de las proyecciones de futuro en sequía e incendios en la zona mediterránea.
- Segrestin, J., Navas, M. L., & Garnier, E. (2020). Reproductive phenology as a dimension of the phenotypic space in 139 plant species from the Mediterranean. *New Phytologist*, 225, 740-753.
- Shavrukov, Y., Kurishbayev, A., Jatayev, S., Shvidchenko, V., Zotova, L., Koekemoer, F., ... & Langridge, P. (2017). Early flowering as a drought escape mechanism in plants: how can it aid wheat production?. *Frontiers in plant science*, 8, 1950.
- Shaw, R. G., & Etterson, J. R. (2012). Rapid climate change and the rate of adaptation: insight from experimental quantitative genetics. *New Phytologist*, 195, 752-765.
- Sultan, S. E. (1995). Phenotypic plasticity and plant adaptation. *Acta botanica neerlandica*, 44, 363-383.
- Sultan, S. E., & Spencer, H. G. (2002). Metapopulation structure favors plasticity over local adaptation. *The American Naturalist*, 160, 271-283.
- Tezara, W., Marín, O., Rengifo, E., Martínez, D., & Herrera, A. (2005). Photosynthesis and photoinhibition in two xerophytic shrubs during drought. *Photosynthetica*, 43, 37-45.
- Valladares, F., Matesanz, S., Guilhaumon, F., Araújo, M. B., Balaguer, L., Benito-Garzón, M., ... & Zavala, M. A. (2014). The effects of phenotypic plasticity and local adaptation on forecasts of species range shifts under climate change. *Ecology letters*, 17, 1351-1364.
- Van Kleunen, M., & Fischer, M. (2005). Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants. *New phytologist*, 166(1), 49-60.
- Vile, D., Garnier, E., Shipley, B., Laurent, G., Navas, M. L., Roumet, C., ... & Wright, I. J. (2005). Specific leaf area and dry matter content estimate thickness in laminar leaves. *Annals of botany*, 96, 1129-1136.
- Volaire, F. (2008). Plant traits and functional types to characterise drought survival of pluri-specific perennial herbaceous swards in Mediterranean areas. *European Journal of Agronomy*, 29, 116-124.
- Weis, A. E. (2018). Detecting the “invisible fraction” bias in resurrection experiments. *Evolutionary Applications*, 11, 88-95.

Welles, S. R., & Funk, J. L. (2021). Patterns of intraspecific trait variation along an aridity gradient suggest both drought escape and drought tolerance strategies in an invasive herb. *Annals of Botany*, 127, 461-471.