



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**FOTOSÍNTESIS, FOTOPROTECCIÓN, PRODUCTIVIDAD Y
ESTRÉS ABIÓTICO: ALGUNOS CASOS DE ESTUDIO**

Eduardo Alberto Tambussi

**Departament de Biologia Vegetal
Universitat de Barcelona**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Divisió de Ciències Experimentals i Matemàtiques

Facultat de Biologia

Departament de Biologia Vegetal

**FOTOSÍNTESIS, FOTOPROTECCIÓN, PRODUCTIVIDAD Y
ESTRÉS ABIÓTICO: ALGUNOS CASOS DE ESTUDIO**

Memoria presentada por

Eduardo Alberto Tambussi

para optar al grado de Doctor en Biología

Directores: José Luis Araus Ortega - Juan José Guiamet

Programa de Doctorado: “*La Fisiología de las plantas i el ambient*”

Bienio: 1998-2000

Vº Bº de los Directores

Dr. José Luis Araus Ortega

Dr. Juan José Guiamet

Eduardo A. Tambussi

Barcelona, Septiembre 2004

Agradecimientos

Muchas personas han hecho posible la presente Tesis. Algunas de ellas tuvieron un papel decisivo en los trabajos que se presentan aquí; otras colaboraron de manera indirecta, pero siempre su ayuda fue invaluable. A todas estas personas, va mi más profundo agradecimiento. En particular quiero hacer explícita mi gratitud a:

a José Luis Araus, por haberme permitido integrarme a su equipo de trabajo durante mi estancia en Barcelona, y por darme su apoyo durante y luego de concluido mi trabajo en la UB.

a Juan José Guiamet (INFIVE, Argentina), por múltiples razones. En primer lugar, por ser quien me transmitió el entusiasmo por la Fisiología Vegetal y por la investigación científica en general. Además, su aporte intelectual fue decisivo en parte de los trabajos presentados aquí; sin su talento, conocimientos e inteligencia, estos trabajos no hubieran llegado a buen fin. Finalmente debo agradecerle todo su apoyo incondicional y amistad durante estos años. Por todo esto, muchas gracias!

a mi compañero del INFIVE (Argentina) Carlos Bartoli ('Tolo') quien es coautor de parte de los trabajos incluidos en esta Tesis. Su papel fue crucial tanto en aspectos teóricos como metodológicos. Además, debo agradecerle (junto a su esposa Aylén Capparelli) la amistad (en afecto y hechos concretos) que me brindaron en estos años. Siempre estuvieron cuando los necesité. Gracias.

a Salvador Nogués, quien es coautor de dos de los trabajos presentados en esta memoria. Debo agradecerle su apoyo y estímulo constante, en Barcelona y a la distancia.

a Jordi Bort, en particular por su apoyo durante mi estancia en Barcelona y luego de mi regreso a la Argentina.

al Ing. José Beltrano, por darme cabida en el INFIVE y por su apoyo para mi estancia doctoral en Barcelona.

al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET, Argentina), por el financiamiento a través de la Beca que me permitió realizar el Doctorado en Barcelona.

a mi amiga Anna Febrero, por su apoyo y amistad durante mi estancia en Barcelona. Mi gratitud a ella y a su esposo Oriol Salvat, por haberme abierto las puertas de su casa cuando era un desconocido. Nunca lo olvidaré.

Al Servei de Camps Experimentals, por todo el trabajo que realizaron en preparación de material y mantenimiento de las plantas. En particular, quiero agradecer a su director, Ricardo Simmoneau. así como a Josep Matas y Jordi Matas.

Al Servei de Microscopía Electrónica (UB), muy especialmente a Nuria Cortadellas y a Almudena por su trabajo y asesoramiento en el procesamiento de las muestras.

al IRTA de Cabrils (Robert Savé) por permitirme utilizar el osmómetro; a Jordi Voltas (Lleida), por su colaboración en uno de los trabajos presentados aquí (Capítulo 7).

a mis queridos compañeros de la Unitat de Fisiologia Vegetal (UB): Sergi Viader, Eva Fernández, Nuria Roca, Eva Casanova, Karen Peña, Bouchra Omari, Pere Rovira, Toni Pardo, Marta Lopes y Sergi Munné. A todos les agradezco las largas charlas y el aliento que me dieron siempre. Un agradecimiento especial a Pitter Ferrio, por su aliento y amistad.

a todo el personal docente de la Unitat de Fisiologia Vegetal (Facultat de Biologia, UB): Henar Alegre, Maribel Trillas, Luisa Moisset, Esther Simon, Joaquin Azcón-Bieto, Isabel Fleck y en especial a Xavier Aranda por su disposición para atender mis consultas. A la secretaria del Departamento, Angels, por su eficiencia y dedicación.

a mis compañeros del INFIVE (Universidad Nacional de La Plata, Argentina), por todo el apoyo y cariño que me brindaron en todo momento. En especial a Corina Graciano por su aliento constante y su ayuda en la edición de la memoria y a Laura Fernández, por el apoyo que me brindó en mi integración a la Cátedra de Fisiología Vegetal. También va mi

agradecimiento a Virginia Luquez, Dana Martinez y Facundo Gómez, por la camaradería que siempre me demostraron.

a mis amigos catalanes del barrio de Gracia en Barcelona: Cristina y José Angel, Celeste y Diego, Isabel y Guillem, Assumpta y Carlos. A todos ellos le agradezco la amistad de nuestros años en Barcelona. Un agradecimiento especial a Assumpta y Jaume, por su apoyo afectivo y logístico, estando siempre que se los necesitaba.

a mis queridos amigos Osiris Roza y Analía Volante, por los años de amistad, apoyo y cariño que me brindan desde siempre. Gracias por la ‘fuerza’ que hicieron para el regreso.

a mis padres y hermanos, quienes no participaron en mi formación en la ciencia, pero lo hicieron de manera decisiva en mi formación como persona. Por su amor y apoyo constante, gracias.

a quienes ‘golpearon a mi puerta’ y me rescataron en los momentos difíciles.

y fundamentalmente, a Cecilia y a Juliana, por las horas, días y años en que me apoyaron con su cariño. Esto no hubiera sido posible sin ellas.

Indice

0. Abreviaturas y símbolos utilizados.....	XII
1. Introducción general.....	1
1.1. El estrés en vegetales.....	3
1.1.1. Significado del estrés en el marco de la fisiología vegetal.....	3
1.1.2. Los tipos de estrés.....	4
1.1.3. Relevancia del estudio del estrés en plantas.....	4
1.1.4. El estrés hídrico.....	5
1.1.4.1. Conceptos de estrés hídrico, déficit hídrico y sequía.....	5
1.1.4.2. Tipos de respuestas de las plantas al estrés hídrico.....	6
1.1.4.3. Cuantificación del estrés hídrico.....	7
1.1.4.4. Respuestas de las plantas al estrés hídrico.....	7
1.1.5. El estrés por bajas temperaturas.....	9
1.1.5.1. Conceptos.....	9
1.1.5.2. Efectos de las bajas temperaturas en los vegetales.....	10
1.1.5.3. Cuantificación del estrés por bajas temperaturas.....	11
1.1.5.4. Tolerancia a las bajas temperaturas.....	11
1.2. Estrés y fotosíntesis.....	13
1.2.1. Déficit hídrico y efectos en la fotosíntesis.....	13
1.2.1.1. Limitación estomática <i>versus</i> limitaciones metabólicas.....	13
1.2.1.2. Limitación por Rubisco.....	14
1.2.1.3. Limitación por la regeneración de Ribulosa 1,5 bisfosfato y ATP	14
1.2.1.4. Transporte fotosintético de electrones y estrés: daño <i>versus</i> ‘ <i>downregulation</i> ’	15
1.2.2. Efectos de las bajas temperaturas sobre la fotosíntesis.....	16
1.3. Fotoinhibición, fotoprotección, y fotoinactivación.....	18
1.3.1. Definición de términos.....	18
1.3.2. Naturaleza de la fotoinactivación.....	18
1.3.3. Mecanismos de fotoprotección en situaciones de estrés.....	20
1.3.3.1. Ciclo de las xantofilas. Vinculación mecanística con el <i>NPQ</i> ..	20

1.3.3.1.1. Cambios espectrales asociados al <i>NPQ</i>	22
1.3.3.1.2. Papel protector de las xantofilas.....	23
1.3.3.2. Destinos alternativos de electrones.....	23
1.3.3.2.1. Fotorrespiración.....	24
1.3.3.2.2. Reacción de Mehler y procesos relacionados.....	24
1.4. Estrés oxidativo y antioxidantes en vegetales.....	26
1.4.1. Especies reactivas del oxígeno (<i>ROS</i>).....	26
1.4.2. Sistemas antioxidantes en las células vegetales.....	27
1.4.3. Acido ascórbico y su rol central en los mecanismos protectivos.....	28
1.4.4. Estreses abióticos y daño oxidativo en plantas.....	30
1.5. Estrés hídrico y productividad de cultivos.....	32
1.5.1. Concepto de tolerancia al estrés en un contexto agronómico.....	32
1.5.2. Tolerancia al estrés <i>versus</i> rendimiento potencial.....	32
1.5.3. Rasgos fisiológicos asociados a la productividad en condiciones de agua limitante.....	34
1.5.3.1. Aspectos fisiológicos del uso del agua en cultivos.....	34
1.5.3.2. Aspectos relacionados con el uso de la radiación.....	35
1.5.4. Llenado de los granos en cereales C_3	36
1.5.4.1. Papel fotosintético de la espiga.....	37
2. Objetivos.....	39
2.1. Fotosíntesis, fotoinhibición y daño oxidativo en condiciones de estrés.....	42
2.1.1. Bajas temperaturas.....	42
2.1.2. Déficit hídrico.....	42
2.2. Fotosíntesis y productividad en ambientes Mediterráneos.....	42
3. Oxidative stress and photodamage at low temperatures in soybean (<i>Glycine max</i> L. Merr.) leaves.....	43
3.0. Abstract.....	46

3.1. Introduction	47
3.2. Material and methods	48
3.2.1. Plant material and growing conditions.....	48
3.2.2. Treatment with antioxidants.....	49
3.2.3. Inhibition of chloroplast protein synthesis.....	49
3.2.4. Induction of oxidative damage by methyl viologen, and protection by Gal and Trolox.....	49
3.2.5. Chlorophyll fluorescence measurements.....	49
3.2.6. Determination of protein carbonylation and <i>MDA</i> content in thylakoids.....	50
3.2.7. Chlorophyll content.....	50
3.3. Results	51
3.3.1. Chilling stress and photodamage.....	51
3.3.2. Oxidation of thylakoid proteins and lipids.....	54
3.3.3. Effects of exogenously applied antioxidants.....	56
3.4. Discussion	60
3.4.1. Photodamage at chilling temperatures.....	60
3.4.2. Oxidative damage to thylakoids.....	60
3.4.3. Antioxidants and photodamage.....	61
3.5. References	63
4. Photoprotection in water-stressed plants of durum wheat (<i>Triticum turgidum</i> var. <i>durum</i>): changes in chlorophyll fluorescence, spectral signature and photosynthetic pigments	67
4.0. Abstract	70
4.1. Introduction	71
4.2. Material and methods	73
4.2.1. Experimental set-up.....	73
4.2.2. Leaf gas exchange and modulated chlorophyll fluorescence.....	73
4.2.3. Photochemical Index.....	74
4.2.4. Pigment determination.....	74

4.2.5. Water status.....	75
4.3. Results.....	76
4.4. Discussion.....	86
4.4.1. Photoprotective response.....	86
4.4.2. Photochemical index, non-photochemical quenching and pigment relationship.....	88
4.5. References.....	90
5. Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.).....	95
5.0. Abstract.....	98
5.1. Introduction.....	99
5.2. Material and methods.....	101
5.2.1. Plant material, water stress, and L-galactonic acid γ -lactone application.....	101
5.2.2. Soil water potential and leaf water status.....	101
5.2.3. Photosynthesis and stomatal conductance.....	101
5.2.4. Determination of ascorbic acid content.....	101
5.2.5. Thylakoid isolation and carbonyl derivatization.....	102
5.2.6. <i>SDS-PAGE</i> and Western blotting.....	103
5.2.7. Photosynthetic electron transport.....	103
5.3. Results.....	104
5.3.1. Physiological responses to water stress.....	104
5.3.2. Oxidative damage to thylakoid proteins.....	106
5.3.3. Effects of L-galactonic acid γ -lactone.....	107
5.3.4. Protection of the photosynthetic apparatus by L-galactonic acid γ -lactone.....	107
5.4. Discussion.....	109
5.4.1. Oxidative stress in droughted plants.....	109
5.4.2. Protection by L-galactonic acid γ -lactone.....	110
5.4.3. Protein oxidation and photosynthetic activity of thylakoid membranes.....	111

5.5. References.....	113
6. Is C₄ metabolism involved in the better photosynthetic performance of ears than flag leaves of durum wheat under drought?	117
6.0. Abstract.....	120
6.1. Introduction.....	121
6.2. Material and Methods.....	123
6.2.1. Growing conditions.....	123
6.2.2. Water status determinations.....	124
6.2.2.1. Relative water content.....	124
6.2.2.2. Water potential.....	124
6.2.2.3. Osmotic adjustment.....	124
6.2.3. Photosynthetic measurements.....	125
6.2.3.1. Gas exchange.....	125
6.2.3.2. Chlorophyll fluorescence.....	125
6.2.3.3. Low oxygen conditions.....	126
6.2.4. Immunocytochemical localisation of Rubisco.....	126
6.2.4.1. Fixation and embedding.....	126
6.2.4.2. Immunocytochemical localisation.....	126
6.3. Results.....	128
6.3.1. Plant water status and osmotic adjustment.....	128
6.3.2. Photosynthetic performance during grain filling.....	130
6.3.2.1. Greenhouse experiment.....	130
6.3.2.2. Field experiment.....	135
6.3.3. Photosynthetic response to low oxygen.....	135
6.3.4. Anatomy and Rubisco distribution.....	136
6.4. Discussion.....	139
6.4.1. C ₃ versus C ₄ metabolism in the ear.....	139
6.4.2. Photosynthetic performance of ear versus flag leaf under water stress.....	141
6.5. References.....	143
7. Does a higher yield potential improve barley performance in Mediterranean conditions?: a case study	149

7.0. Abstract	152
7.1. Introduction	154
7.2. Material and Methods	156
7.2.1. Field studies	156
7.2.1.1. Yield and its agronomic components	156
7.2.1.2. Carbon isotope discrimination	156
7.2.2. Early crop growth	157
7.2.2.1. Experimental set-up	157
7.2.2.2. Gas exchange measurements	157
7.2.2.3. Chlorophyll fluorescence measurements	158
7.2.2.4. Water status	158
7.2.2.5. Biomass analysis	159
7.2.2.6. Carbon isotope discrimination and nitrogen analysis	159
7.2.2.7. Statistical analyses	159
7.3. Results and Discussion	160
7.3.1. Yield performance	160
7.3.2. Performance during tillering	162
7.3.2.1. Plant growth	164
7.3.2.2. Photosynthetic activity	165
7.4. Conclusions	170
7.5. References	171
8. Discusión general	177
8.1. Fotosíntesis, fotoinhibición y daño oxidativo en condiciones de estrés (Objetivo 2.1)	179
8.2. Fotosíntesis y productividad en ambientes Mediterráneos (Objetivo 2.2)	183
9. Conclusiones principales	187
9.1. Fotosíntesis, fotoinhibición y daño oxidativo en condiciones de estrés (Objetivo 2.1)	189
9.1.1. Estrés oxidativo y fotodaño en condiciones de bajas temperaturas en hojas de soja	189

9.1.2. Fotoprotección en plantas de trigo duro (<i>Triticum turgidum</i> var. durum) sometidas a estrés hídrico: cambios en la fluorescencia de la clorofila, firma espectral y pigmentos fotosintéticos.....	189
9.1.3. Daño oxidativo a proteínas tilacoidales en plantas de trigo sometidas a estrés hídrico.....	189
9.2. Fotosíntesis y productividad en ambientes Mediterráneos (Objetivo 2.2).....	190
9.2.1. Fotosíntesis de la espiga de trigo duro en situaciones de estrés hídrico	190
9.2.2. Rendimiento potencial en cebada y grado de adaptación a condiciones Mediterráneas: un caso de estudio.....	190
10. Resúmenes	191
10.1. Estrés oxidativo y fotodaño en condiciones de bajas temperaturas en hojas de soja.....	193
10.2. Fotoprotección en plantas de trigo duro (<i>Triticum turgidum</i> var. durum) sometidas a estrés hídrico: cambios en la fluorescencia de la clorofila, firma espectral y pigmentos fotosintéticos.....	193
10.3. Daño oxidativo a proteínas tilacoidales en plantas de trigo sometidas a estrés hídrico.....	194
10.4. Fotosíntesis de la espiga de trigo duro en situaciones de estrés hídrico.....	195
10.5. Rendimiento potencial en cebada y grado de adaptación a condiciones Mediterráneas: un caso de estudio.....	196
11. Anexo	199
12. Referencias	203

0. Abreviaturas y símbolos utilizados*

A = anteraxantina**

A_{max} = tasa de asimilación neta de CO_2 en condiciones de saturación de CO_2 y luz (valor máximo de la tasa fotosintética en las curvas A/C_i)

A_{sat} = tasa de asimilación neta de CO_2 en condiciones de saturación lumínica y concentraciones ambientales de CO_2 (≈ 360 ppm)

A^*_{sat} = utilizado en la espiga para designar a A_{sat} corregida por la respiración

C_a = concentración ambiental de CO_2 (360 ppm)

C_c = concentración cloroplástica de CO_2

C_i = concentración intercelular de CO_2

DPS = estado de de-epoxidación del ciclo de las xantofilas. Calculado como $[(A + Z) / (V + A + Z)]^{-1}$

ETR = tasa del transporte linear de electrones.

$PSII$ = fotosistema II

F_0, F_m = fluorescencia mínima de la clorofila y máxima respectivamente en hojas adaptadas a la oscuridad (*ca.* 30 min)

F_v/F_m = relación entre la fluorescencia variable ($F_v = F_m - F_0$) y F_m en hojas aclimatadas a un período de oscuridad (*ca.* 30 min)

F_s, F'_m = fluorescencia mínima y máxima respectivamente en plantas adaptadas a la luz

G = glumas (brácteas más externas en cada espiguilla de los cereales)

g_s = conductancia estomática

$J_{max,RuBP}$ = máxima tasa potencial de transporte electrónico que contribuye a la regeneración de RuBP. Parámetro calculado a partir de las curvas A/C_i

$J_{max,PSII}$ = máxima tasa potencial de transporte electrónico vinculada al fotosistema II en condiciones saturantes de luz y CO_2 .

LHC = complejos recolectores de luz asociados a los fotosistemas (= 'antenas').

Lm = lemmas [brácteas internas de la espiguilla en cereales, a menudo prolongada en una arista ('awn')]

$PEPc$ = Fosfoenol piruvato carboxilasa

$PPFD$ *** = densidad de flujo fotónico fotosintético

qP = 'quenching' fotoquímico

* Se ha preferido el uso de las abreviaturas inglesas debido a su amplio uso en la literatura científica.

** Según el contexto, A puede simbolizar a la xantofila anteraxantina o bien a la tasa fotosintética.

qN = 'quenching' no fotoquímico

RuBP = Ribulosa 1,5 bisfosfato

RWC = Contenido Relativo de Agua (relación porcentual entre el contenido de agua de un órgano y el contenido a máxima turgencia)

V = violaxantina

$V_{c,max}$ = máxima velocidad de carboxilación de la Rubisco. Calculado a partir de la pendiente inicial de la curvas A/C_i

VDE = Violaxantina de-epoxidasa

VPD = gradiente de presión parcial de vapor de agua

WUE = eficiencia del uso de agua. Según el contexto, puede referirse al cociente tasa fotosintética / tasa transpiratoria (WUE *instantánea*) o a la relación biomasa producida / agua transpirada (WUE *integrada*)

Z = zeaxantina

Símbolos

Ψ_w = Potencial hídrico.

ϕ_{PSII} = rendimiento cuántico efectivo (a la luz) del fotosistema II. Estimado a partir del coeficiente de la fluorescencia modulada de la clorofila $\Delta F/F'_m = (F'_m - F_s) / F'_m$. Ver Anexo, pag. 199)

λ = longitud de onda

*** Algunos autores prefieren el término *flujo fotónico fotosintético* (PPF) ya que la palabra 'flujo' incluye el concepto de 'densidad'

1. Introducción general

1.1. El estrés en vegetales

1.1.1. Significado del estrés en el marco de la fisiología vegetal

Aunque ampliamente utilizado en fisiología vegetal, el término ‘*estrés*’ es de difícil definición. Muchas de las aproximaciones que se han formulado en relación con este concepto son a veces imprecisas y no exentas de una fuerte dosis de subjetividad. Sin embargo, dado lo extendido del término ‘*estrés*’ en la bibliografía científica, se enumerarán algunas definiciones enunciadas en la literatura. La definición biofísica de estrés involucra *una fuerza ejercida sobre un objeto en relación con el área sobre la cual se aplica* (es decir, posee un significado equivalente al de presión). Por lo tanto, el término estrés en el marco de la fisiología vegetal ‘*refleja la magnitud de presión ambiental que fuerza al cambio en la fisiología de una planta*’ (Nilsen y Orcutt 1996). Levitt (1980) definió al estrés como: ‘*cualquier factor ambiental potencialmente desfavorable para los organismos vivos*’ (ver Lichtenthaler 1996). El problema de este tipo de definiciones radica en cómo calificar en forma objetiva qué factor es desfavorable.

A menudo es difícil distinguir entre aquellas respuestas que repercuten negativamente en la planta y aquellas que poseen un efecto benéfico. Nilsen y Orcutt (1996) señalan que algunos factores pueden tener ambos efectos simultáneamente. Por ejemplo, la marchitez producida por déficit hídrico, si bien tiene un efecto negativo en la tasa de asimilación de CO₂, también puede ser positiva para la planta, ya que colabora en la menor absorción de energía lumínica al cambiar el ángulo de exposición, evitando el daño permanente en la hoja por altas temperaturas.

En este sentido, Lichtenthaler (1996) distingue tres conceptos:

Estrés: es el estado de una planta cuando se la somete a una fuerza

Tensión o esfuerzo¹: es la respuesta de la planta al estrés antes que ocurra algún daño

Daño: es el resultado de un estrés de tal intensidad que no puede ser compensado por la planta.

Usualmente el término ‘tensión’ (o esfuerzo) es escasamente utilizado por los fisiólogos vegetales, siendo usado más bien ‘respuestas al estrés’. Es importante destacar que, aunque el estrés y sus respuestas vinculadas puedan estar presentes, no siempre esto implica la existencia de daño, aún cuando la planta esté sujeta a períodos largos o incluso a estrés continuo.

¹ ‘*Strain*’ en el original en inglés, lo cual puede ser traducido al castellano como ‘tensión’ o ‘esfuerzo’

Otros autores definen al estrés como ‘*cualquier factor ambiental biótico o abiótico que reduce la tasa de algún proceso fisiológico (por ejemplo, crecimiento o fotosíntesis) por debajo de la tasa máxima respecto de la que podría alcanzar*’ (Lambers y col. 1998). Según esta definición, la mayoría de las plantas estarían sometidas a algún tipo de estrés, ya que es improbable la ausencia de algún factor limitante. Estos mismos autores definen tres escalas temporales en la respuesta de las plantas al estrés:

Respuesta al estrés es el efecto inmediato, en general de carácter perjudicial. Ocurre en una escala de segundos a días.

Aclimatación²: es el ajuste morfológico y fisiológico realizado por la planta (como individuo) para compensar el peor funcionamiento de la misma luego de la exposición al estrés. Ocurre en una escala de días a semanas.

Adaptación: es la respuesta evolutiva que resulta de cambios genéticos en las poblaciones, conduciendo a una compensación morfológica y fisiológica. Ocurre en una escala temporal mucho mayor que la aclimatación, usualmente muchas generaciones.

1.1.2. Los tipos de estrés

Existen variadas clasificaciones de los factores de estrés. En general, estos pueden ser clasificados en físicos, químicos y bióticos, siendo los dos primeros agrupados bajo el término de ‘*estreses abióticos*’. Entre los factores físicos se pueden mencionar el estrés por déficit o exceso de agua, altas-bajas temperaturas y radiación *UV*. Entre los factores químicos son ampliamente estudiados la contaminación atmosférica metales pesados, toxinas, salinidad etc. Finalmente, entre los factores bióticos pueden mencionarse la competencia, la herbivoría, la alelopatía y patógenos en general.

1.1.3. Relevancia del estudio del estrés en plantas

Existen numerosas motivaciones para estudiar la fisiología de las plantas bajo estrés, de las cuales nombraremos aquí las más importantes: (a) en primer lugar, el conocimiento de los factores de estrés en los vegetales puede resultar crucial para la elaboración de modelos mecanísticos de naturaleza predictiva (por ejemplo, el estudio de los posibles efectos del cambio climático); (b) desde una perspectiva ecofisiológica, el análisis de la interacción de las plantas con los factores ambientales es fundamental para

² Otro término usado es el de **acomodación**, similar a la aclimatación (Azcón Bieto y Talón, 2000). Algunos autores distinguen el término **aclimatización**, para designar la respuesta a múltiples parámetros ambientales.

comprender la distribución de las especies en los diferentes ecosistemas; y (c) el rendimiento de los cultivos está fuertemente limitado por el impacto de estreses ambientales (Nilsen y Orcutt 1996). Además de las implicaciones a la hora de optimizar las prácticas agronómicas, para realizar una mejora de los cultivos de tipo analítica (es decir, selección genética con una base mecanística, ver sección 1.5, pag. 32) y para encontrar posibles ‘*dianas*’ susceptibles de ser modificadas genéticamente, es crucial comprender los procesos fisiológicos subyacentes en la tolerancia (y/o evitación) de los cultivos al estrés (Ali Dib y col.1990).

Dentro de los estreses abióticos, son de amplia repercusión para el crecimiento y productividad de las plantas el **estrés hídrico** (por déficit) y las **bajas temperaturas** (frío). Como se detallará mas adelante (ver sección de Objetivos), estos dos tipos de estrés se han elegido en la presente tesis como temas de estudio, fundamentalmente por su relevancia en aspectos ecofisiológicos de las plantas y su impacto en la producción agrícola tanto de la cuenca mediterránea como de Argentina.

1.1.4. El estrés hídrico

1.1.4.1. Conceptos de estrés hídrico, déficit hídrico y sequía

En sentido amplio, el estrés hídrico incluye en realidad dos tipos de estrés contrapuestos: por déficit o por exceso de agua en el suelo³. Es bastante frecuente que dos o más factores de estrés coexistan, pudiendo ser la interacción resultante de tipo sinérgico (Nilsen y Orcutt 1996). Un ejemplo clásico de esto es el estrés hídrico, donde la falta de agua puede interactuar con altas temperaturas y altas irradiancias. Las regiones con clima Mediterráneo, donde ocurre déficit hídrico en el período estival ilustran este fenómeno (Acevedo 1999). El término ‘*sequía*’ denota en muchos casos esta interacción entre baja disponibilidad hídrica, alta temperatura y alta irradiancia. Según algunos autores, sequía es un concepto de tipo meteorológico más que fisiológico, ya que se refiere a un período en el cual las precipitaciones no compensan el agua perdida por evapotranspiración (Passioura 1996). Sin embargo, y a pesar de las consideraciones anteriores, sequía y estrés hídrico son términos usados a menudo indistintamente en numerosos trabajos. Algunos autores utilizan el término ‘*déficit hídrico*’ (es decir, transpiración superando la absorción de agua) como

³ El estrés por exceso de agua en el suelo (*‘flooding’* o *‘waterlogging’*) es en general menos extendido, por lo que la mayoría de los autores utilizan el término *‘estrés hídrico’* como sinónimo de déficit. Sin embargo, el estrés por *‘encharcamiento’* puede tener un serio impacto en el rendimiento en algunas regiones con lluvias excesivas o de drenaje deficiente (Samad y col. 2001).

un componente de otros tipos de estrés, ya que la falta de agua puede observarse tanto en situaciones de sequía, como frente a salinidad y bajas temperaturas (Bray 1997).

Entre los factores abióticos, el estrés por déficit hídrico es considerado uno de los más relevantes, tanto desde una perspectiva ecológica como agronómica. Respecto a los cultivos, aunque ha sido señalado que no siempre es el factor central (Richards y col. 2001), está claro que el déficit hídrico es el principal factor abiótico que limita la distribución geográfica y el rendimiento de la mayoría de los cultivos (Araus y col. 2002a).

1.1.4.2. Tipos de respuestas de las plantas al estrés hídrico

Clásicamente el comportamiento de las plantas frente al estrés hídrico ha sido clasificado en escape, evitación y tolerancia, los cuales se describen a continuación:

Escape: en estos casos las plantas ajustan su fenología para cumplir su ciclo fuera de los períodos de déficit hídrico. El caso típico es el de las plantas terófitas o anuales. En cultivos también puede observarse una estrategia de escape. Por ejemplo, en zonas con clima Mediterráneo donde se produce una situación de sequía terminal, existen variedades de cereales como trigo o cebada que ajustan su ciclo fenológico de manera que completan el llenado de los granos antes que se produzcan las condiciones de máximo estrés (Araus y col. 2002; Slafer y col. 1994).

Evitación: en este caso las plantas poseen mecanismos para evitar (o postergar) la deshidratación. Una estrategia es aumentar la capacidad de absorción de agua gracias al incremento de la superficie radicular o disminución de la resistencia hidráulica (ej. Nilsen y Orcutt 1996) siendo frecuente en plantas conocidas como ‘derrochadoras de agua’ (*‘water-spenders’*). La estrategia inversa es la que adoptan las plantas ‘ahorradoras’, que minimizan las pérdidas de agua por diversas vías, tales como el cierre estomático y la disminución de la transpiración cuticular. Dentro de esta misma estrategia conservadora podrían incluirse las plantas que producen menos biomasa aérea al sufrir déficit hídrico, aumentando por ende la proporción relativa de masa radicular.

Tolerancia: este término se refiere a la capacidad de resistir en forma reversible la deshidratación de los tejidos. Aunque el ejemplo extremo de esto son las llamadas *‘plantas poikilohídricas’* (Oliver 1996), las plantas ‘mediterráneas’ como *Rosmarinus* o *Melissa* son capaces de soportar un alto grado de deshidratación de sus tejidos (Munné-Bosch y Alegre 2000a, b).

1.1.4.3. Cuantificación del estrés hídrico

El estado hídrico de una planta (y la magnitud del estrés) es corrientemente caracterizado por el potencial hídrico (Ψ_w) y el contenido relativo de agua (RWC , es decir, el contenido porcentual de agua en relación al contenido de agua a hidratación máxima) (Turner 1988). Sin embargo, ha sido señalado que el grado de estrés no puede ser definido *per se* por el estado hídrico de la planta. Por ejemplo, el potencial hídrico puede ser en muchos casos una consecuencia y no una causa del control de la apertura estomática (Tardieu 1997). Por otra parte, es bien conocido el hecho que las plantas pueden reaccionar a estímulos provenientes del suelo, aún antes que puedan detectarse cambios en el potencial hídrico (y aún mas del RWC) de las hojas (Passioura 1996 y referencias citadas allí). Además, dado que existen importantes diferencias entre especies en el grado de tolerancia al estrés, es dificultoso establecer parámetros objetivos que definan al estrés y su magnitud en forma general. Sin embargo, a pesar de las limitaciones señaladas (Schulte 1992), es claro que el potencial hídrico y el RWC son las formas mas objetivas de cuantificar el estatus hídrico y de hecho su uso está ampliamente extendido en la literatura (Hsiao 1973).

Sólo con el fin de poder comparar diferentes estudios, Hsiao (1973) definió tres grados de estrés hídrico:

- **Estrés leve:** disminución del potencial hídrico de algunos bares (décimas de MPa) o del RWC en un 8-10 % respecto a plantas bien regadas bajo leve demanda evaporativa.
- **Estrés moderado:** disminución del potencial hídrico mas acusada (aunque menor a (1.2-1.5 MPa) o una disminución del RWC entre un 10 y un 20%.
- **Estrés severo:** disminución del potencial hídrico mayor a 15 bares (1.5 MPa) o disminución del RWC mayor a un 20%.

Esta escala, aunque de naturaleza arbitraria por las razones antes expuestas, será utilizada como referencia en el presente trabajo⁴.

1.1.4.4. Respuestas de las plantas al estrés hídrico

Diversos y numerosos procesos de la planta pueden ser alterados por el estrés hídrico. Las respuestas pueden ser respuestas transitorias o bien involucrar cambios en la

⁴ Otros autores (Flexas y Medrano 2002) sitúan al estrés leve cuando el RWC posee valores entre 100 y 85%, el estrés moderado con RWC de 85-70% y severo con RWC por debajo de 70%.

expresión génica. Por ejemplo, la expresión de gran cantidad de genes es modificada en plantas de *Arabidopsis thaliana* sujetas a episodios de déficit hídrico (Bray 2002). El estrés hídrico puede considerarse un síndrome complejo, integrado por una numerosa serie de procesos, algunos de los cuales son deletéreos y otros son adaptativos (Chaves y col. 2002). Por lo tanto, es virtualmente imposible pormenorizar la totalidad de los procesos que son afectados por el estrés hídrico. A continuación se enumeran y describen brevemente tres de las respuestas que se consideran más relevantes en relación al presente trabajo:

Inhibición del crecimiento: una de los primeros efectos del déficit hídrico sobre los vegetales es la inhibición de la elongación celular y por ende, del crecimiento. Es bastante conocido que el crecimiento de la raíz es menos sensible que el crecimiento de la parte aérea, lo que conduce a un aumento de la relación parte aérea / raíz (Mullet y Whitssit 1996). La variación del área foliar es una de las respuestas macroscópicas más tempranas en plantas sufriendo déficit hídrico (Passioura 1996).

Cierre estomático. El cierre estomático (y la consecuente disminución de la conductancia) es uno de los efectos del estrés hídrico más ampliamente conocido. El fenómeno está vinculado al aumento de los niveles xilemáticos (o cambios en la compartimentalización) del ácido abscísico (*ABA*), aunque la intensidad de la respuesta puede ser modulada por otros factores tales como el gradiente de presión parcial de vapor de agua (*VPD*) de forma aún no del todo esclarecida (Tardieu 1997; Tardieu y Simonneau 1998). Es un hecho conocido que el cierre estomático puede inducirse aún antes de cualquier cambio detectable en el Ψ_w y el *RWC* de las hojas, y actualmente se acepta la existencia de una señal proveniente de las raíces (Flexas y Medrano 2002). La naturaleza ‘química’ o ‘hidráulica’ del control en el cierre estomático asociado al estrés hídrico es un tema de intenso debate y escapa al alcance del presente trabajo. La señal que hipotéticamente provendría de las raíces ha sido asociada con el *ABA*, aunque el mecanismo exacto del proceso parece ser complejo y no ha sido esclarecido aún (Davies y Gowing 1999).

El resultado obvio del cierre estomático es la disminución de la tasa transpiratoria y por ende, del agua consumida por la planta. Como se verá mas adelante, la caída de la conductancia estomática (y la paralela disminución de los valores de concentración intercelular de CO_2 o C_i) produce una caída de la asimilación de CO_2 y diversos efectos

asociados, tales como acumulación de poder reductor, susceptibilidad a la fotoinhibición y/o fotooxidación, etc.

Ajuste osmótico. La acumulación de osmolitos en las células vegetales resulta en una disminución del potencial osmótico, permitiendo el mantenimiento de la absorción de agua y de la presión de turgencia. En condiciones de estrés hídrico esto puede contribuir al mantenimiento de diversos procesos fisiológicos tales como la apertura estomática, la fotosíntesis y la expansión celular (Serraj y Sinclair 2002). Esta respuesta al déficit hídrico es conocida como *ajuste osmótico (OA)* u *osmoregulación*. El impacto del *OA* en la producción agronómica agronómico ha sido puesto en duda recientemente, ya que en general, la correlación entre grado de *OA* y rendimiento se da en condiciones de estrés extremo (o sea en situaciones de muy bajo rendimiento; Serraj y Sinclair 2002). Sin embargo su papel en la fisiología de la planta frente al estrés ha sido reportado en numeros estudios (citas en Morgan 1980; Ike y Thurtell 1981; Babu y col. 1999). Debe señalarse que el verdadero ajuste osmótico ocurre cuando hay un aumento en el número total de moléculas osmóticamente activas, no considerándose como tal al aumento pasivo de solutos que se produce en la deshidratación de los tejidos (Nilsen y Orcutt 1996). Por lo tanto, para la correcta evaluación del *OA* debe medirse el potencial osmótico a turgencia máxima, evitando así el artefacto producido por la disminución del volumen celular. Existen diversos métodos para el análisis del *OA*, siendo de amplia utilización las técnicas psicrométricas (ej. por determinación del punto de rocío; Briscoe 1984) en tejidos previamente hidratados (Babu y col. 1999).

1.1.5. El estrés por bajas temperaturas

1.1.5.1. Conceptos

El término ‘bajas temperaturas’ es arbitrario, y se utiliza para designar aquellas temperaturas por encima (*‘chilling’*) o por debajo de 0 °C (*‘freezing’*) que causan algún tipo de daño a las plantas. En adelante, el concepto de estrés por bajas temperaturas se referirá exclusivamente al *‘chilling’*, es decir el estrés causado por temperaturas que pueden estar entre 0 y aproximadamente 15 grados, dependiendo de la especie que se trate.

Dado que las plantas son poikilotermas, las bajas temperaturas son un factor crítico en la distribución de las comunidades vegetales y en el crecimiento de importantes cultivos, como la soja y el maíz (Kratsch y Wise 2000), muchos de los cuales se llevan a cabo cerca de los límites térmicos de la especie (Nilsen y Orcutt 1996). En general, los

cultivos de origen tropical o subtropical (ej. tomate, maíz, soja) presentan susceptibilidad al estrés por frío, en tanto que otros cultivos como el trigo y la cebada (originarios de climas templados), muestran menor sensibilidad a este tipo de estrés. En general, los daños por bajas temperaturas en estos últimos cultivos suelen ocurrir a umbrales más extremos, usualmente muy por debajo de cero grados (*ca.* $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$; Săulescu y Braun 2001).

1.1.5.2. Efectos de las bajas temperaturas en los vegetales

Al igual que lo mencionado para el estrés hídrico, los efectos de las bajas temperaturas en las plantas incluyen cambios en la bioquímica y biofísica de las membranas, en la síntesis proteica, modificaciones conformacionales en enzimas, en la ultraestructura de mitocondrias y cloroplastos (Kratsch y Wise 2000) y en los metabolismos fotosintético y respiratorio (referencias en Nilsen y Orcutt 1996) además de disminución del crecimiento y alteraciones en el desarrollo (Allen y Ort 2001). Uno de los efectos mejor caracterizados de las bajas temperaturas es la disminución de la fluidez de las membranas. El frío produce la llamada ‘separación de fases’, que si se prolonga en el tiempo, impide a la biomembrana mantener los gradientes iónicos y el metabolismo comienza a sufrir alteraciones. Finalmente, la muerte de la célula puede sobrevenir si el daño se acentúa. En este sentido, ha recibido considerable atención el papel de la insaturación de lípidos de membrana en la tolerancia a bajas temperaturas y de hecho éste ha sido considerado como uno de los factores críticos entre los mecanismos de tolerancia por frío (Nishida y Murata 1996). Aquí se prestará especial interés a los efectos sobre el aparato fotosintético (en particular, la fotoinhibición), tal cual se describe en la sección 1.3.2. (pag. 18).

Es importante destacar que el estrés por bajas temperaturas es un síndrome complejo y difícilmente puede ser separado completamente de otros tipos de estrés. Tal cual fue mencionado anteriormente (sección 1.1.4, pag. 5), es frecuente observar déficit hídrico asociado a las bajas temperaturas. Este fenómeno puede tener diversas causas, entre otras, la disminución de la conductividad hidráulica de las raíces y alteraciones en el grado de control estomático (Allen y Orr 2001) conduciendo a un desbalance entre captación de agua y transpiración. Las plantas sometidas a bajas temperaturas muestran una caída (al menos transitoria) en el potencial hídrico y el *RWC* (ej. Vernieri y col. 2001). De hecho, la respuesta de aclimatación al estrés hídrico asociado a bajas temperaturas está recibiendo considerable atención en la actualidad (ver citas en Vernieri y col. 2001).

El daño inducido por bajas temperaturas varía ampliamente según las especies, tanto en magnitud como en la escala temporal en la que los primeros síntomas aparecen. En algunas especies estos daños pueden aparecer durante el episodio de estrés, en otras, en cambio, en el período posterior de recuperación, en que las plantas son sometidas a temperaturas 'normales' para la especie (Nilsen y Orcutt 1996).

La variabilidad en el grado de daño también puede observarse a nivel celular, donde unos componentes son más dañados que otros. Se ha señalado que los cloroplastos parecen ser las organelas más sensibles a las bajas temperaturas (Nilsen y Orcutt 1996). Como se verá más adelante (sección 1.2.2, pag. 16), tanto los procesos fotosintéticos que ocurren a nivel tilacoidal (transporte de electrones, fotofosforilación) como en el estroma cloroplástico pueden ser alterados por episodios de bajas temperaturas.

1.1.5.3. Cuantificación del estrés por bajas temperaturas

No existe una forma universal de caracterizar el grado de estrés térmico que sufre una planta. Sin embargo, dado que - tal cual hemos mencionado antes- una de las principales dianas del estrés por frío son las membranas biológicas, una forma de cuantificar el grado de daño es la medición de la liberación de iones mediante conductividad eléctrica; (ej. Lee y col. 1997). Otras formas de uso bastante extendido son la estimación de algún indicador de daño (pérdida de clorofila, necrosis, muerte de plantas; ej. Janowiak y Dörffling 1996). En los estudios de fotoinhibición asociada a las bajas temperaturas, actualmente la forma más utilizada para cuantificar el grado de daño en el aparato fotosintético es la medición del rendimiento cuántico máximo del *PSII* (F_v/F_m en hojas aclimatadas a la oscuridad; ver *Anexo, pag. 199*; Tsonev y col. 2003).

1.1.5.4. Tolerancia a las bajas temperaturas

En comparación al estrés por déficit hídrico, los mecanismos de tolerancia al estrés térmico son menos conocidos aunque están recibiendo considerable atención en la actualidad. Diversas respuestas de las plantas han sido vinculadas a una mejor tolerancia al frío. Quizás el rasgo mejor caracterizado es el nivel de insaturación de los lípidos de membrana, ya mencionado anteriormente. La insaturación, entre otras cosas, protege al *PSII* de la fotoinhibición, acelerando el proceso de reemplazo del péptido *DI* a nivel del centro de reacción (Nishida y Murata 1996). Otros mecanismos han sido propuestos como posibles mecanismos de tolerancia, aunque poseen menos apoyo experimental. Entre otros, ha sido propuesto el *ABA* como un regulador que incrementaría la tolerancia al frío (Xin y

Li 1992). Presumiblemente, el *ABA* podría actuar en forma indirecta a través de la mejora del estatus hídrico (Pérez de Juan y col. 1997) o bien mediando otro tipo de respuestas (tal como cambios a nivel de las membranas; Janowiak y Dörffling 1996). También las poliaminas están siendo estudiadas en este sentido, aunque aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual pueden incrementar la tolerancia al frío (por ejemplo Lee y col. 1997). Finalmente debe mencionarse el papel de diversos antioxidantes en la tolerancia al frío, un tema intensamente estudiado en la actualidad (por ejemplo Iannelli y col. 1999; Payton y col. 2001; Kang y Saltveit 2002; ver también secciones 1.4.2 y 1.4.4, pags. 27 y 30).

1.2. Estrés y fotosíntesis

1.2.1. Déficit hídrico y efectos en la fotosíntesis

Es un hecho ampliamente establecido que la tasa fotosintética decrece con progresivas disminuciones del RWC y/o el potencial hídrico. Como fue mencionado anteriormente, el cierre de los estomas inducido por el estrés hídrico –y reflejado como una disminución de la conductancia estomática o g_s - juega un papel central en esta respuesta (ej. Lawlor 2002). Además no debe olvidarse el efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento, el cual conduce a una disminución del área foliar del dosel vegetal (ej. Passioura 1994) y por ende, de la capacidad total de asimilación por parte del cultivo.

1.2.1.1. Limitación estomática *versus* limitaciones metabólicas

Durante muchos años se ha discutido si el cierre estomático (y la disminución consecuente de CO_2 en los espacios intercelulares o C_i) es la única causa de la caída de la tasa fotosintética con el estrés, o bien si las causas pueden ser de tipo metabólico. Es decir, si existen ‘*limitaciones no-estomáticas*’ de la fotosíntesis (Escalona y col. 1999; Flexas y col. 1998; Flexas y col. 2002; ver referencias en Lawlor 2002). Algunos autores intentan explicar las limitaciones metabólicas de la fotosíntesis como una consecuencia indirecta mediada por la disminución de C_i . Por ejemplo, se ha reportado que la disminución del C_i inhibe la actividad de enzimas como la sacarosa-fosfato sintasa, ejerciendo un efecto ‘*feedback*’ sobre la tasa de asimilación (Vassey y col. 1991). Por otra parte, algunos autores han sostenido la existencia de limitantes ‘no-estomáticas’ o metabólicas *per se* (por ejemplo, Tezara y col. 1999). La defensa de ambas posturas (es decir, limitaciones estomáticas *versus* metabólicas) ha sido -y lo es aún hoy- materia de fuerte debate entre los especialistas (por ejemplo Quick y col. 1992; Cornic y Massacci 1996; Cornic 2000; Lawlor 2002; Lawlor y Cornic 2002; Medrano y col. 2002; Tang y col. 2002). La discusión es compleja y escapa a los alcances de este trabajo, pero es probable que muchas de las discrepancias entre estudios se deban a alguna de estas tres causas (Lawlor 2002):

- Cuestiones de tipo metodológico (por ejemplo, interpretación de las curvas A/C_i para evaluar las limitantes estomáticas y no estomáticas)
- Diferencias entre especies en el comportamiento frente al estrés (Quick y col. 1992)
- Diferencias en las condiciones experimentales (intensidad y forma de aplicación del estrés etc.)

Entre las causas asociadas a la posible existencia de limitantes metabólicas de la fotosíntesis con el estrés podemos citar: (a) limitación por actividad de la Rubisco; (b) regeneración de Ribulosa 1,5 bisfosfato (*RuBP*) (c) limitación por la disponibilidad de ATP y NADPH y (d) disminución del transporte electrónico a nivel tilacoidal (Tezara y col. 1999; Lawlor 2002)

1.2.1.2. Limitación por Rubisco

El análisis de curvas A/C_i indica que la actividad de la Rubisco disminuye a medida que cae el *RWC*, y esto ha sido verificado mediante análisis de la actividad *in vitro*. En general, la cantidad de la proteína sufre pocas modificaciones con el estrés, sugiriendo que la disminución de la actividad puede estar asociada a cambios en el nivel de activación de la enzima (Flexas y Medrano 2002; Parry y col. 2002). Aunque existen considerables discrepancias entre diferentes trabajos, especies y metodología utilizada para evaluar la actividad de carboxilación (ver referencias en Lawlor 2002), la disminución de la actividad total de Rubisco a menores *RWC* ha sido claramente demostrada en algunas especies (Parry y col. 2002). Sin embargo, se desconoce en qué medida este fenómeno actúa realmente como limitante de la tasa fotosintética.

Se ha postulado que la disminución de actividad de Rubisco podría estar vinculada a la caída de actividad de la enzima Rubisco-activasa. De hecho, una disminución de la actividad *in vitro* de esta enzima ha sido reportada en plantas sometidas a estrés (Tezara y col. 1999; Chaves y col. 2002; Parry y col. 2002).

1.2.1.3. Limitación por la regeneración de Ribulosa 1,5 bisfosfato y ATP

En este punto también existen discrepancias en la literatura, ya que si bien algunos trabajos sugieren la limitación por Ribulosa 1,5 bisfosfato (*RuBP*), otros estudios no apoyan esta postura (ver referencias en Lawlor 2002). Medrano y Flexas (2001) revisaron el tema exhaustivamente e indican que, comparada con la eficiencia de carboxilación, la regeneración de *RuBP* parece ser más sensible al estrés hídrico. De hecho, análisis directos del contenido de *RuBP* confirman estos hallazgos (Flexas y Medrano 2002).

La reducción del contenido de *RuBP* a bajos *RWC* podría provenir de la limitación de unas o más enzimas del ciclo de Calvin (*PCR*) (Flexas y Medrano 2002). Sin embargo, algunas evidencias disponibles parecen indicar que el ciclo *PCR per se* no es la causa de la caída de la tasa fotosintética a bajos *RWC*, sino más bien la falta de disponibilidad de *ATP*

(Tezara y col. 1999). Otros autores, sin embargo, no apoyan esta hipótesis (Cornic 2000). Mas investigación es necesaria en este campo para dilucidar estas cuestiones.

1.2.1.4. Transporte fotosintético de electrones y estrés: daño *versus* ‘downregulation’

Los procesos fotoquímicos a nivel del fotosistema II (*PSII*) han mostrado ser sensibles al estrés hídrico. Sin embargo, la magnitud y consecuencias de esta sensibilidad son variables según la especie y principalmente, la severidad del estrés (ver referencias en Lu y Zhang 1998; Medrano y col. 2002). Bajo situaciones de estrés hídrico, la capacidad de transporte electrónico puede verse afectada por diversas causas: (a) disminución en el número total de centros del *PSII* en estado funcional y (b) cambios en la eficiencia de los centros funcionales (Flexas y Medrano 2002). La disminución del número de centros funcionales se relaciona a la integridad de la maquinaria fotosintética y podría ser asociada con la llamada ‘*fotoinhibición crónica*’ (Osmond y Grace 1995). Aunque existen pocos estudios del daño directo, diversas evidencias sugieren que la maquinaria implicada en el transporte de electrones es escasamente afectada, al menos a estreses moderados (Cornic y Massacci 1996). En definitiva, se considera que el aparato fotosintético es relativamente resistente a estos niveles de estrés (Cornic y Massacci 1996). Sin embargo, estreses hídricos mas severos, los cuales pueden observarse en condiciones naturales de cultivo (ej. Araus y col. 1998), podrían causar eventuales daños a la maquinaria fotosintética.

Cuando se analiza el transporte lineal (o acíclico) de electrones (estimado por la eficiencia cuántica del *PSII*, Φ_{PSII}), en general se observa una caída con el estrés (Flexas y col. 1998), y en general esta regulación a la baja (‘*downregulation*’) está asociada a un aumento en la tasa de disipación de energía al nivel de la antena del *PSII* (Nogués y Baker 2000; Flexas y col. 2002). En términos generales, la disminución de la tasa del transporte electrónico suele ser de menor magnitud que la caída de la tasa fotosintética (Flexas y col. 1998), lo que sugiere que otros procesos (distintos que la asimilación de CO₂) se convierten en destinos alternativos de electrones. Es decir, la disminución del transporte de electrones con el estrés hídrico moderado no parece estar vinculada a daño, sino que sería un proceso que puede revertirse cuando la situación de estrés es superada (Lawlor 2002). Esta ‘*downregulation*’, es un proceso complejo y aún no esclarecido completamente, aunque se conoce que el gradiente transtilacoidal de pH (ΔpH) tiene un papel crucial, descrito más adelante (ver la sección 1.3.3.1, página 20).

1.2.2. Efectos de las bajas temperaturas sobre la fotosíntesis

El estrés por bajas temperaturas produce efectos a diversos niveles del aparato fotosintético. En primer lugar, promueve el cierre estomático (por ejemplo, Perera y col. 1995), lo cual puede provenir de (a) la existencia de déficit hídrico ya mencionado anteriormente (ver sección 1.1.5.2, página 10), (b) por aumento de C_i debido a la disminución de la tasa de asimilación y (c) por efectos directos de las bajas temperaturas en los estomas (Allen y Ort 2001). Tal como fue mencionado anteriormente, en ocasiones puede resultar dificultoso discriminar los efectos de uno u otro tipo de estrés. Sin embargo, algunos fenómenos observados en las plantas sometidas a frío parecen ser un proceso más bien exclusivo de este tipo de estrés. Un buen ejemplo de esto es la fotoinactivación del fotosistema II (evaluada por una caída del parámetro F_v/F_m , ver mas adelante), fenómeno que en general no se observa en condiciones de estrés hídrico.

Particularmente importante es el estrés por bajas temperaturas en presencia de luz ('*light-chilling*'), situación que se produce, por ejemplo, en mañanas frías y soleadas de regiones de clima templado (Van Breusegem y col. 1999). En plantas sensibles, '*light-chilling*' puede afectar severamente todos los componentes del aparato fotosintético, incluyendo el transporte electrónico tilacooidal, el ciclo reductivo del carbono (PCR) y el control de la conductancia estomática (Allen y Ort 2001). Respecto al transporte electrónico, la combinación de bajas temperaturas y altas irradiancias produce la llamada '*fotoinhibición crónica*' (o mas modernamente, '*fotoinactivación*'), un daño permanente al *PSII* (Osmond y Grace 1995). Las bajas temperaturas reducen las tasas de las reacciones metabólicas y limitan los destinos (en este caso la fijación de CO_2 y la fotorespiración) para la energía de excitación absorbida. Cuando esto sucede, aumenta el potencial de daño al *PSII*, en particular la proteína *D1* del centro de reacción (ver sección 1.3, página 18). Además, en estas condiciones es alterado el normal recambio de esta proteína, proceso probablemente vinculado a cambios en la fluidez de las membranas tal como fue descrito anteriormente. De hecho, diversas evidencias muestran que este parece ser un punto crítico en la tolerancia al frío, en particular el grado de insaturación de los lípidos de membrana (Nishida y Murata 1996).

Además de lo ya descrito en relación al recambio de la proteína *D1*, otras hipótesis han sido propuestas para explicar la fotoinhibición por frío (Hull y col. 1997 y referencias citadas): (a) las bajas temperaturas incrementan la tasa de formación de especies activas del oxígeno o *ROS* (b) se reduce la capacidad de disipar el exceso de energía por el ciclo de las xantofilas [sin embargo, algunos trabajos ponen en duda esta hipótesis; por ejemplo en

Lycopersicon se ha observado aumento de fotoprotección por el ciclo de las xantofilas en plantas sometidas a frío (Venema y col. 1999)], y (c) las bajas temperaturas reducirían la protección ofrecida por antioxidantes. La ocurrencia de estrés oxidativo (y la respuesta antioxidante) asociada a bajas temperaturas ha sido reportada en diversas especies (Fadzillah y col. 1996; Wise 1995; Streb y Feirabend 1999; Kingston-Smith y col. 1999), aunque se desconoce su implicación en la fotoinhibición asociada al frío (ver también sección 1.4.4).

1.3. Fotoinhibición, fotoprotección, y fotoinactivación

1.3.1. Definición de términos

Existe cierta confusión en la bibliografía acerca del real significado del término ‘*fotoinhibición*’. En un sentido general, *fotoinhibición* es simplemente la disminución de la tasa fotosintética que se produce como consecuencia del daño al aparato fotosintético cuando existe excesiva radiación (ej. Greer 1998). Otros autores utilizan el término *fotoinhibición* para la caída de eficiencia máxima del *PSII* (estimado por la disminución de la fluorescencia variable o F_v ; véase *Anexo*, pág. 199) no reversible en oscuridad (ej. van Wijk y van Hasselt 1993). Por otra parte Osmond y col. (1999) definen a la *fotoprotección* como una caída (dependiente de la luz y de carácter en general rápidamente reversible) en la eficiencia en los procesos fotoquímicos, indicada por una disminución en la relación fluorescencia variable / fluorescencia máxima (F_v/F_m), acompañado de una caída de la señal de fluorescencia en la oscuridad F_0 . También aumenta el llamado ‘*quenching* no-fotoquímico’ (qN o NPQ), parámetro que indica la tasa disipación térmica del exceso de energía a nivel del *PSII*. (véase *Anexo*, pag. 199). De esta manera, la *fotoprotección* puede ser capaz de prevenir la *fotoinactivación*, disminuyendo la presión de excitación en el centro de reacción del *PSII*. *Fotoinactivación*, por otra parte, se refiere a un fenómeno dependiente de la luz en los procesos fotoquímicos primarios, que es lentamente reversible, a menudo acompañado por un aumento de F_0 y correlacionado con una disminución en la población de centros de reacción del *PSII* funcionales. El incremento de F_0 evidencia un aumento en la fluorescencia de la antena cuando el centro de reacción es inactivado durante la exposición a excesiva radiación. En resumen, *fotoprotección* involucraría cambios principalmente a nivel de la antena y *fotoinactivación* en el centro de reacción del *PSII*. Aunque se considera que la *fotoprotección* minimiza la *fotoinactivación*, ambos procesos pueden superponerse y a menudo son difíciles de distinguir entre sí (Osmond y col. 1999). Por ejemplo, la persistencia de mecanismos de *fotoprotección* durante la noche (‘*sustained photoprotection*’) puede ser confundido con procesos de *fotoinactivación*, ya que en ambos casos puede verificarse una caída del parámetro F_v/F_m , aunque las causas subyacentes en una y otra situación son diferentes (Osmond y col. 1999).

1.3.2. Naturaleza de la fotoinactivación

Aunque se ha propuesto más de un mecanismo para explicar la *fotoinactivación* (ej. Leitsch y col. 1994), el mejor caracterizado es el daño a nivel de una de las proteínas del centro de reacción del *PSII*. La sobreexcitación del aparato fotosintético en condiciones de

intensa radiación puede conducir a la pérdida de la función del centro de reacción del *PSII*, principalmente de un componente clave, la proteína *DI*. Esta proteína es altamente inestable -de vida media muy corta- siendo sometida a un continuo recambio a través de re-síntesis en los ribosomas cloroplásticos. La pérdida de función de los centros de reacción del *PSII* es un proceso inevitable luego que una cierta cantidad de fotones es absorbida (Anderson y col. 1997). Sin embargo, se desconoce aún el mecanismo molecular del inicio de la fotoinactivación.

Es bien conocido que la pérdida de funcionalidad de los centros de reacción es incrementada cuando la síntesis de proteínas en el cloroplasto se inhibe utilizando lincomicina (Tyystjärvi y col. 1999). Esto pone en evidencia que, en definitiva, el grado de fotoinactivación refleja un balance entre daño y reparación (ej. Andersson y Barber 1996).

Uno de los aspectos peor conocidos en relación a la fotoinactivación es la real implicancia de las *ROS*. En este sentido existen evidencias contradictorias. Algunos trabajos muestran evidencias de la participación de *ROS*, en particular del oxígeno singulete. Recientemente se ha reportado que la sobre-expresión de algunas enzimas antioxidantes (ej. *ascorbato peroxidasa*) mejora la tolerancia al frío (Payton y col. 2001). Por otra parte, la aplicación de un pretratamiento con H_2O_2 aumenta la capacidad antioxidante (principalmente glutatión) y la supervivencia de plantas de algunas especies sometidas a bajas temperaturas (ej. Yu y col. 2002). Sin embargo se desconoce si este efecto es mediado a través de la supresión de la fotoinhibición. Además hay trabajos que ponen en duda la participación de *ROS* en la fotoinactivación (referencias en Tyystjärvi 2004). Tal cual señala este autor, la fotoinhibición del *PSII* ocurre rápidamente en condiciones de anaerobiosis, sugiriendo que las *ROS* tendrían un rol marginal en este proceso. En resumen, la vinculación entre *ROS* y la fotoinactivación no ha sido aún claramente establecida y mas investigación es requerida en este sentido.

Finalmente, debe subrayarse que algunos autores consideran que la fotoinactivación no es un proceso deletéreo *per se*. Mas aún, puede representar una estrategia fotoprotectiva de aclimatación en situaciones de estrés (Anderson y col. 1997). De esta manera, el recambio de la proteína *DI* funcionaría como un 'fusible', evitando que el daño se extienda a todo el aparato fotosintético. Es decir, la inactivación de esta parte del transporte electrónico actúa como una válvula de seguridad para la totalidad de la cadena transportadora de electrones (Nilsen y Orcutt 1996).

1.3.3. Mecanismos de fotoprotección en situaciones de estrés

Entre los mecanismos que protegen a la planta contra el exceso de luz, pueden distinguirse los siguientes (Demmig-Adams y Adams 1992): (i) aquellos que **previenen** la absorción de luz excesiva (ii) aquellos que **disipan** el exceso de energía absorbida y (iii) finalmente, mecanismos que **eliminan** las especies tóxicas formadas por el exceso de energía.

Entre los procesos que previenen la absorción excesiva de luz, son ampliamente conocidos los movimientos foliares paraheliotrópicos (Cornic y Massacci 1996) y el desarrollo de estructuras reflectantes en la epidermis (pubescencia, ceras, sales; Lambers y col. 1998). Otra típica respuesta fotoprotectiva son los movimientos fototáxicos de los cloroplastos, los cuales se ubican en forma paralela a los rayos solares cuando la irradiancia es alta, protegiendo al *PSII* de la fotoinactivación (Park y col. 1996). También podría tener cierta importancia la existencia de compuestos ‘pantalla’(ej. antocianos) que reducen la cantidad de luz absorbida por la clorofila, pero su rol fotoprotector no ha sido dilucidado aún (Dodd y col. 1998 y citas en este trabajo). Finalmente, están los sistemas que disipan el exceso de energía (ver secciones siguientes) y los que eliminan las especies tóxicas (sistemas ‘antioxidantes’) lo cual será desarrollado extensamente en secciones subsiguientes.

1.3.3.1. Ciclo de las xantofilas. Vinculación mecánica con el *NPQ*

El proceso de disipación térmica (no-radiativa) mejor caracterizado involucra al llamado ‘*ciclo de las xantofilas*’. Básicamente, es la interconversión dependiente de la luz de tres xantofilas (carotenoides oxigenados): **violaxantina**, **anteraxantina** y **zeaxantina**. Es una reacción cíclica involucrando una secuencia de de-epoxidación del di-epóxido violaxantina vía el mono-epóxido anteraxantina para formar la zeaxantina (sin grupos epóxidos). La reacción es revertida por una secuencia de epoxidación (Demmig-Adams y Adams 1992). Estas reacciones son catalizadas por dos enzimas tilacoidales denominadas violaxantina de-epoxidasa (*VDE*) y zeaxantina-epoxidasa respectivamente. El ciclo está regulado por la luz, ya que la violaxantina se de-epoxida a anteraxantina y zeaxantina a altos *PPFD* (o en situaciones de disminución de la fotosíntesis producida por estrés). En oscuridad (o cuando el factor de estrés es removido), la zeaxantina es epoxidada nuevamente a violaxantina.

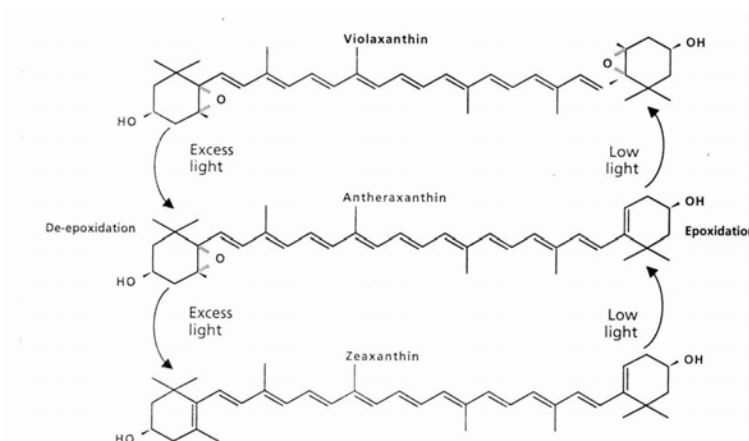


Figura 1. Estructuras moleculares de la violaxantina, anteraxantina y zeaxantina y su interconversión en el ciclo de las xantofilas. La conversión de violaxantina a zeaxantina es catalizada por la violaxantina de-epoxidasa en presencia de luz y/o estreses ambientales. La zeaxantina se reconvierte a violaxantina en la oscuridad mediante la catálisis de la zeaxantina epoxidasa (aunque en ocasiones puede permanecer como zeaxantina en la oscuridad, en particular en casos de estreses ambientales). (extraído de Lambers y col. 1998)

Aunque los aspectos mecanísticos del ciclo y su vinculación con la disipación de energía no han sido dilucidados (Gilmore 1997; Ort 2001), está claro que el proceso es regulado por el gradiente transtilacoidal de pH (ΔpH). Un bajo pH en el lumen tilacoidal (por ejemplo, en situaciones de exceso de irradiancia) promueve la de-epoxidación de la violaxantina a zeaxantina (Gilmore 1997). Otro aspecto bien conocido es que la reacción catalizada por la *VDE* requiere ácido ascórbico como co-substrato (Müller y col. 2001). La presencia del ácido ascórbico es crítica, ya que mutantes de *Arabidopsis* deficientes en este compuesto presentan una menor actividad de-epoxidasa, menores niveles de zeaxantina y, consecuentemente, menor *NPQ* (Müller-Moulé y col. 2002).

En general existe una estrecha correlación positiva entre los niveles de zeaxantina (y anteraxantina) y el índice *NPQ* (Gilmore y Yamamoto 1991; Gilmore y Yamamoto 1993; Munné-Bosch y Alegre 2000a), pero en algunos casos la relación es algo más débil (por ejemplo, Fleck y col. 1998). Aunque la correlación no indica *a priori* una relación causa-efecto entre ambos procesos, la vinculación mecanística entre la presencia de zeaxantina y el *NPQ* ha sido bien documentada mediante diversas aproximaciones: (a) el ditiotreitol inhibe simultáneamente la de-epoxidación de la violaxantina y al *NPQ* (Gilmore y Yamamoto 1991) (b) mutantes de *Arabidopsis* con actividad reducida de *VDE*, muestran reducidos niveles de *NPQ* (Niyogi y col. 1998); similares resultados se han obtenido en mutantes de *Chlamydomonas* (Niyogi 1999). Sin embargo, es claro que la

presencia de zeaxantina es condición necesaria aunque no suficiente para el desarrollo del *NPQ in vivo* (en particular el componente llamado *qE* o *quenching* dependiente de energía) (Peterson y Havir 2000; ver referencias en Müller y col. 2001). En mutantes de *Arabidopsis* que acumulan altos niveles constitutivos de zeaxantina, el *NPQ* es sólo inducido por un bajo pH en el lumen tilacoidal (Niyogi y col. 1998; Niyogi 1999), es decir, la membrana tilacoidal debe estar en una forma ‘energizada’ (Demmig-Adams y Adams 1992; Gilmore 1997). Aún no se ha aclarado el papel de la anteraxantina en el proceso de disipación térmica, aunque algunos estudios sugieren un papel en el *NPQ* para esta xantofila (Goss y col. 1998). Según algunos autores, la anteraxantina contribuye al ‘*quenching no fotoquímico*’ y podría ser la responsable del *NPQ* independiente de zeaxantina (Gilmore y Yamamoto 1993). Esto ha conducido a expresar el estado de epoxidación (*DPS*) como la cantidad de zeaxantina sumada a la de anteraxantina, referida a la suma de las tres xantofilas del ciclo [(es decir, $DPS = (Z + A) / (V + A + Z)$] (Gilmore y col. 1998). Por otra parte, es incierto el papel de la luteína (una xantofila muy abundante en los tilacoides) en el proceso de disipación térmica, aunque algunas evidencias sugieren que este carotenoide podría explicar al menos parte del *NPQ* (Niyogi 1999; Müller y col. 2001). Finalmente, debe mencionarse que algunos autores consideran a la zeaxantina como un modulador alostérico que propicia los cambios conformacionales vinculados a la disipación de calor, pero que no es el ‘*quencher per se*’ (Horton y col. 1996).

1.3.3.1.1. Cambios espectrales asociados al *NPQ*

Cuando una hoja es iluminada, uno de los procesos asociados a la aparición del *NPQ* es el llamado ‘*green-shift*’ o cambio de absorbancia en el verde ($\lambda \cong 500$ nm). La disminución de la absorbancia en esta zona del espectro posee en realidad dos componentes: (a) un cambio de absorbancia centrado en 505 nm, el cual está asociado a la aparición de zeaxantina y (b) una disminución de la absorbancia a 535 nm, fenómeno atribuido a cambios conformacionales que ocurren luego de la protonación del complejo recolector de luz (*LHC*) en presencia de zeaxantina (Bilger y Björkman 1990). Desde hace tiempo se conocía que el ‘*green shift*’ era inhibido (en paralelo a la de-epoxidación de la zeaxantina y a la aparición del *NPQ*) por el *DTT*, sugiriendo que estos tres procesos formarían parte de un mismo mecanismo (Gilmore 1997). De hecho, esto ha sido confirmado con la utilización del mutante *npq1* de *Arabidopsis*. En este mutante, que no posee actividad de *VDE* (y por lo tanto no es capaz de sintetizar zeaxantina), se observa un nivel muy bajo de *NPQ* y carece de los cambios de absorbancia en la zona verde del

espectro (Niyogi y col. 1998). Como se verá en el Capítulo 4, estos cambios de absorbancia pueden ser utilizados para analizar en forma no destructiva el estado del ciclo de las xantofilas, a través de mediciones espectralradiométricas de la luz transmitida o reflejada por la hoja.

1.3.3.1.2. Papel protector de las xantofilas

El ciclo de las xantofilas está ampliamente extendido en vegetales superiores, algas verdes (*Chlorophyta*) y pardas (*Phaeophyta*). Además, algunos organismos presentan interconversiones entre otras xantofilas que putativamente podrían tener función similar⁵. El papel protector del ciclo de la xantofilas ha sido puesto de manifiesto mediante el uso de diversos mutantes de *Arabidopsis*. Según Müller y col. (2001) mutantes deficientes en la función normal del ciclo presentan mayor susceptibilidad a la fotoinhibición, fotooxidación y a la senescencia prematura a altas irradiancias. Sin embargo, el sistema fotoprotector parece ser redundante, existiendo mecanismos alternativos que compensan la deficiencia de algún componente. Por ejemplo, el crecimiento del mutante de *Arabidopsis npq1* (que carece de zeaxantina) es similar al genotipo silvestre en presencia de altas irradiancias (Niyogi 1999).

Finalmente, debe mencionarse que existen crecientes evidencias de otras funciones protectoras para la zeaxantina, tales como eliminación directa de especies activas del oxígeno, en particular oxígeno singulete. Sin embargo, existen escasos estudios al respecto (citas en Sarry y col. 1994; Havaux y col. 2000).

1.3.3.2. Destinos alternativos de electrones

Aunque el transporte fotosintético de electrones puede sufrir una ‘regulación a la baja’ (*downregulation*) en condiciones de estrés, comúnmente ésta suele ser de menor magnitud que la caída de la tasa fotosintética. Como consecuencia de la reducción del consumo de *ATP* y *NADPH* por la asimilación de CO_2 , el poder reductor (electrones) generado en el transporte de electrones debe ser consumido en otros procesos. Estos ‘sumideros’ que funcionan como destinos alternativos de electrones son fundamentalmente: (a) la fotorespiración y (b) la reducción univalente del oxígeno a nivel del fotosistema I (‘reacción de Mehler’) (Foyer y col. 1994).

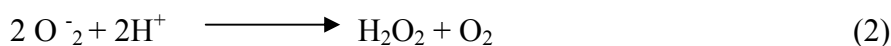
⁵ Las diatomeas y otras algas eucarióticas presentan el ‘ciclo de la diadinoxantina’ (interconversión entre el mono-epóxido diadinoxantina y la diatoxantina). En la angiosperma parásita *Cuscuta reflexa* se ha propuesto el ciclo de la 5,6 epoxi-luteína, que se interconvierte con la luteína (ver referencias en Müller y col. 2001).

1.3.3.2.1. Fotorrespiración

La fotorrespiración es la reducción del O₂ mediada por la reacción oxigenasa de la Rubisco (en plantas C₃) y las reacciones subsiguientes de la ruta del glicolato. En principio, la fotorrespiración es un proceso inherente a las propiedades de la Rubisco y mucho se ha debatido acerca del supuesto rol protector de este proceso en plantas sometidas a estrés (Flexas y Medrano 2002; Noctor y col. 2002). Diversos estudios muestran un aumento de la fotorrespiración en situaciones de estrés hídrico (Wingler y col. 1999) aunque es incierto el grado de protección que ejerce el proceso. Aunque algunos estudios reportan un efecto protector de la fotorrespiración (Kozaki y Takeba 1996; Park y col. 1996), otros trabajos sugieren evidencias en contra (ej. Nogués y Alegre 2002). Se ha sugerido que el consumo de electrones por la fotorrespiración puede tener importancia como fotoprotector en situaciones de *PPFD* moderados. A altas irradiancias; sin embargo, el proceso parece ser insuficiente para proteger del daño al aparato fotosintético (Flexas y Medrano 2002). Otros mecanismos (tal como el ciclo de las xantofilas) han sido señalados como más relevantes en la protección del aparato fotosintético frente al fotodaño inducido por estrés hídrico (Brestic y col. 1995). Aunque es evidente que en situaciones de estrés la fotorrespiración se incrementa en términos relativos respecto a la asimilación de CO₂, es menos claro si la vía fotorrespiratoria aumenta también en términos absolutos (Noctor y col. 2002).

1.3.3.2.2. Reacción de Mehler y procesos relacionados

Se conoce como ‘Reacción de Mehler’ a la reducción univalente del oxígeno a nivel del fotosistema I, donde la ferredoxina (*Fd*) transfiere un electrón a la molécula de oxígeno, produciendo el *radical superóxido* (O₂⁻) que luego dismuta a *peróxido de hidrógeno* (Foyer y col. 1994):



La dismutación del superóxido (reacción 2) puede ocurrir espontáneamente, pero en la célula la velocidad de la reacción es sensiblemente aumentada por la enzima *superóxido dismutasa* (*SOD*). Aunque existen otros sitios de producción de anión superóxido (por ejemplo, Ananyev y col. 1994), la reacción de Mehler (‘*flujo pseudocíclico de electrones*’) parece ser el más importante (Foyer y col. 1994). Este flujo de electrones al oxígeno puede

aumentar en condiciones de estrés, pero ocurre aún bajo condiciones óptimas para la fotosíntesis (Foyer y col. 1994).

El peróxido de hidrógeno formado en la reacción (2) es removido por la **ascorbato peroxidasa** (*APX*), en una reacción que utiliza ácido ascórbico como sustrato. La reacción produce el monodehidroascorbato (una forma oxidada del ácido ascórbico) y agua. Los electrones que siguen la vía de la reacción de Mehler (que provienen en definitiva de la foto-oxidación del agua en el *PSII*) finalmente reducen al oxígeno molecular para producir agua. Por esta razón, esta secuencia de reacciones ha sido denominada ‘*ciclo agua-agua*’ (Asada 1999; Mittler 2002). Además de la eliminación de especies tóxicas (tales como el superóxido y el peróxido de hidrógeno), el ciclo permite mantener un alto ΔpH y por consiguiente, propicia la ‘*downregulation*’ del *PSII*. El ciclo y sus procesos relacionados, por lo tanto, tendrían un papel protector para el aparato fotosintético (Mittler 2002), aunque es incierta la capacidad real de esta vía para sostener el transporte electrónico (citado en Niyogi 1999). Algunas evidencias sugieren escasa importancia de este proceso respecto de otros mecanismos protectivos (Clarke y Johnson 2001).

1.4. Estrés oxidativo y antioxidantes en vegetales

1.4.1. Especies reactivas del oxígeno (ROS)

El oxígeno molecular en estado basal es relativamente poco reactivo (Foyer y col. 1994). Sin embargo, existen formas ‘activadas’ conocidas como ‘especies reactivas del oxígeno’ (ROS). Son especies químicas altamente oxidantes que -dependiendo de la especie de ROS que se trate- pueden dañar diversos componentes celulares tales como lípidos (Moran y col. 1994) y proteínas (Roberts y col. 1991; Berlett y Stadtman 1997). Dentro del grupo de las ROS podemos encontrar **radicales libres** (especies químicas con uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos), tales como los ya nombrados **anión superóxido** (O_2^-) y el **radical hidroxilo** (HO^-). Por otro lado, entre las formas **no-radicales** encontramos el **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2) y el **oxígeno singulete** (1O_2). Las ROS son producidas en diversos lugares de la célula; algunos de los sitios de producción de ROS y los componentes del sistema antioxidante de la célula son resumidos en la Tabla I.

Tabla I. Principales sitios de producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y los respectivos mecanismos de detoxificación (‘scavengers’).

ROS		Sitio primario de producción	‘Scavengers’
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Peroxisomas (fotorespiración)	Catalasa
		Diversos compartimentos celulares (clp, mit, cit.)	APX, glutatión
Anión radical superóxido	O_2^-	Diversos compartimentos celulares (clp, mit, cit.)	SOD, ac. ascórbico, glutatión.
Oxígeno singulete	O_2^1	Tilacoides	α -tocoferol, carotenoides
Radical hidroxilo	HO^-	Diversos sitios (ej. ‘reacción de Haber-Weiss’ en cloroplastos)	ac. ascórbico

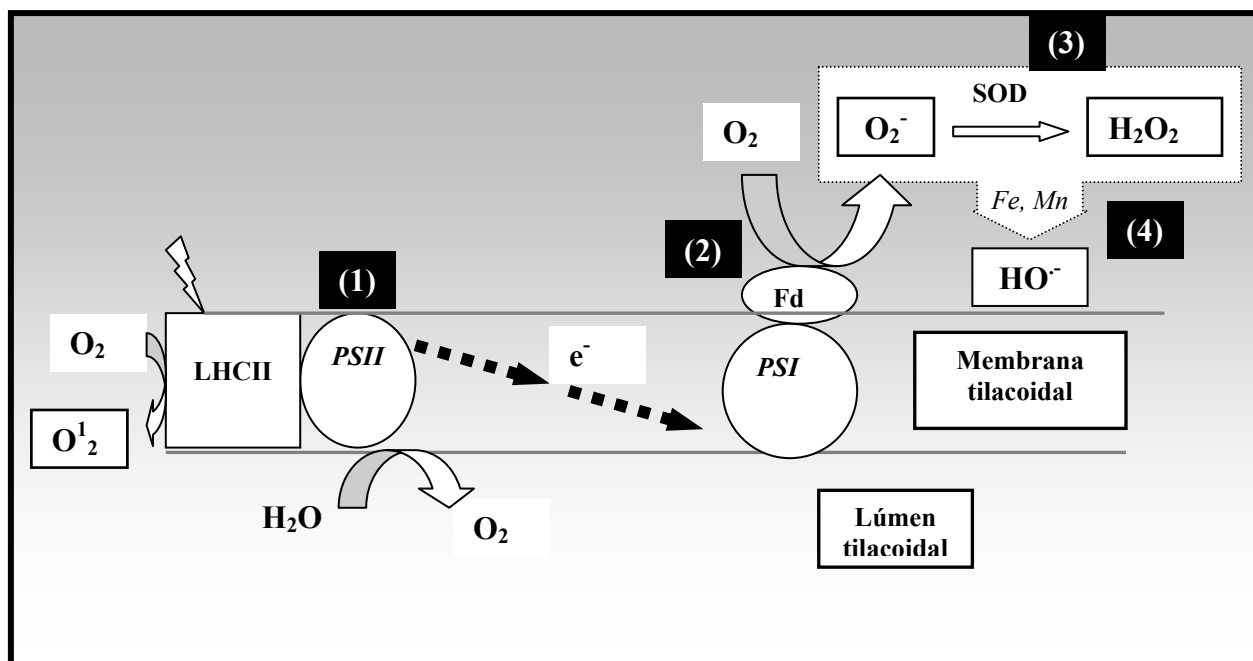


Figura 2. Algunos sitios de producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) a nivel del cloroplasto. (1) Formación de oxígeno singulete al nivel de la antena del PSII (LHCII); (2) formación de radical superóxido a nivel del FSI (reacción de Mehler o ‘transporte pseudocíclico de electrones’); (3) dismutación del anión superóxido (reacción catalizada por la superóxido dismutasa (SOD)); (4) formación de radical hidroxilo a partir de superóxido y peróxido de hidrógeno (‘reacción de Haber-Weiss’). El diagrama es un esquema simplificado. Por razones de espacio sólo se han incluido algunos elementos más destacables y no se ha respetado la estequiometría de las reacciones involucradas.

1.4.2. Sistemas antioxidantes en las células vegetales

Las ROS producidas en las células son eliminadas por diversos **antioxidantes**⁶. Convencionalmente, éstos han sido clasificados como **enzimáticos** y **no enzimáticos**, aunque en muchos casos ambos tipos de antioxidantes funcionan en forma coordinada (por ejemplo Foyer 1994).

Antioxidantes enzimáticos: en este grupo se encuentran diversas enzimas (ver tabla en página anterior) tales como la **catalasa** (ej. elimina H₂O₂ en los peroxisomas), **superóxido dismutasa** (SOD, elimina el anión-radical superóxido), **ascorbato peroxidasa** (APX, elimina H₂O₂ en diversos compartimentos) y glutatión reductasa (regeneración del glutatión).

⁶ El término ‘antioxidante’, aunque universalmente utilizado, no está exento de ambigüedad. La cualidad de pro-oxidante o antioxidante no es una propiedad intrínseca de cada compuesto, sino que depende de los potenciales redox de las especies químicas involucradas. El ácido ascórbico, por ejemplo, puede comportarse también como pro-oxidante en presencia de altas concentraciones de hierro (Buettner y Jurkiewicz 1996).

Antioxidantes no enzimáticos. En este grupo pueden distinguirse los antioxidantes **hidrosolubles** y los **liposolubles**. Entre los primeros (importantes en el citoplasma, estroma cloroplástico etc.) destacan el **ácido ascórbico** y el **glutati6n** (Foyer y col. 1994). Entre los antioxidantes liposolubles (presentes en membranas) se encuentran los **carotenoides** (carotenos y xantofilas; Young 1991) y el α -tocoferol (Munné-Bosch y Alegre 2002).

Existe adem6s gran cantidad de mol6culas antioxidantes putativos (flavonoides, diterpenos), cuyo papel est6 siendo estudiado actualmente (ej. Munné-Bosch y Alegre 2000c).

1.4.3. Acido asc6rbico y su papel en los mecanismos protectivos.

El 6cido asc6rbico es una mol6cula que posee un papel central en el sistema antioxidante e, indirectamente, en la fotoprotecci6n de la c6lula (Smirnoff 2000). Adem6s de su posible papel en la expansi6n celular, entre sus funciones m6s relevantes se pueden citar: (a) eliminaci6n directa no-enzim6tica del $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ y 1O_2 (Buettner y Jurkiewicz 1996; Smirnoff 2000) (b) eliminaci6n del H_2O_2 en la reacci6n catalizada por la ascorbato peroxidasa (Smirnoff 2000) (c) activaci6n de la VDE en el ciclo de las xantofilas (por ejemplo, Ivanov y Edwards 2000) y (d) regeneraci6n del α -tocoferol (Munné-Bosch y Alegre 2002).

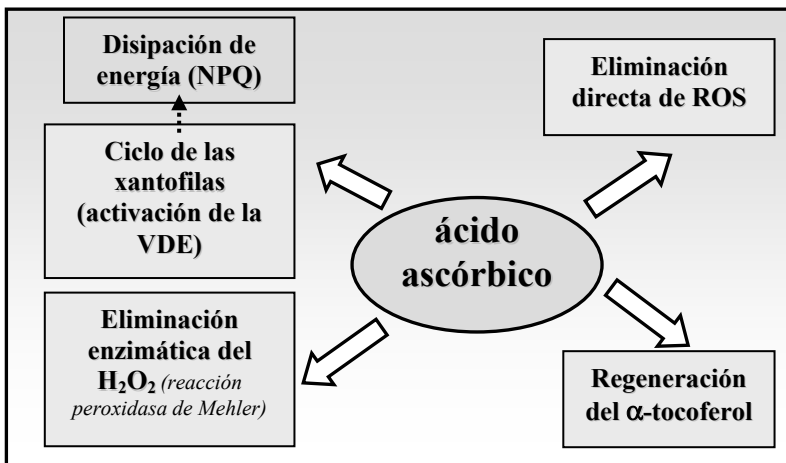


Figura 3. Algunas funciones antioxidantes y fotoprotectoras del 6cido asc6rbico. NPQ, 'quenching no fotoqu6mico'; ROS, reactive oxygen species; VDE, violaxantina de-epoxidasa

El 6cido asc6rbico es una mol6cula muy abundante en los tejidos vegetales, pudiendo hallarse en concentraciones milimolares en cloroplastos y otros compartimentos celulares (Smirnoff 2000; Mittler 2002). En definitiva, el 6cido asc6rbico se encuentra en la base de muchos procesos fotoprotectivos y de eliminaci6n de ROS (Figura 3). En relaci6n a su papel antioxidante, debe destacarse la relativamente alta estabilidad del producto primario de su oxidaci6n, el monodehidroascorbato (Smirnoff 2000).

En resumen, es importante estudiar la implicancia de este antioxidante en la protección del aparato fotosintético, el cual puede ser sujeto a daño oxidativo en situaciones que aumenten la producción de *ROS*.

1.4.4. Estrés abióticos y daño oxidativo en plantas

Diversos factores pueden conducir a un desajuste entre la formación de *ROS* y su eliminación (desajuste entre especies químicas pro y antioxidantes), fenómeno conocido como ‘*estrés oxidativo*’. Diversos factores ambientales han sido vinculados a la existencia de estrés oxidativo en plantas, tales como el déficit hídrico (Moran y col. 1994; Menconi y col. 1995; Sgherri y col. 1996; Bartoli y col. 1999; Chool Boo y Jung 1999; Munné-Bosch y Alegre 2000*b,c*) y las bajas temperaturas (Prasad y col. 1994; Wise 1995; Prasad 1996; Lee y Lee 2000; Yu y col. 2002). Estos estreses promueven la disminución en la utilización de poder reductor a nivel del aparato fotosintético, debido a una baja en la disponibilidad de CO₂ (cierre estomático inducido por estrés hídrico) o por una caída en la actividad de los procesos metabólicos y daño a membranas (ej. bajas temperaturas). Como consecuencia, se intensifica la cesión de energía de excitación (o de electrones) al oxígeno molecular. La reacción de Mehler (producción de anión superóxido a nivel del *PSI*) y la formación de oxígeno singulete pueden verse aumentadas bajo estrés hídrico (Smirnoff 1993) y térmico (Wise 1995). Adicionalmente, el estrés hídrico puede incrementar los niveles celulares de metales de transición (en particular Fe), los cuales actúan como catalizadores en la producción de radical hidroxilo a través de la mencionada reacción de Haber-Weiss (Iturbe-Ormaetxe y col. 1998). Esto exacerbaría el daño oxidativo asociado a este tipo de estrés.

En definitiva, estreses abióticos como el déficit hídrico y las bajas temperaturas producirían una situación de daño oxidativo si la capacidad antioxidante es superada por la generación de *ROS*. Sin embargo, tanto la producción de *ROS* como la respuesta antioxidante es variable de acuerdo a la especie y la severidad del estrés (por ejemplo Smirnoff 1996; citas en Iturbe-Ormaetxe et al. 1998).

Las *ROS* producen diversos daños a los componentes celulares tales como la peroxidación de lípidos (Munné-Bosch y Alegre 2002), la oxidación de proteínas (Berlett y Stadtman 1997) y daños al propio ADN (ej. Veselova y col. 2001). Las proteínas pueden sufrir diversos tipos de daño oxidativo, entre los que se destacan la aparición de grupos carbonilos (‘*carbonilación*’) (Levine y col. 1994). El daño oxidativo a estas macromoléculas puede conducir a una pérdida (o disminución) de su función. Finalmente, el crecimiento y (virtualmente) el rendimiento agronómico, podrían verse afectados si el daño no es reparado.

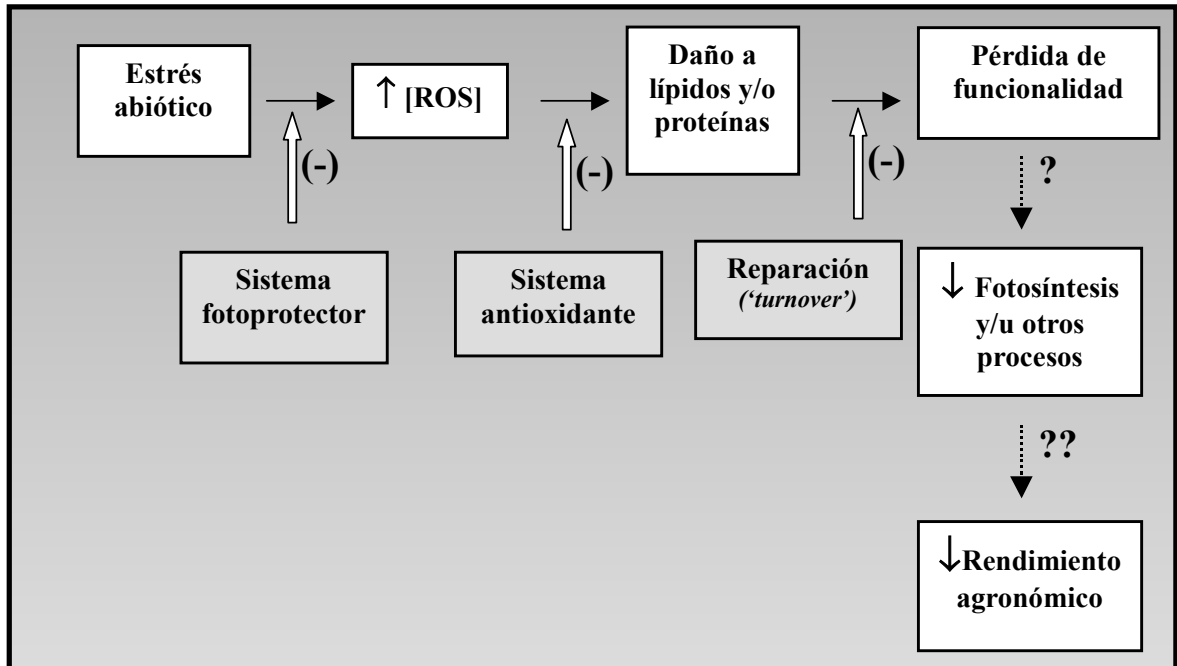


Figura 4. Estrés abiótico, daño oxidativo y posibles impactos en las plantas

En condiciones de estrés hídrico la magnitud del estrés oxidativo y el daño a las estructuras celulares está directamente relacionado con el grado de afectación de la actividad fotosintética (Smirnov 1996). Tal como hemos señalado anteriormente, la disminución de la fotosíntesis depende de numerosos factores tales como la especie, el grado de estrés (en magnitud y velocidad) y la irradiancia recibida durante el episodio de estrés

La respuesta antioxidante ante situaciones de estrés ha sido relativamente bien estudiada (por ejemplo, Menconi y col. 1995; Sgherri y Navari-Izzo 1995; Bartoli y col. 1999; Munné-Bosch y Alegre 2000c; Sgherri y col. 2000); sin embargo, el grado de daño oxidativo a componentes del aparato fotosintético ha recibido menor atención. Debe destacarse el hecho que, dada la dificultad en conocer los niveles estacionarios de la totalidad de las ROS y de los antioxidantes involucrados en un sistema biológico, la medición de parámetros de daño oxidativo (tal como presencia de grupos carbonilos en proteínas o peroxidación de lípidos) resulta fundamental para poder estimar si existe realmente o no estrés oxidativo. Por otra parte, el daño oxidativo a componentes del cloroplasto podría explicar (o al menos contribuir) a la aparición de limitantes no-estomáticas de la fotosíntesis, tal como fue explicado anteriormente. Finalmente, el estudio del grado de impacto del deterioro al aparato fotosintético (y su prevención por mecanismos de protección) en situaciones de estrés puede ser relevante a la hora de diseñar posibles dianas mediante técnicas biomoleculares.

1.5. Estrés hídrico y productividad de cultivos

1.5.1. Concepto de tolerancia al estrés en un contexto agronómico

En un marco fisiológico, a menudo la tolerancia a estreses abióticos como la sequía está asociada a la supervivencia de la planta. Sin embargo, desde un punto de vista agronómico, la tolerancia se entiende mas bien en términos del rendimiento (magnitud y estabilidad) de un cultivo en condiciones limitantes de disponibilidad hídrica (Passioura 1997). La distinción entre ambos conceptos no es sólo semántica. ‘*Tolerancia fisiológica*’ y ‘*tolerancia agronómica*’ pueden ser conceptos, incluso, contrarios. Los intentos de conferir tolerancia a los cultivos frente a factores de estrés están fuertemente influenciados por esta confusión conceptual: un determinado carácter que puede ser adaptativamente importante en términos de tolerancia fisiológica, puede ser negativo en un sentido agronómico. Por ejemplo, la selección de variedades que posean mayor eficiencia del uso del agua (*WUE*, es decir, la razón entre biomasa producida y el agua evapotranspirada), puede ser beneficiosa si consideramos la supervivencia de la planta en condiciones muy limitantes de disponibilidad hídrica. Sin embargo, si la mayor *WUE* viene acompañada de una disminución sustancial del total de agua utilizada, probablemente esto tendrá un efecto negativo en términos de acumulación de biomasa y rendimiento agronómico. En otras palabras, desde una perspectiva ecofisiológica, aquellas respuestas adaptativas que confieren a las plantas capacidad para tolerar la sequía (es decir, sobrevivir en condiciones de estrés severo), tendrán posiblemente un efecto negativo en términos de rendimiento. Por el contrario, se considera que aquellos caracteres que otorgan a la planta la capacidad de evitar el estrés hídrico (por ejemplo, mayor capacidad de absorción de agua), virtualmente no tendrán ‘penalizaciones’ en términos de rendimiento potencial (Araus y col. 2002a). Es decir, en términos agronómicos podrían ser más relevantes los mecanismos de escape/evitación que los de tolerancia propiamente dichos.

1.5.2. Tolerancia al estrés *versus* rendimiento potencial

Cuando se representa en un eje de coordenadas el rendimiento de diversos genotipos en varias sitios geográficos (o en un mismo sitio, bajo condiciones de cultivo diferentes, como por ejemplo variando el aporte hídrico), en función del rendimiento agronómico promedio de cada una de esas localidades (entendido éste como un índice ambiental del grado de limitación hídrica), se obtiene una recta que nos indica cómo se comporta cada genotipo ante situaciones mas o menos estresantes (menores o mayores rendimientos promedio respectivamente; Finley y Wilkinson 1963). Cuando se incluyen

diversos genotipos en este tipo de análisis, es frecuente observar que las variedades que poseen mayor rendimiento potencial (es decir, en condiciones de escasa limitación hídrica), poseen comparativamente menores rendimientos en situaciones de estrés severo (es decir, localidades con bajos rendimientos promedio). En el ejemplo de la Figura 5 se utiliza este enfoque para evaluar el comportamiento de dos cultivares hipotéticos.

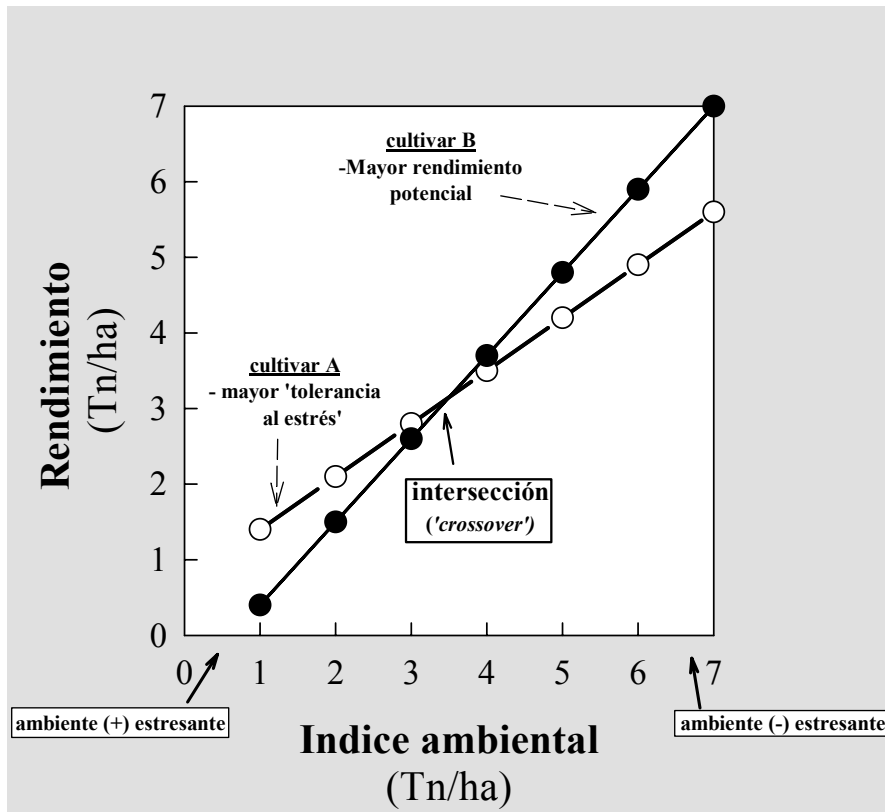


Figura 5. Tolerancia al estrés y rendimiento potencial en cultivos, analizado según el modelo de Finley y Wilkinson (1963). Aquí se contrastan el rendimiento agronómico de dos variedades hipotéticas, versus el rendimiento promedio (Índice ambiental) en diversas localidades y condiciones.

Como puede observarse, para un determinado índice ambiental, las rectas se cortan, invirtiéndose hacia ambos lados el comportamiento de las variedades. Esta intersección de las rectas (*'crossover'*) es producto de la interacción genotipo-ambiente ($G \times E$). Representa que aquellos cultivares mejor adaptados a condiciones de estrés hídrico severo poseen limitaciones en el rendimiento en condiciones hídricas no limitantes (o sea, próximo a su rendimiento potencial). La existencia de este *'crossover'* plantearía la posible disyuntiva entre el rendimiento potencial por un lado y la tolerancia al estrés por el otro. Según este enfoque, ambas alternativas podrían ser excluyentes. Es decir, aquellos cultivares seleccionados por altos rendimientos en condiciones hídricas óptimas, probablemente tendrán un comportamiento agronómico comparativamente peor en condiciones de estrés (y *viceversa*). Esto ha sido un tema de debate y la discusión aún permanece abierta (Blum 1996a; Araus y col. 2002a; Richards 2000; Richards y col. 2002).

Un ejemplo clásico de ‘*crossover*’ - que en general se produce a bajos rendimientos promedio, es decir, en condiciones de estrés severo- puede observarse en las variedades enanas de trigo. Estos cultivares, cuyo rendimiento potencial es alto, poseen un sistema radicular menos desarrollado, lo que les confiere mayor susceptibilidad a condiciones de sequía (Ali Dib y col. 1990). Sin embargo, esta relación inversa entre rendimiento potencial *versus* tolerancia no parece ser universal, por lo que aún es materia de debate si mayor tolerancia agronómica al estrés y mayor rendimiento potencial son rasgos necesariamente excluyentes o no (Blum 1996a; Richards y col. 2001). También es posible que el *crossover* ocurra a menudos a rendimientos muy bajos, lo que lo convierte en irrelevante desde el punto de vista agronómico.

1.5.3. Rasgos fisiológicos asociados a la productividad en condiciones de agua limitante

Desde una perspectiva de la mejora analítica (es decir, la selección de variedades a partir de una base mecanística), diversos rasgos han sido asociados a un mejor funcionamiento del cultivo en condiciones de estrés hídrico. En el campo de la fisiología, estos pueden reunirse en dos grandes grupos: (a) aquellos con relación al uso del agua y (b) aquellos en relación con la eficiencia del uso de la radiación.

1.5.3.1. Aspectos fisiológicos del uso del agua en cultivos

Según el clásico modelo de Passioura (1994), el rendimiento (‘*grain yield*’ o *GY*) en condiciones de limitación hídrica estaría determinado por

$$GY = W * WUE * HI$$

donde *W* es la cantidad de agua utilizada por el cultivo más la evaporada directamente por el suelo, *WUE* es la eficiencia integrada del uso del agua (o capacidad de producción de biomasa por unidad de agua evapotranspirada) y *HI* es el índice de cosecha. Si asumimos la ausencia de cambio en el *HI*, un mayor rendimiento en condiciones de estrés hídrico podría provenir tanto del aumento de *W* como de *WUE*. Sin embargo, como señalan Araus y col. (2002a), los términos de esta ecuación no son independientes. Tal como fue descrito anteriormente, el aumento de *WUE* puede provenir de una disminución paralela del total de agua evapotranspirada por el cultivo (*W*), por lo que el rendimiento puede verse inalterado

o aún perjudicado. Por otra parte, un aumento del uso total de agua por el cultivo puede conducir a aumentos en el rendimiento, a pesar de la concomitante disminución de *WUE*. Sin embargo, en ambientes hídricamente muy pobres, una mayor *WUE* podría ser una estrategia conveniente. Por ejemplo, variedades de trigo harinero desarrolladas en Australia ('*Drysdale*' y '*Glover*' desarrolladas por el CSIRO; CSIRO 2002) seleccionadas por una baja discriminación isotópica del ^{13}C (o sea, una alta *WUE*) muestran adaptación a un ambiente donde no se producen lluvias luego de la siembra. Por lo tanto el crecimiento se sustenta por el agua acumulada con anterioridad. Esta situación es muy diferente a lo que sucede en regiones mediterráneas, donde se producen precipitaciones durante el ciclo de crecimiento del cultivo y en cereales el estrés es post-antesis.

Entre los rasgos morfo-fisiológicos que pueden proporcionar una mayor capacidad de extracción de agua por parte del cultivo podemos citar la presencia de un sistema radicular más profundo (Passioura 1994; Richards y col. 2001) y la capacidad de ajuste osmótico (Blum 1996a), aunque la importancia de este último ha sido puesta en duda tal como fue mencionado anteriormente (Serraj y Sinclair 2002).

En cultivos en zonas Mediterráneas podría ser particularmente importante el desarrollo de una mayor biomasa (y mayor índice de área foliar) en etapas tempranas del cultivo (es decir, vigor inicial; citas en Smith y col. 1999). Una mayor cobertura del suelo al inicio del cultivo disminuye la pérdida evaporativa en forma directa del suelo y además, el crecimiento - y por ende la acumulación de biomasa- se verifica en momentos de baja *VPD*. Por esta razón, la *WUE* del cultivo aumenta (López-Castañeda y col. 1995; Passioura 1994).

1.5.3.2. Aspectos relacionados con el uso de la radiación

La cantidad total de biomasa acumulada por un cultivo (*B*) puede ser representada por la expresión:

$$B = RAD \times I \times RUE,$$

donde *RAD* es la radiación solar durante el ciclo del cultivo, *I* es la proporción interceptada por el cultivo y *RUE* es eficiencia de uso de la radiación y su conversión en energía química. La ausencia de asociación entre rendimiento y biomasa que se observa en muchos casos, sugiere que la *RUE* ha sido escasamente modificada a través de la selección. Como se dijo anteriormente, recientes estudios muestran un aumento de la biomasa en cultivares

modernos de trigo (Reynolds y col. 2000), abriendo nuevas perspectivas a futuras investigaciones.

Uno de los parámetros más estudiados en relación con la *RUE* es la tasa fotosintética a saturación lumínica (A_{sat})⁷. Sin embargo, la mayoría de los estudios muestran que –al menos en cereales C_3 – parece existir escasa o nula asociación entre A_{sat} y el rendimiento (Slafer y col. 1994). Diversas razones pueden explicar esto: (a) la preponderancia de la limitación por el ‘destino’, mas que por la ‘fuente’; (b) diversos procesos podrían reducir la cantidad de asimilados realmente disponibles para el crecimiento (ej. mayor pérdida por respiración) y (c) las hojas individuales generalmente operan por debajo del punto de saturación lumínica (Hay 1999; Reynolds y col. 2000). Tal como señalan estos autores, en los casos donde el rendimiento está vinculado a mayor biomasa, una asociación del primero con la tasa fotosintética es más probable. De hecho, esto ha sido reportado en algunos trabajos, donde se observa una asociación entre fotosíntesis, biomasa y rendimiento (ver citas en Reynolds y col. 2000). Sin embargo, estas relaciones causa-efecto deben ser consideradas con cautela, ya que aumentos de la tasa fotosintética podrían deberse secundariamente a un efecto correlativo por modificación de la fuerza de los sumideros (Reynolds y col. 2000).

Tal como se explica en la sección correspondiente, los factores que provocan estrés en las plantas pueden conducir a una disminución de la tasa fotosintética (y por ende, una caída de la *RUE*; Hay 1999). En este sentido, el estudio de aquellos factores que afectan a la tasa fotosintética bajo situaciones de estrés podría ser más relevante, donde la limitación por la fuente parece ser un fenómeno mas probable que en las condiciones de buena irrigación. Los efectos del estrés hídrico sobre la maquinaria fotosintética fueron analizados en la sección 1.2 (pag. 13).

1.5.4. Llenado de los granos en cereales C_3

En cereales C_3 como el trigo, existe cierto acuerdo en que la disponibilidad de asimilados no es un factor limitante en el proceso de llenado de los granos en condiciones de buena disponibilidad hídrica (Slafer y col. 1994). Más bien, en estos casos el rendimiento parece estar limitado por el número potencial de granos que pueden ser

⁷ En la actualidad, la *tasa fotosintética a saturación lumínica* es simbolizada como A_{sat} (Allen y col.1997; Nogués y col. 2002). Sin embargo, otras notaciones son halladas en la bibliografía, tales como ‘ P_{max} ’ (Austin 1999; Horton 2000) o ‘ A_{max} ’ (Fischer y col. 1998; Reynolds y col. 2000). En particular este último simbolo debe ser evitado, ya que es utilizado para designar a la *tasa fotosintética a saturación de CO_2* (ej. Allen y col.1997)

llenados. En otras palabras, en ausencia de estrés la limitación por la ‘fuente’ sería menos importante que la limitación por el ‘destino’ (Richards 2000). Sin embargo, en ambientes con déficit hídrico, el aporte de fotoasimilados puede convertirse en un factor determinante del rendimiento. Por otra parte, aún en los ambientes hídricamente favorables (por ejemplo, zonas de la Pampa Húmeda en Argentina), pueden existir períodos de sequía intermitentes o bien terminales en años en que las precipitaciones se sitúan por debajo de la media (Richards y col. 2001).

Desde un punto de vista retrospectivo, el principal factor que ha determinado el aumento del rendimiento potencial en trigo y cebada ha sido el incremento del índice de cosecha (Slafer y col. 1994), aunque actualmente este parámetro parece estar alcanzando su máximo teórico (Austin 1999; Reynolds y col. 2000). Por lo tanto, se ha señalado que incrementos futuros en el rendimiento probablemente deberán apuntar al aumento de biomasa (Austin 1999; Richards 2000). De hecho, algunos estudios han reportado un aumento paralelo del rendimiento y la biomasa (ver referencias en Reynolds y col. 1999).

1.5.4.1. Papel fotosintético de la espiga

El llenado de los granos de cereales como el trigo y la cebada se produce a partir de tres fuentes principales de asimilados: (a) fotosintatos de la hoja bandera y (en menor medida), de la hojas inferiores (Evans y col. 1980); (b) translocación de asimilados almacenados en el tallo (ej. Gebbing y Schnyder 1999) y (c) productos de la fotosíntesis de la propia espiga (Araus y col. 1993a). La contribución relativa de cada una de estas fuentes varía según las condiciones y posiblemente, según la variedad o cultivar (ver citas en Araus y col. 1993a).

Como se ha mencionado previamente, existe cierto acuerdo en la literatura que el rendimiento (al menos en el trigo) en condiciones de buen aporte hídrico no está limitado por la disponibilidad de asimilados (‘fuente’), sino mas bien por la cantidad de granos potenciales (es decir, los ‘destinos’) (Slafer y col. 1994). Sin embargo, en cultivos bajo déficit hídrico (ej. regiones de clima Mediterráneo con sequía postantesis), la limitación por la fuente puede cobrar importancia (Araus et al. 2002a). En este contexto, el aporte de asimilados almacenados en el tallo y provenientes de la fotosíntesis de la espiga puede resultar crucial para compensar la disminución de otras fuentes (en particular, la hoja bandera).

Diversos rasgos han sido propuestos para explicar la mayor ‘tolerancia’ de la espiga al déficit hídrico. Ellos son: (a) la existencia de cierto grado de metabolismo C₄ (Nutbeam

y Duffus 1976; Wirth y col. 1976; Singal y col. 1986; Ziegler-Jöns 1989; Imaizumi y col. 1990); (b) una mayor *WUE* (ej. Araus y col. 1993a); (c) la capacidad de refijar al menos parte del CO₂ respirado (Kriedeman 1966; Bort y col. 1996; Gebbing y Schnyder 2001); (d) mayor capacidad de ajuste osmótico, lo cual permitiría el mantenimiento de un mejor estatus hídrico en situaciones de estrés (Morgan 1980).

Existe cierta controversia en la literatura acerca de algunos de estos aspectos. Por ejemplo, respecto a la posible existencia de algún grado de metabolismo C₄ en la espiga existen aparentes evidencias a favor (ya citadas) así como evidencias en contra (Araus y col. 1993b; Bort y col. 1995; para mas detalles, véase la *Introducción y Discusión* del artículo correspondiente; páginas 121 y 139). En particular, podría especularse que las discrepancias entre diferentes estudios son debidas a la diferente metodología para evaluar el metabolismo C₄ (por ejemplo, marcaje con ¹⁴C en hojas cortadas vs. hojas intactas; Singal y col. 1986; Bort y col. 1995) o del material vegetal (diferentes especies, cultivares etc.) empleados. Alternativamente, las diferencias entre distintos trabajos podrían originarse de las condiciones de crecimiento de las plantas (ej. condiciones de buena irrigación vs. estrés hídrico). Por ejemplo, es posible que el metabolismo C₄ pueda inducirse en ciertas condiciones adversas tales como situaciones de estrés hídrico terminal en regiones Mediterráneas. Esta posibilidad es evaluada en una de las partes de esta Tesis (véase artículo capítulo 6, página 117).

Respecto a las relaciones hídricas de la espiga existe escasa información. Algún trabajo muestra alguna ventaja a favor de los tejidos de la espiga respecto de la hoja bandera (por ejemplo mayor capacidad de ajuste osmótico; Morgan 1980). Otro estudio muestra semejantes relaciones hídricas para las brácteas (glumas) y para la hoja bandera (Xu et al. 1990), adjudicando la mayor tolerancia de la espiga al mantenimiento de un mejor *RWC* en el grano.

En definitiva, la base mecánica de la aparente tolerancia de la espiga y al estrés hídrico aún no han sido esclarecida completamente. Más investigación es necesaria para aclarar las causas fisiológicas de este comportamiento diferencial de la espiga ante el estrés.

Objetivos

Objetivos

2. Objetivos

Tal como hemos intentado plasmar en la Introducción, el estudio de la respuesta de la fotosíntesis y productividad de planta a los estreses abióticos puede ser abordado desde diferentes niveles de organización. Los procesos que ocurren en estos diferentes niveles de organización no deben ser considerados ignorando las interacciones con procesos que pertenecen a otras escalas. En la presente tesis se ha procurado tener en cuenta esta complejidad, estudiando fenómenos desde el *nivel tilacoidal* (por ejemplo, análisis de la eficiencia fotoquímica, cambios en pigmentos fotoprotectores, daño oxidativo a proteínas), *de órgano* (asimilación fotosintética en hojas y espigas), de *planta entera* (arquitectura de planta, biomasa, relación vástago/raíz) y *de cultivo* (comportamiento agronómico en situaciones de estrés). Para abordar este objetivo he trabajado con diferentes especies cultivadas y niveles de organización muy dispares. Mientras que este enfoque tiene el peligro de transmitir una imagen de heterogeneidad y falta de objetivos concretos en la Memoria, ha tenido la ventaja para el doctorando de proporcionarle una visión más integrada de los factores fisiológicos de diversa índole que determinan la productividad en condiciones ambientales adversas.

Debido a la gran relevancia del déficit hídrico en extensión y grado de impacto, tanto en el ámbito global como en la cuenca mediterránea, en la presente tesis se le ha concedido mayor importancia respecto al estrés por bajas temperaturas. Los estudios de estrés hídrico incluidos en esta tesis se han llevado a cabo utilizando cereales C₃ como especies modelo (trigo blando, trigo duro y cebada). Estos cereales son ampliamente afectadas por estreses hídricos (y en menor medida por las bajas temperaturas) en regiones de clima Mediterráneo como España (ej. Royo y col. 1998). En Argentina, por otro parte, si bien el régimen isohídrico de la Pampa Húmeda determina ausencia de estrés en buena parte de la superficie cultivada de trigo, frecuentemente se observan situaciones de déficit hídrico en zonas marginales de la zona de producción o bien en años particularmente secos (Guiámet com. pers.). El trabajo que analiza situaciones de bajas temperaturas se ha desarrollado utilizando la soja (*Glycine max* Merr) como especie modelo. La soja es una especie intensamente cultivada en la Argentina, y -a diferencia de los cereales como trigo y cebada (los cuales son tolerantes al frío; Săulescu y Braun 2001)- es sensible a las bajas temperaturas (Kratschy y Wise 2000).

Sobre la base de la información previamente expuesta, se plantearon los siguientes objetivos:

2.1. Fotosíntesis, fotoinhibición y daño oxidativo en condiciones de estrés

2.1.1. Bajas temperaturas

a.- Estudiar la vinculación entre daño oxidativo, fotoinhibición / fotoinactivación y efecto protector del ácido ascórbico en plantas de soja (*Glycine max* Merr) sometidas a un episodio de bajas temperaturas.

2.1.2. Déficit hídrico

b.- Estudiar la respuesta de fotoprotección/fotoinactivación en plantas de trigo sometidas a situaciones de déficit hídrico. Este objetivo fue desarrollado en trigo duro (*Triticum turgidum* L. var. *durum*).

c.- Analizar la importancia del daño oxidativo al aparato fotosintético y el efecto protector ejercido por el ácido ascórbico en situaciones de déficit hídrico. Este objetivo fue llevado a cabo en trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) como planta modelo.

2.2. Fotosíntesis y productividad en ambientes Mediterráneos

d.- Estudiar en forma comparativa la respuesta fotosintética de la espiga y la hoja bandera de trigo duro bajo condiciones de estrés hídrico terminal (post-antesis).

e.-Analizar rasgos fisiológicos asociados a un mejor comportamiento agronómico en condiciones de déficit hídrico en clima Mediterráneo. Este objetivo se llevó a cabo tomando como 'caso de estudio' dos cultivares de cebada (*Hordeum vulgare* L.) ampliamente cultivados en España en diferentes momentos durante los pasados 20 años.