



UNIVERSITAT DE BARCELONA



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

**Eduardo Alberto Tambussi**

**Departament de Biologia Vegetal  
Universitat de Barcelona**

## **8. Discusión general**



## 8.1. Fotosíntesis, fotoinhibición y daño oxidativo en condiciones de estrés (Objetivo 2.1)<sup>8</sup>

Tal como fue delineado en la *Introducción*, los estreses ambientales afectan los diversos procesos involucrados en la fotosíntesis. Estos procesos pueden ser modificados de manera diferencial, ya que mientras algunos son inactivados o regulados a la baja, otros en cambio permanecen relativamente inalterados. Según Lawlor (2002) el transporte de electrones tilacoidal (*ETR*) es mantenido a relativamente altos niveles a bajos *RWC* y cuando decrece lo hace en general cuando la conductancia estomática cae a valores muy bajos (*ca.* 0.10-0.15 mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; Flexas y col. 2002). Cuando esta caída del transporte de electrones ocurre, en general es de menor magnitud que la disminución de la asimilación de CO<sub>2</sub> (Noctor y col. 2002); en otras palabras, el cociente *ETR/A* tiende a aumentar en hojas sufriendo estrés hídrico (Flexas y col. 1998; Medrano y col. 2002). Esto significa que deben existir destinos alternativos de electrones cuando la disponibilidad de CO<sub>2</sub> se ve afectada por el cierre estomático. Estos destinos alternativos son básicamente la fotorespiración y en menor medida la reacción de Mehler. De acuerdo a Lawlor (2002), a altos *RWC* la mayoría de los electrones son utilizados en la asimilación de CO<sub>2</sub>, y en menor proporción usados en la fotorespiración y la reacción de Mehler. Cuando el *RWC* disminuye, una mayor proporción de electrones son usados en estos dos últimos procesos. Si la fotorespiración decrece en términos absolutos (lo cual es controversial; Noctor y col. 2002), entonces la reducción del O<sub>2</sub> vía la reacción de Mehler conduce al aumento de la generación *ROS*. Diversas evidencias muestran que en condiciones normales, el 70% del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido proviene de la fotorespiración y en menor medida de la reacción de Mehler. Cuando los niveles intercelulares de CO<sub>2</sub> caen (por ejemplo en situaciones de estrés hídrico), el aporte de la fotorespiración parece ser incluso mayor (citas en Noctor y col. 2002). De cualquier manera, la producción de *ROS* vía la reacción de Mehler (y otros sitios antes descritos) puede aumentar y conducir al incremento del estado estacionario de diversas *ROS*, promoviendo el daño oxidativo a componentes de los tilacoides (Tambussi y col. 2000). Por ejemplo, la producción de anión superóxido por los tilacoides aumenta en hojas de plantas de trigo duro sometidas a estrés hídrico (Navari-Izzo y col. 1996).

Potencialmente, el daño producido por las *ROS* en componentes fotosintéticos podría promover la disminución de la tasa potencial de asimilación de CO<sub>2</sub> (es decir, la

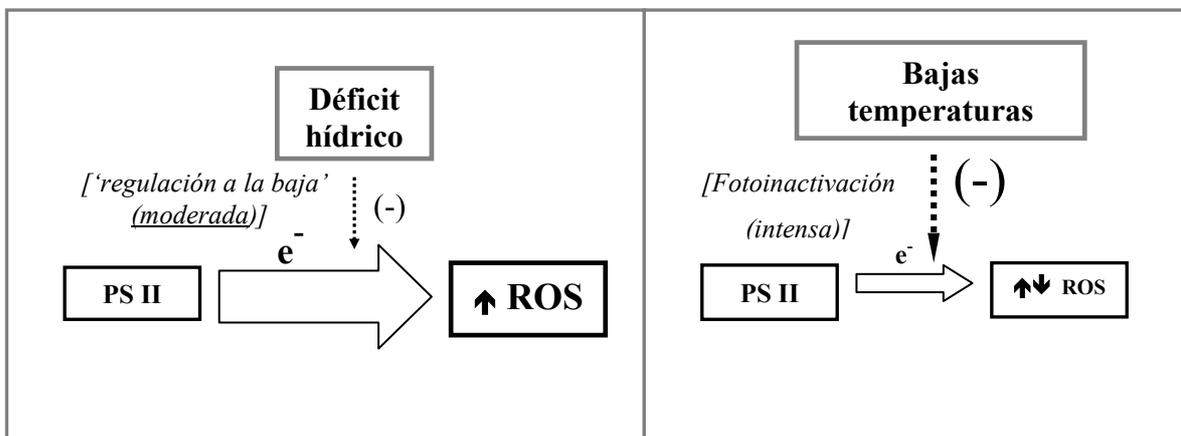
<sup>8</sup> En esta sección se discuten en forma integrada aspectos no tratados en los artículos correspondientes a los objetivo agrupados en la sección 2.1 (capítulos 3, 4 y 5).

tasa fotosintética medida a concentraciones saturantes de CO<sub>2</sub>, donde la limitante estomática es virtualmente eliminada). En otras palabras, podrían surgir limitantes no estomáticas (o metabólicos) de la fotosíntesis si el aumento de ROS promueve el daño a componentes del cloroplasto. A pesar que se han reportado daños a los fotosistemas, en general se considera que los eventos primarios son poco afectados por el estrés hídrico (Lawlor 2002). Por ejemplo, el índice  $F_v/F_m$  (un estimador de la integridad del complejo PSII/LHC; Rosenqvist & van Kooten 2003) permanece relativamente inalterado a bajos RWC (Flagella y col. 1998; Tambussi y col. 2002). Sin embargo, hemos demostrado en esta Tesis que el exceso de poder reductor asociado al estrés hídrico conduce a la oxidación de componentes tilacoidales, en particular, proteínas. Aunque de carácter moderado, este daño oxidativo asociado al estrés hídrico fue prevenido parcialmente por el aumento exógeno de la capacidad antioxidante, en particular de los niveles estacionarios de ácido ascórbico (Tambussi y col. 2000). Tal como fue mencionado en la *Introducción* de esta memoria, la acción protectora del ácido ascórbico pudo estar mediada por su acción activadora sobre el ciclo de las xantofilas (Ivanov y Edwards 2000), por su acción antioxidante directa (Smirnoff 2000) o bien por su participación en la regeneración de otras especies antioxidantes (ej.  $\alpha$ -tocoferol; Munné-Bosch y Alegre 2002). En definitiva, aunque no podemos dilucidar cuales de estos tres procesos estuvieron implicados, puede afirmarse que el aumento del estado estacionario del ácido ascórbico generado en forma exógena disminuyó el daño oxidativo promovido por el estrés hídrico y mejoró la capacidad de transporte electrónico tilacoidal (Tambussi y col. 2000).

Probablemente, el daño oxidativo en el estrés hídrico es sólo moderado en el aparato fotosintético debido a la existencia de mecanismos protectores, tal como el aumento de la disipación térmica (Shangguan y col. 2000; Tambussi y col. 2002). Este aumento de la tasa de disipación de energía está vinculado (al menos parcialmente) a un incremento paralelo de los niveles de carotenoides fotoprotectores, en particular zeaxantina (Tambussi y col. 2002). La capacidad antioxidante endógena, por otra parte, puede prevenir un daño oxidativo mayor en estas condiciones. De hecho, en plantas de trigo blando y duro sometidas a déficit hídrico se observa el aumento de algunos componentes del sistema antioxidante, tal como la enzima glutatión reductasa y los antioxidantes liposolubles  $\alpha$ -tocoferol (Bartoli y col. 1999) y  $\beta$ -caroteno (Tambussi y col. 2002). Por otra parte, la zeaxantina, además de su papel en los mecanismos de ‘*quenching no-*

*fotoquímico*’, también podría tener un rol antioxidante directo, tal como fue discutido previamente (Tambussi y col. 2002).

A diferencia de lo observado en el estrés hídrico, las bajas temperaturas promueven en plantas de soja una fuerte fotoinactivación a nivel del *PSII* (y por ende, del transporte lineal de electrones). Asociado a esto, se registra una ausencia de daño oxidativo, al menos evaluando la peroxidación de lípidos y la carbonilación de proteínas (Tambussi y col. 2004a). Esta falta de daño oxidativo masivo en una situación que (*a priori*) estimularía fuertemente la generación de *ROS* (frío asociado a luz; ej. Massacci y col. 1995; citas en Wise 1995) es a *prima facie*, llamativo. Sin embargo, debe destacarse que el grado de fotoinactivación que ocurre a nivel del *PSII* en hojas sometidas a frío (con la consiguiente caída del transporte lineal de electrones) podría prevenir la conducción de electrones al oxígeno, evitando por ende el daño oxidativo generalizado. En otras palabras, podría especularse que el daño oxidativo masivo al aparato fotosintético pueda estar vinculado a situaciones, como por ejemplo estrés por sequía, donde el transporte electrónico tilacoidal no sufre una fuerte caída (ya sea por ‘*downregulation*’ o por fotoinactivación). Como señalamos antes, en hojas sometidas a estrés hídrico se observa una disminución sólo parcial de la tasa de transporte de electrones, promoviendo la generación de *ROS* en el cloroplasto, fundamentalmente por la reducción univalente del O<sub>2</sub> en la reacción de Mehler (Noctor y col. 2002). En cambio, la fotoinactivación del *PSII* que ocurre bajo otros tipos de estrés (ej. bajas temperaturas) evitaría el daño oxidativo masivo a componentes celulares. Esto es consistente con la idea que la fotoinactivación (dejando de lado las causas subyacentes al fenómeno) puede actuar en realidad como dispositivo de seguridad, protegiendo a todo el sistema del daño generalizado (Nilssen y Orcutt 1996). Estas ideas son resumidas a continuación:



Es importante destacar que diversos trabajos muestran estrés oxidativo en plantas sometidas a bajas temperaturas en oscuridad (ej., Prasad 1996), lo cual sugiere que en orgánulos distintos al cloroplasto aumenta la producción de *ROS* bajo este tipo de estrés. Esta idea sería consistente con la ausencia de daño oxidativo en cloroplastos de plantas de soja sometidas a frío (Tambussi y col. 2004a). Aunque no puede descartarse que la clororespiración (la cual puede funcionar en oscuridad) pudiera estar involucrada en la generación de *ROS*, parece ser poco importante en términos de la capacidad de flujo de electrones (Ort y Baker 2002). Existen recientes evidencias que las proteínas de otros orgánulos (principalmente mitocondrias) pueden ser compartimentos celulares más susceptibles de daño oxidativo comparados con el cloroplasto (Bartoli y col. 2004). Por otro lado, según estos autores, los lípidos muestran un mayor nivel de oxidación en los tilacoides respecto de otros orgánulos. Es decir, el daño a lípidos y proteínas no parece estar asociado en todos los casos. Se desconocen las causas de esto, pero además de diferentes tasas de daño, una posible razón de este fenómeno podría radicar en las diferentes velocidades de recambio de ambos tipos de moléculas. Algunas proteínas tilacoidales poseen tasas de recambio muy altas (tal como *D1* del *PSII*; Mae 2004), y esto podría evitar la acumulación de moléculas dañadas. Los trabajos presentados en esta Tesis no permiten distinguir entre tasas de daño a proteínas *versus* reparación; es decir, sólo se estimó en forma relativa el estado estacionario de moléculas dañadas (Tambussi y col. 2000; 2004a), por lo que se necesita investigar más en este campo. Dado que se desconoce la real identidad de las proteasas involucradas en la degradación de proteínas tilacoidales (Guiamet, com. pers.), aproximaciones de tipo farmacológico (por ejemplo, intentando inhibir su degradación) son dificultosas al estado actual del conocimiento.

El rol de las *ROS* en la fotoinhibición del *PSII* (o fotoinactivación) ha sido largamente debatido (citas en Tyystjärvi 2004). Este autor revisa el tema y muestra diversas evidencias apoyando la idea que las *ROS* tendrían un papel marginal en el proceso, ya que, por ejemplo, la fotoinhibición ocurre aún en condiciones anaeróbicas. Esta apreciación es consistente con los resultados presentados en esta memoria, donde la fotoinhibición por bajas temperaturas no estuvo asociada a daño oxidativo y no fue prevenida por el incremento exógeno de la capacidad antioxidante (Tambussi y col. 2004a). En cambio, en el *PSI* la susceptibilidad al fotodaño parece depender de especies activas, pero este proceso es menos conocido que la fotoinactivación del *PSII* (Sonoike 1998).

Las evidencias en favor del rol protector del sistema antioxidante en la tolerancia al frío son contradictorias (ver citas en Capítulo 3; secciones 3.1 y 3.4; pag. 47 y 60). Mientras que en algunas especies la sobre-expresión de enzimas antioxidantes produce una mejora de la tolerancia (Van Breusegem y col. 1999) en otras se han hallado resultados negativos (Van Camp y col. 1996). Los resultados presentados en esta Tesis apoyan mas bien la segunda vertiente, sugiriendo que los intentos en conferir protección antioxidante en el cloroplasto (fundamentalmente a través de transformación génica) de la soja podrían tener escasa importancia en el caso del estrés por bajas temperaturas. En su lugar, otras dianas podrían ser más relevantes de manipular genéticamente, tal como la composición lipídica de las membranas lo cual parece tener un importante impacto en la tolerancia al *chilling* (véase *Introducción* sección 1.1.5.2).

## **8.2. Fotosíntesis y productividad en ambientes Mediterráneos (Objetivo 2.2)<sup>9</sup>**

En ambientes hídricamente limitados y en particular con estrés terminal, (ej. climas mediterráneos), numerosos rasgos han sido estudiados en función de conferir tolerancia (desde una perspectiva agronómica) a los cultivos. Entre estos rasgos pueden señalarse la fenología (por ejemplo, Slafer y Whitechurch 2001), el vigor inicial (López-Castañeda y col. 1995), sistemas radiculares más profundos (Manske y col. 2001; Richards y col. 2001) y osmoregulación (ej. Blum y col. 1999) entre otros (citas en Araus y col. 2002a).

Se ha propuesto que un mayor crecimiento en etapas tempranas en el cultivo reduce la pérdida evaporativa de agua por la superficie libre del suelo y además permite que el crecimiento (y la concomitante transpiración) se verifique cuando el déficit de presión de vapor es bajo (López-Castañeda y col. 1995; citas en Araus y col. 2002a). De hecho, este factor ha sido reportado como posible responsable de la mayor tolerancia a la sequía de la cebada respecto al trigo (López-Castañeda y col. 1995). En este sentido, el caso de estudio analizado en esta Tesis utilizando dos cultivares de cebada es consistente con esta idea. Los experimentos realizados en condiciones semi-controladas sugieren (aunque no en forma concluyente) que la mayor productividad de Graphic podría relacionarse a su mayor capacidad de crecimiento, produciendo más biomasa y área foliar total en etapas tempranas

---

<sup>9</sup> En esta sección se discuten diversos temas correspondientes a los objetivos agrupados en la sección 2.1 (capítulos 6 y 7).

del cultivo (Tambussi y col. 2004b). Por otra parte, la mayor área foliar de Graphic (tanto al nivel de hoja individual como de planta entera) se asoció a una menor tasa fotosintética, lo cual (al menos en trigo) ha sido atribuido a un aumento del espesor foliar o bien a un mesófilo con mayor empaquetamiento en las hojas más pequeñas (Austin 1999).

A pesar que muestra una menor estabilidad, el cultivar Graphic presenta mayores rendimientos aún en condiciones de muy bajo índice ambiental (es decir, de estrés severo), apoyando la idea que rendimiento potencial y tolerancia agronómica al estrés no son rasgos necesariamente excluyentes. Ha sido argumentado que variedades con alto rendimiento potencial, aún bajo condiciones de estrés moderado rinden mejor. Es decir, sólo bajo condiciones de estrés hídrico severo se manifiesta la interacción negativa (intersección o ‘*crossover*’) entre rendimiento potencial y tolerancia al estrés (Blum 1996). Sin embargo, en nuestro par de cultivares, esta interacción no se evidenció aún a valores muy bajos de índice ambiental (Tambussi y col. 2004b).

Se desconoce la base mecánica de la mayor ‘tolerancia’ agronómica a la sequía que muestra Graphic. Sin embargo, la mayor biomasa de raíces observada este cultivar en forma constitutiva (es decir, en condiciones de buena irrigación en invernadero) sugiere que este rasgo podría estar relacionado con una mayor extracción de agua del suelo. De hecho, la mayor discriminación isotópica observada en Graphic en los experimentos de campo (Tambussi y col. 2004b) apoya la idea que este cultivar mantiene mayores conductancias estomáticas (considerada en forma integrada en el tiempo) durante el ciclo el cultivo (Farquhar y Richards 1984).

Aunque la extrapolación a partir de este estudio es dificultosa (por tratarse de la comparación de sólo dos cultivares), los resultados presentados en esta memoria sugieren que la selección por criterios tales como mayor biomasa en etapas tempranas del cultivo podría ser aplicado en programas de mejora. Este carácter posee la ventaja que puede ser evaluado en condiciones semi-controladas (invernadero) en la etapa inicial del crecimiento. Por otra parte, existen métodos indirectos (y no destructivos) para evaluar la biomasa, tales como las técnicas espectroradiométricas (Casadesus y col. 2000), las cuales permitirían evaluar en forma rutinaria gran cantidad de cultivares en un sistema de escala relativamente reducida.

Por otro lado, una mayor biomasa de raíces expresada en forma constitutiva (es decir, sin presencia de estrés) es posible evaluarla directamente en condiciones controladas o bien indirectamente a través de técnicas tales como la capacitancia eléctrica (Manske y

col. 2001). Ambos caracteres (mayor biomasa total y mayor relación raíces/parte aérea), podrían ser criterios de selección -no excluyentes entre sí- a utilizar en programas de mejora.

En el campo del estudio de la tolerancia al estrés en cereales, el papel fotosintético de la espiga es un aspecto que (comparativamente con las hojas) ha recibido menor atención. Como fue descrito anteriormente, la espiga puede tener un importante rol en relación al rendimiento, en particular en regiones Mediterráneas con estrés terminal (es decir post-antesis; Araus y col. 1993a). En situaciones con estrés hídrico, es más probable la aparición de limitación del rendimiento por la disponibilidad de asimilados (Araus y col. 2002a) y en este contexto, la aportación de la espiga podría ser comparativamente mayor.

Las bases fisiológicas que subyacen al mejor comportamiento de la espiga en situaciones de sequía no han sido claramente establecidas. Tal como fue expuesto anteriormente (ver *Introducción*), entre los factores que podrían estar implicados pueden citarse la posible existencia de algún grado de metabolismo  $C_4$  (o intermedio  $C_3$ - $C_4$ ; Singal y col. 1986; Ziegler-Jöns 1989) y la capacidad de refijación del  $CO_2$  respirado (Kriedemann 1966; Bort y col. 1996; Gebbing y Schnyder 2001). Dejando de lado la refijación (sustentado por evidencia experimental; ver citas más arriba), en la presente memoria se han reportado resultados que apoyarían la existencia de un metabolismo típicamente  $C_3$  en la espiga, tanto en condiciones de buena irrigación (consistente con lo encontrado por Bort y col. 1995) así como en presencia de estrés hídrico (ver *Capítulo 6*). La aparente 'tolerancia' de la espiga al estrés hídrico parece deberse más a factores hídricos, en particular a la capacidad de mantener en sus estructuras fotosintéticas (brácteas y en particular, aristas) un mayor contenido relativo de agua. Este fenómeno podría explicarse por el mayor grado de ajuste osmótico observado en la espiga (Morgan 1980; Tabla 2 ver sección 6.3), aunque otros factores no pueden descartarse tal como ajuste elástico (no analizados aquí) o rasgos asociados a la xeromorfía que presentan sus órganos fotosintéticos (Fig. 1, sección 6.3).

Según los escasos datos disponibles, parece existir variabilidad genética (al menos en trigo duro) en relación al aporte que puede realizar la espiga en el llenado de los granos (v.g. Araus y col. 1993a). Este campo de estudio permanece aún por explorar, y los resultados de futuras investigaciones en este sentido podrían aportar valiosa información para los fitomejoradores, en particular en ambientes que sufren estrés hídrico terminal post-antesis.



## **9. Conclusiones principales**



## **9.1. Fotosíntesis, fotoinhibición y daño oxidativo en condiciones de estrés (Objetivo 2.1)**

### **9.1.1. Estrés oxidativo y fotodaño en condiciones de bajas temperaturas en hojas de soja**

- 1- Nuestras evidencias no apoyan que la fotoinactivación producida por bajas temperaturas esté causada por daño oxidativo en lípidos y proteínas.
- 2- La fotoinhibición del *PSII* (y por ende del transporte electrónico lineal) observada por las bajas temperaturas (estimada por la caída de  $F_v/F_m$ ) podría explicar la ausencia de daño oxidativo en los componentes tilacoidales.

### **9.1.2. Fotoprotección en plantas de trigo duro (*Triticum turgidum* var. *durum*) sometidas a estrés hídrico: cambios en la fluorescencia de la clorofila, firma espectral y pigmentos fotosintéticos**

- 1- La caída de la actividad de transporte de electrones del *PSII* asociada al estrés hídrico en trigo duro parece ser un proceso mas bien de ‘regulación a la baja’ que de inactivación de los centros de reacción de ese fotosistema.
- 2- El aumento del nivel de de-epoxidación con el estrés hídrico está fuertemente asociado a incrementos en la tasa de disipación de energía ( $qN$ ), aunque ésta parece mostrar un comportamiento de saturación respecto del primero.
- 3- El Índice Fotoquímico (derivado de mediciones espectralradiométricas) parece ser un indicador adecuado de estrés hídrico, asociado a un aumento en la tasa de disipación térmica en el fotosistema II y al incremento de xantofilas asociadas con fotoprotección.

### **9.1.3. Daño oxidativo a proteínas tilacoidales en plantas de trigo sometidas a estrés hídrico**

- 1- El estrés hídrico promueve daño oxidativo moderado en proteínas tilacoidales
- 2- Este daño oxidativo se asocia a una caída en el transporte fotosintético de electrones
- 3- El aumento exógeno de antioxidantes (ácido ascórbico) protege, al menos parcialmente, al aparato fotosintético del daño oxidativo.

## **9.2. Fotosíntesis y productividad en ambientes Mediterráneos (Objetivo 2.2)**

### **9.2.1. Fotosíntesis de la espiga de trigo duro en situaciones de estrés hídrico**

- 1- La espiga (y especialmente, las aristas) muestra mecanismos de escape a la deshidratación, manteniendo un mayor *RWC* en sus tejidos, y mayor tasa fotosintética en situación de estrés hídrico.
- 2- El mejor estado hídrico de la espiga (respecto de la hoja bandera) en situación de estrés hídrico parece estar asociado una mayor capacidad de ajuste osmótico.
- 3- Diversas evidencias apoyan la existencia de metabolismo típicamente  $C_3$  en la espiga, ya sea en forma constitutiva (es decir, en plantas bien regadas) o en situación de estrés hídrico.

### **9.2.2. Rendimiento potencial en cebada y grado de adaptación a condiciones Mediterráneas: un caso de estudio**

- 1- Nuestro caso de estudio apoya el punto de vista que la mejora del rendimiento en cebada en un amplio rango de condiciones ambientales de tipo Mediterráneo (incluyendo situaciones de estrés hídrico severo) puede estar asociada con un mayor rendimiento potencial.
- 2- Diferencias constitutivas en crecimiento y capacidad fotosintética entre cultivares durante el ahijado están relacionadas con el contenido de nitrógeno por área: un bajo contenido de nitrógeno y una baja tasa fotosintética por área podrían ser criterios apropiados en las estrategias de selección dirigidas a incrementar el rendimiento en condiciones Mediterráneas.

## **10. Resúmenes**



### **10.1. Estrés oxidativo y fotodaño en condiciones de bajas temperaturas en hojas de soja**

Las bajas temperaturas limitan en forma severa la fotosíntesis y el crecimiento de plantas sensibles. La disminución en la capacidad fotosintética puede ser debido parcialmente a daño oxidativo asociado al frío en componentes del cloroplasto. Por lo tanto, se intenta determinar el grado de peroxidación lipídica y daño oxidativo a proteínas tilacoidales en hojas de soja (*Glycine max* L. Merr.) expuestas a estrés por frío en presencia de luz. La relación entre fluorescencia variable y fluorescencia máxima ( $F_v/F_m$ ) decreció en plantas expuestas durante 24 hs. a 7°C y 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de densidad flujo fotónico fotosintético (*PPFD*), pero no en hojas sometidas a frío en oscuridad. La caída inicial de  $F_v/F_m$  fue exacerbada mediante el tratamiento con lincomicina (inhibidor de la síntesis de proteínas cloroplásticas), sugiriendo que los mecanismos de reparación mejoran el daño al fotosistema II (*PSII*) asociado al frío. El grado de daño oxidativo a proteínas tilacoidales (carbonilación) y a lípidos (estimado como contenido de malondialdehído) no cambia en respuesta al frío. Además, la aplicación exógena del L-galactono-1,4-lactona (Gal), precursor del ácido ascórbico, o del análogo del  $\alpha$ -tocoferol ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) no previene la disminución de  $F_v/F_m$  inducida por el frío, aunque dichos tratamientos fueron efectivos al proteger del daño oxidativo masivo producido por el paraquat. Nuestros datos sugieren que el estrés por frío no causa daño oxidativo masivo a las proteínas tilacoidales y a lípidos, por lo que otros compartimentos celulares podrían ser más susceptibles que los tilacoides al daño oxidativo asociado con estrés por bajas temperaturas.

### **10.2. Fotoprotección en plantas de trigo duro (*Triticum turgidum* var. durum) sometidas a estrés hídrico: cambios en la fluorescencia de la clorofila, firma espectral y pigmentos fotosintéticos**

Se analiza aquí la respuesta de fotoprotección de plantas de trigo duro (*Triticum turgidum* var. *durum* cv. Mexa) sometidas a estrés hídrico. Las plantas fueron crecidas en un invernadero durante 4 semanas y luego sometidas a estrés hídrico por suspensión del riego durante 8 días. El progreso del estrés hídrico fue monitoreado como una disminución del contenido relativo de agua (*RWC*) y la asimilación neta de  $\text{CO}_2$  de la última hoja

totalmente expandida. La respuesta fotoprotectiva fue evaluada en las mismas hojas mediante análisis de la fluorescencia modulada de la clorofila, cambios espectralradiométricos y contenido de pigmentos. Las medidas fueron realizadas en los días 3, 6 (estrés moderado) y 8 (estrés severo) luego del comienzo del tratamiento de estrés hídrico. El ‘*quenching no fotoquímico*’ de la fluorescencia de la clorofila ( $qN$ ), así como el contenido de zeaxantina y anteraxantina aumentó significativamente a partir del día 6 de tratamiento. Sin embargo, un incremento posterior de esas xantofilas en el día 8 no estuvo asociado con un ningún aumento del  $qN$ . Además, el contenido de  $\beta$ -caroteno se incrementó significativamente en el día 8, sugiriendo un aumento de las defensas antioxidantes. El índice fotoquímico ( $PI$ ), derivado de las medidas espectralradiométricas, mostró una progresiva disminución en los días 6 y 8, lo cual fue paralelo a un incremento en el estado de de-epoxidación del ciclo de las xantofilas ( $DPS$ ), en particular por el contenido de zeaxantina. A mediodía, el  $PI$  estuvo fuertemente (negativamente) correlacionado con el  $DPS$  y  $qN$ . Esos resultados sugieren que el  $PI$  puede ser un indicador confiable de fotoprotección en el estudio del estrés vegetal y en programas de mejora.

### **10.3. Daño oxidativo a proteínas tilacoidales en plantas de trigo sometidas a estrés hídrico**

La producción de especies reactivas del oxígeno en el cloroplasto se puede incrementar en situaciones de déficit hídrico. Con el fin de determinar si esto causa daño oxidativo al aparato fotosintético, hemos analizado la acumulación de proteínas dañadas oxidativamente en tilacoides de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) sometidas a estrés hídrico. El estrés hídrico fue impuesto en plantas de 4 semanas de edad por suspensión del riego durante 10 días hasta alcanzar un potencial hídrico de aproximadamente  $-2.0$  MPa.

En los tilacoides de hojas de plantas estresadas hubo un aumento del daño oxidativo, particularmente en polipéptidos de 68, 54,41 y 24 kDa. Proteínas de alto peso molecular oxidadas (probablemente ‘*intercruzadas*’) se acumularon en los cloroplastos de hojas de plantas estresadas. El daño oxidativo estuvo asociado con una sustancial caída en la actividad del transporte electrónico fotosintético. El tratamiento de hojas estresadas con L-galactono-1,4-lactona (*Gal*) incrementó su contenido de ácido ascórbico e intensificó el ‘*quenching*’ fotoquímico y no fotoquímico de la fluorescencia de la clorofila. La aplicación con *Gal* redujo el daño oxidativo a proteínas fotosintéticas de plantas estresadas, pero sólo

revirtió parcialmente la disminución en la actividad del transporte electrónico. Esto sugiere que otros factores también podrían contribuir a la pérdida de actividad observada en las plantas sometidas a estrés hídrico. El aumento del contenido de ácido ascórbico en las hojas podría ser una estrategia efectiva para proteger a las membranas tilacoidales del daño oxidativo promovido por el estrés hídrico.

#### **10.4. Fotosíntesis de la espiga de trigo duro en situaciones de estrés hídrico**

Las características fotosintéticas de la espiga y la hoja bandera de plantas de trigo duro bien regadas y sometidas a estrés hídrico (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). Este estudio se realizó en plantas crecidas en invernadero y en condiciones Mediterráneas de campo. Se utilizaron medidas de intercambio de gases en simultáneo con fluorescencia modulada de la clorofila con el fin de evaluar la respuesta fotosintética de la espiga y hoja bandera al CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. La existencia de metabolismo C<sub>4</sub> fue analizada mediante la sensibilidad de la tasa fotosintética y el transporte electrónico al oxígeno. Además, la distribución de la enzima Rubisco en partes de la espiga fue estudiado por inmunolocalización.. Finalmente se midió el contenido relativo de agua (*RWC*) y el ajuste osmótico (potencial osmótico a plena turgencia) en esos mismos órganos.

La sensibilidad de la tasa de asimilación y el transporte electrónico, y la ausencia de compartimentalización de la Rubisco en el mesófilo indicó que el metabolismo C<sub>4</sub> no ocurre tanto en plantas bien regadas como en plantas sometidas a estrés hídrico. Sin embargo, la actividad fotosintética de la hoja bandera fue más afectada por el estrés hídrico que en la espiga, tanto en condiciones controladas como en el campo. La menor sensibilidad de la espiga bajo estrés hídrico con respecto a la hoja bandera estuvo asociada a un mayor *RWC* y ajuste osmótico en las brácteas de la espiga y en las aristas. Asimismo se encontró una fuerte correlación negativa entre el contenido de agua (en base al peso fresco) de diversos órganos estudiados (láminas foliares, glumas, lemmas y aristas) en plantas bien regadas y el *RWC* de los mismos órganos en condiciones de estrés hídrico. Estos resultados sugieren que ciertos rasgos xeromórficos (así como el ajuste osmótico) de brácteas y aristas de brácteas y aristas está también relacionado a la ‘tolerancia’ de la espiga a la sequía.

Concluimos que la mejor respuesta de la espiga al estrés hídrico (comparada a la hoja bandera) no está relacionada a metabolismo C<sub>4</sub>. La tolerancia de la espiga es

explicada por su mayor RWC en situación de sequía. El ajuste osmótico y rasgos xeromórficos de las partes de la espiga pueden ser responsables de esta respuesta.

### **10.5. Rendimiento potencial en cebada y grado de adaptación a condiciones Mediterráneas: un caso de estudio**

La cebada es uno de los cultivos más ampliamente cultivados en áreas de secano Mediterráneas, donde la sequía es el principal factor que limita el rendimiento. El conocimiento de rasgos fisiológicos relacionados a adaptación a ambientes Mediterráneos de cultivares de cebada puede ser relevante para futuras estrategias de mejora. Rendimiento potencial *versus* tolerancia al estrés es un debate abierto. En este trabajo hemos estudiado dos cultivares de cebada (Graphic y Kym) de similar fecha de anthesis y duración del cultivo, que son ampliamente cultivados en el Mediterráneo occidental. El rendimiento agronómico fue evaluado en 41 ensayos, el cual estuvo situado en un rango (promediando los 16-32 cultivares utilizados en cada ensayo) entre 0.7 y 9.1 Mg ha<sup>-1</sup>. Los componentes del rendimiento y la discriminación isotópica del carbono ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) en los granos fue analizado en otros dos ensayos. La producción de Graphic fue mayor que la de Kym en todas las condiciones. Este mayor rendimiento fue causado principalmente por más espigas por unidad de superficie, lo cual podría ser atribuido a mayor crecimiento potencial durante el ahijamiento. Además, Graphic mostró mayor  $\Delta^{13}\text{C}$  de los granos, indicando un mejor estatus hídrico al final del ciclo del cultivo. Con el fin de examinar diferencias en crecimiento en etapas tempranas, esos cultivares fueron crecidos en condiciones óptimas, donde se analizó la actividad fotosintética y biomasa al final del ahijamiento. El cultivar Graphic mostró mayor biomasa aérea y de raíces, así como área foliar total por planta y por hijuelo. En este cultivar también se observó una tendencia a tener mayor cantidad de hijuelos por planta, pero la relación biomasa de vástago/raíz fue menor. El contenido de nitrógeno por unidad de área foliar se correlacionó negativamente con el área foliar por planta y por hijuelo, y positivamente con la relación biomasa de vástago/raíz. La tasa fotosintética por unidad de área fue menor en Graphic y positivamente relacionado al menor contenido de nitrógeno, mientras que la limitación estomática de la fotosíntesis y la eficiencia del uso del agua fueron similares en ambos cultivares. La capacidad de regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato contribuyó a la menor tasa fotosintética de Graphic. Además, el rendimiento cuántico del transporte electrónico

del fotosistema II (*PSII*) fue también menor en Graphic que en Kym, lo cual sugiere que mecanismos distintos a la estructura foliar contribuyeron a la mayor capacidad fotosintética del primero. Sin embargo, como resultado de las diferencias en área foliar, la fotosíntesis total por planta fue mayor en Graphic.

Los resultados indican que el mayor rendimiento de Graphic bajo un amplio rango de condiciones Mediterráneas podrían ser sustentado por un mayor crecimiento de la planta y fotosíntesis total durante el ahijado, aunque la capacidad fotosintética por unidad de área foliar es menor que en el caso de Kym. Graphic tiene un mayor sistema radical que el de Kym, lo que podría mejorar el estatus hídrico en estadios finales del cultivo. El contenido de nitrógeno por unidad de área foliar es un buen indicador del crecimiento y actividad fotosintética de plantas de cebada en estadios tempranos del ciclo del cultivo.



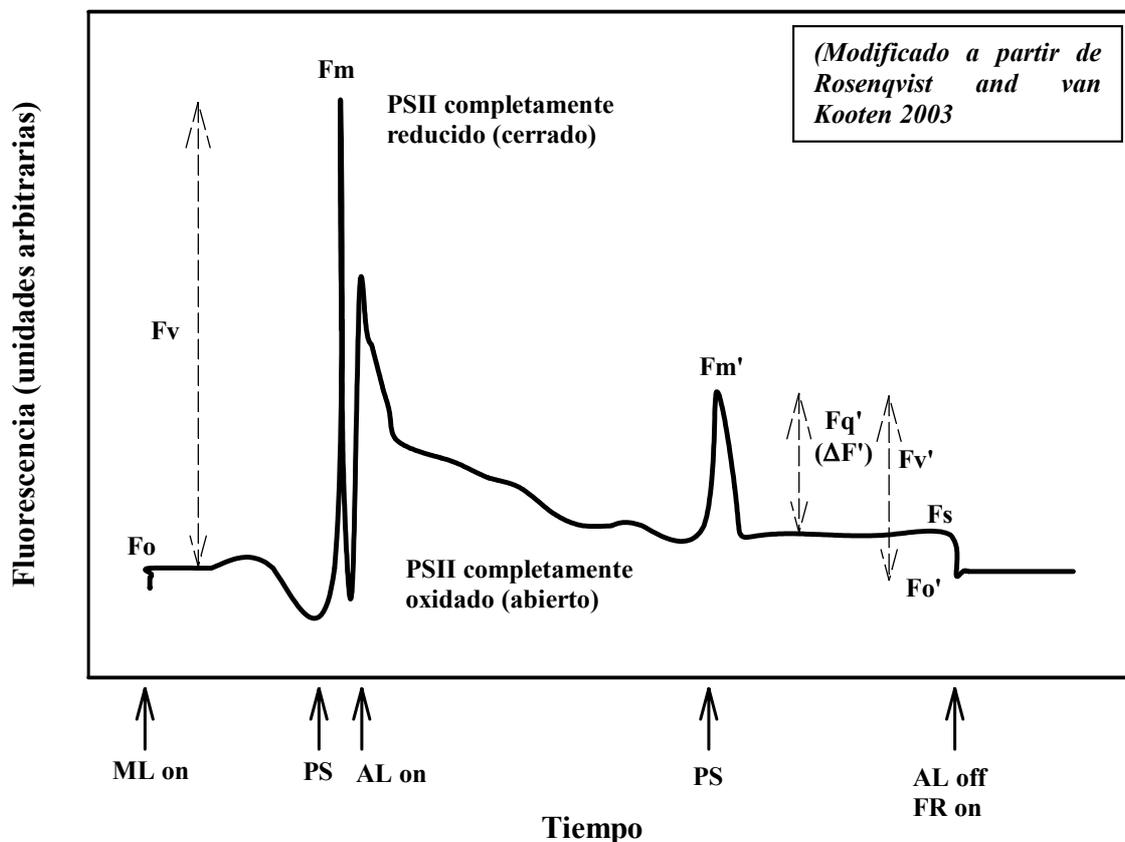
## 11. Anexo

### ***La fluorescencia modulada de la clorofila: método del pulso saturante***

Cuando una molécula de clorofila es excitada por la luz, la energía absorbida puede ser disipada a través de tres procesos: (a) fotoquímica, (b) disipación térmica (procesos no-fotoquímicos) y (c) fluorescencia. Los tres procesos mencionados compiten entre sí, de tal forma que el aumento en la eficiencia de cualquiera de ellos resulta en la disminución del rendimiento de los otros. Actualmente, la fluorescencia de la clorofila puede ser fácilmente estudiada mediante la modulación de la señal<sup>10</sup>, siendo una técnica ampliamente extendida. Es mas, la disipación fotoquímica y no-fotoquímica pueden ser discriminadas mediante la ***técnica del pulso de luz saturante***, el cual se describe a continuación:

- Cuando una hoja (previamente aclimatada a condiciones de oscuridad) es iluminada con luz de muy baja irradiancia (lo suficientemente débil para que no se produzca fotoquímica), la hoja emite una señal baja de fluorescencia denominada  $F_0$ . Esta señal procede principalmente de la antena del *PSII*.
- Si a continuación se aplica un pulso de luz saturante (normalmente, varios miles de  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), la fluorescencia alcanza un máximo ( $F_m$ ) cuando la fotoquímica es saturada. En estas condiciones, el aceptor primario de electrones ( $Q_A$ ) es completamente reducido.
- Si posteriormente se ilumina la hoja con luz actínica (es decir, luz fotosintéticamente activa), la hoja emite una señal de fluorescencia basal llamada  $F_s$ . Luego es aplicado otro pulso saturante y una nueva señal de máxima fluorescencia es obtenida ( $F'_m$ ). Esta señal  $F'_m$  es siempre menor que  $F_m$  debido a la existencia de procesos de disipación térmica (no-fotoquímicos) inducidos por la luz actínica y que normalmente están relajados en la oscuridad. Si luego la luz actínica es removida y se ilumina con luz débil de tipo rojo lejano ( $\lambda = 730 \text{ nm}$ ), se obtiene una nueva señal basal llamada  $F'_0$ , la cual suele ser menor a la  $F_0$  (tomada en oscuridad).

<sup>10</sup>***Fluorescencia modulada:*** es aquella en la que la luz de excitación posee un destello de alta frecuencia, de modo que puede ser discriminada del resto de las emisiones de luz (por ejemplo, luz solar directa).



**Figura 5.** Curva de inducción de fluorescencia modulada de la clorofila en el método del pulso saturante. Abreviaturas : AL : luz actínica; FR: luz roja lejana; ML: luz de medida (no-actínica); PS: pulso saturante de luz

### Parámetros de fluorescencia<sup>11</sup>

*F<sub>o</sub>* : Fluorescencia mínima en hojas aclimatadas a la oscuridad

*F<sub>m</sub>* : Fluorescencia máxima en hojas adaptadas a la oscuridad

*F<sub>v</sub>* : Fluorescencia variable en hojas adaptadas a la oscuridad. ( $F_v = F_m - F_o$ )

*F<sub>s</sub>* : Fluorescencia a estado estable a cualquier nivel de luz

*F<sub>m</sub>'* : Máxima fluorescencia en hojas iluminadas

*F<sub>q</sub>' (= ΔF')* : Cambio de fluorescencia provocado por el cierre de PSII. ( $F_q' = F_m' - F_s$ )

*F<sub>v</sub>'* : Fluorescencia variable en hojas iluminadas ( $F_v' = F_m' - F_o'$ )

*F<sub>o</sub>'* : fluorescencia mínima en hojas iluminadas (rojo lejano)

<sup>11</sup> **Nota:** Recientemente, la nomenclatura de fluorescencia de la clorofila ha sufrido algunos cambios. En particular,  $\Delta F'$  es simbolizado como  $F_q'$  (Rosenqvist and van Kooten 2003), aunque su uso aún no se ha generalizado en la bibliografía.

A partir de los parámetros descritos anteriormente, se han definido una serie de coeficientes, los cuales se describen brevemente a continuación (ver Maxwell y Johnson 2000 y referencias citadas en este trabajo):

$F_v/F_m$  : donde  $F_v$  es la fluorescencia variable =  $(F_m - F_0)$ . Este coeficiente, denominado ‘rendimiento cuántico máximo del PSII’, puede tomar valores entre 0 y *ca.*0,85. Hojas sanas que no están sufriendo ningún tipo de estrés poseen típicamente valores de alrededor de 0,8. Este índice muestra una clara correlación con el porcentaje de centros funcionales del fotosistema II (ver referencias en Anderson y col. 1997), por lo que su disminución es considerada un indicador de pérdida de función a nivel del aparato fotosintético (Bilger y col. 1995). Sin embargo, también se ha descrito una disminución de este parámetro asociado a procesos de fotoprotección (Osmond y col. 1999), por lo que debe tomarse con cautela asociar la disminución de  $F_v/F_m$  con existencia de daño al aparato fotosintético.

$\Delta F/F'_m$  , donde  $\Delta F = (F'_m - F_s)$ . Este índice es conocido como ‘rendimiento efectivo del PSII’ ( $\phi_{PSII}$ ). Es proporcional al rendimiento cuántico de la asimilación de CO<sub>2</sub> en condiciones no-fotorespiratorias (Genty y col. 1989). Su valor puede estar entre 0 y 0.8. A partir de este valor es posible estimar la tasa lineal de transporte electrónico (ver ‘ETR’), conociendo los valores de PPF, absorción foliar y asumiendo igual distribución de energía absorbida entre el fotosistema I y II.

$NPQ$  : ‘non-photochemical quenching’ o ‘parámetro de Stern-Volmer’. Calculado como  $(F_m - F'_m)/F'_m$ . Aunque su real naturaleza es discutida, se lo considera un indicador de la tasa de disipación no-fotoquímica. Puede tomar valores entre 0 e infinito, aunque son comunes valores entre 0 y 4.

Otro parámetro para estimar la disipación térmica es  $qN = 1 - (F'_m - F'_0)/(F_m - F_0)$ . Su valor puede estar entre 0 y 1.

$F_v'/F'_m$  donde  $F'_v = (F'_m - F'_0)$  : Rendimiento intrínseco del PSII o eficiencia de los centros abiertos (= oxidados) del PSII.

$qP$  = calculado como  $(F'_m - F_s)/(F'_m - F'_0)$  : es conocido como ‘quenching fotoquímico’. Se considera una medida del estado de oxidación de Q<sub>A</sub> o sea, la proporción de centros del PSII que se encuentran en estado ‘abierto’. Su valor puede estar entre 0 y 1.

Aquí es importante señalar que el parámetro  $\Delta F/F'_m$  es el producto de los dos últimos coeficientes:

$$\Delta F/F'_m (= \phi_{PSII}) = F_v'/F'_m \times qP \quad (\text{Andrews y col. 1993})$$

En otras palabras, los cambios en el rendimiento cuántico efectivo a la luz (es decir,  $\phi_{PSII}$ ) pueden deberse a alguno de estos dos parámetros (o de ambos): la proporción de centros del *PSII* en estado abierto ( $qP$ ) o a cambios en el rendimiento intrínseco de estos centros ( $F_v'/F'_m$ ).

$$ETR \text{ (Indice de la tasa de transporte de electrones)} = \phi_{PSII} \cdot PPFD \cdot 0.5 \cdot a$$

donde *PPFD* es la densidad de flujo fotónico fotosintético incidente, 'a' es la fracción de luz que es absorbida por la hoja y **0.5** es la fracción de luz absorbida utilizada por el *PSII* (Rosenqvist and van Kooten 2003)