



# Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Departamento de Nutrición Vegetal  
Estación Experimental de Aula Dei  
Zaragoza



Tesis Doctoral

## El Ciclo de las Xantofilas en Plantas Sometidas a Estrés Nutricional o Climático

Memoria presentada por Dña. María del Carmen Pérez Rontomé

Licenciada en Ciencias, Sección Químicas, para optar al  
grado de Doctor en Ciencias

Zaragoza, julio de 2000

---

## ***INDICE GENERAL***

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	La fotosíntesis .....	3
1.2	La célula vegetal .....	4
1.2.1	Cloroplastos.....	6
1.2.2	Tilacoides .....	8
1.2.3	Componentes de la membrana tilacoidal.....	11
1.2.4	Pigmentos fotosintéticos.....	19
1.3	Factores abióticos que afectan a la fotosíntesis.....	21
1.3.1	Concepto de estrés.....	22
1.3.2	Métodos para evaluar los distintos factores que alteran el proceso fotosintético .....	23
1.4	El ciclo VAZ como marcador de estrés .....	31
1.4.1	Avances en el conocimiento del ciclo de las xantofilas .....	33
1.4.2	Hipótesis sobre la función del ciclo de las xantofilas.....	37
1.4.3	Influencia de las condiciones ambientales en la expresión del ciclo..	41
2	OBJETIVOS.....	47
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
3.1	Materiales.....	53
3.1.1	Experimentos con plantas modelo.....	53
3.1.2	Plantas con alteraciones nutricionales .....	54
3.1.3	Experimentos en comunidades forestales naturales .....	55
3.2	Cultivo en hidropónico.....	64

---

---

3.2.1	Condiciones de trabajo en la cámara de cultivo.....	65
3.3	Infiltraciones a diferentes pH.....	68
3.4	Aislamiento de tilacoides.....	69
3.5	Cuantificación de proteínas .....	71
3.6	Separación y cuantificación de proteínas mediante electroforesis desnaturalizante (PAGE).....	71
3.6.1	Preparación de la electroforesis .....	72
3.6.2	Tinción de nitrato de plata para gel de placa larga.....	75
3.6.3	Tinción con TMBZ .....	76
3.7	Análisis de pigmentos por HPLC .....	77
3.7.1	Extracción de pigmentos fotosintéticos.....	78
3.7.2	Cuantificación de pigmentos fotosintéticos .....	78
3.8	Análisis químico de nutrientes.....	82
3.8.1	Preparación de las muestras. Digestión del material.....	82
3.8.2	Análisis por absorción atómica .....	82
3.8.3	Determinación de potasio por emisión atómica .....	83
3.8.4	Determinación de fósforo en material vegetal .....	83
3.8.5	Determinación de nitrógeno en material vegetal. Método Kjeldahl ..	83
3.8.6	Determinación de hierro activo.....	84
3.9	Determinación de parámetros de fluorescencia .....	84
3.9.1	Fluorescencia modulada.....	85
3.9.2	Medidas de fluorescencia con el fluorímetro portátil.....	88
3.10	Medida del potencial hídrico .....	89
3.11	Análisis de prolina .....	91

---

---

4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	93
	4.1 El ciclo de las xantofilas en especies “modelo” .....	95
	4.1.1 Antecedentes .....	95
	4.1.2 Funcionamiento del ciclo: verificación de las hipótesis existentes ....	96
	4.2 Comportamiento del ciclo VAZ en plantas sometidas a estreses nutricionales .....	115
	4.2.1 Antecedentes .....	116
	4.2.2 Deficiencia de hierro .....	116
	4.2.3 Deficiencia de manganeso .....	134
	4.2.4 Desequilibrios nutricionales en cerezo .....	143
	4.3 Variaciones de los pigmentos del ciclo VAZ a lo largo del año en siete especies leñosas mediterráneas.....	148
	4.3.1 El encinar mediterráneo.....	148
	4.3.2 Antecedentes .....	149
	4.3.3 Condiciones experimentales.....	152
	4.3.4 Análisis fenológico de siete especies del encinar.....	154
	4.3.5 Análisis de los parámetros elegidos para cada una de las especies ..	157
	4.3.6 Interpretación conjunta de los resultados de todas las especies .....	189
	4.3.7 Relaciones entre los parámetros climáticos y los pigmentos fotosintéticos .....	197
5	CONCLUSIONES.....	201
6	BIBLIOGRAFÍA.....	205
7	ANEXO .....	235
	7.1 ÍNDICE DE TABLAS .....	237
	7.2 ÍNDICE DE FIGURAS.....	240

---

---

---

## ***1 INTRODUCCIÓN***



### 1.1 La fotosíntesis

La fotosíntesis es uno de los procesos biológicos más importantes, mediante el cual, algunos organismos son capaces de sintetizar materia orgánica a partir de luz, dióxido de carbono y agua. Es decir, se produce la conversión de energía luminosa en energía química. El proceso puede dividirse en tres fases: (1) la etapa fotoquímica, (2) el transporte electrónico fotosintético, y (3) el conjunto de reacciones bioquímicas mediante las cuales se incorpora el  $\text{CO}_2$  a los carbohidratos (Nobel, 1991). En la Figura 1.1 se resume todo el proceso.

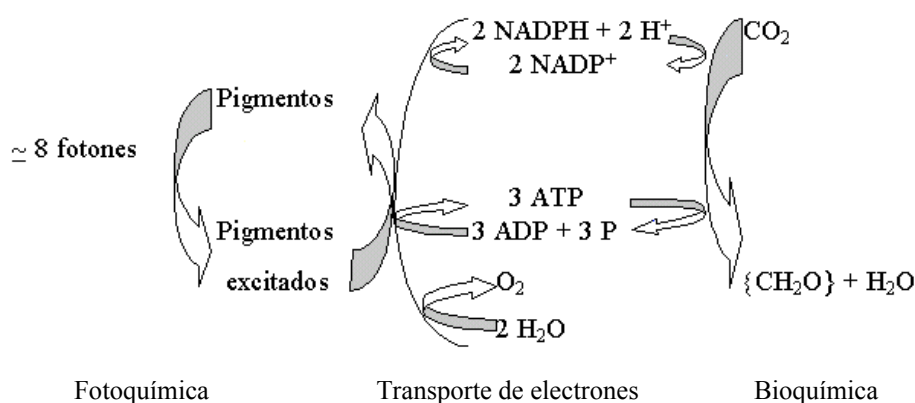


Figura 1.1: Representación esquemática de las tres etapas de la fotosíntesis. La absorción de la luz produce la excitación de los pigmentos fotosintéticos. Los electrones son transferidos a través de una serie de moléculas, el  $\text{NADP}^+$  se reduce a  $\text{NADPH}$ ; la formación de  $\text{ATP}$  también está acoplada a la transferencia de electrones. Las reacciones bioquímicas de la fotosíntesis se pueden llevar a cabo en la oscuridad y requieren 3 moles de  $\text{ATP}$  y 2 moles de  $\text{NADPH}$  por molécula de  $\text{CO}_2$  transformada en carbohidratos (Fuente: Nobel, 1991).



La fotosíntesis tiene lugar en los cloroplastos, orgánulos que se localizan en las células de los organismos fotosintéticos y se lleva a cabo gracias a las moléculas de clorofila. Las propiedades de la clorofila permiten que se produzcan reacciones de oxidoreducción (redox) en las membranas tilacoidales para obtener finalmente NADPH y ATP, es decir, energía y poder reductor, que serán utilizados posteriormente para la fijación de dióxido de carbono (Arnon, 1992).

Cuando un fotón incide sobre un átomo o una molécula capaz de absorber luz a una determinada longitud de onda, se produce una absorción de energía por parte de algunos de los electrones de esta molécula, que se promocionan a niveles de energía superiores. Al estado que alcanza el átomo o molécula que se enriquece en energía se le denomina “excitado”. Posteriormente, la molécula excitada vuelve a su estado fundamental, bien desprendiendo la energía absorbida (ya sea en forma de calor o como fluorescencia), o bien reaccionando con otra molécula. En las células fotosintéticas las moléculas que se excitan son los pigmentos. Las células fotosintéticas contienen tres tipos de pigmentos que captan la luz: las clorofilas, los carotenoides y las ficobilinas.

La clorofila es el principal pigmento absorbente de luz en la mayor parte de las plantas verdes. Las plantas superiores contienen principalmente dos tipos de clorofila, designadas como “clorofila a” (Chl a) y “clorofila b” (Chl b), aunque otros organismos fotosintéticos contienen otros tipos. Al igual que la clorofila, los pigmentos accesorios pueden ser utilizados como receptores de la energía luminosa. Sin embargo, cuando la luz es absorbida por estos pigmentos accesorios, tiene que transferirse como energía de excitación a las moléculas de clorofila antes de que pueda utilizarse para la fotosíntesis.

## ***1.2 La célula vegetal***

La célula, animal o vegetal, presenta un alto grado de organización, con numerosas estructuras internas delimitadas por membranas. La membrana nuclear establece una barrera entre la cromatina (material genético) y el citoplasma. A diferencia de la célula animal, la vegetal tiene la pared celular formada por celulosa rígida y una única vacuola, muy grande y llena de líquido (Figura 1.2).

Otros orgánulos que no aparecen en las células animales son los plástidos, que están presentes en todas las células de las plantas. A esta familia pertenecen los proplástidos, amiloplastos, cloroplastos, cromoplastos y etioplastos. Los proplástidos son los pequeños precursores del resto de los miembros de la familia, y son particularmente abundantes en las células de los meristemos. Los cloroplastos son unos orgánulos capaces de sintetizar azúcares a partir de dióxido de carbono, agua y luz solar, es decir, realizan la fotosíntesis.

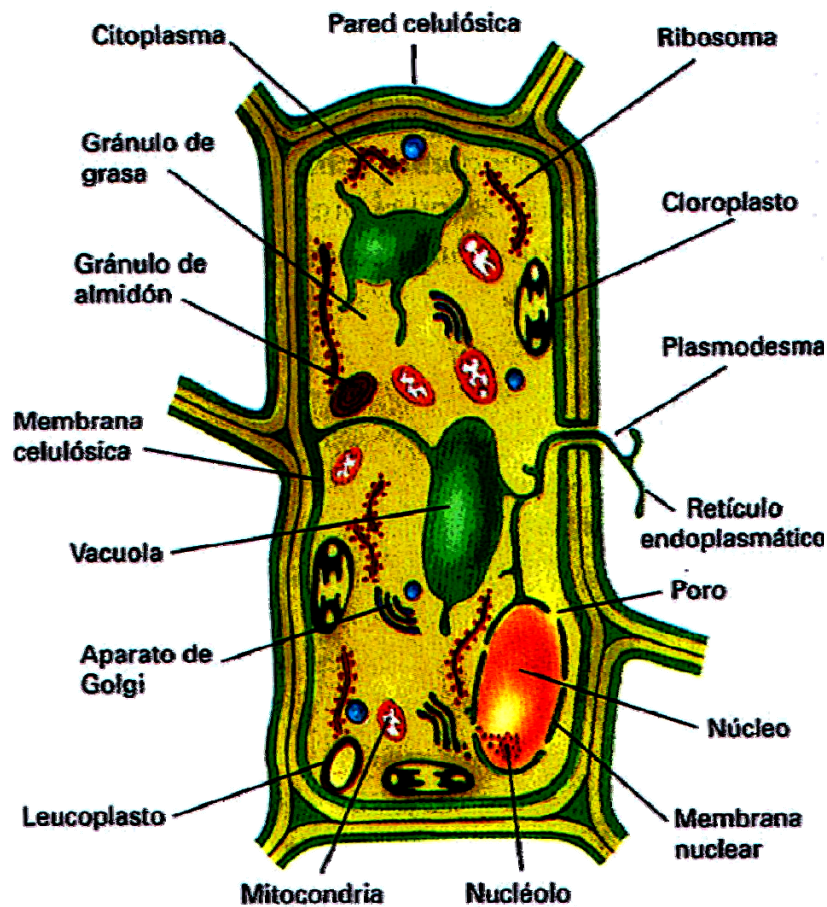


Figura 1.2: Esquema de una célula vegetal con sus diferentes componentes.

### *1.2.1 Cloroplastos*

Los cloroplastos son orgánulos con forma de disco, de entre cuatro y seis micrómetros de diámetro. Aparecen en mayor cantidad en las células de las hojas, lugar en el cual parece que pueden orientarse hacia la luz. En las plantas superiores, los cloroplastos se encuentran fundamentalmente en las células de la empalizada y del mesófilo esponjoso de las hojas, mientras que en las células de la epidermis se encuentran presentes en mucha menor cantidad. El número de cloroplastos varía con el tipo de célula y especie de planta, pero generalmente aumenta con el tamaño de la célula. En las células de la empalizada y del mesófilo de las hojas de espinaca son típicos 300-400 y 200-300 cloroplastos por célula respectivamente. Normalmente se encuentran alrededor de la periferia de la célula, pegados al plasmalema.

Los cloroplastos se desarrollan en presencia de luz, a partir de unos orgánulos pequeños e incoloros que se llaman proplastos. A medida que las células se dividen en las zonas de crecimiento, los proplastos que están en su interior también se dividen por fisión. De este modo, las células hijas tienen la capacidad de producir cloroplastos. En las algas, los cloroplastos se dividen directamente, sin necesidad de desarrollarse a partir de proplastos. La capacidad que tienen los cloroplastos para reproducirse a sí mismos, y su estrecha similitud, con independencia del tipo de célula en que se encuentren, sugiere que estos orgánulos fueron alguna vez organismos autónomos que establecieron una simbiosis en la que la célula vegetal era el huésped.

El contenido del cloroplasto está encerrado en una envoltura formada por dos membranas separadas por un espacio intermedio. Esta membrana es lisa y continua, sin ninguna perforación ni partículas regularmente dispuestas sobre ella, aunque presenta permeabilidad diferencial.

Todos los cloroplastos, por definición, contienen clorofila. Sin embargo, no son siempre verdes, en algunas algas marrones o rojas, su color está enmascarado por otros pigmentos.



Figura 1.3: Representación tridimensional de un cloroplasto. En el corte se ven las pilas de tilacoides que forman los grana.

El cloroplasto contiene en su interior una sustancia básica, denominada estroma, que está atravesada por un sistema de membranas llamadas lamelas, embebidas en un medio hidrofílico (matriz proteica o estroma). Las lamelas se originan según la mayoría de los autores, como invaginaciones de la membrana interna, pero en los cloroplastos bien diferenciados las conexiones con ella se han perdido y sólo se aprecian ocasionalmente (Figura 1.3).

La función de los cloroplastos es la transformación de energía luminosa, primero en energía eléctrica y después en energía química. La energía eléctrica en los sistemas biológicos aparece, bien como agentes reductores, bien como gradientes de potencial derivados de la separación de cargas y/o concentración de iones a través de las membranas. La estructura más simple requerida para la producción y el mantenimiento de un gradiente iónico es un compartimento rodeado de una membrana semipermeable capaz de bombear especies iónicas vectorialmente a través de ella.

La morfología de los organismos fotosintéticos es muy variable. En las bacterias fotosintéticas este compartimento es la propia célula, mientras que en cianobacterias, algas y plantas superiores éste lo constituyen los tilacoides.

### *1.2.2 Tilacoides*

Los tilacoides son membranas planas con una gran relación superficie / volumen. Son vesículas individuales de la membrana fotosintética que se encuentran flotando en el estroma y que no están conectadas con la envoltura del cloroplasto. En los tilacoides se pueden diferenciar dos regiones, la parte en que las membranas adyacentes están apiladas (formando unos agregados denominados grana) y la parte en que las membranas están en contacto con el estroma y que sirve para conectar los grana entre sí. El nombre de grana hace referencia a los pequeños granos verdes distinguibles al microscopio óptico. Utilizando técnicas de criofractura, aislamiento y separación de las porciones granales y estromáticas se ha llegado a la conclusión de que los tilacoides granales son sólo el 5 % del total.

La vesícula está completamente aplanada, por lo que una sección transversal ofrece el aspecto de dos membranas paralelas muy juntas que se unen en los extremos (Figura 1.4). Generalmente, pueden encontrarse de 40 a 60 granas por cloroplasto y de 5 a 20 tilacoides por grana.

El sistema lamelar está presente prácticamente en todos los cloroplastos, sin embargo, no todos presentan granas. En plantas superiores existe una familia denominada  $C_4$ , con niveles de fijación de  $CO_2$  notablemente superiores a las demás, que contienen dos tipos de cloroplastos: los que tienen grana en las células del mesófilo y los del parenquima perivascular que carecen de ellos.

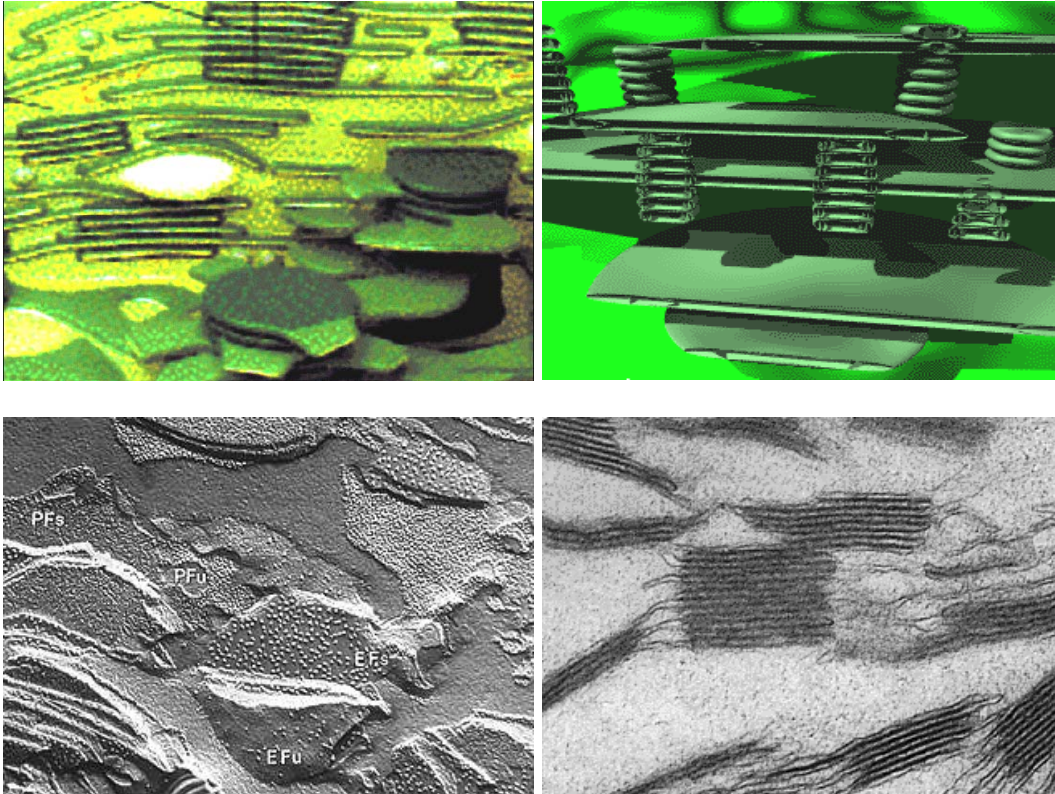


Figura 1.4: Detalle de los apilamientos del tilacoide en el interior del cloroplasto. En la parte superior se muestran las representaciones esquemáticas y en la inferior, a la izquierda, la microfotografía electrónica de barrido en una muestra crio fracturada y en la parte inferior derecha los apilamientos observados por microscopía de transmisión.

En la membrana se han podido aislar varios complejos, entre los que cabe destacar las asociaciones entre pigmentos y proteínas, que son los componentes funcionales de la fotosíntesis. Estos están embebidos en la membrana y orientados según sus características físico-químicas.

Las membranas tilacoidales son similares a otras celulares; contienen proteínas y lípidos en una relación 1:1 en peso. La matriz de la membrana es una bicapa lipídica compuesta fundamentalmente por carbohidratos que contienen glicolípidos. Los carbohidratos hidrofílicos están colocados en la superficie, en contacto con el exterior, mientras que las partes hidrofóbicas se proyectan hacia el interior. Embebidos en la

membrana se encuentran proteínas funcionales y complejos lipoproteicos. En contacto con las membranas fotosintéticas, o embebidos en ellas, encontramos los componentes de la cadena transportadora de electrones, distribuidos en cuatro partes funcionales:

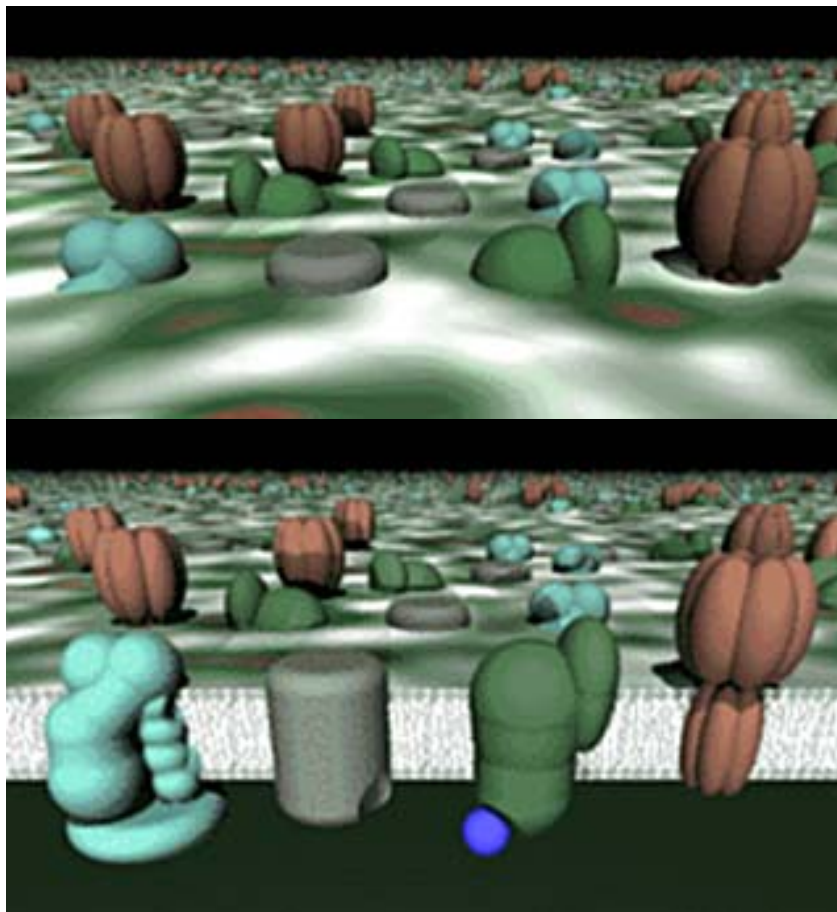


Figura 1.5: Detalle de la disposición superficial de los componentes funcionales de la cadena de transporte electrónico fotosintético (parte superior). En el esquema inferior se aprecia cómo están embebidos en la matriz lipídica de la membrana. De izquierda a derecha están representados el fotosistema II, el citocromo  $b_6f$ , el fotosistema I y la ATPasa. En azul se observa la plastocianina que se encuentra libre en el interior de la membrana.

- 1- Los complejos captadores de la luz: formados por pigmento-proteínas.

- 2- Los centros de reacción: que reciben la energía absorbida y producen las primeras reacciones fotoquímicas.
- 3- La cadena transportadora de electrones y protones, a través de la membrana.
- 4- El “coupling factor” responsable de la síntesis química de energía en forma de ATP.

Su distribución en la membrana se representa en la Figura 1.5.

### *1.2.3 Componentes de la membrana tilacoidal*

Los pigmentos que absorben la luz en los organismos fotosintéticos no están dispuestos al azar, sino que se hallan distribuidos a través de las membranas fotosintéticas, unidos a proteínas para formar complejos pigmento–proteína específicos. La alta eficacia en la captura de electrones requiere una organización de las estructuras tilacoidales que proporcione distancias óptimas y orientaciones específicas entre los sistemas de transferencia. Existen, en principio, dos tipos de complejos: los que tienen exclusivamente la misión de recolectar la luz (antenas) y los que sirven como trampa final de la energía (centros de reacción). La diferencia entre las antenas y los centros de reacción estriba en que las antenas transfieren la energía de excitación procedente de la luz, es decir, hay transferencia de energía, no de electrones. Por el contrario, en los centros de reacción se produce transferencia de electrones, dando lugar a la conversión de energía física en energía química (Clayton, 1965). La energía absorbida por la antena es transferida al centro de reacción donde tiene lugar la reacción fotoquímica primaria.



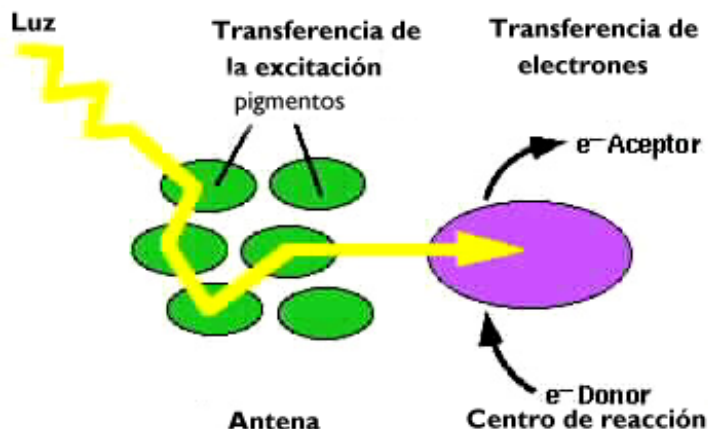


Figura 1.6: Esquema de la transferencia de energía luminosa, a través de la antena, hasta los centros de reacción.

El aparato fotosintético contiene una serie de proteínas intrínsecas y, en algunos casos, incluye proteínas hidrofóbicas ancladas en la membrana. Estas últimas pueden separarse por ruptura mecánica, pero para separar las proteínas intrínsecas del entorno lipídico se requiere la presencia de detergentes. En los experimentos iniciales de Ogawa et al. (1966), se aislaron los complejos pigmento-proteína solubilizándolos con SDS, un detergente fuerte que los separa de la membrana. La generación de ATP y NADPH dentro del cloroplasto implica la interacción cooperativa de cuatro componentes muropeptídicos: fotosistema 2 (PSII), fotosistema 1 (PSI), citocromo  $b_6f$  (Cyt  $b_6f$ ), y el factor de acoplamiento (ATP sintetasa,  $CF_0$ - $CF_1$ ). Este último componente es el responsable de la síntesis de ATP, mientras que los otros tres, usando la energía luminosa, actúan en serie, para lograr la oxidación del agua y la concomitante formación de  $NADP^+$ . Estas reacciones son vectoriales e implican el movimiento de protones y electrones a través de las membranas del tilacoide. Los cuatro complejos tienen partes sustanciales de sus estructuras ancladas en la fase hidrofóbica de la doble capa lipídica de este sistema de membranas, y se encuentran orientadas de una forma específica. La localización de estos complejos se encuentra restringida a unas determinadas regiones del tilacoide (Barber, 1983b). Así, los complejos del PSII se encuentran en las regiones conocidas como grana, donde las membranas están agrupadas en forma de apilamientos. Por el contrario, el PSI y el  $CF_0$ - $CF_1$  se encuentran solamente en las lamelas estromáticas y las regiones de los

grana expuestas al estroma, mientras que el Cyt  $b_6f$  está distribuido uniformemente entre las dos regiones.

La separación lateral de estos complejos está esquematizada en la Figura 1.8, en la cual se señala que la transferencia de equivalentes redox se realiza a través de unos componentes móviles: PQ, PC y Fd. El mantenimiento de esta organización parece implicar un delicado balance entre fuerzas electrostáticas y de van der Waals, fácilmente perturbables (Barber, 1982) y, por lo tanto, bajo ciertas circunstancias, parte del PSII, y también LHCII podrían migrar a las membranas no granales (Marden y Barber, 1989).

Se han elaborado modelos que responden bien a los resultados experimentales y, en los cuales, los diferentes complejos pigmento-proteína estarían distribuidos de la siguiente forma:

#### 1.2.3.1 Fotosistema II

El fotosistema II (PSII) es un complejo multiproteico (Seibert, 1993) que se localiza en las membranas granales. Se trata de un conjunto de proteínas de membrana que contiene, al menos, 25 polipéptidos; está presente en todos los organismos fotosintéticos oxigénicos y puede ser dividido en diferentes partes según su funcionalidad. Sus componentes son la antena extrínseca LHCII y la unidad central o “core complex”. Esta, a su vez, se divide en antenas intrínsecas, el centro de reacción (RCII) y las proteínas extrínsecas asociadas a la fotólisis del agua.

El mecanismo del fotosistema II es de especial interés porque permite el uso de agua como única fuente de hidrógeno para la fotosíntesis, lo que tiene importantes consecuencias bioenergéticas adicionales debido a la producción de oxígeno como un producto de desecho.

El complejo fotosintético del PSII cataliza la fotólisis del agua y la transferencia fotoinducida de electrones desde el agua a las plastoquinonas. La unidad central del PSII, también llamada “oxygen evolving core complex” (complejo OEC), puede ser definida como la unidad mínima capaz de producir la separación de cargas, reducir las quinonas y emitir oxígeno como subproducto de la reacción (Ghanotakis y Yocum, 1986). Una parte

de los componentes del complejo interno del PSII están integrados en la membrana tilacoidal, mientras que la otra está compuesta por proteínas extrínsecas fijadas a la superficie luminal. El centro de reacción contiene varios polipéptidos: D1, D2 y Cyt b<sub>559</sub>, mientras que el conjunto del complejo interno contiene además los polipéptidos CP47 y CP43, el extrínseco de 33 kD y otros de menor peso molecular. La denominación D1 y D2 proviene de los polipéptidos que se resuelven por electroforesis en gel de acrilamida como bandas "difusas" y fueron descubiertos por Chua y Gilham (1977). Se denomina D1 a la banda correspondiente a "la proteína de 32 kD a la que se ligan herbicidas" y D2 a "la proteína similar a la de 32 kD". Estos dos polipéptidos forman parte del centro de reacción del PSII y tienen ligadas cuatro moléculas de clorofila a, dos feofitinas, un β-caroteno y un hierro no hemínico. Dos de estas clorofilas forman probablemente el donador primario fotoquímico (P680) del PSII. Estas dos clorofilas son idénticas a las que se encuentran en los complejos de antena, pero su función no es la de captador de luz, sino la de promocionar electrones a un estado superior de energía (Hankamer et al., 1997). En la Figura 1.7 se muestra la estructura tridimensional del PSII.

El CP47 y CP43 (llamados así por creer que son los mismos complejos que los encontrados por primera vez en *chlamydomonas*) son considerados las antenas internas del PSII (Green, 1988). Además de todos estos complejos, el centro de reacción contiene dos moléculas de quinona (Gounaris y Barber, 1985) que aunque se piensa que sus lugares de anclaje se encuentran en D1 y D2, éstas se pierden en el proceso de aislamiento del subcomplejo D1/D2/Cyt b<sub>559</sub> (Barber et al., 1987; Nanba y Satoh, 1987).

El centro de reacción del PSII está alimentado por una gran antena captadora de luz, que contiene varios cientos de moléculas de clorofila por centro de reacción. La mayoría de los captadores de luz están localizados en distintos complejos embebidos en las membranas del tilacoide. El LHCIb es la forma del LHCII que ha sido estudiada con mayor detalle y es la más abundante con un contenido medio del 40 % de la clorofila tilacoidal. Su composición consiste en 6-13 moléculas de clorofila por apoproteína y dos o tres moléculas de xantofila (Chitnis y Thornber, 1988). Aunque este complejo de antena ha sido aislado *in vitro* como un monómero, la microscopía electrónica ha demostrado que, *in vivo*, se agrupan en estructuras triméricas (Kuhlbrandt, 1984, Li, 1985).

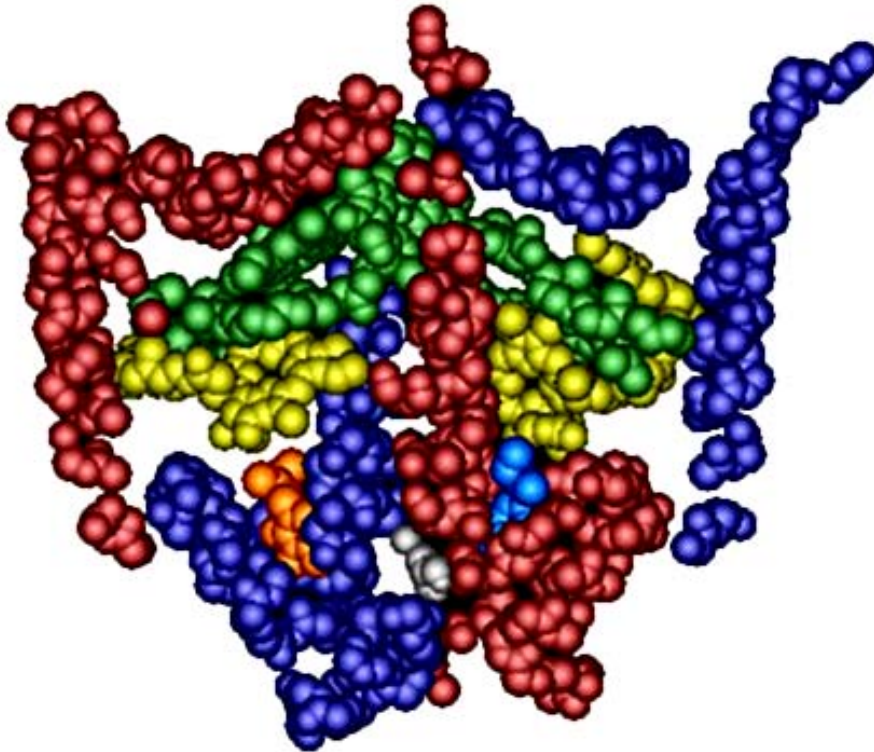


Figura 1.7: Estructura tridimensional del PSII. En el esquema se muestra una sección transversal de 15 Å. D1 está coloreada de azul, D2 de rojo, las clorofilas son verdes, las feofitinas amarillas,  $Q_A$  es azul claro,  $Q_B$  naranja, y el bicarbonato gris (Ruffle et al., 1992).

En los tilacoides apilados (grana) se encuentra una relación baja de Chl a/b, lo que indica una gran proporción de PS II. Por el contrario, los tilacoides del estroma tienen una relación de Chl a/b mayor, que es indicativa de una mayor concentración de fragmentos ricos en PSI (Chow et al., 1991).

#### 1.2.3.2 Cadena central de transporte

Los dos fotosistemas se encuentran conectados en un transporte electrónico lineal, que produce la reducción del NADP y un gradiente electroquímico de protones (Figura 1.8). El electrón que, desde  $Q_A$  es dirigido, vía  $Q_B$ , a la plastoquinona, que se transforma en

una plastohidroquinona, debe recorrer considerables distancias, dada la separación entre el fotosistema II y el complejo citocromo b<sub>6</sub>/f.

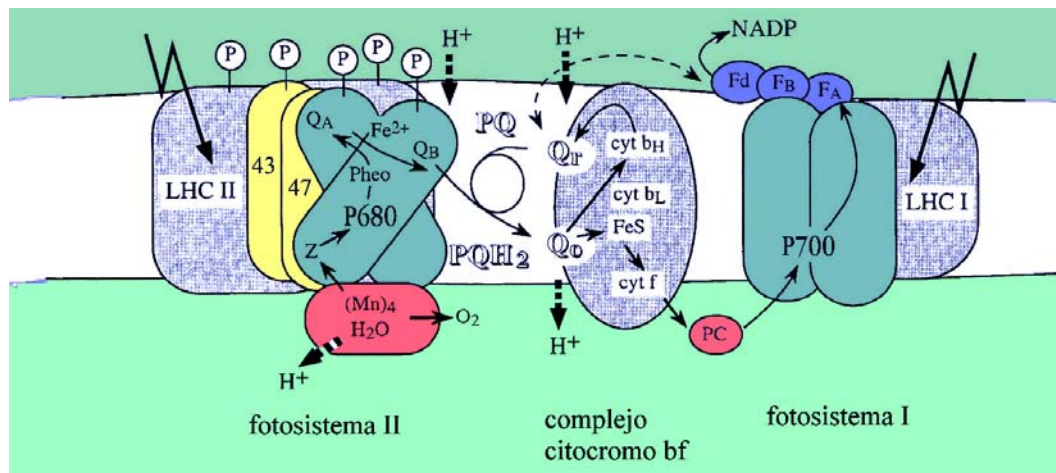


Figura 1.8: Representación del transporte lineal de electrones en la fotosíntesis.

#### 1.2.3.2.1 Citocromo b<sub>6</sub>f

Este complejo, es el intermediario en la transferencia de electrones entre los dos centros de reacción, y contribuye a la formación del gradiente de protones a través de la membrana tilacoidal.

En la Figura 1.9 se representa un esquema de cómo pueden estar distribuidos sus componentes a través de la membrana tilacoidal. Este complejo contiene, al menos, siete subunidades polipeptídicas, cuatro de las cuales tienen pesos moleculares superiores a 18 kDa (Cramer et al., 1997). La subunidad mayor es el citocromo f, que está unido covalentemente y orientado en un ángulo oblicuo al plano de la membrana (Martinez et al., 1994); el Cyt b está unido de forma no covalente en el interior de la bicapa lipídica; la siguiente en tamaño es la proteína de Rieske, que es un centro Fe-S (Takabe, 1987). Las tres subunidades menores son hidrofóbicas, están orientadas hacia el interior, y tienen unidos grupos prostéticos. Una de estas subunidades está unida a una molécula de Chl a como grupo prostético, algo que resulta bastante inusual. Las otras subunidades parecen

necesarias para estabilizar el complejo de este citocromo (Howe y Merchant, 1992; Wollman et al., 1995).

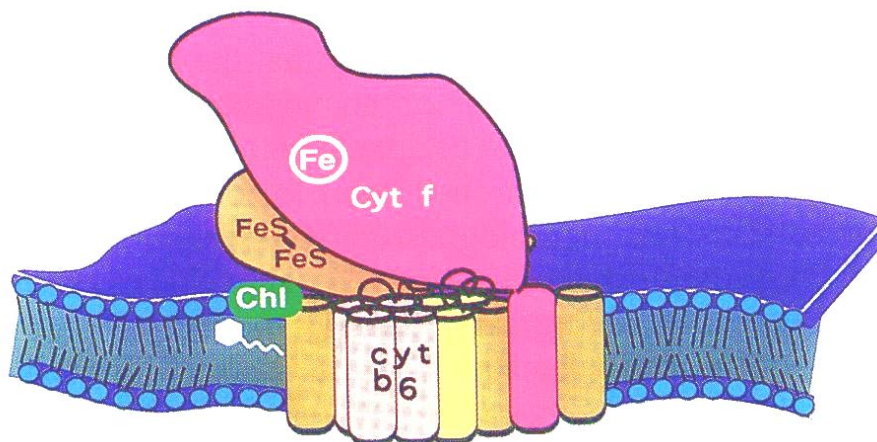


Figura 1.9: Esquema de la distribución de los componentes del complejo citocromo  $b_6f$  en la membrana del tilacoide. Embebidos en la membrana están el citocromo  $b_6$  (rosa pálido), la subunidad IV (amarillo) y otras tres subunidades denominadas PetL, PetM y PetG (marrón claro). Una de ellas lleva unida la molécula de Chl a (verde). Hacia el lado del lumen se encuentran el citocromo f (rosa) y la proteína de Rieske (naranja). (Adaptado de Cramer et al., 1997).

### 1.2.3.3 Fotosistema I

El fotosistema I (PSI) es un sistema multiproteico que se localiza, casi exclusivamente, en las lamelas del estroma (Krauss et al., 1993) y transfiere electrones desde la plastocianina reducida hasta la ferredoxina oxidada. La elevada energía que requiere este proceso ( $77 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) proviene de la luz. Está formado por 11-17 subunidades polipeptídicas, unas 90 moléculas de Chl a, 10-15 moléculas de  $\beta$ -caroteno, dos moléculas de filoquinona, y tres agrupaciones  $[4\text{Fe-4S}]$ . En la Figura 1.10 se muestra un esquema de cómo estarían ensambladas las subunidades que forman este fotosistema. El núcleo del sistema es un heterodímero formado por las unidades PSI-A y PSI-B. Este dímero se denomina CP1 y a él se unen los pigmentos, el centro de reacción P700 y los aceptores  $A_0$ ,  $A_1$  y  $F_x$  (Scheller et al., 1997).

La plastocianina (Pc), ferredoxina (Fd) y NADP-ferredoxina-oxidorreductasa (FNR) son proteínas solubles que funcionan como donadores y aceptores de electrones. Los electrones procedentes del fotosistema I llegan a la ferredoxina y reducen el NADP, a través de la NADP<sup>+</sup>-ferredoxinaoxidorreductasa.

La ferredoxina es una proteína no enzimática, de carácter ácido, esencial en la fotosíntesis y en la reducción de nitritos. En plantas superiores forma, con intervención del ATP, un agregado del tipo 2Fe-2S, cuyos polipéptidos están codificados por el DNA nuclear (Takahashi et al., 1996). Si se suministra ferredoxina a plantas deficientes en hierro se observa un incremento en la tasa de fotosíntesis (Miller et al., 1984).

El centro de reacción está formado por dos moléculas de Chl a y se denomina P-700, (absorben a 700 nm). En el PSI se genera el poder reductor en forma de NADPH. Dependiendo de los procedimientos de aislamiento, podemos encontrar un número variable de polipéptidos, cuyo peso molecular varía entre 50 y 70 kDa. Las proteínas de los centros de reacción del PSI se han aislado en diferentes especies y los pigmentos que lo constituyen son mayoritariamente Chl a y β-caroteno (Bigus et al., 1995).

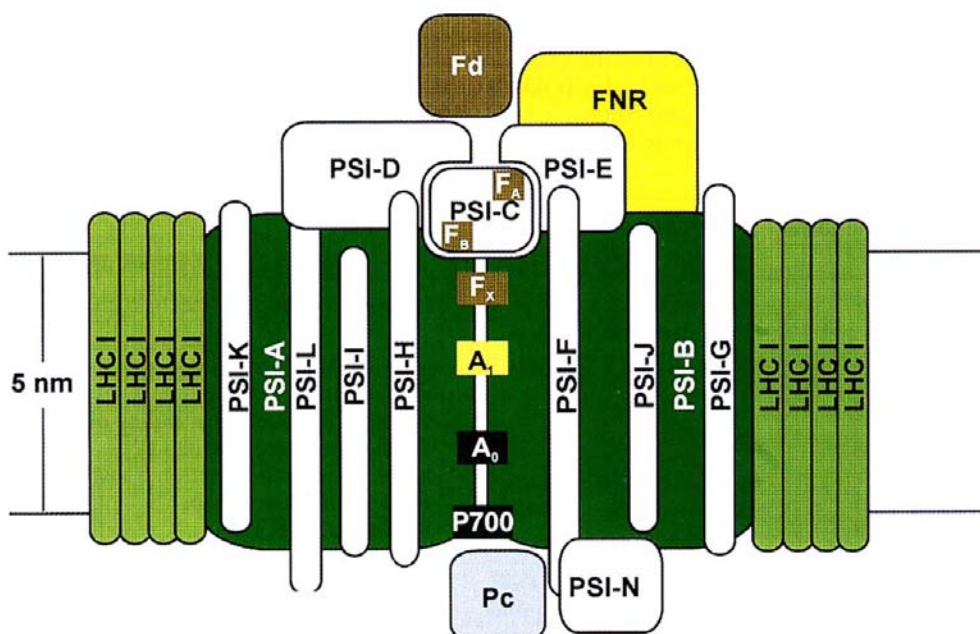


Figura 1.10: Modelo esquemático del PSI en plantas superiores (Adaptado de Scheller et al., 1997)

En cuanto a las unidades que forman la antena de este fotosistema (LHC I), se sabe que son hidrofóbicas, que contienen una o más regiones que cruzan la membrana y que contienen Chl a y Chl b (Golbeck, 1994; Chitnis et al., 1995).

#### 1.2.4 Pigmentos fotosintéticos

Se denominan pigmentos fotosintéticos a aquellas moléculas localizadas en las membranas tilacoidales de las plantas superiores y de las algas, que son capaces de absorber la energía radiante. Los dos pigmentos principales son las clorofilas *a* y *b*, pero los organismos fotosintéticos contienen otras sustancias que también absorben la luz y que se denominan pigmentos accesorios. Estos son los carotenoides y las ficobilinas. Los carotenoides, que se dividen en carotenos y xantofilas, se encuentran presentes en todos los organismos fotosintéticos. Las ficobilinas, cuyos principales constituyentes son la ficoeritrina y la ficocianina, existen en algunas algas y en las cianobacterias.

##### 1.2.4.1 Clorofilas

La clorofila es el principal pigmento absorbente de luz en la mayor parte de las plantas verdes. Contrariamente a lo que se pensaba hace unas décadas, la clorofila no se encuentra ligada a la matriz lipídica de la membrana tilacoidal, sino que aparece en su totalidad en forma de complejos pigmento - proteína. Las clorofilas son porfirinas, es decir, están constituidas por un anillo de cuatro pirroles asociados en posición “ $\alpha$ ”. En estas moléculas, los dobles enlaces se presentan, prácticamente, conjugados, de ahí que posean color. En las posiciones “ $\beta$ ”, las porfirinas poseen diversos sustituyentes según su naturaleza y, en el centro, contienen un átomo metálico con distinto grado de coordinación. Las porfirinas fisiológicas suelen poseer el pirrol en la posición IV invertido. Las clorofilas presentan el anillo pirrónico unido a un anillo isocíclico pentanómico, con un átomo de Mg quelato en el centro del tetrapirrol y un resto alcohólico en el pirrol invertido (Figura 1.11).



Las clorofilas son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos. Se pueden distinguir diversos tipos, pero en plantas superiores solo se encuentran la *a* y la *b*.

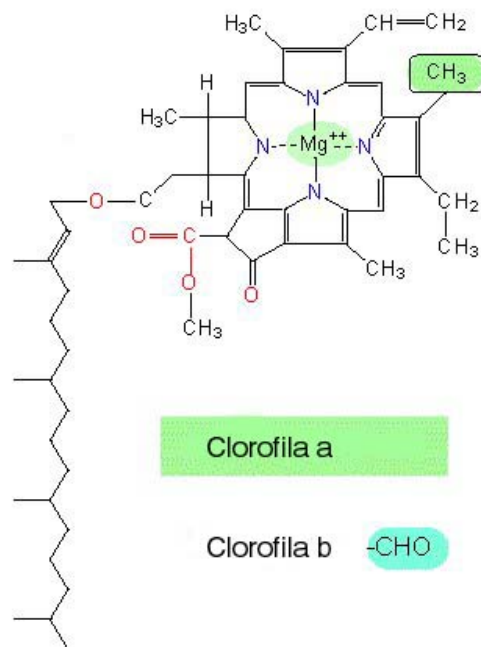


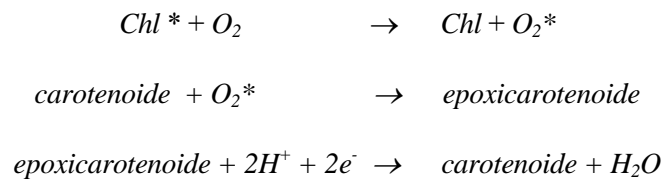
Figura 1.11: Estructura de la molécula de clorofila

#### 1.2.4.2 Carotenoides

Junto a las clorofilas, todos los organismos fotosintéticos contienen carotenoides en sus membranas tilacoidales. La mayor parte de los carotenoides de las plantas se encuentran en los cloroplastos de los tejidos verdes. Los carotenos constituyen el 5-40 % de los carotenoides y el  $\beta$ -caroteno es el más común. Los polienos poco coloreados se encuentran siempre en cantidades pequeñas en las hojas verdes normales. En los grana de los cloroplastos, los carotenoides se hallan, probablemente, asociados a proteínas. En el PS I existe más  $\beta$ -caroteno y en el PS II, más xantofilas.

Son muchas las hipótesis que se barajan sobre la función de los carotenoides, debido a la gran cantidad de procesos biológicos, fisiológicos y ecológicos en los que intervienen. A su función principal de captadores de luz en la antena del aparato

fotosintético hay que añadir la de protección de las clorofilas. Se ha demostrado que cualquier mutación que inhibe la síntesis de carotenoides sin afectar a las clorofilas es letal en presencia de luz y oxígeno. Los carotenoides son aceptores de oxígeno, la zeaxantina (Z) incorpora oxígeno molecular en un proceso dependiente de la luz formando mono- y diepóxidos. Estos por desoxigenación reductora, en presencia de protones, revierten a Z (Schindler y Lichtenthaler, 1996).



El hecho de que los epoxi-carotenoides se encuentren sólo en organismos fotosintéticos aeróbicos parece indicar que se originan a partir de carotenoides que actúan como aceptores de oxígeno.

Los carotenoides juegan, además, un papel funcional, dando lugar a coloraciones brillantes de los frutos, flores y semillas. Esta coloración se ha fijado en el camino evolutivo, y se puede explicar desde un punto de vista ecológico; es decir, la coloración de estas estructuras actúa como atrayente de algunos animales y, por consiguiente, condiciona algunos de los comportamientos de polinización y dispersión de frutos y semillas.

### **1.3 Factores abióticos que afectan a la fotosíntesis**

A pesar de que las reacciones químicas que convierten la luz solar en energía química tienen un gran rendimiento, la capacidad de estas reacciones es limitada. Por lo tanto, las plantas suelen absorber más energía luminosa que la que puede ser utilizada en la fotosíntesis. Sin embargo, numerosos factores ambientales pueden limitar la capacidad de las plantas para utilizar la energía que proviene de la luz.

### *1.3.1 Concepto de estrés*

A lo largo de esta Memoria, se hará referencia en numerosas ocasiones a situaciones de estrés para las plantas. El término “planta estresada” se ha utilizado por muchos autores en un sentido muy amplio, sin que exista un criterio único para definir el concepto. Para unificar criterios, a partir de este punto, se considerará que existe una situación de “estrés” cuando el metabolismo de la planta, su crecimiento o su desarrollo se vean bloqueados o limitados por cualquier sustancia o condición desfavorable (Lichtenthaler, 1996).

Hay que diferenciar también cuándo las condiciones desfavorables se producen a corto, medio o largo plazo; además, hay que separar las situaciones en que el estrés es compensado parcialmente por aclimatación, adaptación o mecanismos de reparación. Cuando la situación desfavorable es muy fuerte, o se prolonga en el tiempo, puede causar daños que pueden ser irreparables, incluso, la muerte de las células y de la planta.

Todos los organismos sufren estrés, pero la forma en que éste se manifiesta difiere según su grado de organización. Desde el punto de vista botánico, se puede describir como un estado en el cual el aumento de las necesidades conduce a la planta a una desestabilización inicial de sus funciones, que va seguida de una normalización y, posteriormente, de un aumento de la resistencia. Si se exceden los límites de tolerancia, puede producirse un daño permanente e incluso la muerte. Se puede concluir que el estrés está compuesto de elementos destructivos y constructivos: por un lado es un factor de selección y por otro, la clave para aumentar la resistencia (Larcher, 1987).

La forma en que las plantas son capaces de sobrevivir en ambientes “estresantes” y cambiantes ha sido objeto de numerosos estudios eco-fisiológicos (Eckstein y Robinson, 1996; Maury et al., 1996; Pugnaire et al., 1996; Martínez-Ferri et al., 2000). Se han investigado los efectos de las condiciones desfavorables en algún órgano de la planta, en concreto del aparato fotosintético. Por ejemplo, se ha invertido mucho esfuerzo en conocer los daños o efectos negativos que puede provocar el exceso de luz en el aparato fotosintético, sin embargo, algunos mecanismos de protección frente a esos posibles daños han sido caracterizados recientemente (Demmig-Adams, 1990).

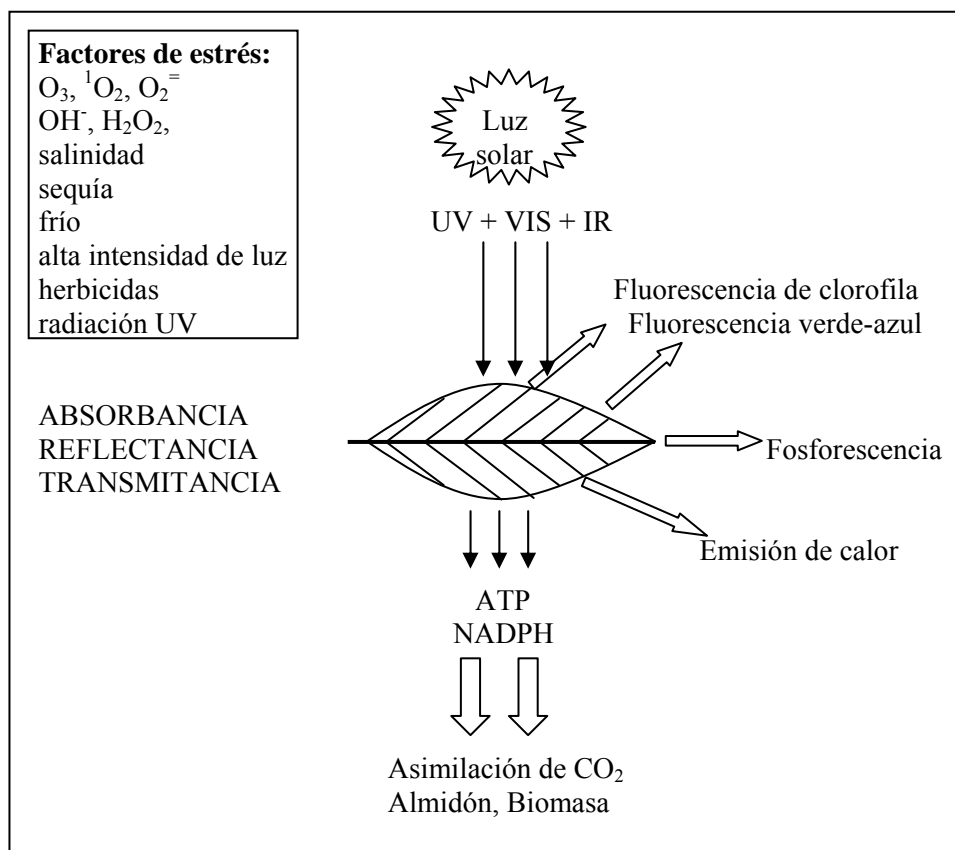


Figura 1.12: Esquema del flujo de energía fotónica en una hoja.

En la Figura 1.12 se representan los mecanismos que desarrollan las hojas para disipar el exceso de flujo de energía fotónica que recibe. Se incluyen también algunas sustancias y situaciones inductoras de estrés.

### 1.3.2 Métodos para evaluar los distintos factores que alteran el proceso fotosintético

Se han desarrollado técnicas, como la fluorescencia (Krause y Weis, 1984) o medidas de eficacia fotosintética que permiten “cuantificar” el estado del aparato fotosintético de las plantas, y evaluar el daño debido a alguna situación de estrés. En este trabajo se detallan cuatro métodos utilizados para intentar caracterizar las situaciones de

estrés: fluorescencia de clorofila, potencial hídrico, concentración foliar de prolina y concentración relativa de los pigmentos del ciclo de las xantofilas.

### 1.3.2.1 Fluorescencia de clorofila

La luz absorbida por los pigmentos fotosintéticos puede ser utilizada en las reacciones fotoquímicas, emitida en forma de fluorescencia de clorofila o disipada como energía térmica. La energía luminosa que sobrepasa la que puede ser utilizada por la cadena transportadora de electrones, tiene que ser disipada para evitar una acumulación de excitación que sería potencialmente dañina para el aparato fotosintético. Esta energía puede ser disipada en forma de calor o mediante una reemisión de fotones, este fenómeno se conoce con el nombre de fluorescencia.

En el aparato fotosintético, la luz es absorbida por los pigmentos contenidos en las estructuras responsables de su captación (LHC - light harvesting complex), la energía absorbida se transfiere a los centros de reacción de los dos fotosistemas y hace que se produzcan una serie de reacciones fotoquímicas. En resumen, el aparato fotosintético transforma la energía luminosa en energía química. En condiciones de baja radiación luminosa y estado óptimo, la energía capturada se invierte en las reacciones fotoquímicas primarias de la fotosíntesis (más del 90 %) y muy poca se disipa en forma de fluorescencia.

La fluorescencia emitida por la Chl a de las plantas refleja la actividad fotosintética, por lo que su medición constituye una herramienta poderosa en fisiología, ya que es, en la práctica, uno de los pocos métodos no destructivos para el análisis de muchos fenómenos (Krause y Weis, 1984).

#### 1.3.2.1.1 Cinética de la emisión de fluorescencia

Cuando una hoja adaptada a la oscuridad durante varios minutos se somete a una fuerte intensidad luminosa, la intensidad de la fluorescencia varía según una cinética compleja. Se produce un aumento rápido de la intensidad de la fluorescencia, seguido de

un descenso a un estado estacionario en el momento en que se han puesto en marcha los procesos fotosintéticos. Estos cambios se conocen como inducción de fluorescencia, transición de fluorescencia o, simplemente, efecto Kautsky (Kautsky et al., 1960), y se pueden clasificar en rápidos (menos de un minuto) o lentos (varios minutos). Tras la iluminación, la fluorescencia alcanza un nivel inicial ( $F_0$ ) donde la quinona aceptora de electrones  $Q_A$  se encuentra en estado completamente oxidado y la eficiencia fotoquímica del PSII es máxima. A partir de este momento aumenta hasta llegar al punto en el que  $Q_A$  está totalmente reducida, se denomina fluorescencia máxima ( $F_m$ ). Posteriormente, desciende de una manera más lenta debido a la reoxidación de  $Q_A$ , (los electrones se desplazan hacia el  $NADP^+$ ) y a la generación de un gradiente protónico. En la curva de inducción de fluorescencia, el aumento de  $F_0$  a  $F_m$  refleja la reducción de  $Q_A$  -centros abiertos- a  $Q_A^-$  -centros cerrados- (Govindjee, 1995).

La emisión de fluorescencia es un competidor minoritario en la desactivación del PSII, que en términos cuantitativos supone el 3 %, cuando todos los centros de reacción están cerrados ( $F_m$ ), (Figura 1.13) y tan solo el 0.6 % cuando todos están abiertos ( $F_0$ ) y hay competencia con las reacciones fotoquímicas primarias, mientras que en una disolución de clorofila en medio orgánico (etanol, acetona) esta fracción aumentaría hasta un 30 % de la luz absorbida. A temperatura ambiente, la mayor parte de la emisión de fluorescencia se debe a la Chl a del PSII (Krause y Weis, 1991).

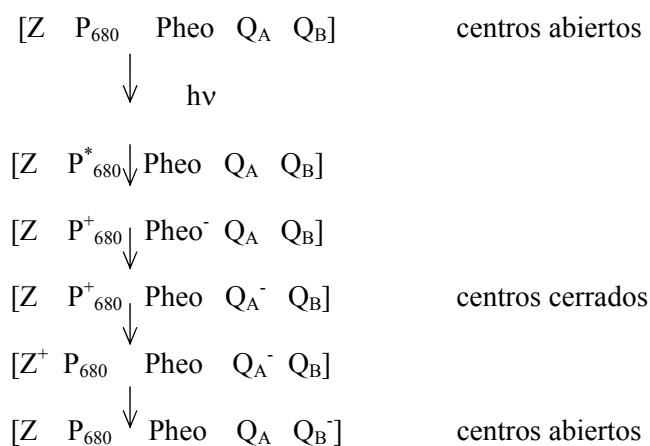


Figura 1.13: Reacciones fotoquímicas que se producen en el PSII.

Cualquier factor ambiental que reduzca la actividad fotosintética provoca cambios en los parámetros de fluorescencia. La medición de estos parámetros y sus relaciones proporcionan información sobre el estado del aparato fotosintético (Schreiber et al., 1986).

Si se mantiene una hoja en la oscuridad durante unos pocos minutos, y a continuación se ilumina, la fluorescencia que emite alcanza un pico en menos de un segundo, y después disminuye siguiendo una cinética más o menos sencilla. El análisis detallado de lo que sucede en los primeros segundos o fracciones de segundo (cinética rápida) puede dar información útil acerca de los procesos primarios de la fotosíntesis. La cinética más lenta de la curva está influida por la asimilación de CO<sub>2</sub>, pero este proceso, junto con la conversión de ATP y la síntesis de almidón, no ocurren en la membrana tilacoidal, donde se encuentra la clorofila, sino en el estroma. Para poder explicar cómo una ruta en la que no interviene físicamente la clorofila puede afectar a la fluorescencia emitida por ella, es necesario conocer en profundidad los mecanismos que intervienen (Krause y Weis, 1988).

Cuando el aceptor primario del fotosistema II (PSII) -Q<sub>A</sub>- está oxidado, (por ejemplo después de un tiempo de oscuridad) puede aceptar electrones que provienen del centro de reacción del PSII (P680) y cederlos a los aceptores que le siguen en la cadena transportadora de electrones y que, en orden, son: Q<sub>B</sub>, plastoquinona, fotosistema I y finalmente al NADP. Cuando Q<sub>A</sub> está completamente reducido, no puede aceptar más electrones y aumenta la probabilidad de que el exceso de energía sea disipado como fluorescencia. Por eso, cualquier mecanismo que permita que Q<sub>A</sub> se vuelva a oxidar, como sería la transferencia de electrones a NADP y finalmente la fijación de CO<sub>2</sub>, hace que disminuya la emisión de fluorescencia. Esta sería una de las vías de interacción entre la fijación del CO<sub>2</sub> y la fluorescencia, la otra sería el quenching energético o no fotoquímico (Walker, 1988).

Como ya es conocido, cuando se produce el transporte electrónico hay una entrada de protones al interior del tilacoide, lo que provoca la acidificación del espacio, produciéndose un gradiente de pH a ambos lados de la membrana. Cuando esto ocurre, hay más energía que se disipa en forma de calor y menos como fluorescencia. De acuerdo

con la teoría quimio-osmótica de Mitchell, el gradiente de protones y el gradiente eléctrico asociado constituyen la “fuerza” que, en presencia de ADP y fosfato inorgánico, es utilizada por la ATPasa para la síntesis de ATP. Si la velocidad de fijación de CO<sub>2</sub> es alta, la velocidad de fijación de ATP también es alta y, por tanto, la disipación del gradiente de protones también será rápida. A simple vista, la relación entre la fluorescencia de clorofila y la asimilación del CO<sub>2</sub> puede parecer distante, pero es notable la rapidez con la que la fluorescencia responde a cualquier factor que afecte a la síntesis de CO<sub>2</sub> (Walker, 1988).

#### 1.3.2.1.2 Mecanismo de quenching

En la curva de inducción de fluorescencia se denomina ‘*quenching*’ a la disminución del nivel de fluorescencia, desde el máximo (F<sub>m</sub>) hasta un nivel estacionario (F<sub>s</sub>) bajo iluminación con luz blanca, esta disminución o extinción de la fluorescencia es debida a una serie de procesos fisiológicos que determinan cada componente del quenching (Pospisil, 1997).

El mecanismo de quenching podría ser, en principio, bastante simple. Estudios físico-químicos han puesto de manifiesto que la clorofila no emite fluorescencia cuando, en solución, tiene una concentración similar a la que hay en el interior de la hoja. Esto puede ser atribuido a interacciones entre “dímeros estadísticos” que introducen niveles de energía adicionales que permiten rutas para la disipación de energía por vía térmica. Las clorofilas en la antena del centro de reacción del PSII están inmovilizadas por uniones a ligandos. Existen varios mecanismos que amortiguan (quench) la fluorescencia de la clorofila y se pueden clasificar en fotoquímicos y no fotoquímicos. Si la excitación de clorofila se canaliza como trabajo fotoquímico, no podrá ser disipada como fluorescencia. Por ello, todas las reacciones fotoquímicas que ocurren en el cloroplasto afectan a la fluorescencia de la clorofila, estas alteraciones son las que constituyen el quenching fotoquímico (NPQ).

Normalmente el quenching se cuantifica mediante unos ‘*coeficientes de quenching*’ ( $0 \leq q \leq 1$ ) que indican la proporción de fluorescencia máxima que es extinguida (Schreiber et al., 1986). Varios son los mecanismos de quenching que contribuyen a esta



disminución (Krause y Weis, 1988) y la resolución en sus distintas componentes proporciona gran información sobre el estado funcional del aparato fotosintético, y más específicamente sobre el PSII. Como se ha comentado con anterioridad, existe el fotoquímico y el no-fotoquímico. El denominado *quenching fotoquímico* ( $q_p$ ), se define como la proporción de fluorescencia extinguida debido a las reacciones fotoquímicas, es decir, la reoxidación de  $Q_A^-$  a  $Q_A$ , y representa la proporción de excitones capturados por los centros abiertos que es convertida en energía química en el centro de reacción del PSII. El *quenching no fotoquímico* (NPQ) al que contribuyen varios mecanismos que hacen disminuir la fluorescencia independientemente del estado de oxidación de  $Q_A$ . En la Figura 1.14 se representa de forma esquemática cada uno de estos coeficientes.

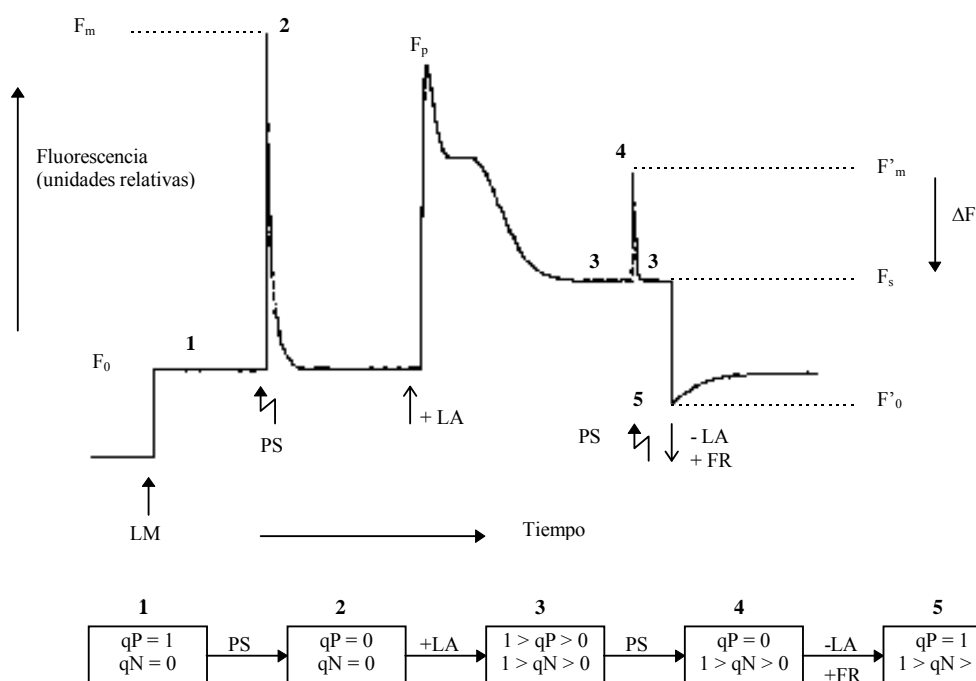


Figura 1.14: Principio del análisis de quenching por el método de los pulsos saturantes. Dependiendo de las condiciones de la luz se pueden distinguir 5 estados diferentes que corresponden a los diferentes niveles de fluorescencia en la curva ( $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F'_m$ ,  $F_s$  y  $F'_0$ ). LM: luz modulada de medida; PS: pulso saturante; LA: luz actínica (blanca); FR: luz en el rojo lejano.

### 1.3.2.2 Potencial hídrico

La medida del potencial hídrico es otra de las herramientas utilizadas para evaluar el grado de estrés al que está sometida la planta. Como en el caso de la fluorescencia, se puede considerar que se obtienen valores *in vivo*, porque se trabaja con brotes enteros. A diferencia de la fluorescencia, esta es una determinación destructiva, ya que hay que cortar una parte de la planta.

Cuando la planta no dispone de suficiente agua para su funcionamiento óptimo, en primer lugar cierra los estomas para evitar su pérdida. El cierre estomático va acompañado de una disminución de la fijación de CO<sub>2</sub>, y, por lo tanto, de la fotosíntesis junto con variaciones en su metabolismo (Stuhlfauth et al., 1990).

Las plantas pueden absorber agua a través de toda su superficie, pero la mayor parte del suministro proviene del suelo a través de las raíces. Pueden tomar agua del sustrato en la medida que el potencial hídrico de sus raíces finas es más negativo que el de la solución que hay en el suelo. Dentro de la planta, el agua se mueve según un gradiente de potencial hídrico, por difusión de una célula a otra (transporte a corta distancia), y por conducción a través del xilema (transporte a larga distancia). En este sistema, las plantas hacen de puente entre el suelo y la atmósfera, los brotes y las hojas están expuestos a la presión de vapor del aire (que tiene un potencial hídrico menor), por lo que se crea un flujo de agua a través de ellas. Mediante este mecanismo se consigue toda el agua necesaria para la vida y crecimiento de los organismos vegetales. Cuando la cantidad de agua en el suelo disminuye (en épocas de sequía), es necesario aumentar la fuerza de succión para absorber la cantidad necesaria y, si esta situación se prolonga, las plantas pueden morir. En invierno, a pesar de que es una estación en la que se producen precipitaciones, las plantas pueden tener dificultad para obtener agua, debido a problemas de congelación o, simplemente, porque en suelos fríos la absorción de agua es más difícil, debido a la mayor viscosidad de ésta (Tranquilini, 1982).

La determinación del potencial hídrico proporciona una medida del estado hídrico en que se encuentra la planta en un momento dado. Se suele realizar en dos momentos del día, al alba, (la planta está en equilibrio con el suelo), y a medio día, momento en que la transpiración es máxima (Loewenstein y Pallardy, 1998).

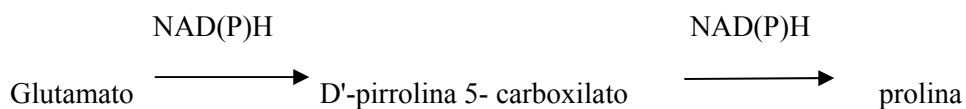
### 1.3.2.3 Acumulación de prolina como respuesta al estrés hídrico

Otra de las técnicas analíticas utilizadas para evaluar el estado de la planta, ha consistido en utilizar un marcador que responde a situaciones de estrés hídrico. Se ha sugerido que la concentración foliar de prolina libre es un índice muy útil para evaluar el déficit de agua (Lansac et al., 1994).

Muchos organismos, incluidas las especies adaptadas a ambientes mésicos, o hábitats áridos, acumulan aminoácidos libres durante los periodos de estrés hídrico. De todos los aminoácidos que se acumulan, el que lo hace en mayor cantidad es la prolina. La acumulación de prolina en situaciones de estrés hídrico ha sido descrita en bacterias, algas y plantas superiores (Paleg y Aspinal, 1981). A pesar de que la prolina se acumula en distintos órganos de la planta durante el déficit hídrico, parece que es en la hojas donde este aumento es más rápido y acusado (Singh et al., 1973). La acumulación de prolina libre en los tejidos de muchas especies como respuesta a distintos tipos de estrés (salinos, térmicos o por sequía), ha sido asociado con la posibilidad de que este aminoácido actúe como un osmolito, como un agente protector de las enzimas del citoplasma, como una reserva de carbono y nitrógeno para el crecimiento posterior al estrés o incluso como un estabilizador de la maquinaria para la síntesis de proteínas (Martínez et al., 1996).

En el caso de plantas halófitas, se ha encontrado una buena correlación entre la capacidad para acumular prolina y la tolerancia a la salinidad, lo que parece sugerir que la prolina podría ser una fuente de solutos para los ajustes osmóticos intracelulares en condiciones salinas (Stewart y Lee, 1974).

La prolina se forma a partir del ácido glutámico, la ruta que tiene lugar es:



Según Joyce et al. (1992), la acumulación de prolina está afectada por la tasa fotosintética, de manera que varía según las condiciones de cada momento. Los resultados que obtienen estos autores evidencian que la síntesis de prolina no se puede abastecer de los átomos de C que vienen de la fijación de CO<sub>2</sub>. Esto no pasa ni siquiera

cuando la planta ha estado previamente en la oscuridad y, por lo tanto, carece de carbohidratos sintetizados.

Una de las últimas hipótesis acerca del papel de la acumulación de prolina en situaciones de estrés ha sido propuesta recientemente por Hare y Cress (1996). Según estos autores, la acumulación de este aminoácido puede reducir la acidificación celular producida por el estrés y también la respiración oxidativa suministrando la energía necesaria para la recuperación.

#### 1.3.2.4 El ciclo de las xantofilas

Por último, el estudio de la concentración relativa de los pigmentos implicados en el ciclo de las xantofilas es otra herramienta útil para evaluar el grado de estrés al que está sometido el aparato fotosintético de una planta. La forma de relacionar dicha concentración con alteraciones del aparato fotosintético se describe a continuación.

### **1.4 El ciclo VAZ como marcador de estrés**

El ciclo de las xantofilas está ampliamente distribuido en la naturaleza y se localiza en las membranas tilacoidales de plantas superiores, hongos y algas. Existen dos variantes del ciclo, el de la violaxantina, que es el más común, y se da en las plantas superiores y, el ciclo de la diadinoxantina en algunos tipos de algas (Adamska, 1997). Todas las plantas, excepto las fotobacterias y tres grupos de algas, contienen este ciclo en alguna de sus dos variedades. Las algas que no lo tienen (las algas rojas, las azules y las criptofíceas) contienen en su defecto ficobilinas (Hager y Stransky, 1970 a, b, c). Estos organismos están filogenéticamente muy relacionados y son bastante primitivos. En algunas macroalgas marinas, el ciclo no está presente, pero se ha descrito la formación de zeaxantina en condiciones de alta intensidad de luz (Vershinin y Kamnev, 1996). También se han encontrado bacterias marinas capaces de sintetizar zeaxantina y transportarla a otros organismos de los que son huéspedes, como ciertas esponjas (Miki et al., 1996). Virtualmente, todos los organismos que realizan la fotosíntesis aeróbica tienen la posibilidad de sintetizar zeaxantina. Las cianobacterias carecen de estos ciclos, pero en

condiciones de alta intensidad luminosa, son capaces de sintetizar zeaxantina a partir de  $\beta$ -caroteno (Demmig-Adams, 1990).

La exposición de las plantas a una radiación superior a la que puede ser usada en el proceso de la fotosíntesis induce cambios en el ciclo de las xantofilas, caracterizados por la conversión de violaxantina en anteraxantina y posteriormente en zeaxantina, mediante una serie de epoxidaciones inducidas por la luz. La zeaxantina y, posiblemente, la anteraxantina, son capaces de “atrapar” el exceso de energía presente en la antena fotosintética y disiparla en forma de calor (Eskling et al., 1997).

La fotoinhibición ha sido definida como el proceso que provoca daños en el aparato fotosintético, aunque recientemente se cree más en un proceso de regulación en el que disminuye considerablemente la fotosíntesis sin que realmente llegue a observarse un daño directo en las estructuras fotosintéticas. En el momento en que el aparato fotosintético se encuentra inactivo, por alguna causa, la energía que, en condiciones normales podría ser utilizada en la fotosíntesis, resulta excesiva y se produce la fotoinhibición. Las causas por las que se desencadenan procesos asociados a la fotoinhibición son diversas, puede estar provocada por las bajas temperaturas invernales o por el estrés hídrico debido a la ausencia de precipitaciones durante el verano (Björkman y Powles, 1984; Ludlow y Björkman, 1984).

Los procesos de fotoprotección actúan disipando la energía de excitación que llega a la molécula de clorofila y que no se puede utilizar en las reacciones fotoquímicas. Mientras la energía absorbida por la clorofila no es excesiva, es decir, puede ser utilizada en la fotosíntesis, el ciclo se encuentra en forma de violaxantina, que normalmente es la que predomina en las membranas fotosintéticas. Cuando la energía absorbida por la clorofila resulta excesiva, bien por un aumento de la intensidad de radiación o porque el aparato fotosintético haya sufrido algún cambio y no esté operativo al 100 %, el pH del lumen disminuye hasta 5 (valor óptimo de la enzima violaxantina desepoxidasa), produciéndose la conversión de violaxantina en anteraxantina y posteriormente en zeaxantina. Se ha sugerido que ambos pigmentos, zeaxantina y anteraxantina, actúan como intermediarios en el proceso de fotoprotección del aparato fotosintético (Verhoeven et al., 1999 a,b). Cuando las condiciones se vuelven favorables y la energía recibida no

excede a la que puede ser utilizada en la fotosíntesis, la zeaxantina vuelve a convertirse en anteraxantina y violaxantina por la acción de la enzima zeaxantina oxidasa (Adams y Demmig-Adams, 1994).

Aunque la existencia del ciclo fue descubierta a finales de los cincuenta (Sapozhnikov et al., 1957), los verdaderos avances en la elucidación de sus funciones se produjeron cuando Demmig et al. (1987) lo relacionaron con la disipación del exceso de energía luminosa. Desde entonces, se han hecho estudios que ponen de manifiesto la existencia de buenas correlaciones entre el contenido de zeaxantina y la disipación del exceso de energía mediante mecanismos no fotoquímicos que protegen los centros de reacción del PSII frente a una excitación dañina (Demmig-Adams y Adams, 1992b; Gilmore, 1997). A pesar de que el mecanismo por el que la zeaxantina es capaz de disipar el exceso de energía de forma no-fotoquímica, sigue siendo motivo de debate (Owens, 1996; Ruban y Horton 1999), está aceptado que la disipación de energía por esta vía tiene lugar en las antenas del PSI y del PSII (Bassi et al., 1997).

#### *1.4.1 Avances en el conocimiento del ciclo de las xantofilas*

Desde las primeras investigaciones realizadas por Sapozhnikov et al. (1957) se ha sabido que, en las plantas superiores y en algunas algas, la concentración de un epóxido denominado violaxantina (V) disminuye cuando los organismos son sometidos a iluminación. El desarrollo de las técnicas cromatográficas permitió a Yamamoto et al. (1962) la separación de los carotenoides isómeros del ciclo de las xantofilas.

En la Figura 1.15 se muestran las estructuras de los tres epoxi-carotenoides implicados en el ciclo VAZ. Como puede observarse, su estructura sólo difiere en la incorporación de un átomo de oxígeno a la molécula. La estructura de las xantofilas es muy similar a la de otros carotenos de las plantas, por lo que podría pensarse que derivan del  $\beta$ -caroteno, como ha sido propuesto por algunos autores (Hundle et al., 1993; Albrecht et al., 1999; Lagarde y Vermaas, 1999).

El ciclo tiene lugar en los cloroplastos, prueba de ello es que en orgánulos aislados también se produce la desepoxidación. Sin embargo, esta conversión sólo tiene lugar si en

su centrifugación y resuspensión se añade ácido ascórbico. Aunque el volumen de los cloroplastos es el 10 % del total de la célula, su contenido relativo en ácido ascórbico es de un 40-50 %. La mayor parte de los pigmentos que constituyen el ciclo de las xantofilas se encuentran en el cloroplasto. Los estudios relacionados con la localización del ciclo en la membrana tilacoidal concluyen que la desepoxidación de la V ocurre en la misma extensión tanto en los tilacoides granales, como en los expuestos al estroma (Yamamoto, 1979; Schäfer et al., 1994; Bouvier et al., 1998). La presencia del ciclo VAZ en el LHCII es evidente si tenemos en cuenta que estos pigmentos están involucrados en la regulación del flujo de energía hacia los centros de reacción del PSII, mediante la desexcitación no radiante en la antena. Se ha encontrado que los pigmentos del ciclo de las xantofilas están asociados con polipéptidos de antena (Bassi et al., 1993; Ruban et al., 1994) y, dentro de estos polipéptidos, están asociados principalmente con las proteínas CP29 y CP26 de las antenas próximas al centro de reacción (Goss et al., 1997). También se ha evidenciado la presencia del ciclo en la antena del fotosistema I (Lee y Thornber, 1995), que junto con el  $\beta$ -caroteno, presente en alta concentración (Damm et al., 1987), podrían ejercer funciones protectoras para el centro de reacción de este fotosistema.

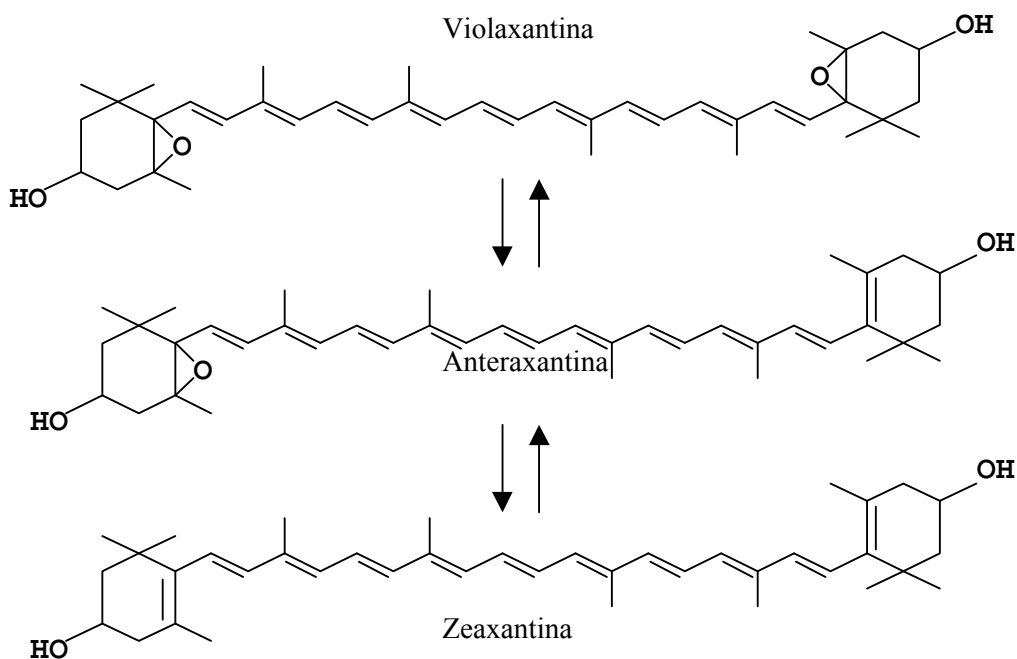


Figura 1.15: Estructura de la molécula de zeaxantina, anteraxantina y violaxantina

La reacción de desepoxidación está catalizada por una enzima desepoxidasa, (Hager, 1980) que se encuentra en la membrana interna del tilacoide en la región del lumen, se activa a un valor de pH próximo a 5 y necesita la presencia de ascorbato en el medio. Esta enzima fue purificada por Yamamoto (1979) y es una lipoproteína que en su estructura sólo contiene monogalactosildiglicéridos. El gen ha sido clonado y secuenciado de *Lactuca sativa* (Bugos y Yamamoto, 1996), *Nicotiana tabacum* (Bugos et al., 1999) y *Arabidopsis thaliana* (Bugos et al., 1998). El péptido encontrado es similar a otros localizados en el lumen. La actividad de esta enzima está controlada por el pH del lumen. Así, a un pH inferior a 6.6 la enzima se une a la membrana del tilacoide, el ascorbato capta un protón y se transforma en ácido abscísico ( $pK_a = 4.2$ ) que, en definitiva, es el verdadero sustrato para la violaxantina - desepoxidasa. Las propiedades y localización de la enzima V- desepoxidasa, responsable de la transformación de V en Z, se estudiaron utilizando vesículas de membranas de tilacoides aisladas de *Spinacia oleracea* sin usar detergentes (Havir et al., 1997). Si se tratan los tilacoides mediante ciclos de congelado – descongelado, la enzima queda liberada en el medio. Con esta misma técnica, también se libera la plastocianina, que está implicada en la cadena de transporte electrónico. La unión de la enzima a las vesículas también depende del pH, a partir de pH 6.5 empieza a ser más difícil separarla, y a pH 5 resulta casi imposible. De estos resultados se puede concluir que el enzima V desepoxidasa se encuentra, al igual que la plastocianina, libre en el lumen del tilacoide a valores de pH próximos a 7, condiciones que, *in vivo*, se dan en la oscuridad. Sin embargo, bajo una fuerte iluminación, cuando el pH del lumen desciende por debajo de 6.5, se forma un gradiente de protones a través de la membrana, y las propiedades de la enzima se alteran uniéndose fuertemente al tilacoide. Estos hallazgos están de acuerdo con un modelo en el que las dos enzimas del ciclo VAZ se sitúan a ambos lados de la membrana del tilacoide (Hager y Holocher, 1994). La enzima violaxantina – desepoxidasa es una proteína de 43 kDa (Akerlund et al., 1995, Rockholm y Yamamoto, 1996) y se encuentra en la proporción de una molécula por cada 20-100 cadenas transportadoras de electrones (Arvidsson et al., 1996). La reacción de desepoxidación es un proceso rápido que, en condiciones de temperatura ambiente, se produce en aproximadamente 10 minutos, sin embargo, la



reacción inversa es mucho más lenta, y no se consiguen los niveles iniciales hasta que no ha transcurrido varias horas (Morales et al., 1990).

La reacción de epoxidación estaría catalizada por la zeaxantina epoxidasa. Esta enzima requiere FAD (dinucleótido de riboflavina y adenina) como cofactor y parece que usa la ferredoxina en lugar del NADPH como reductor. La zeaxantina epoxidasa no ha sido aislada hasta el momento, pero su gen ha sido secuenciado y se ha encontrado que expresa una proteína funcional de 72.5 kDa (Marin et al., 1996). La formación de zeaxantina a partir de violaxantina, pasando por el intermedio anteraxantina, tiene su máxima actividad a pH 7-7.5, que es similar al del estroma (Siefertmann y Yamamoto, 1975). La reacción ocurre en la oscuridad, pero parece que se estimula por luz débil (Hager, 1966).

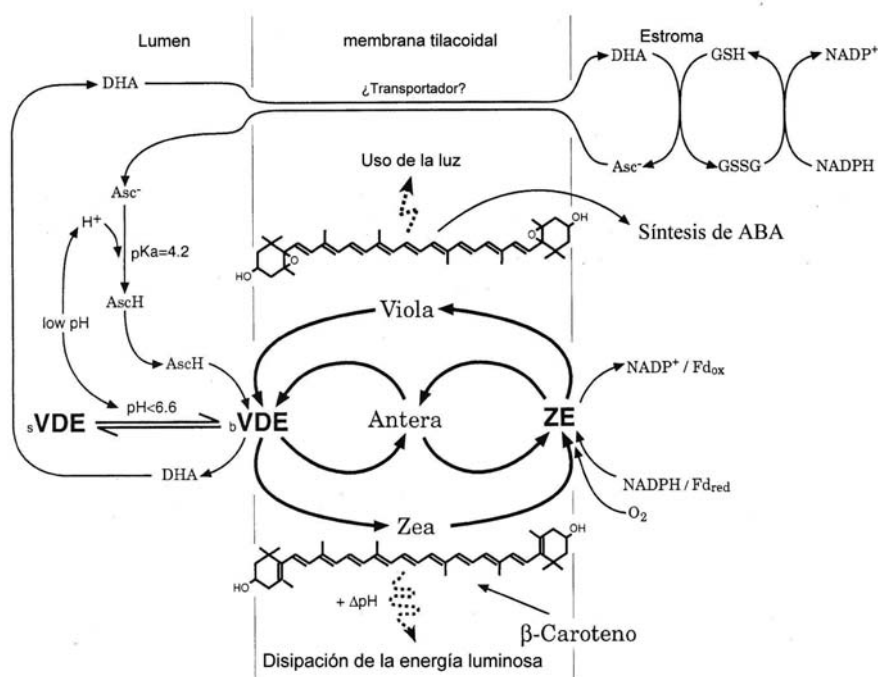


Figura 1.16: Esquema simplificado de la organización de la membrana del tilacoide, en el que se indica la conexión entre la fotosíntesis y el ciclo de las xantofilas. Adaptado de Eskling et al. (1997).

En la Figura 1.16 se muestra un esquema simplificado de la organización del ciclo, sus cofactores y sustratos, a través de la membrana del tilacoide.

#### 1.4.2 *Hipótesis sobre la función del ciclo de las xantofilas*

Durante los últimos años, se ha prestado mucha atención a la función protectora que tiene la Z. El papel que se ha dado a la Z se basa en las medidas de quenching de fluorescencia y en la gran correlación que se ha encontrado entre el quenching no fotoquímico y la concentración de Z (y A) (Demmig-Adams y Adams, 1996b). Otras funciones que se le han asignado a este ciclo han sido la de protector contra el estrés oxidativo de los lípidos de la membrana (Havaux et al., 1991), modulación de la fluidez de la membrana (Havaux y Gruszecki, 1993) y regulación de la síntesis del ácido abscísico (Marin et al., 1996). Por último, Gruszecki et al. (1996) encontraron que la conversión de V en Z tiene como resultado un aumento del transporte electrónico cíclico alrededor del PS II, disminuyendo el flujo electrónico vectorial que comienza con la fotólisis del agua.

##### 1.4.2.1 Quenching del exceso de energía en el fotosistema II

Actualmente, el papel de la zeaxantina y del ciclo de las xantofilas como protectores contra la fotodestrucción, está basado casi exclusivamente en su correlación con las medidas de fluorescencia. Como el componente mayoritario de la fluorescencia, a temperatura ambiente, proviene del PSII, la mayor parte de los estudios funcionales se han centrado en este fotosistema. Pero, de igual modo que estos pigmentos son capaces de proteger al PSII, es posible que protejan al PSI, aunque la información a este respecto sea todavía escasa (Zhu et al., 1997). En cualquier caso, el PSI es mucho más estable que el PSII, por lo que para que sufra daños, es preciso que el PSII se haya alterado previamente.

Las plantas superiores deben disipar la energía luminosa que excede su capacidad fotosintética para evitar el daño molecular a los pigmentos y proteínas que constituyen el

aparato fotosintético. El calor es una de las formas de disipar la energía en exceso, que se puede medir mediante el cálculo del quenching no fotoquímico (NPQ) de la Chl a del PSII. El mecanismo del NPQ está regulado por la magnitud del gradiente de pH que se genera a través de la membrana del tilacoide, y en especial por los pigmentos del ciclo VAZ. En el mecanismo del NPQ, la movilidad de los grupos desepoxidados de Z y A así como su orientación en la membrana, están fuertemente afectadas por las interacciones con las clorofilas protonadas que están unidas a los complejos pigmento – proteína de la antena interna del PSII. Los sitios protonados de estos complejos y las diferentes etapas están muy influidas por el dominio protónico contenido en el interior del centro proteo-lipídico del centro de la membrana del tilacoide. El hecho de que en las proximidades a estos puntos haya una elevada concentración de los pigmentos del ciclo VAZ puede explicar por qué cambios en otros puntos periféricos de la antena no tienen necesariamente que modificar la concentración de pigmentos del ciclo de las xantofilas ni en base a unidades de PSII, ni en base al mecanismo del NPQ (Gilmore, 1997). Se han propuesto diferentes hipótesis para explicar el papel protector de este ciclo. Así, Demmig-Adams (1990), propone que la deepoxidación de los pigmentos del ciclo es la responsable de la disipación del exceso de energía radiante. Adams et al. (1999) sostienen la hipótesis de que se producen cambios muy rápidos en la acidificación de los tilacoides. Por otra parte, según Lichtenthaler et al. (1992) los pigmentos del ciclo son capaces de mitigar el daño causado por especies dañinas de oxígeno, y Schubert et al. (1994), haciendo experimentos en algas, observaron que la presencia de una determinada cantidad de estos pigmentos contribuye a disminuir el daño producido por exceso de luz.

La Z se diferencia de la V en que carece de grupos epóxido, lo que hace que la longitud de la cadena de dobles enlaces conjugados sea mayor, pasando de 9 en V a 11 en Z. Estos cambios implican diferencias fotofísicas y físico-químicas. La cuestión que se plantea a continuación es la siguiente, ¿cuáles son las propiedades que explican su papel en NPQ?

- Efectos físico-químicos:

La Z adopta una conformación plana, debido a sus dobles enlaces, mientras que en la V los grupos epóxido sobresalen de este plano. Estos efectos no explican

automáticamente el papel del ciclo de las xantofilas en el quenching, pero hacen que se esperen marcadas diferencias en sus interacciones con los complejos pigmento – proteína de la antena (Young y Frank, 1996).

- Efectos fotofísicos:

Experimentos relacionados con la transferencia de energía desde los pigmentos del ciclo de las xantofilas a la clorofila de la antena indican que puede haber transferencia de energía desde V a Chl a, como se podría esperar en un pigmento de la antena fotosintética, pero no desde Z a Chl a (Frank et al., 1996). Sin embargo, sí que puede haber transferencia de energía de moléculas de Chl a hacia moléculas de Z, esto sería la base del mecanismo de quenching de fluorescencia (Frank et al., 1996).

El mecanismo propuesto para explicar el NPQ implica las siguientes etapas:

- Transferencia de protones inducida por la luz
- Unión de protones a uno o más polipéptidos de la antena LHCII
- Transiciones conformacionales en LHCII que darán como resultado la formación de un elemento “quencher”.

La conversión de V en Z es una parte integrante del proceso de formación de un complejo, capaz de inducir el quenching, que involucraría a la clorofila unida a la antena LHCII. Este complejo puede ser Chl-Zea o bien Chl-Chl. En el primero, el quenching proviene directamente de la transferencia de energía a la Z, pero en el segundo, las xantofilas modulan la formación del complejo.

Sin embargo, los experimentos de Tardy y Havaux (1996) ponen en entredicho la función de protección que se ha asignado a estos pigmentos por el resto de los autores. Ellos, trabajando con un mutante de *Arabidopsis thaliana* en el que todos los pigmentos del ciclo se encuentran inicialmente en la forma zeaxantina, encontraron que no había diferencias en el NPQ entre las hojas del mutante y las del control. Por tanto, concluyen que no se puede relacionar directamente la función del ciclo con la disipación del exceso de energía en forma térmica. Más aún, según estos autores, la función de estos pigmentos no se basa en la transformación de violaxantina en zeaxantina.

#### 1.4.2.2 Protección contra el estrés oxidativo de los lípidos de la membrana.

Según Havaux et al. (1991), el estrés producido por altas intensidades de luz en plantas de guisante, es concomitante con la degradación de los lípidos de la membrana tilacoidal. Estos autores sugieren que el ciclo VAZ es un mecanismo de adaptación diseñado para proporcionar, en condiciones de baja iluminación, un pigmento accesorio (violaxantina) que, en alta irradiación, se convierte en zeaxantina protegiendo a los lípidos y otros componentes de la membrana tilacoidal. Sarry et al. (1994), trabajando con hojas de tabaco, demostraron que a bajas temperaturas, que provocan la inactivación del ciclo VAZ, se produce gran cantidad de etano, que indica la peroxidación de lípidos, mientras que a temperatura ambiente se produce gran cantidad de zeaxantina y la producción de etano disminuye drásticamente. Estos resultados fueron confirmados por Havaux y Niyogi (1999) trabajando con un mutante de *Arabidopsis thaliana*, que tiene inactivada la violaxantina desepoxidasa, encontrando que la exposición prolongada de estas plantas a la luz intensa producía mayor peroxidación de lípidos que la encontrada en plantas control.

#### 1.4.2.3 Modulación de las propiedades físicas de la membrana

Los experimentos realizados por Tardy y Havaux (1997), relacionan los cambios en la concentración de zeaxantina con la rigidez de la membrana tilacoidal que se producen cuando las hojas se exponen a la luz. La incursión de las moléculas del ciclo en las membranas tilacoidales disminuye la fluidez de la membrana, aumenta su termoestabilidad y la hace más resistente a la peroxidación de sus lípidos (Sarry et al., 1994; Havaux, 1998). Havaux y Gruszecki (1993), utilizando hojas de patata, mostraron que cuando se acumulaba zeaxantina, en ausencia de condiciones de fotoinhibición, algunas de las características del aparato fotosintético, como la estabilidad del PSII o la movilidad de la plastoquinona en la matriz lipídica del tilacoides, resultaban modificadas.

#### 1.4.2.4 Intermediario en la ruta de síntesis del ácido abscísico

Según Marin et al. (1996), la formación de zeaxantina contribuye a disminuir la síntesis de ácido abscísico en condiciones de estrés. El ácido abscísico (ABA) es una

hormona de las plantas que interviene en una gran variedad de procesos fisiológicos, como son la adaptación al estrés ambiental y el desarrollo de las semillas. En las plantas superiores, el ABA es un intermediario en la ruta de los carotenoides. El gen ABA2 de *Nicotiana plumbaginifolia* codifica la zeaxantina epoxidasa, que es la enzima que cataliza la conversión de Z a V (Frey et al., 1999). Los cambios en la expresión del gen de la zeaxantina epoxidasa regulan la biosíntesis de ABA en semillas y raíces, pero no en las hojas. Este dato podría esperarse si se considera el papel de las xantofilas en la fotoprotección de la fotosíntesis (Audran et al., 1998).

#### 1.4.3 *Influencia de las condiciones ambientales en la expresión del ciclo*

En el apartado anterior se han descrito los posibles mecanismos mediante los que el ciclo de las xantofilas es capaz de contribuir a disipar el exceso de energía en la fotosíntesis. Independientemente de cual sea el mecanismo de protección, está claro que intervienen en la disipación del exceso de energía que llega al aparato fotosintético. Esta energía puede resultar excesiva, bien porque el aparato fotosintético haya sufrido alguna alteración, o bien porque se haya producido un aumento rápido de la intensidad que alcanza las estructuras fotosintéticas. El grado de conversión de violaxantina en zeaxantina y la cantidad total de estas xantofilas presentes en la antena proporcionan información sobre la susceptibilidad a la fotoinhibición en un momento determinado.

##### 1.4.3.1 Alteraciones nutricionales

Ciertas alteraciones nutricionales de la planta también tienen como resultado variaciones en el rendimiento fotosintético, por lo que resulta lógico esperar cambios en las concentraciones de los pigmentos del ciclo de las xantofilas. En condiciones de deficiencia de hierro, Morales et al. (1994) encontraron que, los cambios en el NPQ inducidos por esta deficiencia, también estaban asociados con cambios en la composición del ciclo VAZ. Las variaciones en la concentración de todos los pigmentos fotosintéticos parecen lógicas, debido a que la deficiencia de hierro produce alteraciones en la composición de la membrana fotosintética y, en concreto, en las proporciones de

complejos pigmento-proteína (Abadía et al., 1989). Los síntomas de la deficiencia de hierro se manifiestan con claridad en las hojas jóvenes, que se vuelven amarillas (cloróticas) debido a la disminución en el contenido de clorofila. La deficiencia de hierro reduce la concentración de todos los pigmentos fotosintéticos por unidad de área foliar (Val et al., 1987; Abadía et al., 1989). También se ha encontrado una disminución en la relación *Chl/carotenoides*. Estos dos hechos parecen estar relacionados, y explicarían por qué la disminución de xantofilas es menos acusada que las que sufren las clorofilas y el  $\beta$ -caroteno (Bolle-Jones y Notton, 1953; Monge et al., 1987). En cuanto a los cambios en la relación *Chl a/b*, hay autores que han descrito aumentos (Brinda, 1980; Terry y Abadía, 1986) y otros que no han encontrado diferencias significativas (Spiller y Terry, 1980; Botril et al., 1970). Según Val et al. (1987), esta aparente contradicción podría explicarse teniendo en cuenta que la relación *Chl a/b* sólo varía en condiciones de deficiencia de hierro severa, es decir, cuando la clorofila total no llega a alcanzar  $10 \mu\text{g cm}^{-2}$ .

Las variaciones del ciclo VAZ con relación al total de clorofilas y el grado de conversión de V a Z se modifican en condiciones de deficiencia de hierro (Abadía et al., 1991).

Además del hierro, otras alteraciones nutricionales modifican el ciclo VAZ; Verhoeven et al. (1997) demuestran que, en hojas de espinaca con deficiencia de nitrógeno, el ciclo de las xantofilas contribuye a disipar el exceso de energía, resultados que se confirman con los obtenidos por Ramalho et al. (1997, 2000) en hojas de café cultivadas a distintas concentraciones de nitrógeno.

#### 1.4.3.2 Ajustes rápidos en el ciclo de las xantofilas

El tipo de respuesta del ciclo es flexible y depende de condiciones ambientales, como la intensidad de luz y la temperatura. En condiciones favorables para la fotosíntesis, el ciclo de las xantofilas está en forma epoxidada. Los cambios de radiación que se producen en el entorno provocan respuestas rápidas (de segundos a minutos) en el estado del ciclo. La cantidad de “pool” de estas xantofilas, así como la capacidad para formar Z,

varía con las condiciones de luz a que se ha sometido a la planta durante el periodo de crecimiento (Thayer y Björkman, 1990), por eso, es frecuente encontrar grandes diferencias entre hojas expuestas al sol y hojas de sombra. Las hojas de plantas que se han desarrollado en zonas umbrías tienen menor capacidad para el transporte electrónico fotosintético y para la fijación de CO<sub>2</sub> (Björkman, 1981). Cuando reciben radiación de intensidad moderada o alta, sólo pueden utilizar una pequeña parte en el transporte electrónico fotosintético (Logan et al., 1997) y el resto debe de ser disipada. Königer et al. (1995) encontraron que, en estas condiciones, el ciclo de las xantofilas puede desepoxidarse en una proporción muy elevada. Otros estudios más recientes (Adams et al., 1999), demuestran que el porcentaje de pigmentos del ciclo VAZ, con respecto al resto de los pigmentos foliares, varía dependiendo de las condiciones lumínicas en que se ha desarrollado la planta, pero, además, encuentra que a lo largo del día se producen cambios en la concentración relativa de estos pigmentos. En este mismo trabajo se sugiere que la respuesta del ciclo de las xantofilas responde a la radiación total recibida a lo largo del día, más que al valor máximo de dicha radiación.

Variaciones y ajustes de estos pigmentos a lo largo del día han sido descritos en otras especies (Valladares et al., 1995; Gilmore, 1997).

#### 1.4.3.3 Influencia de las condiciones climáticas: Variación estacional

De todo lo dicho hasta aquí, se desprende que el ciclo VAZ sirve para proteger a las plantas en caso de que estén expuestas a altas intensidades de luz, pero en condiciones naturales, el frío es uno de los factores más importante que contribuyen a los procesos de estrés. En algunos casos, las plantas, durante su desarrollo, están sometidas a un estrés permanente, mientras que en otros la incidencia del estrés puede ser periódica o incluso puntual. El ciclo del VAZ es capaz de responder a estos cambios en un tiempo muy corto, (por ejemplo, si una hoja está en condiciones de máximo rendimiento fotosintético y en un momento determinado se ve sometida a una intensidad de luz superior a la energía que puede aceptar la cadena transportadora de electrones, se pueden observar aumentos en la concentración de zeaxantina en cuestión de minutos), pero también el ciclo VAZ responde a cambios en otras escalas temporales (cambios de intensidad de luz a lo largo



del día, o ajustes estacionales). Además, se ha observado en diferentes especies que el tamaño del “pool” y la cantidad de Z capaz de sintetizarse en condiciones de fotoinhibición es mucho más elevada durante el invierno (Adams y Demmig-Adams, 1994). Estos cambios han sido observados no sólo entre diferentes estaciones (García-Plazaola et al., 1997), sino como adaptación a días fríos o cálidos dentro de una misma estación. En algunos trabajos (Adams et al., 1995a; Ottander et al., 1995; Verhoeven et al., 1996) se describe el comportamiento del ciclo en diferentes especies como respuesta al frío invernal al que están sometidas las plantas que conservan sus hojas y, por tanto, un aparato fotosintético activo durante esta época del año. En estas especies, se ha encontrado que, los días en que se alcanzan bajas temperaturas durante la noche, la concentración de Z y A sigue siendo considerable a la mañana siguiente, lo que confirma la idea de que el ciclo sirve como disipador del exceso de energía, ya que se llegan a encontrar ajustes relacionados con el cambio diario de temperatura. El ciclo de las xantofilas y el proceso de disipación de la energía asociado con él, confiere a las plantas la flexibilidad requerida para soportar el exceso de luz absorbido por las clorofilas bajo un amplio rango de condiciones climáticas y tiene que estar relacionado con los procesos de fotoinhibición durante el periodo invernal (Adams y Demmig-Adams, 1994; Adams et al., 1995b). El rendimiento del ciclo de las xantofilas también está influido por la temperatura. La disipación de energía se lleva a cabo más lentamente en condiciones de baja temperatura, aunque al final, cuando se alcanza el estado estacionario, los niveles de disipación logrados son mayores; es en estas condiciones cuando el grado de utilización de energía es muy bajo debido a la baja actividad de la cadena transportadora de electrones (Adams y Demmig-Adams, 1995). En ensayos realizados en laboratorio se ha comprobado que la disipación de energía se produce en la misma proporción que la formación de zeaxantina a diferentes temperaturas (Gilmore, 1997). En el campo, antes de la salida del sol o por las mañanas, después de un día frío, las plantas retienen cierta cantidad de zeaxantina y de violaxantina asociadas con una disminución de la fotosíntesis. Adams et al. (1995b), ha sugerido que esta disminución de la actividad fotosintética asociada con las bajas temperaturas del invierno se debe a que la planta se prepara para afrontar el día, cuando la energía que va a recibir va a ser presumiblemente mayor que la requerida.

Los cambios estacionales también están afectados por la disponibilidad de agua que tiene la planta. El estrés hídrico afecta a la fotosíntesis, y numerosos trabajos ponen de manifiesto el papel protector del ciclo VAZ en estas situaciones. (Xu et al., 1999).



## **2 OBJETIVOS**



El ciclo VAZ ha sido descrito ampliamente por numerosos autores (*ver revisiones de Pfündell y Bilger, 1994; Demmig-Adams y Adams, 1996; Havaux, 1998*). Aunque existe un amplio acuerdo en que los pigmentos de este ciclo desempeñan un papel protector frente al exceso de energía recibida por el aparato fotosintético, por el momento, no se ha encontrado una explicación exacta de cómo desempeñan esta función.

El objetivo de este trabajo ha consistido en obtener información de la actuación del ciclo VAZ estudiando un amplio rango de situaciones de estrés, fundamentalmente deficiencias nutricionales y variaciones climáticas.

Para alcanzar el objetivo mencionado se cubrieron las siguientes etapas de trabajo:

1.- Determinar los valores óptimos de pH para las dos enzimas implicadas en el ciclo en dos especies modelo (maíz y remolacha), en condiciones óptimas de desarrollo y en deficiencia de hierro.

2.- Localizar las zonas de la antena del aparato fotosintético que están mayoritariamente implicadas en los procesos de disipación de energía asociados con el ciclo VAZ. Para ello se utilizó un mutante de cebada (*chlorina f2*) deficiente en antena distal.

3.- Estudiar el comportamiento de estos pigmentos en dos situaciones de estrés nutricional que inducen modificaciones en el aparato fotosintético: deficiencia de hierro y de manganeso. Ambas deficiencias se indujeron artificialmente en soja, como planta

modelo y los resultados contrastaron con los obtenidos en melocotonero en condiciones de campo.

4.- Utilizar la concentración foliar de zeaxantina como marcador de posibles situaciones de estrés nutricional. En concreto, se analizó la influencia del patrón, como suministrador de nutrientes a la parte aérea del árbol, en una plantación de cerezos con carencias minerales.

5.- Establecer una relación entre la concentración de los pigmentos del ciclo de las xantofilas y la capacidad de adaptación de varias especies al clima mediterráneo. Se utilizaron siete especies, 2 caducifolias y 5 perennifolias, en unas condiciones medioambientales caracterizadas por presentar dos épocas de estrés: el frío invernal y la sequía estival. Con este material se pudieron determinar, en función de la concentración de los pigmentos VAZ: i) la diferencia entre hojas expuestas al sol y las adaptadas a la sombra; ii) el comportamiento de plantas perennes frente a caducas; iii) la relación entre la actividad del ciclo y la fenología de cada especie; iv) Establecer las respectivas relaciones entre estos pigmentos y el clima, utilizando como exponentes la precipitación mensual y las temperaturas mínima en enero y máxima en julio.

### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**





### 3.1 Materiales

#### 3.1.1 Experimentos con plantas modelo

Los primeros experimentos se realizaron en cámara de cultivo en medio hidropónico (*ver más adelante*, apartado 3.2) con las siguientes especies:

Remolacha (*Beta vulgaris* L.): las remolachas forman el género *Beta*, de la familia *Quenopodiáceas*, siendo la más común *Beta vulgaris*. La remolacha suele ser bianual tiene hojas lisas, ovaladas y pecioladas, dispuestas en rosetas y, más tarde, tallos altos con hojas y flores.

Maíz (*Zea mays* L.): forma un tallo erguido y macizo. La peculiaridad que diferencia a esta planta de casi todas las demás gramíneas, es que lo tienen hueco. La altura es muy variable, oscila entre poco más de 60 cm en ciertas variedades enanas hasta más de 6 m en otras variedades; siendo la media de 2.4 m. Las hojas, alternas, son largas y estrechas.

Para conseguir plantas deficientes en antena fotosintética se trabajó en invernadero, en condiciones menos controladas que en la cámara de cultivo. La especie elegida fue la cebada.

Cebada (*Hordeum vulgare* L.): Se utilizaron plantas control (*Hordeum vulgare* L. cv. Gunillay) y un mutante (*H. vulgare* L. cv. Dornaria, chlorina-f2), cuya principal característica es que muestra deficiencia de clorofila, aún creciendo en condiciones de

alta intensidad de luz. Los cloroplastos de estas plantas mutantes tienen menos tilacoides que las plantas control, pero, además, tienen menos lamelas apesadas. La deficiencia en clorofila se debe fundamentalmente a la pérdida de LHCII y LHCII-680, con la consecuente pérdida de clorofila b y de las xantofilas neoxantina y luteína (Knoetzel y Simpson, 1991).

### 3.1.2 Plantas con alteraciones nutricionales

Los ensayos de esta segunda parte del trabajo fueron realizados sobre material diverso, las deficiencias nutricionales se provocaron artificialmente, o bien, fueron consecuencia de alteraciones en la asimilación de los minerales presentes en el suelo. Se trabajó con las siguientes especies:

Soja (*Glycine max* L.): la soja pertenece a la familia de las Leguminosas (*Leguminosae*). La más conocida es la especie *Glycine max* L., nombre común de una leguminosa anual y de las semillas que forma. La planta es erguida, pubescente, de 0.5 a 1.5 m de altura, con grandes hojas trifoliadas, flores pequeñas de color blanco o púrpura y vainas cortas que encierran entre una y cuatro semillas.

Melocotonero (*Prunus persica* L. Batsch): es el nombre común de un árbol caducifolio de la familia de las Rosáceas que produce el fruto llamado melocotón. Las hojas son lanceoladas con el borde aserrado. Tienen estípulas que caen muy pronto.

Los estudios se realizaron en varias plantaciones de melocotonero próximas a la Estación Experimental de Aula Dei. Por las características del terreno, es típico encontrar árboles que presenten parte o la totalidad de sus hojas de un color amarillento, debido a la deficiencia de hierro, que es conocida como clorosis (Abadía, 1992). En estas condiciones se trabajó con distintos grados de clorosis, caracterizados por la cantidad de clorofila que tenían las hojas en el momento de la recolección. Las condiciones de cultivo, riego y ambientales fueron las mismas para todos los árboles estudiados, pero algunos manifestaron síntomas de clorosis y otros no.

Cerezo (*Prunus avium* L.): se compararon diferentes tipos de patrones sobre los que se injertó una misma variedad de cerezo. Los pies estudiados, usados normalmente en

países mediterráneos, son: Adara (*Prunus cesarifera* L.), SL 64 (*Prunus mahaleb*) y Colt (*Prunus avium* x *Prunus pseudocerasus*). Adara es una variedad que se ha desarrollado en la Estación Experimental de Aula Dei (Tabuenca y Moreno, 1988) especialmente adaptada a los suelos calcáreos del Valle del Ebro. Esta variedad resulta adecuada para evitar la asfixia de las raíces producida por la colmatación de los suelos o por el riego a manta, condiciones en las que a otras variedades les resulta más difícil sobrevivir.

Los árboles tenían 13 años cuando se realizó el experimento y estaban localizados en una zona próxima a la Estación Experimental de Aula Dei. Las muestras se tomaron de árboles en posición alternante, para evitar que los resultados del estudio dependiesen del sustrato sobre el que habían sido plantados. Desde el establecimiento del cultivo se realiza un seguimiento anual del estatus nutricional de la plantación (Moreno et al., 1996; Betrán et al., 1997).

### 3.1.3 Experimentos en comunidades forestales naturales

Las especies elegidas para el estudio del ciclo del VAZ en condiciones naturales fueron siete de los árboles y arbustos más importantes de las comunidades de *Quercus ilex* subsp. *ballota* en climas continentalizados del NE de la Península Ibérica (Castro Díez 1996; Castro Díez et al., 1998a):

*Arbutus unedo* L.: Arbusto o pequeño árbol perennifolio de hojas grandes. Es una planta moderadamente termófila que evita los ambientes más secos y prefiere los suelos ácidos o acidificados. Por sus requerimientos ecológicos, es poco abundante en el territorio aragonés. Suele hallarse en la franja de territorio comprendida entre 300 y 600 m de altitud. Sin embargo, en el Pirineo, puede ascender hasta 1.100 m (J. A. Sesé, com. personal) siempre en enclaves secos y abrigados (Montserrat-Recoder, 1975). Habitualmente convive con otras especies de encinar como *Lonicera implexa*, *Viburnum tinus*, *Rhamnus alaternus*, *Phillyrea angustifolia*, *P. latifolia*, etc. (Montserrat-Recoder et al., 1988).

*Buxus sempervirens* L.: Arbusto perennifolio de hojas pequeñas y coriáceas. Es muy abundante en la mitad septentrional de Aragón, generalmente en zonas de clima submediterráneo. Ocupa sustratos y ambientes muy diversos en todas las exposiciones, en comunidades con muy diferente grado de desarrollo forestal: desde matorrales degradados poco densos hasta bosques muy densos y sombríos. En el Pirineo asciende hasta 2.150 m de altitud en el macizo del Turbón (Ninot et al., 1993), aunque la mayor densidad de individuos se sitúa entre las cotas de 500 y 1800 m, generalmente en el dominio del quejigal. Tolera mal la aridez, por lo que en las cotas más bajas de su área de distribución suele refugiarse en las umbrías más frescas. Es abundante en los carrascales montanos pero rehuye los más secos. Al sur del río Ebro, es una planta mucho menos abundante, caracterizando las áreas de quejigal que soportan un periodo seco estival más breve (Montserrat-Recoder et al., 1988). Parece que su óptimo ecológico se sitúa en las comunidades forestales, ya que cuando medran en ambientes muy abiertos y soleados suelen presentar numerosas hojas de intenso color rojo, que parecen poseer menor vitalidad y longevidad (datos no publicados).

*Pistacia lentiscus* L.: Arbusto perennifolio de hojas compuestas con folíolos gruesos y coriáceos. Es una planta termófila que evita las localidades de gran altitud así como las zonas más bajas, frecuentemente salinizadas y que soportan inversiones térmicas invernales muy intensas (Braun-Blanquet y Bolòs, 1957). En el Pirineo sólo se encuentran poblaciones localizadas en las solanas más abrigadas del Prepirineo, donde, puntualmente, puede alcanzar hasta 950 m (Villar et al., 1997). Caracteriza las comunidades forestales y arbustivas de los enclaves más secos y abrigados del territorio: coscojares, carrascales secos y pinares de *Pinus halepensis*.

*Pistacia terebinthus* L.: Arbusto o árbol de pequeña talla, caducifolio de hojas compuestas con folíolos grandes. Es planta menos termófila que su congénere, *P. lentiscus* (Castro Díez et al., 1998b; Montserrat-Martí y Montserrat-Martí, 1988). Ocupa enclaves secos, soleados y abrigados, generalmente en terrenos rocosos de barrancos, congostos y pies de acantilado. Introduce sus raíces por las grietas de las rocas hasta alcanzar el agua reservada a más profundidad. En el territorio aragonés se distribuye, principalmente, entre 150 y 700 m, aunque en el Prepirineo, excepcionalmente, puede

alcanzar los 1250 m (Villar et al., 1997). Suele aparecer en los encinares o en sus comunidades de degradación.

*Quercus coccifera* L.: Arbusto perennifolio de hojas pequeñas y coriáceas. Forma extensos coscojares en laderas secas de altitud baja y media, generalmente en lugares que han soportado incendios frecuentes y una alta presión de pastoreo, gracias a su gran capacidad de rebrotar de raíz y cepa. Además de tolerar dichas perturbaciones, resiste bien la carencia de agua por lo que puede vivir en las colinas más áridas del centro de la Depresión del Ebro (Braun-Blanquet y Bolòs, 1957). Es planta frecuente desde las cotas más bajas en el Bajo Ebro hasta unos 900 m en solanas de vegetación leñosa muy perturbada, pudiendo alcanzar hasta 1200 m en el Prepirineo (Villar et al., 1997). Aparece en comunidades totalmente dominadas por ella (sardas o coscojares), pinares de pino carrasco (*Pinus halepensis*) y carrascales, especialmente en los degradados.

*Quercus rotundifolia* L.: también llamada *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp. Esta especie es un árbol de pequeña talla (rara vez supera los 12 m de altura), perennifolio, de hojas pequeñas y coriáceas. Abunda en todo el territorio aragonés, apareciendo desde sus cotas más bajas hasta unos 1650 m en el Pirineo (Villar et al., 1997) y quizá, aún a mayor altitud en el Sistema Ibérico turolense. Ocupa terrenos secos, generalmente pedregosos y bien drenados. Tolera muy bien las condiciones extremas del clima mediterráneo continentalizado, es decir, un intenso frío invernal y una cierta sequedad estival. Por su alta capacidad de rebrotar de cepa y raíz ha sido tradicionalmente muy explotada para obtener leña y carbón vegetal, por lo que la inmensa mayoría de las plantas silvestres presentan cepas viejas con numerosos tallos bastante gruesos. Esta característica arquitectónica tan generalizada refleja la situación de abandono de la explotación de leña que ocurre desde hace 30 ó 40 años. Forma comunidades boscosas que generalmente están pobremente caracterizadas florísticamente y que sólo alcanzan un desarrollo adecuado en algunos barrancos y desfiladeros abrigados del Prepirineo. En dichos enclaves pueden verse densos carrascales que contienen un gran número de especies de encinar (*Viburnum tinus*, *Lonicera implexa*, *Arbutus unedo*, *Smilax aspera*, *Phillyrea angustifolia*, etc.), incluida la misma encina (*Q. ilex* subsp. *ilex*) (Castro-Díez 1996; Castro-Díez et al., 1998a).

*Q. faginea* L.: Árbol caducifolio de hoja bastante pequeña que puede permanecer seca sobre la planta durante el invierno (follaje marcescente). Vive en áreas similares a las de la carrasca aunque suele preferir suelos más pesados con mayor capacidad de retención de agua (arcillas y margas). Con frecuencia se encuentran comunidades en las que coexisten ambas especies, compartiendo especies típicas de encinar y de quejigal. Se hibrida fácilmente con otras especies de robles y quejigos por lo que la zona más septentrional de su área de distribución en Aragón está dominada por estirpes hibridógenas (*Quercus cerrioides* Willk. y Costa). Los quejigos, considerados en sentido amplio, son abundantes en gran parte del territorio aragonés, desde sus cotas más bajas hasta unos 1800 m (Villar et al., 1997). El quejigo también ha sido muy explotado para leña, por lo que los individuos multicaules son muy frecuentes.

#### 3.1.3.1 Área de estudio

El área de estudio de estas siete especies se localiza al Norte de la provincia de Zaragoza (términos de Santa Eulalia de Gállego y de Murillo de Gállego) y en la zona adyacente de la provincia de Huesca (Oeste de la provincia: Agüero y Santa M<sup>a</sup> de Gállego). Todas las localidades están relativamente próximas y se sitúan en condiciones similares de suelo y clima, en altitudes comprendidas entre 460 y 740 m de altitud. El clima es mediterráneo de montaña con precipitaciones anuales medias de 672 mm, una temperatura mínima media del mes de enero de 4.3 °C y una temperatura media máxima del mes de julio de 28.4 °C. Estos valores se estimaron a partir de ecuaciones de regresión entre la precipitación y la altitud de la estación del Servicio Nacional de Meteorología de Ayerbe.

La toma de muestras se realizó durante 1997 y 1998 (desde diciembre de 1996 hasta enero de 1999). Estos dos años fueron climáticamente muy diferentes, siendo 1997 un año de temperaturas suaves comparado con la media de los últimos 30 y, en cambio, 1998 fue más seco y caluroso en verano. En la Figura 3.1 y en la Figura 3.2 se muestra las gráficas de temperatura y precipitación de la estación meteorológica de Ayerbe (585 m), situada a 10 Km al ESE del lugar de estudio. Estas figuras muestran el valor medio de los últimos 30 años y los del periodo en que se llevó a cabo el estudio. También se representa

el año 1996, porque durante el verano y el otoño de este año se desarrollaron las yemas que dieron lugar a los nuevos brotes en la primavera de 1997 y, en la mayoría de las especies, también los primordios de las hojas.

En la Tabla 3.1 se resumen las características climáticas de los tres años. Las siete especies se localizaban en una zona relativamente próxima, con lo que el diagrama climático puede aplicarse a todas ellas.

Las especies estudiadas se representan en la Figura 3.3 y en la Figura 3.4. La elección de esta diversidad de especies se basó en su diferente plasticidad para adaptarse a las condiciones ambientales, lo que en principio, haría pensar en una respuesta diferente en igualdad de condiciones ambientales. Todas ellas estaban situadas en una zona próxima para evitar diferencias relacionadas con el clima o con el tipo de suelo.

Tabla 3.1: Resumen de la precipitación y la temperatura media durante los años de estudio y media de la zona de estudio en los últimos 30 años.

Año	Precipitación (mm)	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)
1996	926.0	18.61	7.77
1997	931.1	20.09	8.55
1998	315.5	19.73	8.01
Media	676.8	19.50	8.10



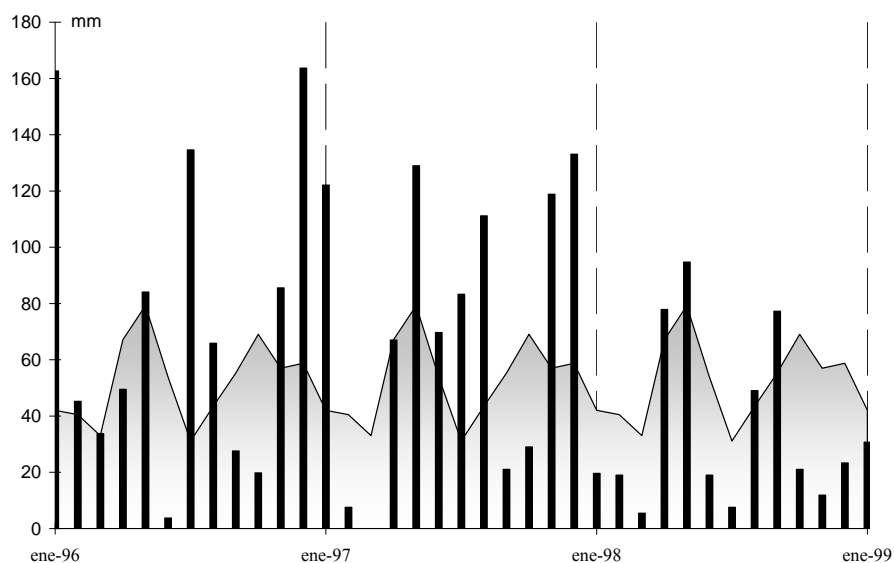


Figura 3.1: Precipitación media de los últimos 30 años (área sombreada) y datos de la precipitación durante el periodo de estudio (barras verticales). Los datos corresponden a la estación del Servicio Meteorológico Nacional de Ayerbe (Huesca).

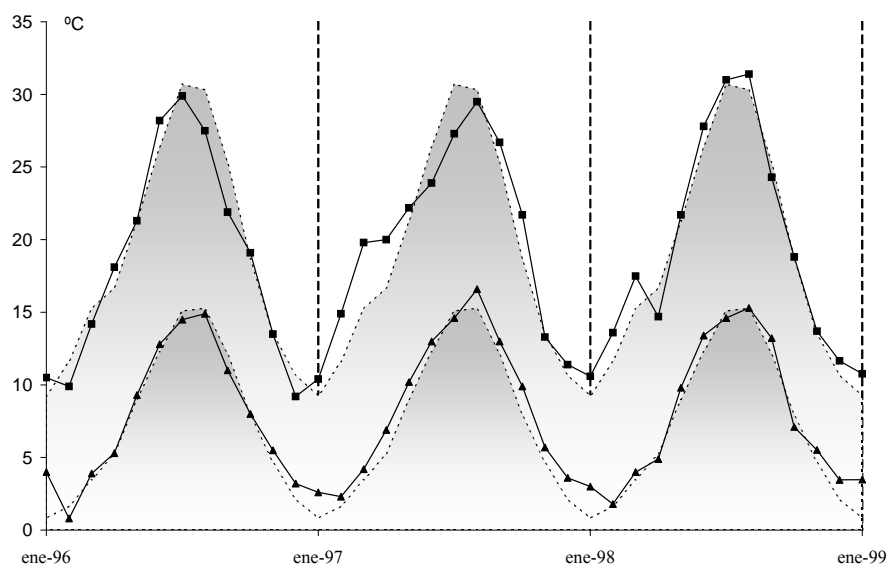


Figura 3.2: Temperatura máxima (cuadrados) y mínima (triángulos) del periodo de estudio y medias de los últimos 30 años (área sombreada). Los datos corresponden a la estación del Servicio Meteorológico Nacional de Ayerbe (Huesca).



*Quercus rotundifolia*



*Quercus coccifera*



*Quercus faginea*

Figura 3.3: Fotografía de las tres especies del género *Quercus* estudiadas.



*Arbutus unedo*



*Buxus sempervirens*



*Pistacia lentiscus*



*Pistacia terebinthus*

Figura 3.4: Fotografía de cuatro especies estudiadas

### 3.1.3.2 Toma de muestras

Para el estudio del ciclo VAZ se recogieron, mensualmente, muestras de seis individuos de cada especie, tres de ellos en la zona más sombreada de la planta, y otros tres en la zona totalmente expuesta al sol. Los muestreos se realizaron sobre los mismos individuos durante todo el experimento, para evitar que se produjesen diferencias por el tipo de sustratos. Los individuos estaban totalmente desarrollados y podían considerarse representativos de la comunidad vegetal. En plantas perennifolias se tomaron hojas de la última cohorte. En el momento en que aparecían las hojas nuevas de primavera se empezaban a analizar las nuevas. En las caducifolias sólo se tomaban hojas unos pocos meses al año, aunque en *Q. faginea* las hojas permanecen en el árbol durante el invierno, se considera que están muertas, y, sólo se toma una muestra en noviembre. El momento de la toma de muestras coincidía con el mediodía solar, y siempre en un día claro, para asegurar que la concentración de zeaxantina fuese lo más elevada posible (Belkhodja, 1998). En ese momento se medía la intensidad de la luz, que resultó estar comprendida entre 1700 y 2350  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Los valores máximos se obtuvieron en los meses de junio y julio, y los mínimos en enero. Las hojas que se analizaron correspondían a la última cohorte, es decir, se trabajó con hojas que tenían un año de vida como máximo.

Para poder estimar el estrés hídrico al que estaban sometidas las plantas en el momento de la recogida de pigmentos, se tomaba una muestra de hojas adicional para análisis de prolina, que se mantenían congeladas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis.

### 3.1.3.3 Fenología de las especies estudiadas

La descripción de la fenología de las especies de estudio se realizó siguiendo el método propuesto por Orshan (1989): Para cada especie se eligió una población natural, bien desarrollada, en la que se realizó un muestreo mensual durante los años 1997 y 1998. Se seleccionaron 10 ejemplares bien desarrollados, sanos y de talla media en la población como referencia para la descripción fenológica. Cada mes se describió detalladamente el

estado fenológico de cada uno de los ejemplares seleccionados y se tomaron muestras (en ejemplares diferentes de los 10 de referencia) de ramas representativas del estado de cada fenofase, así como de todos los eventos singulares que pudieran observarse. Con el material recolectado se preparó un herbario fenológico. Mediante la síntesis de las observaciones tomadas en los 10 ejemplares de referencia y el detenido estudio del material de herbario se realizaron diagramas de fenofases para cada especie.

En los diagramas de fenofases se indica la actividad de una determinada fenofase en la población cuando se ha observado en más de uno de los 10 ejemplares de referencia. Si sólo se observa en uno o en algún otro de la población distinto de los de referencia, se indica la fenofase de manera discontinua. Para que se considere que una fenofase se está produciendo en un individuo es necesario que se exprese, por lo menos, en un 5 % del conjunto de sus ramas.

### **3.2 *Cultivo en hidropónico***

Para el cultivo en hidropónico se parte de semillas que se conservan en el laboratorio. Se lavan las semillas con agua destilada durante 2 horas para eliminar el posible fungicida y el inhibidor de la germinación que se hubiese añadido para su conservación. Se colocan sobre un lecho poroso de vermiculita, previamente humedecido con agua destilada, y se cubren con más vermiculita, también húmeda. Se lleva el recipiente de germinación a la cámara de cultivo y se mantiene la humedad del lecho con solución nutritiva de concentración 1/5 de la solución nutritiva de Hoagland (2.1.1). Se conserva en la oscuridad hasta que aparecen las primeras plántulas, a los 4-6 días.

En el plazo de una semana se obtienen plántulas con una altura aproximada de 4 cm. En este momento se extraen cuidadosamente las plántulas del lecho, lavando las raíces con agua destilada. El paso a hidropónico se realiza en dos fases. En la primera, se colocan las plántulas en un recipiente de 50 litros de capacidad, con solución nutritiva de concentración 1/2 de la solución nutritiva de Hoagland que contenga 2 ppm de Fe en forma de quelato, como se describe posteriormente, y con borboteo de aire. Cuando se desarrollan las primeras hojas, se traspasan las plantas a otro recipiente de 20 litros de

capacidad, con la misma solución nutritiva, manteniendo constante el borboteo de aire a través de la solución (Figura 3.5). Se colocan 4 plántulas por contenedor. Las plantas se mantienen en estas condiciones aproximadamente 20 días, reponiendo la pérdida de agua que se produce con agua destilada.



Figura 3.5: Cámara de cultivo con plantas de remolacha control (derecha) y clorótica (izquierda) en su tercera semana de desarrollo.

### 3.2.1 Condiciones de trabajo en la cámara de cultivo

Fotoperiodo: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Temperatura: 25° C

Humedad: 90 %

Intensidad luminosa: 350  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Radiación luminosa: 400-700 nm.

3.2.1.1 Preparación de la solución nutritiva 1/2 de Hoagland

La solución nutritiva utilizada se prepara a partir de cuatro soluciones madre con la siguiente composición:

**Solución 1:** (100 mL para 20 L de agua)

Producto	g 10 L <sup>-1</sup>	Pm	M	Concentración final	ppm	
KNO <sub>3</sub>	505.5	101.11	0.5	2.5 mM	97.8 K	35.0 N
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	493.0	246.50	0.2	1.0 mM	24.3 Mg	32.0 Na
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	272.2	136.09	0.2	1.0 mM	39.1 K	31.0 P
NaCl	58.5	58.50	0.1	0.5 mM	11.5 Na	17.7 Cl

**Solución 2:** (50 mL para 20 L de agua)

Producto	g 10 L <sup>-1</sup>	Pm	M	Concentración final	ppm	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	236.15	218	1	2.5 mM	100 Ca	70 N

**Solución de microelementos:** (10 mL para 20 L de agua)

Producto	g L <sup>-1</sup>	Pm	M	Concentración final	ppm	
MnCl <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	1.81	197.94	9.14	4.6 M	0.25 Mn	0.33 Cl
BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	2.86	61.81	46.30	23.2 M	0.25 B	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.025	205.94	0.12	0.06 M	0.06 Mo	
ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.69	287.54	2.40	1.2 M	0.078 Zn	0.013 S
CuSO <sub>4</sub>	0.06	159.55	0.37	0.185 M	0.012 Cu	0.006 S

**Solución de hierro:** (60 mL para 20 L de agua)

Producto	g L <sup>-1</sup>	Concentración final	ppm
Sequestrene® 138	14	44.8 M	2.52 Fe

Estas soluciones se añaden en el momento de colocar las plantas en los contenedores de 20 L.

## 3.2.1.2 Inducción de clorosis férrica

Para inducir deficiencia de hierro en cualquier especie es necesario tomar cierto tipo de precauciones que impidan la contaminación por hierro, que haría imposible obtener las plantas cloróticas. Estas precauciones consistieron en la adición de 20 g de CaCO<sub>3</sub> y 20 mL de NaOH 0.1 N en el momento de la colocación de las plantas, para evitar la acidificación de la solución. Se controla regularmente el pH y si es preciso se hacen nuevas adiciones de CaCO<sub>3</sub>. De esta forma, si existe hierro en la solución, precipitará en forma de hidróxido y no podrá ser absorbido por las raíces. Al preparar la solución nutritiva se procede como en el caso de las plantas control pero no se añaden los 60 mL de Sequestrene®.

## 3.2.1.3 Inducción de deficiencia de manganeso

Al preparar la solución nutritiva no se añade MnCl<sub>2</sub> 4 H<sub>2</sub>O en la solución de microelementos. En este caso no hay que tomar tantas precauciones como en el caso de la deficiencia de hierro.



### 3.3 Infiltraciones a diferentes pH

El pH óptimo de las dos enzimas principales que intervienen en el ciclo VAZ (violaxantina desepoxidasa y zeaxantina epoxidasa) es 5.3 y 7.5 respectivamente. Estas condiciones se consiguieron de forma artificial. Se realizaron infiltraciones en suspensiones de tilacoides y en discos de hojas con las soluciones formadas por los reactivos descritos a continuación:

#### pH 5.3

Reactivo	Concentración
Ascorbato	80 mM
Sorbitol	300 mM
NaCl	10 mM
Citrato	50 mM

El pH se ajusta con ácido cítrico

#### pH 7.5

Reactivo	Concentración
Ascorbato	80 mM
Sorbitol	300 mM
NaCl	10 mM
HEPES	50 mM

El pH se ajusta con NaOH

Para las infiltraciones a diferentes valores de pH se utilizaron las siguientes modificaciones de las soluciones anteriores:

pH = 4, 5 y 6: se utilizan las mismas soluciones que para conseguir pH 5.3 pero se añade más ácido cítrico. En los casos de pH 4 y 5 se utiliza mayor concentración de citrato (73.5 mM).

pH =7 y 8 se parte de las mismas concentraciones que para conseguir un pH de 7.5 pero se utiliza NaOH (0.1 N) hasta conseguir el pH deseado.

En todos los casos, tanto en tilacoides como en hojas, para asegurarnos que la solución ha alcanzado el interior de las células se utiliza la técnica de infiltración a vacío. La presión negativa que se aplica es muy suave y se consigue mediante una trompa de vacío unida a un grifo de agua.

### 3.4 Aislamiento de tilacoides

El aislamiento de tilacoides se realizó siguiendo el método de Nishio et al. (1985), utilizando las siguientes soluciones:

#### Solución A

Producto	Pm	Concentración
Sorbitol	182.2	330 mM
MgCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	203.3	5 mM
NaCl	58.4	10 mM
Tricina	179.2	50 mM
PVP*	10.0	1 %
DTT*	154.2	10 mM
Ascorbato*	198.1	0.4 %

\*Añadir sólo en el caso de material de campo.

#### Solución B

Producto	Pm	Concentración
EDTA	372.2	1 mM

#### Solución C

Producto	Pm	Concentración
Tricina	179.2	50 mM

Una vez recogidas las hojas se trabaja en la oscuridad y en la cámara fría (4°C) para disminuir la degradación de los tilacoides.

Se quitó el peciolo y el nervio central de las hojas y se cortaron con unas tijeras en trozos pequeños. Este material se homogeneizó con solución A y se trituró en una batidora Osterizer mediante pulsos de 3 ó 4 segundos. Luego se filtró a través de dos capas de Miracloth (Calbiochem) y se centrifugó en una Sorvall RC5C (Du Pont), con un rotor SS-34 a 12000 \* g durante 8 minutos.

El precipitado se lavó una vez con solución A y otra con agua destilada para provocar, mediante choque osmótico, la ruptura de los cloroplastos. A continuación, se lavó una vez con solución B y tres veces con solución C. Después de estos lavados se centrifugó a 12000 x g durante 8 minutos. Al final, el precipitado se resuspendió con 500 µL de tricina y se guardó en alicuotas de 200 µL en N<sub>2</sub> líquido para su uso posterior.

Para determinar la cantidad de detergente que habrá que añadir para solubilizar los tilacoides, con una pequeña fracción se calculó la concentración de clorofilas. Se disuelven 50 µL del precipitado de los tilacoides obtenidos en 10 mL de acetona y la concentración de clorofilas se calculó después de leer con el espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu, mod. UV-2101PC) a dos longitudes de onda (666 y 653 nm), tal como se describe en Val et al. (1985). La concentración de clorofila (µg mL<sup>-1</sup>) se obtiene aplicando las siguientes fórmulas:

$$\text{Chl a } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 15.05 * A_{666} - 7.34 * A_{653}$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 27.05 * A_{653} - 11.21 * A_{666}$$

$$\text{Chl t } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \text{Chl a} + \text{Chl b}$$

Para expresar la concentración en µg cm<sup>-2</sup> se utilizó la siguiente conversión:

$$C(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}) = \frac{\text{Chl total } (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) \times V(\text{mL})}{A_d(\text{cm}) \times n}$$

donde  $V$  es el volumen de acetona,  $A_d$  es el área del disco y  $n$  el número de discos.

### 3.5 *Cuantificación de proteínas*

El método colorimétrico utilizado fue propuesto por Markwell et al. (1969) y es una modificación del clásico de Lowry para la cuantificación de proteínas totales.

Se utilizan los siguientes reactivos:

A	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2 %
	NaOH	0.4 %
	NaTartrato	0.16 %
	SDS	1 %
B	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	4 %
C	100 mL A + 1 mL B	
D	Folin Ciocalteau 2N / H <sub>2</sub> O 1/1 v/v	

Se mezcla 1 mL de muestra (10-100 µg de proteína) con 3 mL de reactivo C; se deja incubar entre 10 minutos y 24 horas a temperatura ambiente. A continuación se añaden 0.3 mL de reactivo D y se agita vigorosamente. Se incuba 45 minutos, también a temperatura ambiente, y se mide la absorción en un espectrofotómetro a 730 nm. Para calcular la concentración hay que hacer una curva de calibrado con un patrón de albúmina bovina.

### 3.6 *Separación y cuantificación de proteínas mediante electroforesis desnaturizante (PAGE)*

La electroforesis en geles de poliacrilamida es una herramienta utilizada para la separación de proteínas según sus pesos moleculares. Como agente disgregante de las proteínas en los polipéptidos que las constituyen se utiliza el SDS (dodecil sulfato de sodio). La mezcla de proteínas se desnaturiza calentándola en presencia del detergente y

DTT (para romper los puentes de azufre). Las cargas del polipéptido son insignificantes si se comparan con la carga negativa que supone la unión con el SDS, así, los complejos formados entre los polipéptidos y el detergente tienen la misma densidad de carga, y su migración en el gel de poliacrilamida depende exclusivamente de su tamaño. Para analizar la composición de la muestra, hay que determinar el peso molecular de los polipéptidos de la muestra por comparación con la movilidad de otros de peso molecular conocido que se han sometido a las mismas condiciones electroforéticas (Hames, 1981).

### 3.6.1 Preparación de la electroforesis

La técnica que se utilizó es una variación del método general descrito por Delapelaire y Chua (1981).

Los reactivos necesarios son los siguientes:

---

A	Acrilamida: 29.2 % + 0.8 % bisacrilamida.	Filtrar la solución
B	Persulfato amónico 10 %	Preparar en el momento
C	Tris-HCl	Tris 0.5 M pH = 6.8
D	Tris-HCl	Tris 1.5 M pH = 8.8
E	LiDS 20 %	
F	Sacarosa	
G	Temed	

---

- Tampón inferior      Tris-HCl: 12.1 g (Tris 25 mM)  
                                    Glicina: 57.6 g (Glicina 0.192 M)

Llevar a cuatro litros con H<sub>2</sub>O. El pH es 8.3.

- Tampón superior      A 300 mL de la solución inferior se añade 1.5 mL de LiDS del 20 % y 45 mg de EDTA (0.4 mM).

- Gel separador con gradiente

Para formar el gradiente de acrilamida se preparan las siguientes cantidades:

Mezcla primera:

Reactivo	Cantidad	Concentración
A	5.84 mL	10.0 %
B	88.00 $\mu$ L	0.5 %
D	4.38 $\mu$ L	375.0 mM
E	88.00 $\mu$ L	0.1 %
F	0.88 g	5.0 %
G	10.00 $\mu$ L	
H <sub>2</sub> O	4.10 mL	

Mezcla segunda:

Reactivo	Cantidad	Concentración
A	10.00 mL	17.0 %
B	88.00 $\mu$ L	0.5 %
D	4.38 mL	375.0 mM
E	88.00 $\mu$ L	0.1 %
F	3.07 g	17.0 %
G	10.00 $\mu$ L	

Las soluciones se filtran antes de añadir el LiDS, el persulfato amónico y el Temed.

• Gel toma de muestra

Reactivo	Cantidad	Concentración
A	1.50 mL	5.0 %
B	125.00 $\mu$ L	
C	2.50 mL	125.0 mM

E	50.00 $\mu\text{L}$	0.1 %
Glicerol	1.00 mL	5.0 %
G	10.00 $\mu\text{L}$	
H <sub>2</sub> O	4.10 mL	

---

### 3.6.1.1 Solubilización de las muestras

Solución con DTT: Disolver en 5 mL de agua 27 mg de NaCO<sub>3</sub>, 39 mg de DTT y 600  $\mu\text{L}$  de glicerol

Relación Proteína / DTT = 2.5

La solución contiene 7.8 g DTT L<sup>-1</sup> La cantidad de  $\mu\text{L}$  que hay que añadir se calcula según la relación:

$\mu\text{g}$  de proteína total / 19.5

Solución detergente: A 10 mL de agua se añade 1 g de LiDS y 0.5 mL de Triton X-100

Relación detergente / proteína =2

La cantidad de  $\mu\text{L}$  de detergente que hay que añadir es:

$\mu\text{g}$  de proteína total \*2 /100

### 3.6.1.2 Colocación de las muestras

Unos 150  $\mu\text{g}$  de proteína por pocillo. Los viales se centrifugan y se solubilizan teniendo en cuenta las consideraciones anteriores. El volumen que hay que poner en cada pocillo se calcula según la relación:

$$\text{volumen } (\mu\text{L}) = 150 \frac{\text{volumen de solución de solubilización } (\mu\text{L})}{\text{proteína total } (\mu\text{g})}$$

## 3.6.1.3 Condiciones de corrido

Preelectroforesis: 4 W durante 30 minutos

Electroforesis: 1.5 W durante 24 h.

## 3.6.2 Tinción de nitrato de plata para gel de placa larga

Para revelar los polipéptidos que contiene cada muestra se utilizó una técnica que permite conocer la cantidad de proteína contenida en cada banda, consistente en la tinción del gel con nitrato de plata (Young et al., 1983). Esta técnica es laboriosa, pero a diferencia de la tinción con azul de Coomassie, es cuantitativa.

## 3.6.2.1 Soluciones en stock

1	Dicromato potásico	3.4 M	Acido nítrico	3.2 mM (d=1.33)
2	Nitrato de plata	12 mM		
3	Carbonato sódico	0.28 M	Formaldehido	0.05 %
4	Acido acético	1 %		

Utilizar agua destilada de calidad Milli Q® para preparar todos los reactivos.

## 3.6.2.2 Fijado y lavado

Para fijar proteínas se coloca el gel en 1L de la siguiente solución: Metanol 500 mL y ácido acético 120 mL enrasado a 1L con agua desionizada. Se deja al menos 30 minutos.

El gel se lava tres veces utilizando cada vez 650 mL de la siguiente solución: Etanol 100 mL y ácido acético 50 mL enrasada la mezcla a 1 L con agua. Se lava 30 minutos cada vez.



### 3.6.2.3 Tinción

Sumergir totalmente el gel en la solución de dicromato potásico (1), durante 5-10 minutos agitando suavemente. Seguidamente se lava el gel cuatro veces con agua destilada durante un minuto (el agua saldrá cada vez menos amarillenta). Se añade al gel un mínimo de 500 mL de la solución de nitrato de plata (2), de forma que el gel quede totalmente cubierto, y se deja durante media hora a la luz (la luz fluorescente de las habitaciones suele ser suficiente). Se lava seguidamente el gel con agua desionizada durante 1 minuto agitando suavemente.

### 3.6.2.4 Revelado y fijado

Los geles se lavan dos veces en aproximadamente 1 litro cada vez de la solución (3). Este lavado ha de ser muy rápido (se vierte el líquido sobre el gel e inmediatamente se retira). Esto se hace para evitar los depósitos de plata sobre el gel. Después del segundo lavado, se añade otro litro de esta solución (3) y se agita muy suavemente, hasta que las manchas aparezcan. Esto ocurre aproximadamente a los 5-7 min.

La reacción de revelado se detiene mediante dos rápidos lavados con la solución (4). Los geles se pueden conservar indefinidamente en 750 mL de la solución (4) o secados.

### 3.6.3 Tinción con TMBZ

Esta tinción se empleó para detectar la presencia de grupos con actividad peroxidasa (grupos hemo). El método es básicamente el descrito por Guikema y Sherman (1980).

Los reactivos necesarios son:

- 1 TMBZ (3,3',5,5', tetrametilbencidina) 6.3 mM en metanol
- 2 Acetato sódico 0.25 M (pH=5)
- 3 TMBZ (1) al 30 % en Acetato sódico (2)

4 Acetato sódico (2) al 70 % en metanol

5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 %

El gel se agita en la oscuridad, durante 2 horas, sumergido en el reactivo 3. A continuación se añaden 300 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5) y se continúa agitando 1 hora más. Posteriormente se lava con el reactivo 4. El gel puede decolorarse lavándolo con sulfito sódico (71 mM en el reactivo 4) durante dos horas.

### 3.7 *Análisis de pigmentos por HPLC*

La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales constituye un lecho estacionario de gran desarrollo superficial y la otra es un fluido que pasa a través o a lo largo del lecho. Para separar los diferentes componentes de una muestra hay varios tipos de cromatografía:

- filtración en gel
- adsorción
- partición
- intercambio iónico
- fase reversa

La técnica utilizada fue cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa (RP). La fase estacionaria es un núcleo de sílice químicamente modificado con compuestos que le confieren una superficie no polar, hidrofóbica. Los componentes se unen según sean sus interacciones hidrofóbicas con la superficie estacionaria hidrocarbonada. Luego se eluyen combinando solventes polares y apolares según los componentes que se quieran separar. Se eluyen por orden de polaridad decreciente o lo que es lo mismo, creciente hidrofobidad. Cuanto más acuosa -polar- sea la fase móvil, más retenidos quedan los solutos, que son hidrofóbicos.

El tiempo de retención de los solutos es proporcional a la longitud de la cadena carbonada; además, es muy importante la cantidad de sílice que queda expuesta. Cuanto

mayor sea ésta, aumentan las colas en los picos, y la columna proporciona menor eficacia, pero tiene la ventaja de que aumenta la diferencia en los tiempos de retención de los compuestos.

Los solventes para HPLC deben ser de calidad para cromatografía, estables en las condiciones de trabajo, con capacidad tampón, transparencia óptica y miscibles con los demás solventes. Tampoco pueden alterar la columna. Para prepararlos hay que filtrarlos por una membrana de 0.2  $\mu\text{m}$  - 2  $\mu\text{m}$  y desgasificarlos.

### 3.7.1 Extracción de pigmentos fotosintéticos

Las muestras tomadas para analizar pigmentos fotosintéticos consistieron en discos de hojas de 0.358  $\text{cm}^2$  de área (5 ó 10 por tratamiento), que se extrajeron inmediatamente en mortero con 5 ó 10 mL de acetona fría (100 %) en presencia de una pequeña cantidad de ascorbato sódico (punta de espátula pequeña) para evitar la formación de feofitinas. Las muestras de material procedentes de la cámara de cultivo se extraen inmediatamente después de haber sido recolectadas. Las muestras procedentes del campo se conservan en  $\text{N}_2$  líquido hasta su extracción.

La suspensión resultante se filtró a través de un sistema Millex de 5  $\mu\text{m}$  (Millipore) utilizando presión (jeringuilla). Todo el proceso se llevó a cabo en ausencia de luz. Los extractos se guardaron en congelador (-20 °C) hasta su análisis.

### 3.7.2 Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

El sistema cromatográfico modular utilizado consta de un inyector *Rheodyne 7010* con inyector de 20  $\mu\text{L}$  (Cotati). El tipo de lecho que utilizamos es un cartucho radial Novapak  $\text{C}_{18}$  (100 x 8 mm; Waters) de 4  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, en un módulo de compresión radial RCM 8 x 10 (Waters). La columna va precedida de una precolumna  $\mu$ -Bondapak que suele ser del mismo tipo de lecho que la columna pero mucho más corta (1-2 cm) su uso está recomendado para alargar la vida de la columna. Las fases móviles están impulsadas por una bomba (Waters M-51) con un flujo de 2  $\text{mL min}^{-1}$ . Para la

detección, en principio, se puede utilizar cualquier característica físico-química que sirva para diferenciar compuestos. El detector es visible/ultravioleta *Shimadzu* (SPD-6AV) y tiene un sistema de registro/integración informatizado *PC-Integration Pack ver. 3.00, Softron* (Kontron).

El método utilizado, que fue el descrito por Val et al. (1994), consiste en 2 etapas isocráticas en las que las fases móviles son: (i) 1.75 % metanol, 1.75 % diclorometano y 96.5 % acetonitrilo y (ii) 50 % acetonitrilo y 50 % acetato de etilo, con un flujo de 2 mL min<sup>-1</sup>. Los pigmentos fueron detectados a 440 nm. La cuantificación de pigmentos se llevó a cabo según lo descrito por Val et al. (1986), que consiste a grandes rasgos en el aislamiento de los pigmentos individuales mediante la recolección de las fracciones que salen del detector para su identificación espectroscópica y cristalización. Posteriormente se calibra la columna para cada pigmento inyectando cantidades conocidas de los mismos disueltas en un medio para el que se conocen perfectamente los coeficientes de extinción. De este modo se obtienen los coeficientes (Tabla 3.2) para cada pigmento que, multiplicados por el área de los picos del cromatograma permiten calcular la concentración de cada pigmento en la solución inyectada.

Tabla 3.2. Pesos moleculares y coeficientes de calibración para los pigmentos fotosintéticos separados por HPLC.

Pigmento	Peso Molecular (g·mol <sup>-1</sup> )	Coficiente (μg·mL <sup>-1</sup> )
Neoxantina	512.0	1.55 10 <sup>-5</sup>
Violaxantina	600.8	1.42 10 <sup>-5</sup>
Anteraxantina	584.8	1.44 10 <sup>-5</sup>
Luteína	568.9	1.78 10 <sup>-5</sup>
Zeaxantina	568.8	1.81 10 <sup>-5</sup>
Clorofila b	907.5	2.57 10 <sup>-5</sup>
Clorofila a	893.5	3.62 10 <sup>-5</sup>
β-Caroteno	536.9	2.03 10 <sup>-5</sup>

En caso de expresar la concentración foliar de pigmentos en  $\mu\text{mol cm}^{-2}$  se utilizaría la fórmula descrita a continuación:

$$C(\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2}) = \frac{\text{Coeficiente}(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) \times A_p \times V(\text{mL})}{A_d(\text{cm}^2) \times n \times Pm(\mu\text{g} \cdot \mu\text{mol}^{-1})}$$

donde  $A_p$  es el área del pico,  $V$  el volumen de extracción de la muestra,  $A_d$  el área del disco,  $n$  el número de discos y  $Pm$  el peso molecular de cada pigmento. La concentración se obtiene en  $\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2}$  si trabajamos con áreas o bien en  $\mu\text{mol g}^{-1}$  si trabajamos en peso.

En nuestro caso, al expresar la concentración en  $\mu\text{g cm}^{-2}$  se utilizó la siguiente fórmula:

$$C(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}) = \frac{\text{Coeficiente}(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) \times A_p \times V(\text{mL}) \times 60000}{A_d(\text{cm}^2) \times n}$$

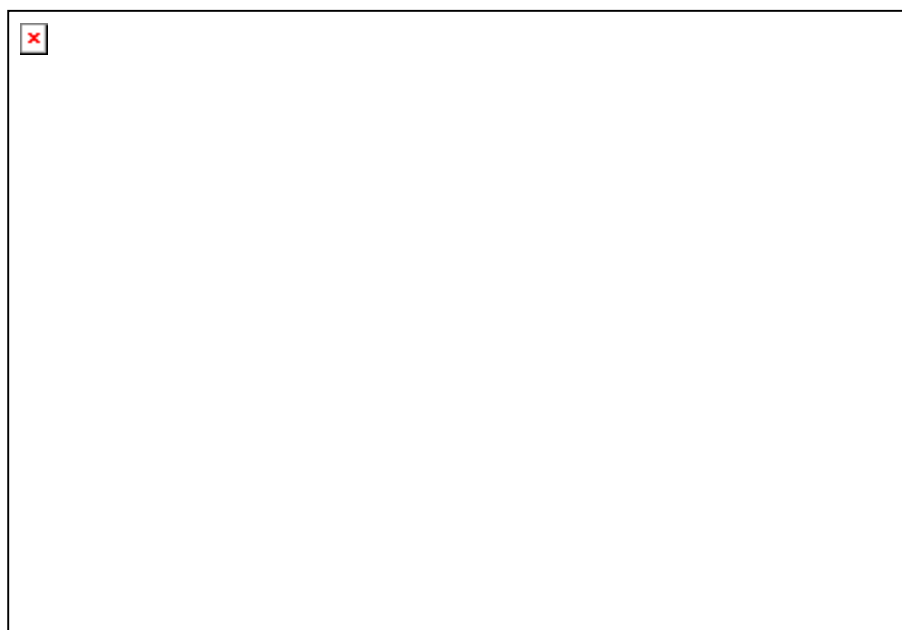


Figura 3.6. Cromatograma típico de los pigmentos estudiados tras su separación por HPLC. Los picos que se cuantificaron fueron: 1- neoxantina, 2-violaxantina, 3- anteraxantina, 4-luteína, 5-zeaxantina, 6- clorofila b, 9- clorofila a, 12- $\beta$ -caroteno.

Para expresar los cambios en el estado de epoxidación de los pigmentos del ciclo VAZ, o, en otras palabras, cuál es el pigmento mayoritario (violaxantina, anteraxantina o zeaxantina), Bilger y Björkman (1991) utilizaron los cambios de absorbancia a 505 nm. Posteriormente, Quílez (1994) utilizó el valor del índice de epoxidación (IE) definido como:

$$IE = \frac{(2 * \%Violaxantina + \%Anteraxantina)}{200}$$

Este parámetro proporciona una estimación del número real de epóxidos sobre el máximo posible. Por tanto, un IE cercano a 1 indicará un desplazamiento del ciclo hacia la forma epoxidada (Violaxantina), y un bajo IE indicara un desplazamiento hacia la forma zeaxantina. Otros autores (Król et al., 1999), lo denominan con la abreviatura inglesa EPS (epoxidation state).

En este trabajo, la forma elegida para expresar el estado del ciclo VAZ en la planta ha sido el valor % Z, % A y % V, definidos como:

$$\% V = \frac{\text{concentración de violaxantina}}{\text{concentración de (violaxantina + anteraxantina + zeaxantina)}} \times 100$$

$$\% A = \frac{\text{concentración de anteraxantina}}{\text{concentración de (violaxantina + anteraxantina + zeaxantina)}} \times 100$$

$$\% Z = \frac{\text{concentración de zeaxantina}}{\text{concentración de (violaxantina + anteraxantina + zeaxantina)}} \times 100$$

La descripción del estado del ciclo de las xantofilas según el valor % Z ya ha sido usada por otros autores, y es una forma de expresar en qué extensión el ciclo se encuentra afectado por condiciones de estrés (Demmig-Adams y Adams, 1992a). En este caso se considera 100 la suma total de los tres pigmentos que componen el ciclo. Un valor de violaxantina cercano a 100 indicaría que la forma epoxidada es la más abundante. Lo contrario estaría representado por un valor de zeaxantina próximo a 100.

### 3.8 *Análisis químico de nutrientes*

#### 3.8.1 *Preparación de las muestras. Digestión del material*

Para analizar la composición mineral de las hojas, se comienza por lavarlas suavemente con agua jabonosa (1 %) y se aclaran con agua destilada para eliminar la posible contaminación por la suciedad acumulada en su superficie. Cuando se trabajó con plantas de cámara de cultivo, no se utilizó jabón. Las hojas se secaron en la estufa a 60 °C hasta peso constante. Posteriormente se homogeneizaron en molino y se pasaron por un tamiz (0.5 mm), obteniéndose así una molienda homogénea. De este material se pesó 1 g y se sometió a calcinación durante 24 horas en mufla a 600 °C, las cenizas obtenidas se disolvieron, en la campana extractora, con 4 mL de ácido nítrico (70 %) diluido 1:1 (v:v), consiguiéndose la total disolución de las cenizas mediante calentamiento (100 °C) en placa calefactora. La disolución obtenida se evaporó hasta sequedad y el residuo se introdujo de nuevo en mufla (600 °C) durante una hora. Tras enfriar, las cenizas se disolvieron calentando en la placa con 10 mL de ácido clorhídrico (65 %) diluido 1:1 (v:v). Esta disolución se pasó a través de papel de filtro (*Watman* nº 9) enrasándose a 25 mL con agua destilada. La disolución se mantuvo a -4 °C hasta su utilización (Pinta y DeWaele, 1975).

Ca, Mg, Fe, Mn, Cu y Zn se determinaron por absorción atómica, el K por espectrofotometría de emisión de llama y P por emisión atómica. El N se calculó mediante la técnica de Kjeldhal.

#### 3.8.2 *Análisis por absorción atómica*

Por esta técnica se determinaron directamente de las disoluciones anteriores todos los microelementos y macroelementos excepto nitrógeno, potasio y fósforo. Las concentraciones se determinaron por interpolación en una recta de calibrado realizada con patrones preparados a partir de estándares comerciales (*Tritisol*, Merck), diluidos hasta un rango de concentraciones adecuado para cada elemento. Las longitudes de onda de medida en el equipo utilizado (*Unicam*, Mod. 969) fueron:

---

<b>Elemento</b>	<b>Longitud de onda (nm)</b>
Calcio	422.67
Magnesio	285.21
Hierro	248.30
Manganeso	279.50
Cinc	213.86
Cobre	324.75

---

### 3.8.3 *Determinación de potasio por emisión atómica*

Por esta técnica se determinó el K (llama de Acetileno/Aire), para lo cual hubo que diluir las disoluciones obtenidas inicialmente 50 veces, los estándares se prepararon de igual modo que en la técnica anterior y la longitud de onda de medida fue de 766.49 nm. El equipo utilizado fue un *Unicam* (Mod. 969).

### 3.8.4 *Determinación de fósforo en material vegetal.*

La concentración de fósforo en hoja se determina colorimétricamente en la solución obtenida tras la digestión del material vegetal. En presencia de  $V^{5+}$  y  $Mo^{6+}$ , el fósforo, en medio ácido desarrolla un complejo amarillo de vanadofosfomolibdato cuya densidad óptica se mide a 430 nm en espectrofotómetro. La intensidad de la señal a esta longitud de onda es proporcional a la concentración de elemento presente en la muestra (Martín-Prevel et al., 1987).

### 3.8.5 *Determinación de nitrógeno en material vegetal. Método Kjeldahl*

El método consiste en la digestión 0.5 g de material molido con 20 mL de ácido sulfúrico concentrado (98 %) y un catalizador (selenio) durante 2 horas a 150 °C y



reflujo. En este paso, todo el nitrógeno de la muestra pasa a la forma  $\text{NH}_4^+$ . Una vez digerida, la muestra se deja enfriar y se coloca en un sistema de destilación (*Buchi*) con capacidad para 4 muestras y a cada uno de ellas se le añaden 6-8 gotas de indicador (*fenolftaleína*) y agua destilada hasta un volumen de 100 mL. Estas disoluciones se neutralizan con NaOH (0.1 N), detectándose por el cambio de color a rosa oscuro, con lo que el  $\text{NH}_4^+$  pasa a  $\text{NH}_3$ . A continuación las muestras se destilan en arrastre de vapor recogiendo el destilado sobre matraces que contienen 15 mL de HCl (0.1 N) y 6-8 gotas de indicador *Shiro-Tashiro* (0.08 g de azul de metileno y 0.125 g de rojo de metilo en 100 mL de etanol de 96°) hasta que el volumen total recogido alcanza 300 mL (8 ó 10 minutos de destilación). Una vez realizada la destilación, los matraces conteniendo el destilado se dejan enfriar y el exceso de HCl (0.1 N) se valora con NaOH (0.1 N). El % de N en la muestra puede calcularse con la fórmula:

$$\%N = \frac{0.1 \times (V - V') \times 0.014}{p} \times 100$$

V = volumen de NaOH necesario para neutralizar un blanco (0 % de N)

V' = volumen de NaOH consumido por HCl de exceso

p = peso de la muestra

### 3.8.6 *Determinación de hierro activo*

Para determinar el hierro activo se utilizó 1 g de material fresco. Después de cortarlo finamente con una tijera de plástico, se incubó durante 48 horas en 10 mL de  $\alpha, \alpha'$  dipiridilo (83 mM, pH=3). El extracto se filtró en un cartucho C18 Sep-Pack (Waters) y la absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 522 nm (Abadía et al., 1984).

### 3.9 *Determinación de parámetros de fluorescencia*

La fluorescencia de clorofila a (Chl a) emitida por las plantas es un buen indicador de su actividad fotosintética. El análisis de los parámetros de fluorescencia, obtenidos por

la aplicación de distintas técnicas, permite profundizar en el conocimiento de procesos como: la absorción de luz, la transferencia de energía y las reacciones fotoquímicas en el PSII. Los avances en la metodología (Schreiber, 1986) han hecho que desde hace unos años, la fluorescencia sea una herramienta importante en la investigación de la fisiología vegetal tanto básica como aplicada.

### 3.9.1 Fluorescencia modulada

En esta técnica se utiliza una fuente luz modulada para excitar la fluorescencia en combinación con un sistema de detección que registra únicamente la fluorescencia emitida a la frecuencia de la luz de excitación. Es por tanto posible excitar la muestra con luz blanca continua que contenga la misma longitud de onda en la que la fluorescencia va a ser detectada y el detector únicamente registrará la fluorescencia emitida en la misma frecuencia que la luz modulada (Figura 3.7).

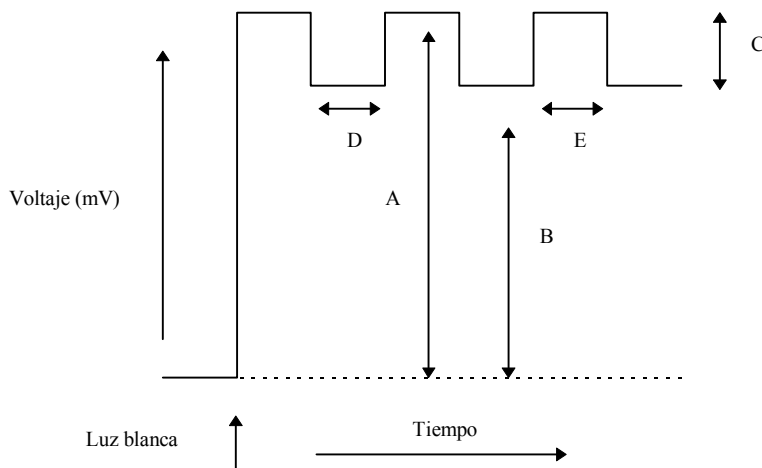


Figura 3.7: Esquema del sistema de luz modulada.

Cuando la muestra está expuesta a la luz modulada y a la luz blanca (periodo E en la Figura 3.7) la señal eléctrica alcanza el nivel A, que es debido a la fluorescencia generada en la muestra excitada por las dos fuentes de luz y a la luz blanca reflejada por la superficie de la muestra. Cuando la luz modulada está apagada (periodo D en la Figura

3.7) la señal alcanza el nivel B, debido a la fluorescencia generada en la muestra por la luz blanca y a la luz blanca reflejada por la superficie de la hoja. La diferencia entre los niveles A y B da la fluorescencia generada por la luz modulada (C). Por tanto, la señal que se mide y es enviada al sistema de registro es C. D es el tiempo durante el cual la luz modulada está apagada y E el tiempo que está encendida.

En los experimentos realizados, las medidas se llevaron a cabo con un fluorímetro PAM (Pulse Amplitude Modulation, Walz) desarrollado por Schreiber (1986). La luz modulada de medida (LM) induce la fluorescencia y es generada por diodos emisores de luz (LED, Stanley) que producen pulsos de luz roja ( $\lambda = 650$  nm, anchura a la mitad de la banda 25 nm) de 1 ms de duración a una frecuencia variable de 1.6 o 100 kHz en una secuencia similar a la de la Figura 3.7. La luz procedente de los diodos pasa a través de un filtro de corte ( $\lambda > 670$  nm, Balzers) de modo que evita que incida sobre la hoja luz de la misma longitud de onda que la de emisión de fluorescencia ( $\lambda > 685$  nm). La fluorescencia llega a un detector de fotodiodos (S 1723, Hamamatsu) protegido con un filtro de corte ( $\lambda > 700$  nm, Schott RG 9). Un sistema selectivo de amplificación de pulsos ignora todas las señales excepto la fluorescencia excitada durante el pulso de medida de 1 ms.

Una fibra óptica con 4 brazos, guía hasta la muestra las distintas luces necesarias para la medida. Por uno de ellos se conduce la luz de medida procedente del fluorímetro, por otro se recoge la fluorescencia emitida y se conduce al detector. Los otros dos brazos sirven para guiar, por un lado los pulsos de luz blanca saturante (PS) procedentes de una lámpara KL 1500 tipo FL 103 (Walz) de intensidad de luz variable, provista de un obturador electrónico de rápida apertura; y por el otro la luz actínica (LA) producida por una lámpara KL 1500 tipo FL 101 (Walz) de intensidad de luz variable. El fluorímetro consta de 2 unidades; el módulo PAM-101 que controla la intensidad, la frecuencia de la luz de medida (1.6 ó 100 kHz) y la amplificación de la señal, y el módulo PAM-103 que controla la frecuencia y duración de los pulsos saturantes producidos por la lámpara FL 103. Se dispone de un montaje para realizar fluorescencia acoplado a un PAM, la fibra óptica tiene cuatro brazos conectados con el lugar donde se coloca la muestra. Uno está conectado con la luz roja de baja intensidad para medir  $F_0$ . Otro va al detector, otro está

conectado a la luz de alta intensidad para dar un pulso y el último a la luz de intensidad variable que se utiliza en cada experimento para hacer las medidas. Se puede regular la luz de medida mediante el uso de filtros de intensidad.

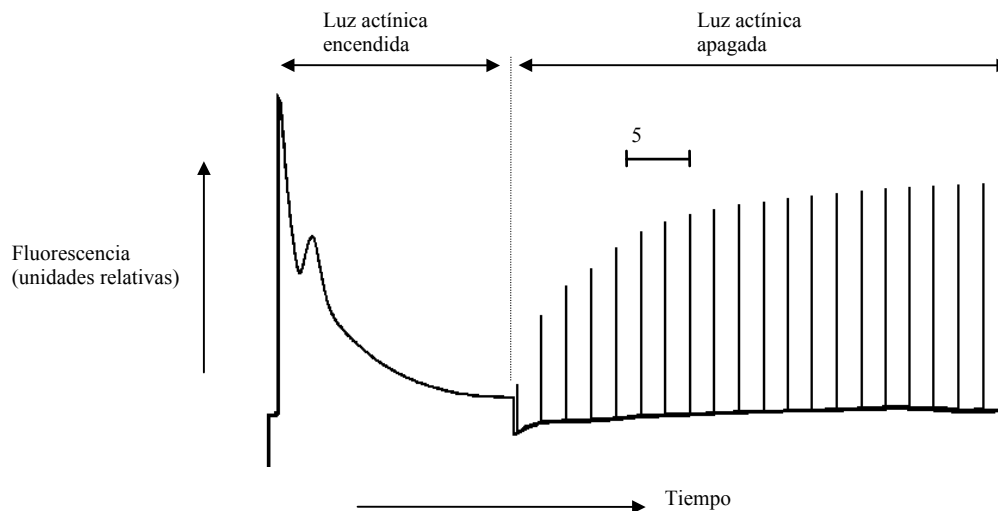


Figura 3.8: Fluorescencia de clorofila durante la iluminación con luz actínica y recuperación en la oscuridad del quenching no fotoquímico.

La Figura 3.8 muestra el protocolo de la medida. Una vez obtenido el nivel estacionario de fluorescencia, se apagó la luz actínica alcanzándose el nivel  $F'_0$  rápidamente, el quenching no fotoquímico se registró dando pulsos saturantes ( $7000 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) de 800 ms de duración a intervalos regulares lo que aumenta el nivel de fluorescencia hasta el máximo  $F'_m$ . Como se observa en la Figura 3.8, se van alcanzando niveles más altos con el tiempo. Esto refleja la relajación del quenching no fotoquímico (NPQ) desde el máximo (menor valor de  $F'_m$ ) hasta el final de la medida.

El experimento realizado consistió en calcular el NPQ de discos de cebada (*Hordeum vulgare* L.) control y mutante. En todos los casos, las muestras fueron iluminadas los 10 primeros minutos con una intensidad de  $2000 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , y a continuación quedaron en parcial oscuridad ( $23 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). y recibieron un pulso de luz saturante. Cada muestra recibió un solo pulso de luz para no producir artefactos.

### 3.9.2 Medidas de fluorescencia con el fluorímetro portátil

Se midió la cinética de fluorescencia de clorofila en hojas intactas (unidas a la planta) mediante un fluorímetro portátil, PEA (Hansatech).

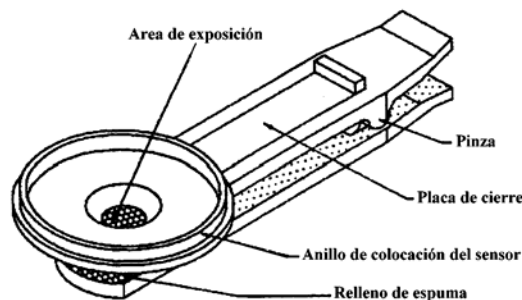


Figura 3.9. Pinza para hojas, suministrada con el fluorímetro PEA.

Previamente a la medida se colocaron unas pinzas especiales (Figura 3.9) suministradas con el fluorímetro, que mantienen en oscuridad la zona de medida de la hoja mediante un obturador (lengüeta de acero). Una vez transcurrido el tiempo de adaptación a la oscuridad, se coloca el sensor sobre la pinza y se abre el obturador para realizar la medida. Las hojas enteras se mantuvieron en oscuridad hasta que se realizaron las determinaciones (30 minutos como mínimo) para obtener el máximo grado de oxidación de  $Q_A$ .

El sensor (Figura 3.10) alberga conjuntamente la fuente de iluminación y el detector. La fuente de iluminación consiste en una luz roja (650 nm), de intensidad regulable, producida por 6 LEDs que están enfocados sobre la superficie de la hoja, en nuestro caso la intensidad utilizada fue de  $600 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (35 % del máximo). El detector es un fotodiodo de alta sensibilidad asociado con un circuito amplificador y con un filtro de corte ( $\lambda < 700 \text{ nm}$ ) que asegura que la luz que incide sobre él sea únicamente la emitida por la clorofila de la hoja en forma de fluorescencia. El sensor está conectado mediante un cable de 2 m de longitud a una caja de control que registra la señal mediante un convertidor A/D. La señal inicial es recogida durante 2 ms a una frecuencia

de 100 kHz (200 puntos) para obtener una buena resolución en la medida de  $F_0$ , los siguientes puntos den registrados a una frecuencia de 500 Hz (4738 puntos) durante 9.476 s, y finalmente los últimos 62 puntos se recogen a una frecuencia de 10 Hz (6.2 s). El tiempo total de medida fue de 15 s y el número total de puntos en cada medida fue de 5000. Una vez recogidos todos los puntos, los parámetros de fluorescencia ( $F_0$ ,  $F_m$  y  $F_v/F_m$ ) son automáticamente calculados y, bien pueden ser almacenados en la memoria del registrador (máximo de 100) hasta su utilización, o bien son mostrados en una pantalla en la caja de control.

Las medidas de fluorescencia se realizaron en hojas de soja y melocotonero, control, deficientes en hierro y en manganeso.

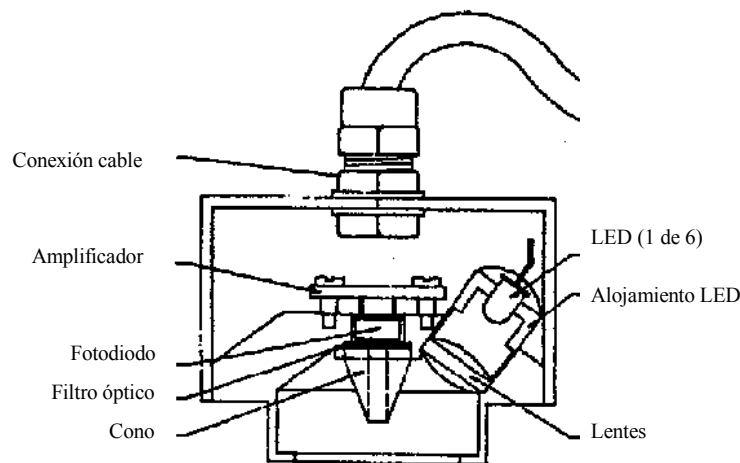


Figura 3.10. Esquema del sensor utilizado en la medida de fluorescencia con el fluorímetro portátil

### 3.10 Medida del potencial hídrico

La técnica más sencilla para este tipo de mediciones fue desarrollada por Scholander et al. (1965). Se basa en la idea de que el potencial hídrico de los tejidos es la tensión que fuerza la succión de agua. Para contrarrestar dicha tensión basta con aplicar una presión positiva que anule dicha tensión. Justo en ese momento, el agua será liberada por los tejidos, saliendo por el xilema. La fuerza de succión en el xilema es mínima en las

raíces, y aumenta conforme nos acercamos a las células del mesófilo de las hojas, este gradiente de potencial hídrico es el que produce el movimiento del agua.

Para determinar el potencial hídrico se corta una hoja o un brote, debido a ello, la columna de agua en el xilema se rompe y se retira hacia el interior, forzada por la succión de los tejidos. Inmediatamente después de cortarlo, se introduce el brote en la cámara de presión (Figura 3.11), en la cual, la presión externa puede ser aumentada gradualmente hasta compensar la tensión en el interior de las células. Este punto se alcanza cuando el agua sale de los tejidos y empuja la columna del agua en el xilema hasta la zona de corte, mojándolo. En ese instante se corta la entrada de gas a la cámara. La presión aplicada se lee directamente en un manómetro, y corresponde a la presión negativa que existe en el brote.

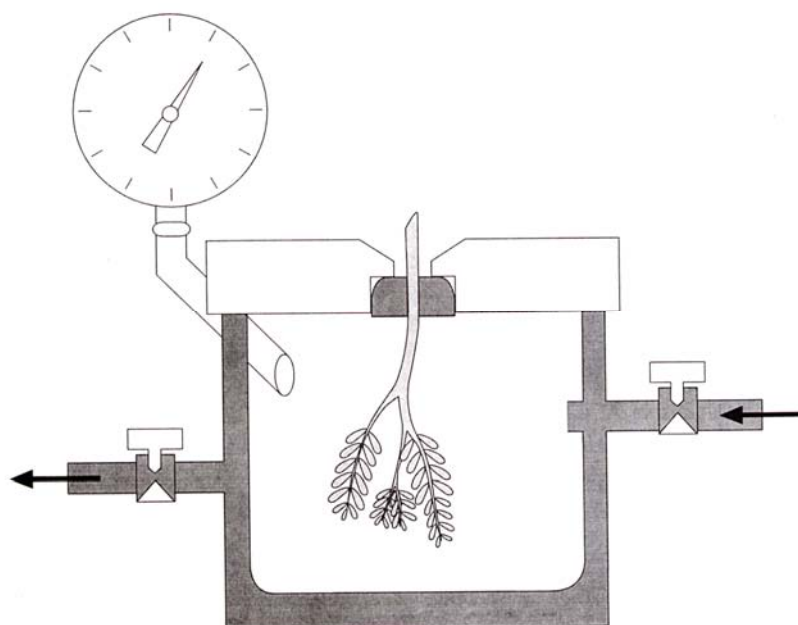


Figura 3.11. Diagrama de una cámara de presión tipo Scholander, utilizada para determinar el potencial hídrico de los tallos. La presión va aumentando en el interior de la cámara hasta que empieza a salir agua por el extremo del corte del tallo. En ese momento la presión medida es igual y opuesta a la que tienen las hojas.

### 3.11 *Análisis de prolina*

El análisis de prolina está basado en el método de Bates et al. (1973). Esta técnica se fundamenta en una reacción colorimétrica de los aminoácidos libres con la ninhidrina. Se forma un complejo coloreado, cuya absorción depende de la concentración de aminoácidos libres que contenga la muestra.

Los reactivos utilizados son:

- Ácido ninhidrínico: 1.25 g de ninhidrina + 30 mL de ácido acético + 20 mL de ácido fosfórico 6 M.
- Ácido sulfosalicílico: 3 % en H<sub>2</sub>O
- Tolueno

Material: 0.5g de muestra pesados en fresco. (Se puede congelar a -20° C hasta su utilización).

Se homogeneiza el material con ácido sulfosalicílico al 3 % y se filtra con papel Watman n° 2.

La reacción tiene lugar calentando a 100 °C durante 1 hora. Se toman 2 mL del filtrado, 2 mL de ácido ninhidrínico y 2 mL de ácido acético glacial y se ponen en un baño a 100 °C. La reacción se detiene introduciéndola en baño de hielo.

Después de la reacción, el cromóforo se extrae con 4 mL de tolueno, agitando vigorosamente y dejando reposar la muestra durante 15 – 20 minutos. Luego se separa el tolueno de la fase acuosa mediante una pipeta Pasterur y se mide en el espectrofotómetro a 520 nm.

La cuantificación se hace por comparación con el standard de prolina.





## ***4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN***



#### **4.1 El ciclo de las xantofilas en especies “modelo”**

En este capítulo se exponen resultados obtenidos trabajando con plantas modelo. Estas especies han sido ampliamente estudiadas en nuestro laboratorio, por su fácil cultivo, rápido crecimiento y reproducción del material obtenido. En los experimentos planteados, se somete el material vegetal a condiciones que produzcan alteraciones en la fotosíntesis, para luego estudiar las variaciones que experimenta el ciclo de las xantofilas como respuesta a esas modificaciones.

##### **4.1.1 Antecedentes**

La oxidación del agua en el proceso fotosintético requiere un potencial de oxidación extremadamente alto. En estas condiciones, los pigmentos y proteínas del PSII, especialmente la proteína D1, puede dañarse por la formación de P680 en estado triplete que induce la producción de oxígeno en estado singlete y también por la oxidación debida a la especie P680<sup>+</sup> (Barber, 1995; Andersson et al., 1998). El daño al centro de reacción ocurre en cualquier condición y parece ser una consecuencia inevitable de la función del PSII. La extensión del daño es alta en exceso de luz y se exagera en presencia de otros factores de estrés. La reparación de la proteína D1 implica el desensamblaje, la proteólisis y la introducción del polipéptido D1 sintetizado *de novo* (Park et al., 1995). Este proceso no es energéticamente costoso, pero tiene una cinética muy lenta. Cuando la extensión de

daño excede la tasa de reparación, se acumulan centros inactivos, lo que provoca una disminución de la fotosíntesis. Además, el centro de reacción dañado puede generar clorofilas oxidadas y radicales libres y causar graves daños a la estructura del tilacoide. Finalmente, debido a que la reparación de los centros dañados es lenta, se producirán pérdidas en el rendimiento fotosintético, incluso tras haberse eliminado el exceso de luz (Horton et al., 1996). Por lo tanto, es de suponer que exista una fuerte presión de selección para desarrollar mecanismos de defensa ante el exceso de radiación lumínica. Ciertas respuestas fisiológicas, como la alteración del ángulo de inserción de las hojas y/o los movimientos de los cloroplastos ayudan a disminuir la absorción de luz. A escala molecular, existen mecanismos de disipación que provocan la disrupción del normal funcionamiento de los complejos captadores de luz, eliminando el exceso de radiación en forma de calor (Demming-Adams y Adams, 1992a). Actualmente, se ha alcanzado un amplio acuerdo acerca de la estrecha relación entre la disipación no-fotoquímica de energía y el ciclo de las xantofilas -conversión reversible, dependiente de la luz, de violaxantina a zeaxantina- (Horton et al., 1996). Este ciclo se describió hace varios años (Hager, 1966), aunque solo en la última década ha empezado a relacionarse con la disipación del exceso de energía por el aparato fotosintético (Demmig Adams y Adams, 1992b; Maslova et al., 1996; Gilmore, 1997).

#### *4.1.2 Funcionamiento del ciclo: verificación de las hipótesis existentes*

Según Hager y Holocher (1994), el ciclo VAZ se localiza en la membrana del tilacoide. La enzima violaxantina desepoxidasa se encuentra libre en el lumen tilacoidal a  $\text{pH} > 6.5$ , pero la disminución de  $\text{pH}$  asociada con la iluminación, hace que se ancle a la membrana ( $\text{pH}$  óptimo 5.2). El sustrato lipofílico, que es la violaxantina, se transforma así en zeaxantina con la ayuda del co-sustrato ascorbato. El deshidroascorbato que se produce se reduce por el NADPH vía glutatión. La transformación de zeaxantina en violaxantina vía anteraxantina está catalizada por la zeaxantina epoxidasa, una oxigenasa, que utiliza NADPH y  $\text{O}_2$  como co-sustratos, que se localiza en la superficie del tilacoide en contacto con el estroma (Hager, 1975). La actividad de la violaxantina desepoxidasa está controlada por el  $\text{pH}$  del lumen del tilacoide que depende, a su vez, del transporte

electrónico inducido por la luz y, en consecuencia, de los niveles de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NADP}^+$  y  $\text{ADP} + \text{P}_i$ . La actividad de la zeaxantina epoxidasa está controlada por la concentración de  $\text{NADPH}_2$  y  $\text{O}_2$ . Este modelo se representa en la Figura 4.1.

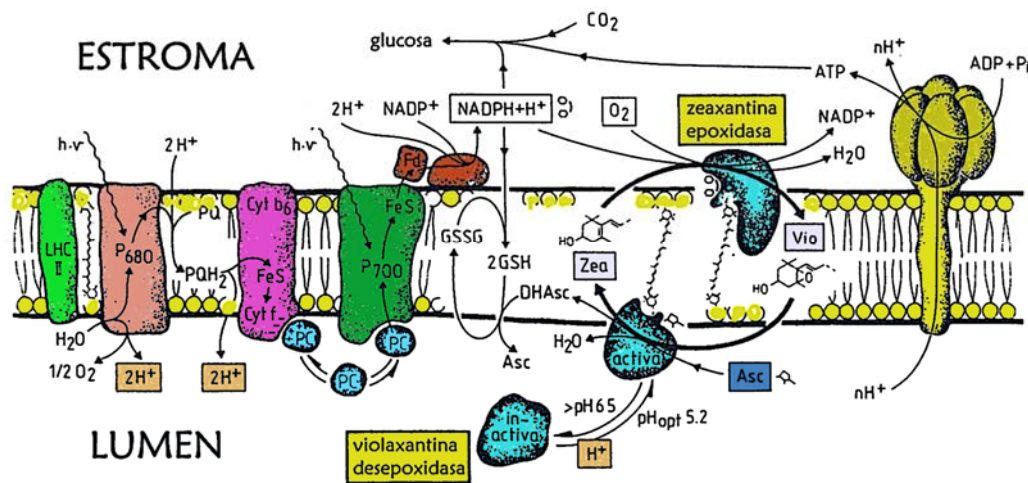


Figura 4.1. Modelo de interconversión de violaxantina a zeaxantina, vía anteraxantina y localización de los principales componentes del aparato fotosintético en la membrana tilacoidal (adaptado de Hager y Holoher, 1994).

Es decir, para que se produzca la interconversión de violaxantina a zeaxantina, es preciso que el pH del lumen tilacoidal sea menor de 6.5, siempre que haya ascorbato en el medio, que actúe como co-sustrato.

En este capítulo se va a comprobar el grado de actividad del ciclo de las xantofilas en tilacoides y en hojas de plantas control, modificando artificialmente el pH del lumen. Posteriormente, se hará lo mismo para plantas con el aparato fotosintético modificado por la ausencia de hierro en la solución de cultivo, que tienen menos cantidad de estructuras fotosintéticas. Por último, se utilizarán plantas que tienen menor tamaño de antena fotosintética que las usadas como control, para verificar la respuesta del ciclo de las xantofilas ante estas situaciones que provocan menor procesamiento de energía en la fotosíntesis, y, por tanto, mayor necesidad de mecanismos de disipación para proteger el aparato fotosintético.

Las especies utilizadas, por su disponibilidad y conocimiento previo, fueron remolacha (*Beta vulgaris* L.) y maíz (*Zea mays* L.). Para trabajar con plantas deficientes en antena se utilizó cebada (*Hordeum vulgare* L.), por la disponibilidad de una mutante con esta característica. En el momento de la recolección, las hojas estaban totalmente desarrolladas, bien nutridas y su eficacia fotosintética, determinada a través de medidas de fluorescencia, era máxima (Morales et al., 1998).

#### 4.1.2.1 Acidificación artificial del lumen tilacoidal

En condiciones naturales, la acidificación del lumen se produce cuando el transporte electrónico fotosintético está activo. Es decir, cuando la luz incide sobre las hojas y comienzan las reacciones de la fotosíntesis. Pero también puede inducirse artificialmente suspendiendo o infiltrando el material vegetal con soluciones tampón a pH's ácidos.

El experimento planteado con remolacha consistió en el aislamiento de membranas cloroplásticas de remolacha, en el medio de extracción descrito en el apartado 3.4 de material y métodos. Los tilacoides aislados se resuspendieron, a vacío durante 30 minutos, en soluciones tampón a pH 5.3 y 7.5 para conseguir la activación de las enzimas violaxantina desepoxidasa y zeaxantina epoxidasa respectivamente. En ambas soluciones se añadió ascorbato como co-sustrato. Posteriormente se procedió a iluminar una alícuota de estas suspensiones ( $1500-1600 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), mientras que el resto se siguió manteniendo en oscuridad. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.2.

La concentración de tilacoides con la que se trabajó, así como los tiempos de iluminación se eligieron tras una serie de ensayos previos cuyos resultados no se muestran en el trabajo. Se utilizaron 4  $\mu\text{L}$  de tilacoides por mL de solución, resultando una concentración de clorofila total =  $5.25 \mu\text{L mL}^{-1}$ .

Tras los 30 minutos de infiltración la concentración de zeaxantina en tilacoides alcanzó un valor de 25.7 y 9.1 % para los pH's 5.3 y 7.5 respectivamente. De las muestras que continuaron en oscuridad, solo la incubada a pH 5.3, incrementó ligeramente su concentración de Z, mientras que en la suspendida a pH 7.5 descendió drásticamente

hasta el valor 0. Sin embargo, en las muestras iluminadas, incubadas a pH 7.5, la cantidad de zeaxantina disminuye ligeramente. Como hipótesis, podría apuntarse que, los tilcoides a pH 7.5 sufren dos efectos contrapuestos, por una parte, el lumen tilacoidal estaría enriqueciéndose en protones que provienen del transporte electrónico fotosintético, pero, al estar inmersos en un tampón a un pH más básico, no se produce, en apariencia, la necesaria acidificación del lumen para activar la desepoxidasa. Como confirmación de esta hipótesis, puede observarse que en los tilcoides iluminados a pH 5.3 se observa el efecto aditivo de la luz al producirse un aumento en la concentración de Z, mucho mayor que en las mantenidas en completa oscuridad a este mismo pH.

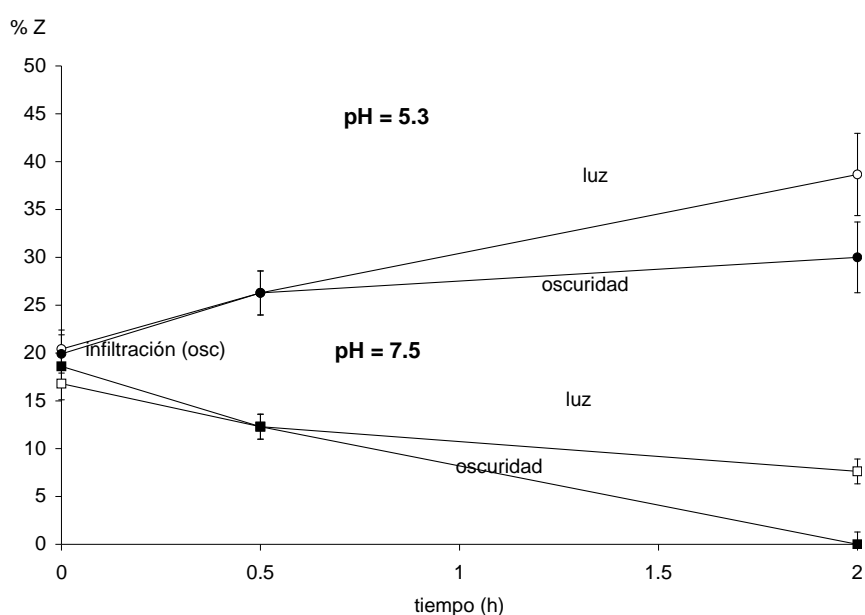


Figura 4.2: Tilcoides de remolacha resuspendidos en soluciones de pH 5.3 y 7.5 y sometidos a distintos tratamientos tanto en la luz como en la oscuridad para comprobar la variación de la concentración de zeaxantina.

A la vista de los resultados anteriores, se planteo un nuevo experimento en las mismas condiciones, pero ampliando la toma de datos hasta las 6 horas. De esta forma, podría evaluarse la capacidad del tampón para estabilizar el pH del lumen y en qué



momento el efecto de la entrada de protones procedentes de la fotosíntesis no puede ser neutralizado.

Tabla 4.1: Variación de la concentración de zeaxantina en las dos soluciones tampón de trabajo (pH 5.3 y 7.5) en tilacoides de remolacha incubados en oscuridad a diferentes tiempos.

Tiempo (h) \ pH	Luz		Oscuridad	
	5.3	7.5	5.3	7.5
0.5	26.28±2.00	12.30±1.85	26.28±2.00	12.30±1.85
2	33.00±3.70	11.82±0.80	27.22±3.05	4.65±2.53
4	46.82±2.03	19.31±1.30	39.58±0.06	0.00±0.00
6	47.32±4.07	32.05±3.35	33.54±1.86	0.00±0.00

En la Tabla 4.1 se puede apreciar cómo los valores de zeaxantina siguen aumentando hasta que se alcanza el máximo en torno a 4 horas de permanencia en oscuridad. Posteriormente los datos obtenidos apuntan un ligero descenso, que puede deberse a que la ATP'asa sigue actuando, y va haciendo que el pH en el lumen empiece a ser menos ácido. En el caso de los tilacoides incubados en presencia de luz a pH 5.3, la máxima concentración de zeaxantina se alcanza entorno a las 4 horas. A partir de este momento se estabiliza, dando la impresión de que, en estas condiciones, el ciclo no puede virar en mayor porcentaje a la forma zeaxantina. Sin embargo, los tilacoides a pH 7.5, en presencia de luz mantienen su capacidad de sintetizar zeaxantina y al cabo de 6 horas, parece que aún no se ha alcanzado el valor máximo, pero en este punto, el efecto de la fotosíntesis prima sobre el efecto tampón del medio de suspensión.

#### 4.1.2.2 Plantas control. Infiltraciones con diferentes pH

Una vez comprobado el funcionamiento del ciclo *in vitro* en suspensiones de tilacoides, se procedió a trabajar *in vivo* con discos de hojas. El experimento que se

planteó fue muy similar al diseñado para tilacoides, es decir, infiltración a vacío con soluciones de distintos valores de pH (Buch et al., 1994; Guardia et al., 1996). Sin embargo, en este caso podrían existir dudas, ya que la solución no sólo tenía que atravesar la membrana del tilacoide para entrar en el lumen, sino que tenía que penetrar a través de la cutícula de la hoja, membrana celular, envoltura del cloroplasto y finalmente, modificar la acidez del lumen.

Según el experimento anterior, el pH óptimo para que la actividad de ambas enzimas sea máxima, parece coincidir con los referidos en la bibliografía. Sin embargo, en el proceso de infiltración podrían producirse modificaciones de pH al atravesar los distintos medios (fluido apoplástico, citoplasma, estroma), por lo que en este experimento se utilizaron cinco soluciones con distintos valores de pH (4, 5, 6, 7 y 8). Asimismo, como fuente de luz actínica se utilizó una lámpara de tungsteno colocada a una distancia tal que la intensidad que recibía la muestra era de 1500-1600  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

Las soluciones utilizadas se describen en el apartado 3.3 de Materiales y Métodos. El experimento se repitió en dos especies que, en principio, por la diferencia en la rigidez de sus hojas, deberían mostrar distinta resistencia a la penetración de los tampones.

En el momento de la recolección, las plantas tenían 45 días de edad aproximadamente. Antes del corte de los discos, las plantas estuvieron expuestas a la luz de la cámara de cultivo durante dos horas.

De la Figura 4.3, se puede deducir que, cuando sometemos las hojas de remolacha a una intensidad luminosa mucho mayor que la utilizada para su desarrollo, la cantidad de componentes del ciclo de las xantofilas que se encuentra en la forma zeaxantina es prácticamente el 100 %, independientemente del pH infiltrado. En este caso, es posible que el gradiente de pH que se produce debido a la entrada de protones procedentes de la fotosíntesis supere al que pueda ser amortiguado por las soluciones tampón infiltradas. Hay que resaltar que, en el caso del experimento realizado en tilacoides, aun cuando las condiciones para la activación de la violaxantina desepoxidasa fueron óptimas, nunca pudieron alcanzarse porcentajes de zeaxantina superiores al 45 %, lo que quizá se deba a la pérdida de integridad funcional de la estructura tilacoidal, tras haber sufrido los

procesos de separación y aislamiento. Sin embargo, en el caso de los discos de hoja, las estructuras celulares, incluyendo las fotosintéticas se mantienen intactas, y, por tanto, de producirse las condiciones adecuadas, el ciclo podría alcanzar la plena funcionalidad.

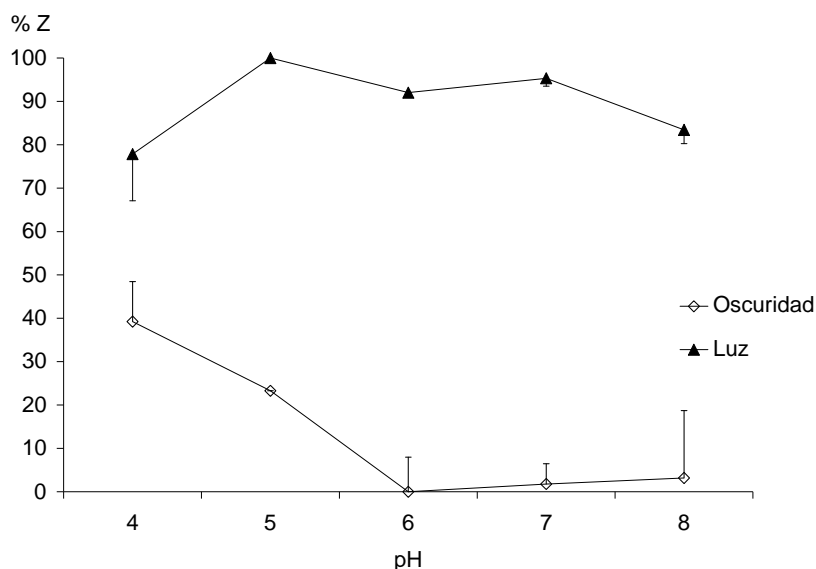


Figura 4.3: Variación de la concentración de Z (expresado en % respecto al resto de los componentes del ciclo VAZ) en discos de hojas de remolacha resuspendidos en la solución tampón del pH correspondiente durante 4 horas, tanto en oscuridad como iluminados.

En oscuridad, el pH de la solución de trabajo es más importante. Como era de esperar a  $\text{pH} > 6$ , el porcentaje de zeaxantina es prácticamente nulo. Sin embargo, el mayor valor de zeaxantina se obtiene infiltrando a los valores de pH más ácidos. Tras 4 horas de oscuridad, los pigmentos del ciclo VAZ de las hojas de remolacha en condiciones óptimas de crecimiento, se encuentran en su forma epoxidada (Morales et al., 1990). Por lo tanto, la zeaxantina sintetizada tras infiltrar a pH 4 y 5 deberá ser consecuencia de la activación de la violaxantina desepoxidasa inducida por esta acidez. Es decir, la solución habrá alcanzado el lumen tilacoidal.

Una vez comprobada la efectividad de las infiltraciones a distintos pH en remolacha, material tierno que, en teoría, no debe ofrecer excesiva resistencia a la penetración de las soluciones, se repitió el experimento en plantas de maíz. Las hojas de

maíz son más rígidas que las de remolacha, por lo que podría pensarse en un aumento de la resistencia a la infiltración para que, finalmente, la solución alcance el lumen tilacoidal.

El experimento en maíz confirmó los resultados que se habían obtenido en remolacha, como se observa en la Figura 4.4, pero hay algunos puntos que merecen ser destacados. Por una parte, los valores de zeaxantina que se alcanzan en la oscuridad son siempre superiores a cero y mucho más altos que los obtenidos para remolacha. Por otra parte, el hecho de encontrar una elevada concentración de zeaxantina en la oscuridad al infiltrar a pH's ácidos confirma la idea de que éste es el requerimiento más importante para que la enzima pueda actuar. Además, la hipótesis de que no pudiese penetrar en el interior del tilacoide también queda descartada, ya que es a pH 4 y 5 cuando, de nuevo, los valores alcanzados son más elevados.

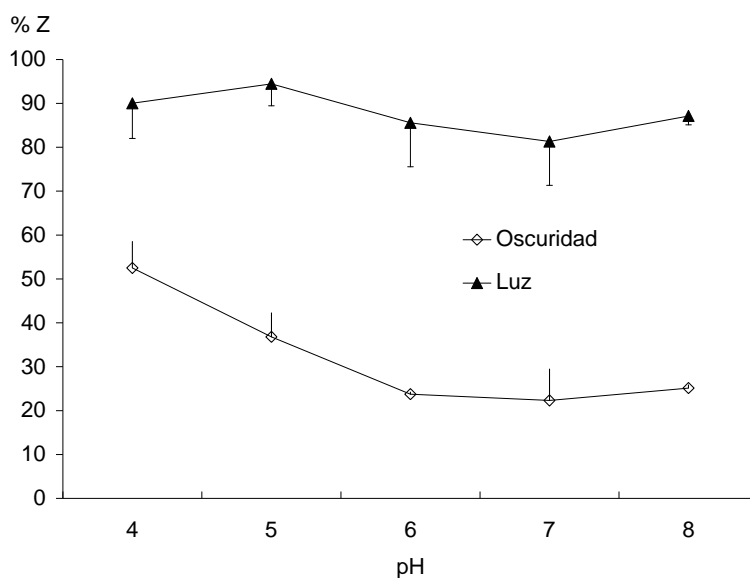


Figura 4.4: Variación de la concentración de Z (expresado en % respecto al resto de los componentes del ciclo VAZ) en discos de hojas de maíz resuspendidos en la solución tampón del pH correspondiente durante 4 horas, tanto en oscuridad como iluminados.

#### 4.1.2.3 Disminución de estructuras fotosintéticas: deficiencia de hierro

Una vez comprobado la funcionalidad del ciclo de las xantofilas y la posibilidad de modificarlo artificialmente mediante infiltraciones a distintos pH's, en plantas cultivadas en condiciones óptimas de humedad, temperatura y nutrientes disponibles, se planteó la posibilidad de utilizar esta herramienta para estudiar el ciclo en plantas sometidas a un estrés (deficiencia de hierro) que modifica la composición en pigmentos de las hojas y su capacidad fotosintética.

La deficiencia de hierro produce una disminución en el número de lamelas por cloroplasto (Spiller y Terry, 1980); este proceso está asociado con una disminución en todos los componentes de la membrana, incluyendo los transportadores de electrones de la cadena fotosintética y los pigmentos captadores de luz (Morales et al., 1990, 1994; Abadía y Abadía 1993; Penev, 1995). Actualmente se ha demostrado, por técnicas de fluorescencia aplicadas a remolacha, que se produce una disminución en la eficacia de conversión fotosintética en hojas cuyo contenido en clorofila es muy bajo (Morales et al., 1991; Belkhodja, et al., 1998). Por otra parte, la clorosis férrica se caracteriza por modificar la actividad del ciclo VAZ aumentando la concentración de zeaxantina como respuesta al estrés lumínico (Abadía et al., 1991). Como hipótesis cabría pensar que la acidificación del medio conseguida por la infiltración a pH's bajos se sumaría a la activación natural de la enzima potenciada por dichas condiciones de estrés.

El experimento se realizó sobre las mismas especies (remolacha y maíz) y en las mismas condiciones que en el caso descrito en el apartado anterior, excepto que el medio de cultivo no contenía hierro, en el caso de la remolacha, o la concentración era muy baja, en el caso del maíz (esta planta no puede desarrollarse en ausencia total de Fe).

Las plantas de remolacha clorótica incubadas durante 4 horas en presencia de luz, no mostraron diferente actividad del ciclo para los valores de pH que se utilizaron (Figura 4.5). De hecho, al igual que las plantas verdes, los valores de zeaxantina encontrados se aproximaron al máximo posible (100 %), independientemente del pH infiltrado. Sin embargo, el umbral de zeaxantina en discos adaptados a la oscuridad durante 4 horas fue un 30 % mayor que para plantas control (Figura 4.3), incluso para los pH's más ácidos. Esto sugiere que el estrés al que está sometida la planta es suficiente como para activar el

ciclo y que parte de la cantidad total de los pigmentos que lo constituyen se encuentre en la forma desepoxidada.

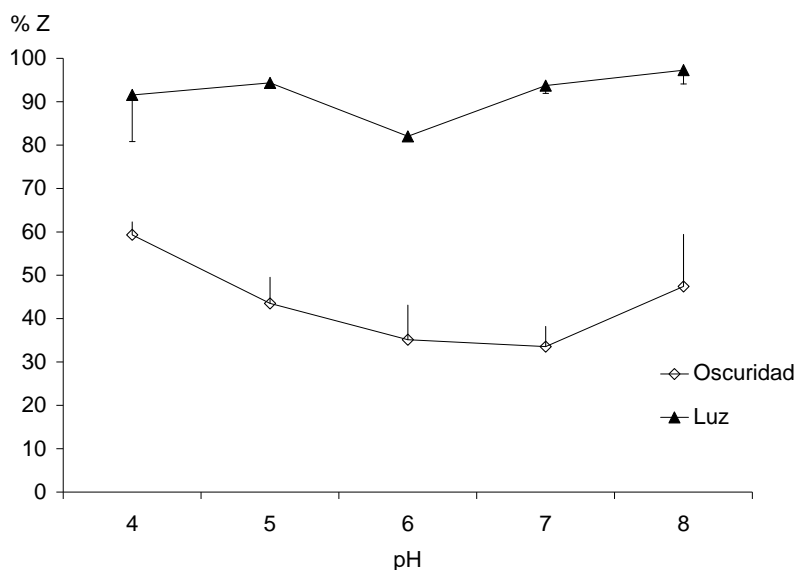


Figura 4.5: Variación de la concentración de Z (expresado en % respecto al resto de los componentes del ciclo VAZ) en discos de hojas de remolacha clorótica resuspendidos en la solución tampón del pH correspondiente durante 4 horas, tanto en oscuridad como iluminados.

Los datos correspondientes a los experimentos realizados sobre discos de hojas de maíz clorótico se muestran en la Figura 4.6.

En presencia de luz se puede observar que, en todos los casos, se ha producido un desplazamiento hacia la forma zeaxantina más o menos pronunciado según las condiciones del experimento. La mayor concentración de zeaxantina se encuentra en el material clorótico. De hecho, al aumentar la severidad de la deficiencia de hierro, mayor es la actividad del ciclo, como ya ha sido descrito para numerosas especies (Morales et al., 1994).

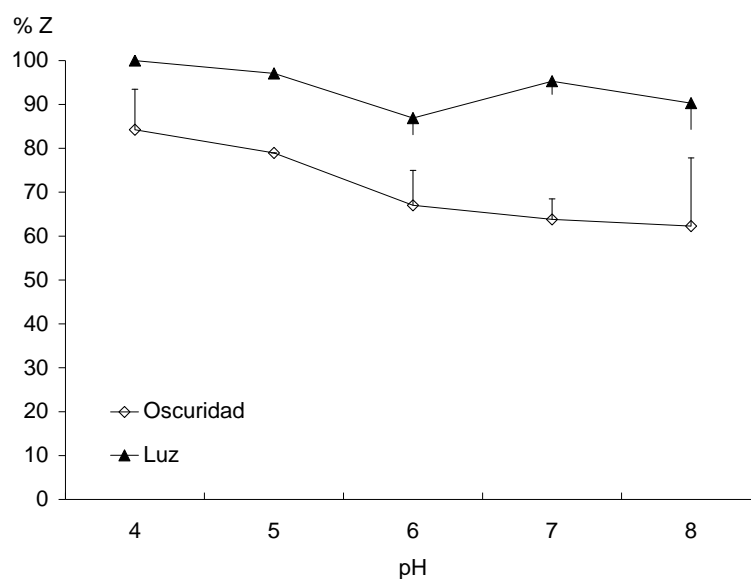


Figura 4.6: Variación de la concentración de Z (expresado en % respecto al resto de los componentes del ciclo VAZ) en discos de hojas de maíz clorótico resuspendidos en la solución tampón del pH correspondiente durante 4 horas, tanto en oscuridad como iluminados.

Kramer et al. (1999), propusieron un modelo para simplificar los procesos que ocurren asociados al gradiente de protones que se establece entre ambos lados de la membrana del tilacoide. Este gradiente contribuye por un lado a la formación del ATP, pero también sirve para activar algunos de los procesos que regulan la fotosíntesis. Según este modelo, en plantas intactas bajo condiciones favorables, la fotosíntesis está regulada, de manera que el pH del lumen varía entre 5.8 y 6.5, rango de modulación de la actividad violaxantina desepoxidasa, no restringe significativamente la conversión reversible del citocromo  $b_6f$  y no desestabiliza el centro productor de oxígeno. Sólo en condiciones de estrés, la entrada de luz supera la capacidad tanto de la fotosíntesis como de los procesos de regulación, el pH del lumen desciende a valores inferiores a 5, favoreciendo la fotoinhibición.

En plantas desarrolladas en condiciones óptimas se ha comprobado que, variando el pH del entorno tilacoidal, se desplaza el equilibrio entre los pigmentos del ciclo VAZ, tanto en suspensiones de cloroplastos como en discos de hoja. La variación de pH puede

producirse por el gradiente protónico producido en la fotosíntesis o inducirse artificialmente infiltrando con soluciones de distinta acidez. Este mismo desplazamiento se produce amplificado cuando se utilizan plantas deficientes en hierro, sugiriendo la necesidad de una mayor disipación de energía por un aparato fotosintético alterado.

#### 4.1.2.4 Plantas con diferente tamaño de antena fotosintética.

Como ya se ha comentado en el capítulo de Introducción, la energía luminosa absorbida por la clorofila de las plantas puede ser utilizada en las reacciones fotoquímicas, emitida en forma de radiación de fluorescencia o desprendida como calor. En plantas superiores, la disipación del exceso de energía luminosa por procesos no radiantes tiene un papel muy importante en la protección de las plantas contra los posibles daños al aparato fotosintético (Baker, 1991; Gilmore y Yamamoto, 1993).

La disipación de energía por procesos no radiantes puede ser observada como quenching de fluorescencia no fotoquímico (NPQ) (Bradbury y Baker, 1984; Schreiber et al., 1986; Richter et al., 1999). El NPQ es complejo y parece estar constituido por tres componentes, el irreversible, el reversible lentamente y el reversible rápidamente (Krause y Weis, 1984). El componente que contribuye en mayor medida y que ha sido caracterizado más ampliamente es el reversible rápidamente, también conocido como dependiente del gradiente de pH, o quenching de fluorescencia de “alta energía”. La denominación que se le ha dado varía dependiendo del autor que estemos considerando, se puede expresar como  $q_E$  (Schreiber et al., 1986),  $k_D$  (Demmig-Adams, 1990) o  $SV_E$  (Gilmore y Yamamoto, 1992). Este componente se ha relacionado, desde los primeros trabajos en este campo, con la concentración de zeaxantina (Demmig-Adams, 1990) y estudios con técnicas más complejas, como la cinética de fluorescencia medida en picosegundos, siguen confirmando estos datos (Richter et al., 1999).

Aunque se ha asumido que el mecanismo del quenching se produce en las estructuras de antena captadoras de luz (Genty et al., 1989, 1990), los datos más actuales muestran una heterogeneidad de la antena y se propone la existencia de un LHC mayoritario relacionado con la captación y transducción de energía luminosa y otra parte



minoritaria, próxima al centro de reacción (CP29 y CP26), que sería la principal responsable de dexcitar el exceso de energía y que albergaría el 80 % del total de los pigmentos del ciclo VAZ (Bassi et al., 1993; Jahns y Krause, 1994; Ruban et al., 1994; Härtel y Lokstein, 1995; Lee y Thornber, 1995).

A pesar del gran número de trabajos publicados relacionando el NPQ y el ciclo de las xantofilas, el mecanismo de interacción entre ambos, en hojas intactas, continúa siendo motivo de debate (Härtel et al., 1996; Ruban y Horton, 1999).

La relación entre el exceso de energía de excitación disipada y el tamaño de la antena fotosintética puede estudiarse usando plantas deficientes en estructuras captadoras de luz. Tradicionalmente se han utilizado mutantes de cebada en los que la antena del fotosistema II se encuentra en mucha menor proporción que en las plantas control y también el conjunto de pigmentos asociados a proteínas (Gilmore et al., 1996). Uno de estos mutantes de cebada, que se comporta de una forma similar a las plantas obtenidas con iluminación intermitente, se denomina chlorina f2 y se ha descrito ampliamente en numerosos trabajos (Bassi et al., 1985; Król et al., 1999). Una descripción detallada de la composición de los complejos pigmento-proteína para este mutante fue analizada por White y Green (1988). Este mutante carece de la antena externa, y sólo tiene pequeñas cantidades de las antenas proximales CP29 y CP26. El número de centros de reacción PSII $\alpha$  es menor que en el control. Según Horton et al. (1991), el mutante es capaz de desarrollar valores elevados de NPQ, pero otros autores (Falk et al., 1994a,b) han encontrado que, después de exponer a las hojas a una radiación de 500  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante 10 minutos, los valores de NPQ eran similares a los del control. Sólo en las plantas que carecían totalmente de antena (distal y proximal), el NPQ desaparece totalmente.

En este experimento, se cultivó, en invernadero, cebada control (*Hordeum vulgare* L.) y mutante (*H. vulgare* L. cv. Dornaria, chlorina f2). Las hojas de cebada permanecieron en oscuridad durante una hora antes de realizar los experimentos de fluorescencia.

La composición foliar de pigmentos fotosintéticos se muestra en la Tabla 4.2. La mayor diferencia entre ellas consiste en que el mutante carece prácticamente de clorofila b. En el resto de los pigmentos las diferencias no son tan elevadas. Estos datos

están de acuerdo con los descritos por White y Green (1988), según los cuales la variedad clorina f2 carece de antena distal (LHCIIb). La concentración de los pigmentos del ciclo de las xantofilas también es menor en el mutante que en el control, pero sólo en valor absoluto, porque si se expresa por unidad de clorofila total, el resultado es el contrario (Tabla 4.3).

Tabla 4.2: Concentración foliar de pigmentos fotosintéticos ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) en hojas de cebada control y mutante (chlorina f2). Los datos son la media de 7 repeticiones  $\pm$  SE.

	Control	Mutante
Neoxantina	1.13 $\pm$ 0.043	0.22 $\pm$ 0.016
Violaxantina	0.72 $\pm$ 0.033	0.45 $\pm$ 0.037
Anteraxantina	0.39 $\pm$ 0.039	0.25 $\pm$ 0.022
Luteína	3.10 $\pm$ 0.136	1.55 $\pm$ 0.116
Zeaxantina	0.71 $\pm$ 0.088	0.39 $\pm$ 0.069
Clorofila b	11.82 $\pm$ 0.574	0.20 $\pm$ 0.056
Clorofila a	29.49 $\pm$ 1.431	17.67 $\pm$ 1.072
$\beta$ -caroteno	2.62 $\pm$ 0.152	1.73 $\pm$ 0.126

Tabla 4.3: Relación entre los componentes del ciclo de las xantofilas y la clorofila total ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) en cebada control y mutante. Los datos son la media de 7 repeticiones  $\pm$  SE

	Control	Mutante
VAZ	1.83 $\pm$ 0.086	1.08 $\pm$ 0.094
Chl Total	41.31 $\pm$ 1.951	17.88 $\pm$ 1.090
VAZ/Chl total	0.044 $\pm$ 0.0007	0.060 $\pm$ 0.0037

La epoxidación de zeaxantina consume oxígeno molecular y NADPH (ambos subproductos de la fotosíntesis), por lo que es un proceso que se estimula en presencia de intensidades de luz débiles (Hager, 1975). Antes de realizar el experimento se ensayaron diferentes condiciones para conseguir que la zeaxantina disminuyese durante el periodo de relajación lo más rápido posible. Tras un proceso de optimización, se decidió iluminar los discos de hoja de cebada durante 10 minutos, con alta intensidad de luz (2000  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Posteriormente, para conseguir la máxima conversión de zeaxantina en

violaxantina, durante el proceso de relajación, se mantuvieron en luz tenue ( $23 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

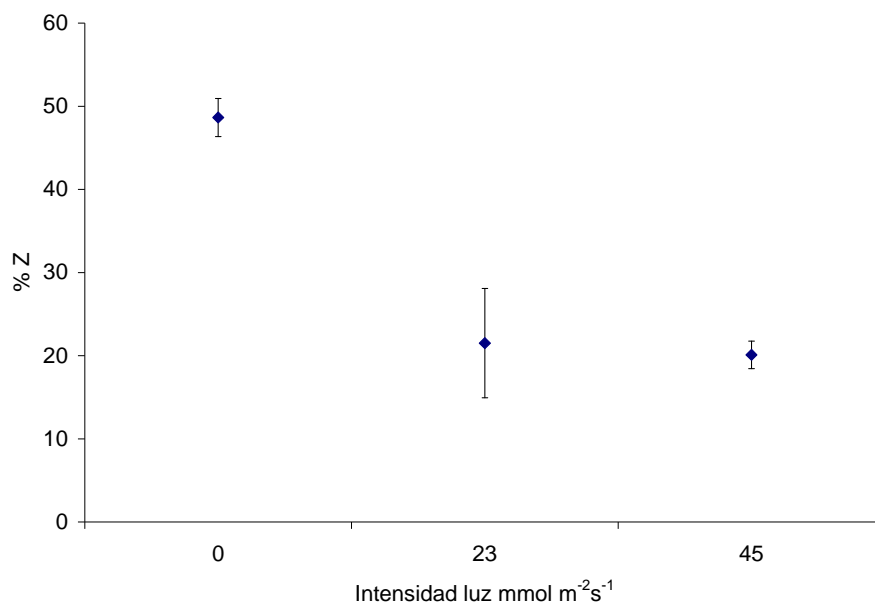


Figura 4.7: Variación del porcentaje de zeaxantina después de 10 minutos de luz saturante y 20 minutos de relajación, para tres intensidades diferentes.

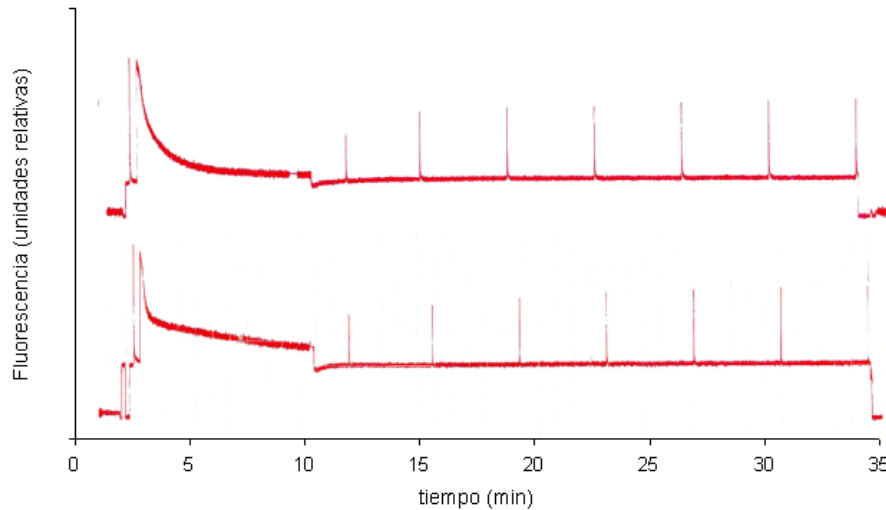


Figura 4.8: Ejemplo de fluorescencia emitida por una hoja de cebada control (superior) y mutante (inferior). La primera parte corresponde al tiempo de iluminación y la parte final al tiempo de oscuridad aplicando pulsos saturantes para determinar el NPQ.

Esta intensidad de iluminación se eligió como óptima tras realizar numerosos ensayos, incluyendo la oscuridad completa. Los valores de zeaxantina que se encontraron en las condiciones elegidas fueron menores que los encontrados en ausencia total de luz durante el periodo de relajación (Figura 4.7).

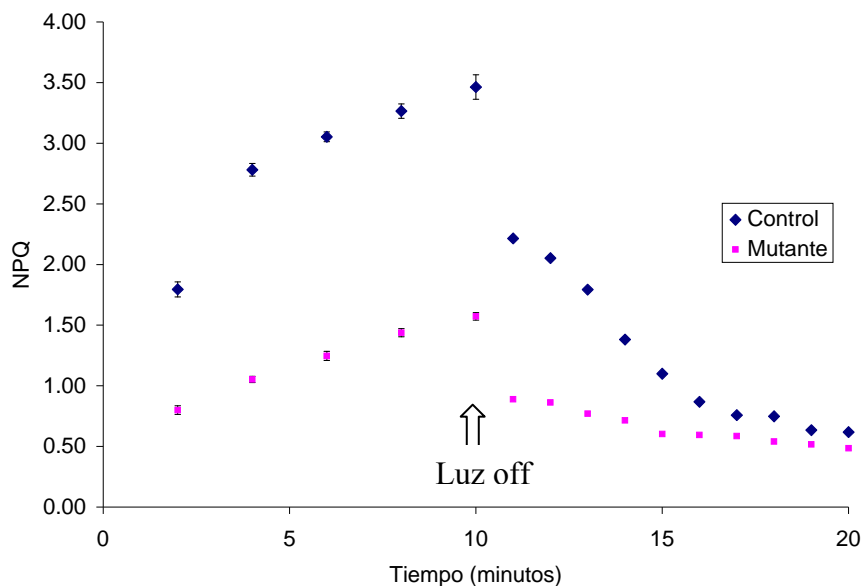


Figura 4.9: Comparación del NPQ en hojas de cebada control y deficiente en antena.

En la Figura 4.8 se muestran, como ejemplo, dos registros de fluorescencia aplicando pulsos saturantes para calcular el NPQ en discos de hoja de cebada. Los valores de NPQ para cebada control y deficiente en antena se representan en la Figura 4.9. Si se comparan las dos muestras, se puede observar que la magnitud del quenching no fotoquímico está directamente relacionada con el tamaño de la antena. En plantas control es siempre mayor que en la *chlorina f2*, tanto durante el periodo de iluminación como durante la primera parte del proceso de relajación en la oscuridad. Durante el periodo de relajación, las plantas control que habían alcanzado valores de NPQ mayores en presencia de la luz, tardan el mismo tiempo que el mutante (aproximadamente seis minutos) en alcanzar el mismo valor de NPQ.

En la Figura 4.10, se observa la evolución del porcentaje de zeaxantina, respecto al total de componentes del ciclo de las xantofilas, durante el proceso de relajación después de apagar la luz de alta intensidad. Como se puede apreciar, en el momento en que termina la iluminación, el nivel inicial es prácticamente el mismo en las dos especies, y también la cinética de relajación es muy similar en los dos casos.

Por otra parte, el aumento o disminución en la superficie de captación de luz del aparato fotosintético no modifica sustancialmente su capacidad fotosintética, estimada a través de los valores de  $F_v/F_m$  ( $0.82 \pm 0.07$  y  $0.79 \pm 0.05$  en el control y en el mutante, respectivamente) y, tampoco afecta a la actividad del ciclo de las xantofilas (Figura 4.10).

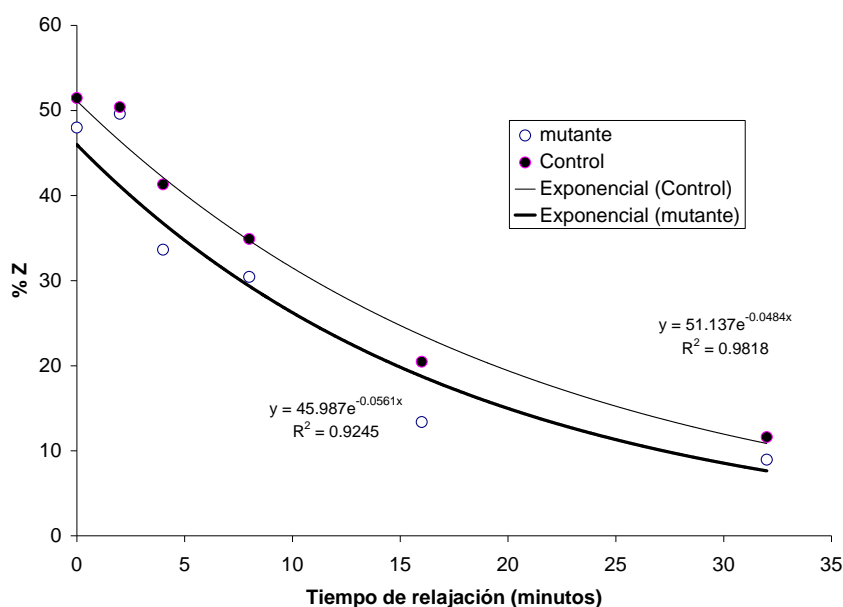


Figura 4.10: Evolución del porcentaje de zeaxantina durante el tiempo de relajación.

Durante el tiempo de relajación en luz tenue, la concentración de zeaxantina disminuye de forma rápida, comparado con otras especies descritas, en las que este periodo era en total oscuridad (Morales et al., 1990). En ellas, los tiempos de relajación hasta que la concentración de zeaxantina disminuye al 50 % de la inicial son de varias horas.

De los datos anteriores (Figura 4.10) puede deducirse que la actividad el ciclo VAZ es independiente del tamaño de la antena, al no apreciarse diferencias significativas entre las plantas control y las mutantes como ya ha sido corroborado por otros autores (Härtel et al., 1996; Gilmore et al., 1996).

Según Bassi et al. (1993), es razonable pensar que las proteínas de las antenas internas menores del LHCII son las que fundamentalmente están implicadas en la formación del NPQ dependiente del pH, ya que están enriquecidas en violaxantina y su capacidad de conversión a zeaxantina es muy alto. Walters et al. (1994) refrendan esta hipótesis mediante tratamientos con dicitohexilcatboimida, que se une a dichas proteínas inhibiendo rápidamente el NPQ reversible. Los bajos valores de NPQ encontrados en nuestro mutante podrían explicarse asumiendo que contiene menor cantidad de antena interna que los controles, lo que justificaría el descenso de la cantidad de los componentes del ciclo VAZ observada en el mutante (Tabla 4.3). Los datos que se muestran en la Figura 4.9 referentes al NPQ, apoyan la hipótesis de Gilmore et al. (1996), según la cual, la antena periférica LHCII únicamente actúa en la transferencia de energía de excitación hacia la antena interna, y no contribuye al NPQ.

Briantais (1994) propone que los valores altos de NPQ podrían ser el resultado de una alta conectividad entre unidades de PSII, y Härtel et al. (1996) sugieren que la fracción externa del LHCII potencia la conexión entre dichas subunidades. Este modelo también explicaría la disminución del NPQ que se ha encontrado en este experimento (Figura 4.9).

La implicación de la zeaxantina en el mecanismo del NPQ se explicaría mediante la aplicación de dos modelos diferentes: a) la zeaxantina podría facilitar la cohesión de los LHCII, dando lugar al NPQ dependiente del gradiente de pH (Horton et al., 1994); y b) la zeaxantina sería capaz de dexcitar directamente el estado singlete de la clorofila (Demmig-Adams, 1990). Independientemente de qué modelo sea más correcto, parece lógico pensar que debe existir una fuerte interacción entre xantofilas y proteína de la antena.



#### **4.2 Comportamiento del ciclo VAZ en plantas sometidas a estreses nutricionales**

En este segundo capítulo, una vez descritas algunas de las condiciones necesarias para la activación del ciclo de las xantofilas, se estudia su respuesta en plantas que sufren algún tipo de alteración nutricional. Así, se muestran los resultados obtenidos en plantas de soja bajo deficiencia inducida de hierro y manganeso, melocotonero clorótico por deficiencia de hierro y manganeso, y en ciruelo injertado en tres patrones con diferente capacidad de absorción y transporte de nutrientes. La característica común a las plantas anteriormente citadas es la alteración del aparato fotosintético de todas ellas. La hipótesis de que el comportamiento del ciclo VAZ siga un patrón determinado en plantas superiores sometidas a diversos tipos de estrés, podría confirmarse, desde nuestro punto de vista, planteando una serie de experimentos con varias especies sometidas a deficiencias nutricionales. De esta forma se persigue relacionar las alteraciones abióticas del aparato fotosintético con la producción de zeaxantina o desaparición de violaxantina. La distinta naturaleza de los tipos de estrés estudiados ayudará a interpretar el papel del ciclo cuando la energía que llega al aparato fotosintético supera a la que puede procesar.



#### *4.2.1 Antecedentes*

La actividad fotosintética de una planta puede verse alterada por muchos motivos, y, generalmente, esta alteración está asociada con una disminución de la producción o del crecimiento del individuo. Ante este tipo de situaciones, las plantas desarrollan mecanismos para minimizar o incluso reparar estos daños. Desde el punto de vista de la investigación, una de las posibles formas de abordar el estudio sobre los mecanismos protectores consiste en inducir de forma artificial un estrés similar al que se produce en condiciones naturales. Como ejemplo de inhibición de la capacidad fotosintética, podrían citarse ciertos tipos de estrés nutricional. Las deficiencias de Fe y Mn, ampliamente extendidas, están asociadas con cambios de coloración en la parte aérea de la planta, debido a las alteraciones que inducen en la concentración foliar de sus pigmentos fotosintéticos. Los experimentos realizados en solución hidropónica o sobre bases inertes en las que se omiten estos elementos permiten una caracterización precisa y un mejor conocimiento de su papel en el metabolismo vegetal.

Una vez que caracterizados los cambios que se producen por la supresión del elemento en el medio de cultivo, el estudio puede trasladarse a situaciones reales y comprobar hasta que punto los resultados son extrapolables. La clorosis debida a deficiencia de hierro o a deficiencia de manganeso tienen síntomas visuales similares y, a menudo, se producen simultáneamente (Thomas et al., 1998). Ambas deficiencias reducen la actividad fotosintética de las plantas debido a alteraciones que se producen en el aparato fotosintético (Sharma et al., 1995; Eyletters et al., 1998).

#### *4.2.2 Deficiencia de hierro*

La deficiencia de hierro ha sido muy estudiada en las últimas décadas, se sabe que afecta a la fotosíntesis y a multitud de funciones de la planta. El hierro está implicado en la respiración, reducción de nitrato y fotosíntesis (Mengel y Kirkby, 1979), forma parte de citocromos, ferredoxinas y varios intermediarios de la cadena transportadora de electrones (Terry, 1980). La deficiencia de hierro parece inhibir preferentemente el desarrollo de las membranas fotosintéticas, y su efecto parece estar confinado a los

cloroplastos, mientras que otros orgánulos no parecen verse afectados (Platt-Aloia et al., 1983). Los cloroplastos obtenidos de plantas deficientes en hierro tienen una estructura y composición diferentes a los de las plantas control (Ladygin y Semenova, 1993). Como regla general, la deficiencia de hierro tiene menos influencia en el crecimiento de las hojas, en el número de células por unidad de área, o en el número de cloroplastos por célula, que en el tamaño de los cloroplastos o en el contenido de proteínas por cloroplasto (Thoiron et al., 1997). En condiciones de deficiencia muy severa, también se ve afectado el proceso de división celular, y por lo tanto, disminuye el tamaño foliar. El hierro es necesario para la síntesis de proteínas, por eso, el número de ribosomas disminuye en las células de las hojas deficientes. Se observa una drástica reducción de las membranas tilacoidales con pocos apilamientos granales, y una disminución de los componentes de las membranas fotosintéticas. También el fitoplancton se ve afectado por la clorosis férrica con alteraciones de tipo estructural y funcional, lo que provoca una disminución de la fijación de CO<sub>2</sub> (Greene et al., 1992).

En las membranas de los tilacoides, alrededor de 20 átomos de hierro están involucrados directamente en la cadena transportadora de electrones entre el PSI y el PSII. Este gran requerimiento de hierro, así como el hecho de formar parte de la ferredoxina y ser necesario para la síntesis de clorofila, podría explicar la alta sensibilidad de los cloroplastos y en particular de los tilacoides, a la deficiencia de hierro (Marschner, 1995).

En las hojas deficientes en hierro, no todos los pigmentos fotosintéticos ni todos los componentes de la cadena transportadora de electrones se ven afectados con la misma intensidad (Abadía et al., 2000). Así, la actividad del PSI está mucho menos afectada que la del PSII. El contenido de clorofilas o de β-caroteno disminuye muy rápidamente, sin embargo, se ha descrito que el de algunas xantofilas y en particular de la A y Z, que están implicadas en el ciclo VAZ, aumenta en estas condiciones (Beljhoka, 1998). Esto se debe posiblemente a que la deficiencia de hierro produce cambios estructurales en la membrana.

Las hojas deficientes en hierro se caracterizan visualmente por un color amarillento (Figura 4.11), y si se analiza su composición se observan contenidos bajos de almidón y

de azúcares (Rai, 1997), como cabe esperar, al tener menor cantidad de clorofila y reducida su capacidad fotosintética.



Figura 4.11: Manifestación de la clorosis de hierro en hojas de melocotonero.

En condiciones controladas, como puede ser en medio hidropónico, se encuentran buenas correlaciones entre el contenido en hierro del sustrato nutritivo y la concentración de clorofila en las hojas. Estas correlaciones no siempre se encuentran en el campo. De hecho, el contenido en hierro del material afectado por clorosis férrica es, a veces, normal e incluso, en ocasiones, más elevado que el del material verde, a pesar de lo cual las plantas cloróticas presentan una sintomatología visual anormal y característica, que desaparece cuando se aporta hierro al sistema (Heras et al., 1976). La concentración de clorofila foliar es la aproximación más correcta para cuantificar la severidad de la deficiencia de hierro (Abadía et al., 1984), pero otros tipos de alteraciones nutricionales también modifican los pigmentos foliares. Otra aproximación utilizada por diversos autores para cuantificar la deficiencia de hierro consiste en extraer el  $\text{Fe}^{2+}$  presente en las hojas por distintos procedimientos (Katyal y Sharma, 1980; Abadía et al., 1984; 1985). Así se encuentran buenas correlaciones entre el  $\text{Fe}^{2+}$  extractable con  $\alpha, \alpha'$  bipiridilo (hierro activo) y el contenido de clorofila en las hojas (Abadía, 1992). Según

Chang et al., (1998), el contenido en hierro activo de hojas cloróticas de melocotonero supone menos del 50 % del encontrado en hojas sanas.

Como se ha descrito anteriormente, la deficiencia de hierro induce disminuciones de clorofila y rendimiento fotosintético, lo cual hace pensar que el papel fotoprotector del ciclo VAZ debería estar potenciado en este tipo de plantas. En peral (Morales et al., 1994) y remolacha (Morales et al., 1990) se ha comprobado que la concentración de zeaxantina aumenta en plantas deficientes.

Para estudiar como se comportaban los pigmentos del ciclo VAZ en condiciones de deficiencia de hierro se eligieron dos especies. Por un lado, se estudió la deficiencia de hierro en una planta modelo en condiciones controladas (soja) y por otro en melocotonero en condiciones de campo. En esta especie, la clorosis férrica tiene una gran repercusión económica a escala mundial.

#### 4.2.2.1 Soja (*Glycine max* L.)

Se trabajó con hojas jóvenes y viejas de plantas control y deficientes en hierro. La deficiencia se indujo eliminando el hierro de la solución nutritiva.

##### 4.2.2.1.1 Análisis de nutrientes

Se analizó la composición mineral de las hojas y en la Tabla 4.4 se muestran los elementos que variaron significativamente. En deficiencia de hierro, la concentración de hierro total y fisiológicamente activo se vio afectada tanto por el tratamiento como por la edad de las hojas. La concentración de hierro activo (ver apartado 8 de material y métodos) fue mucho más alta en las hojas control que en las deficientes en hierro. El calcio también varió de forma significativa, aumentando en las hojas deficientes en hierro, y disminuyendo en las hojas más jóvenes.

La concentración de Zn aumentó en hojas jóvenes deficientes, este hecho puede estar relacionado con los resultados descritos por Rufner y Barker (1984) trabajando en

hojas de espinaca y tomate, con deficiencia inducida de hierro o exceso de zinc. Según estos autores, los síntomas de la deficiencia de hierro son los mismos que los que se producen cuando se aporta Zn en exceso al medio de cultivo. En ambos casos se observa clorosis intervenal y los mismos cambios en la estructura de los cloroplastos foliares. El aporte adicional de hierro parece que compensa los síntomas del exceso de Zn.

Tabla 4.4: Concentración de nutrientes en hojas de soja control y deficientes en hierro. Los análisis se hicieron considerando dos estados de desarrollo de las hojas: viejas y jóvenes (medias  $\pm$  error estándar de 7 ensayos)

	Control		- Fe		Trat Edad	
	Viejas	Jóvenes	Viejas	Jóvenes		
Ca	2.41 $\pm$ 0.04	1.27 $\pm$ 0.26	2.67 $\pm$ 0.40	1.62 $\pm$ 0.08	**	**
Mn	66.68 $\pm$ 8.00	47.19 $\pm$ 6.25	68.88 $\pm$ 6.63	37.00 $\pm$ 5.81	n.s.	**
Zn	23.63 $\pm$ 3.15	32.56 $\pm$ 2.51	19.15 $\pm$ 4.70	33.50 $\pm$ 1.60	n.s.	**
Fe	202.00 $\pm$ 21.20	186.50 $\pm$ 19.50	60.50 $\pm$ 24.50	39.20 $\pm$ 19.80	***	**
Fe activo	22.17 $\pm$ 2.35	20.52 $\pm$ 1.90	10.64 $\pm$ 0.95	8.34 $\pm$ 0.50	***	**

La concentración de Ca está expresada en g 100 g<sup>-1</sup>, y el resto en mg kg<sup>-1</sup> de peso seco

Respecto a la edad de las hojas, se encontraron menos diferencias, destacando que las hojas jóvenes mostraban una menor concentración de hierro activo que las viejas y los niveles de Mn aumentaron en las viejas.

#### 4.2.2.1.2 Pigmentos fotosintéticos

Como ya se ha puesto de manifiesto en numerosos trabajos (Terry y Abadía, 1986; Monge et al., 1987; 1991), la deficiencia de hierro modifica considerablemente todos los pigmentos fotosintéticos debido a la reducción de las membranas tilacoidales.

En el caso de la soja, la deficiencia de hierro redujo la concentración foliar de los pigmentos fotosintéticos, sobre todo de las clorofilas. Sin embargo, la relación Chl *a/b* no se vio afectada por la deficiencia, ni por la edad de las hojas (Tabla 4.5), aunque en el

caso de las hojas deficientes más jóvenes se aprecia un aumento si bien éste no llega a ser estadísticamente significativo. La suma de los pigmentos del ciclo VAZ en relación con la cantidad total de clorofila también aumentó en el caso de las hojas deficientes, sobre todo en las más jóvenes (Figura 4.12), que, como se ha visto, son las más afectadas por la deficiencia.

Tabla 4.5: Concentración foliar de pigmentos fotosintéticos ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) en hojas de soja control y deficientes en hierro. Los datos se expresan como la media de 7 repeticiones  $\pm$  SE.

	Control		- Fe		Trat.	Edad
	Vieja	Jóvenes	Vieja	Jóvenes		
Chl b	11.20 $\pm$ 0.44	6.08 $\pm$ 1.10	9.10 $\pm$ 0.72	2.33 $\pm$ 0.79	***	***
Chl a	37.31 $\pm$ 0.55	21.62 $\pm$ 2.10	29.40 $\pm$ 0.90	9.04 $\pm$ 1.10	***	***
$\beta$ -caroteno	4.37 $\pm$ 0.42	2.50 $\pm$ 0.34	3.34 $\pm$ 0.40	0.91 $\pm$ 0.36	***	***
Chl a/b	3.33 $\pm$ 0.32	3.50 $\pm$ 0.25	3.23 $\pm$ 0.77	3.88 $\pm$ 0.43	n.s.	n.s.
VAZ /Chl t	0.062 $\pm$ 0.02	0.067 $\pm$ 0.02	0.075 $\pm$ 0.03	0.155 $\pm$ 0.03	**	**

En cuanto a la composición del ciclo VAZ, si consideramos la suma de sus tres componentes como el 100 %, también se encontró un claro aumento del porcentaje de zeaxantina con respecto a los otros dos pigmentos (Figura 4.13). Un gran número de autores (Pfündel y Bilger, 1994; Demmig-Adams, et al., 1996; Havaux y Niyogi, 1999), consideran que el aumento del porcentaje de zeaxantina es un buen marcador de situaciones de estrés.

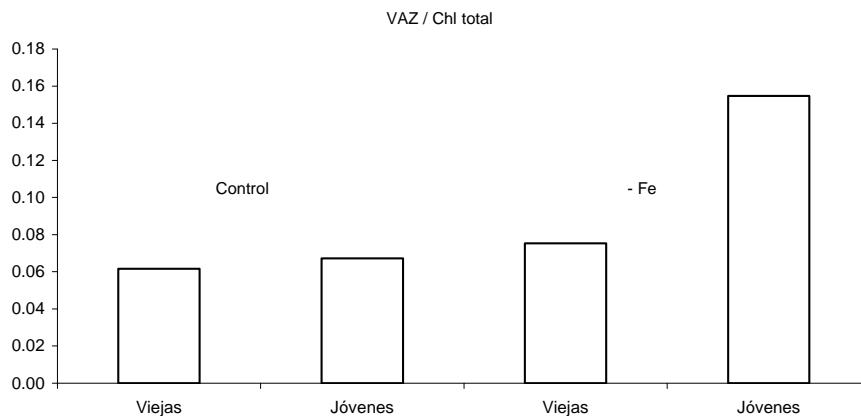


Figura 4.12: Relación entre la concentración de los pigmentos del ciclo VAZ y la cantidad de clorofila total en hojas de soja de plantas control y deficientes en hierro en dos estados de desarrollo.

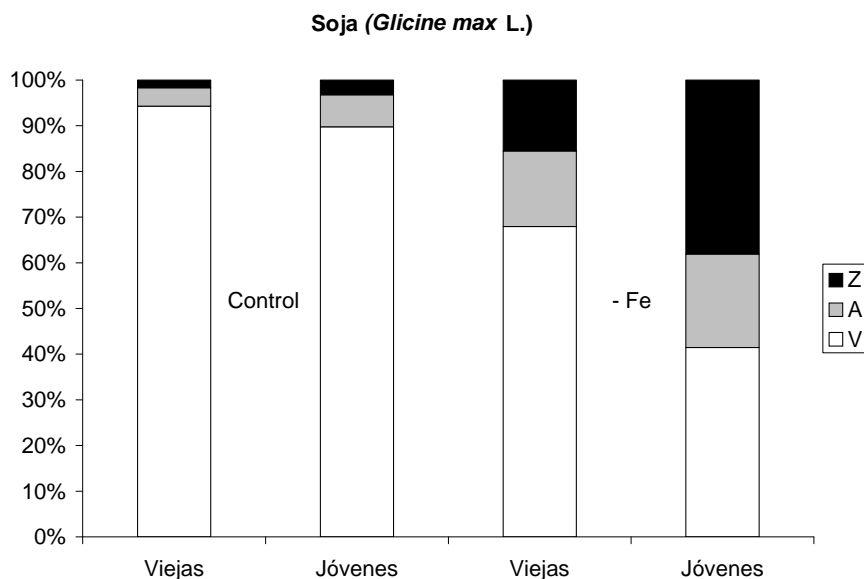


Figura 4.13: Comparación del estado del ciclo VAZ entre plantas control y cloróticas de soja.

Aunque no se presentan los datos, también se encontró que la deficiencia de hierro afectó a toda la morfología de la planta, reduciendo de manera significativa el tamaño de las hojas y de las raíces.

La fluorescencia de clorofila es una herramienta útil para evaluar la capacidad fotosintética de las plantas al estudiar deficiencias nutricionales (Val et al., 1993; 1995).

Tabla 4.6: Parámetros de fluorescencia en hojas de soja deficientes en Fe y control, en dos estadios de desarrollo. Los datos son la media de 7 repeticiones  $\pm$  SE.

	Control		- Fe	
	Viejas	Jóvenes	Viejas	Jóvenes
F <sub>0</sub>	0.82 $\pm$ 0.05	0.43 $\pm$ 0.03	1.40 $\pm$ 0.17	0.57 $\pm$ 0.08
F <sub>m</sub>	4.10 $\pm$ 0.21	2.27 $\pm$ 0.06	5.55 $\pm$ 0.47	1.32 $\pm$ 0.08
F <sub>v</sub>	3.28 $\pm$ 0.15	1.85 $\pm$ 0.19	4.15 $\pm$ 0.65	0.75 $\pm$ 0.07
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	0.81 $\pm$ 0.07	0.80 $\pm$ 0.06	0.75 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.06

En la Tabla 4.6 se muestran los parámetros de fluorescencia determinados en hojas jóvenes y viejas de plantas de soja bajo deficiencia inducida de hierro. La deficiencia de hierro produce la reducción de unidades fotosintéticas por unidad de superficie (Spiller y Terry, 1980) y la disminución de la eficacia fotoquímica de las unidades restantes (Morales et al., 1998). En nuestro caso, la eficacia fotosintética estimada por la relación F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> disminuye en hojas deficientes y especialmente en las más jóvenes. Este descenso es menos acusado en el caso de las hojas viejas puesto que, como se observa en la Tabla 4.5, el grado de afección de la deficiencia es menos severo que en las jóvenes. Sin embargo, al estudiar los parámetros individualmente, se aprecia que, en deficiencia, el valor de F<sub>0</sub> es mayor que el encontrado en las plantas control. Belkhodja et al. (1998), explican este hecho atribuyendo parte del aumento en F<sub>0</sub> a la reducción en el número de cadenas transportadoras de electrones en el lado aceptor del PSII, que tiene lugar en las hojas deficientes en hierro durante el periodo de adaptación a la oscuridad, necesario para realizar las determinaciones de fluorescencia. Los procesos que causan la reducción en la oscuridad del “pool” de plastoquinona producen, en el caso de la deficiencia de hierro, la



infravaloración de la eficacia fotoquímica y del transporte electrónico posterior a  $Q_A$ , cuando se utilizan técnicas de fluorescencia en material adaptado a la oscuridad.

Una vez realizado el estudio en la planta modelo en condiciones controladas, vamos a ver como afecta este tipo de deficiencia a plantas de melocotonero cultivadas en condiciones naturales.

#### 4.2.2.2 Melocotonero clorótico (*Prunus persica* L. Batsch)

La deficiencia de hierro es un problema muy extendido en terrenos con suelos calizos, limitando mucho la producción de estos. Estos suelos pueden contener cantidades elevadas de Fe total, sin embargo, la concentración de dicho elemento en formas asimilables por las plantas es mucho menor (Abadía et al., 1984; 1985). Por eso pareció conveniente estudiar el comportamiento del ciclo VAZ en árboles que crecían en las mismas condiciones que los considerados como control, pero que eran menos eficaces en la utilización del hierro, manifestando distintos grados de clorosis.

##### 4.2.2.2.1 Análisis de nutrientes

En la Tabla 4.7 se muestran las concentraciones foliares de los nutrientes que mostraban diferencias significativas para esta deficiencia. En las hojas viejas la concentración de hierro desciende significativamente cuando comparamos controles con deficientes. Este hecho, no se repite en las hojas jóvenes, en las que no se observa ninguna variación. En este caso, los datos no son coherentes con los esperados a partir del color de las hojas que visualmente se identificaban como deficientes (Figura 4.14).

Tabla 4.7: Concentración de nutrientes ( $\text{mg kg}^{-1}$  de peso seco) en hojas de melocotonero control y deficientes en hierro. Los análisis se hicieron considerando dos estados de desarrollo de las hojas: viejas y jóvenes (medias  $\pm$  error estándar de 10 ensayos)

	Control		- Fe	
	Vieja	Jóvenes	Vieja	Jóvenes
Fe	156.7 $\pm$ 9.53	89.35 $\pm$ 8.52	85.1 $\pm$ 5.2	90.4 $\pm$ 5.6

Mn	31.4±1.50	20.75±2.30	22.2±1.5	24.2±2.3
----	-----------	------------	----------	----------

---

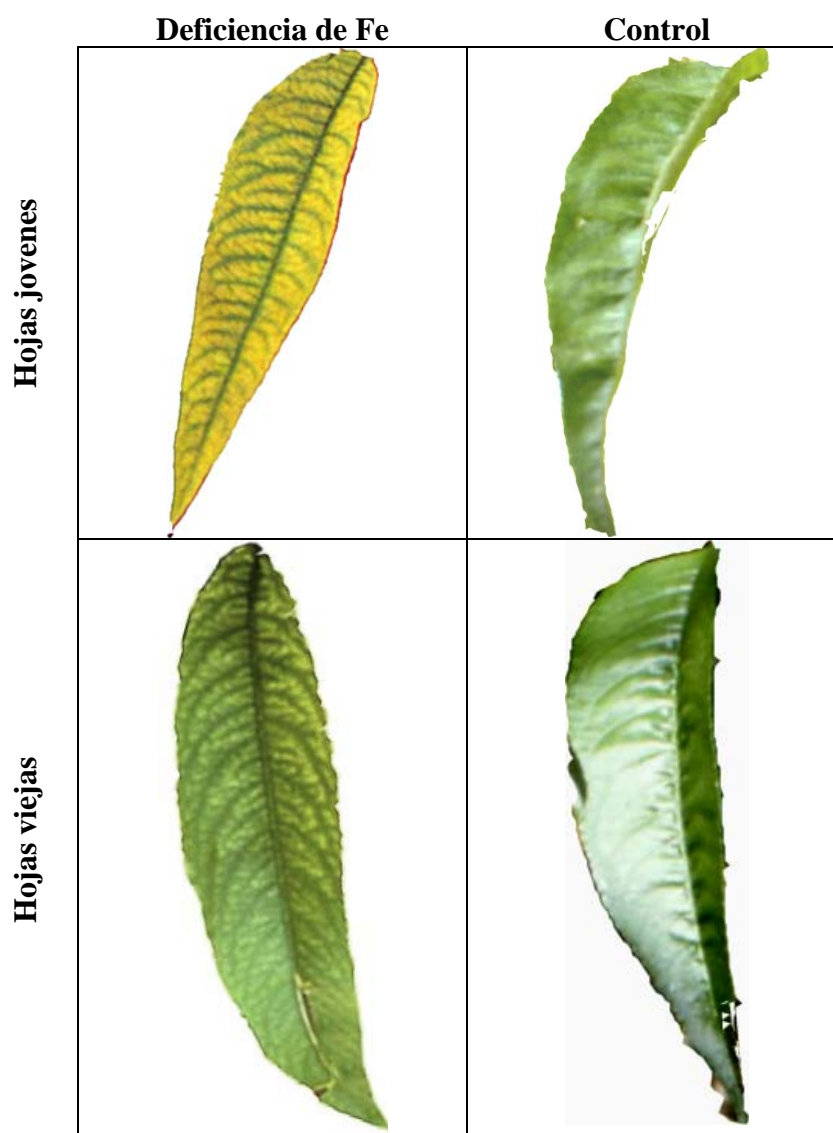


Figura 4.14: Aspecto de las hojas de melocotonero control y deficientes de hierro, en los dos momentos de desarrollo en los que se ha hecho el experimento.

Cuando en los suelos calcáreos se manifiestan síntomas de clorosis en las hojas, para comprobar que está causada por una deficiencia de hierro, es preferible analizar el hierro fisiológicamente activo. En la Figura 4.15 se representan las correlaciones entre la concentración de clorofila y el hierro extractable por unidad de área ( $r = 0.93$ ), y entre clorofila y desprendimiento de oxígeno medido en hojas intactas ( $r = 0.94$ ). Esto implica que la capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis por parte de la planta depende de la concentración de clorofila, y que la clorofila de las hojas cloróticas continúa realizando su función en las estructuras fotosintéticas.

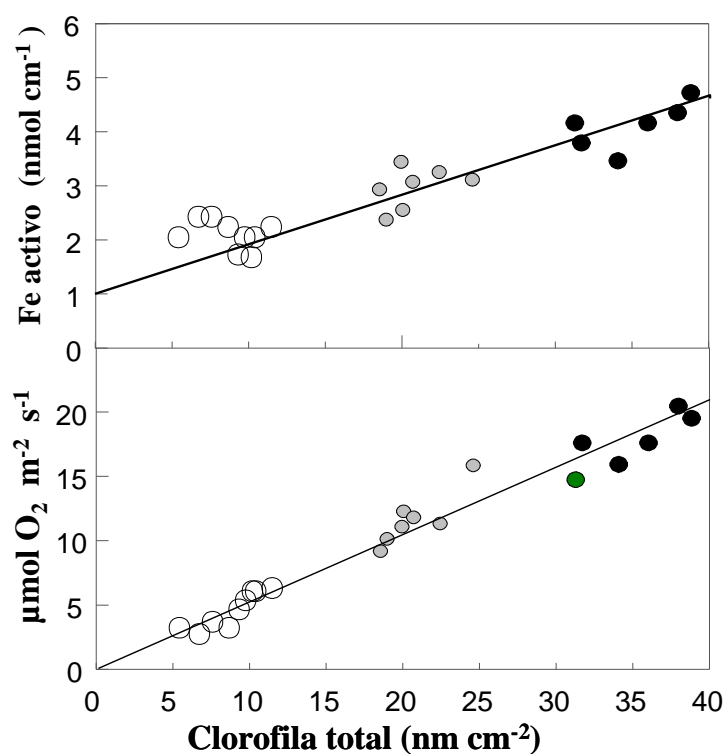


Figura 4.15: Hierro activo extraído con  $\alpha, \alpha'$  bipiridilo y evolución del oxígeno fotosintético en las hojas en función de la concentración de clorofila total. Las muestras se agruparon en control (símbolos negros), ligeramente deficientes (gris) y con deficiencia muy severa en hierro (blancos).

## 4.2.2.2 Pigmentos fotosintéticos

Se analizaron los pigmentos fotosintéticos para comprobar si este tipo de deficiencia produce modificaciones en la composición del aparato fotosintético, y para verificar si el ciclo VAZ ejerce algún mecanismo de protección en este tipo de plantas.

La deficiencia de hierro no modificó la relación Chl a/b cuando la concentración de clorofila en hoja fue mayor de 15 nmol cm<sup>-2</sup> (Figura 4.16). También se calculó la relación entre Chl a y β-caroteno, para poder estimar la proporción de antena frente a la de centros de reacción; teniendo en cuenta que ambas clorofilas están contenidas en los complejos captadores de luz (antenas), mientras que el β-caroteno y la Chl a son los pigmentos fotosintéticos más abundantes en el centro de reacción. Sin embargo, esta relación permaneció constante en todos los grados de clorosis considerados (Figura 4.17). La relación entre las xantofilas totales y la Chl b, sólo aumentó en hojas con deficiencia de hierro muy severa (concentración de clorofila menor de 15 nmol cm<sup>-2</sup>), lo que puede indicar alteraciones estructurales en la antena (Figura 4.18).

Tabla 4.8: Concentración foliar de pigmentos fotosintéticos (μg cm<sup>-2</sup>) de hojas de melocotonero control y deficientes en hierro. Los valores son la media de 10 ensayos ± error estándar.

	Control		- Fe		Trat.	Edad
	Vieja	Jóvenes	Vieja	Jóvenes		
Chl b	9.20±0.44	8.02±1.10	2.34±0.72	0.62±0.79	***	***
Chl a	31.17±0.55	23.14±2.10	9.49±0.90	3.12±1.10	***	***
β-caroteno	2.38±0.42	1.24±0.34	1.17±0.40	0.31±0.36	***	***
Chl a/b	3.39±0.32	2.89±0.25	4.06±0.77	5.03±0.43	n.s.	**
VAZ /Chl t	0.13±0.01	0.09±0.02	0.18±0.01	0.16±0.03	n.s.	**

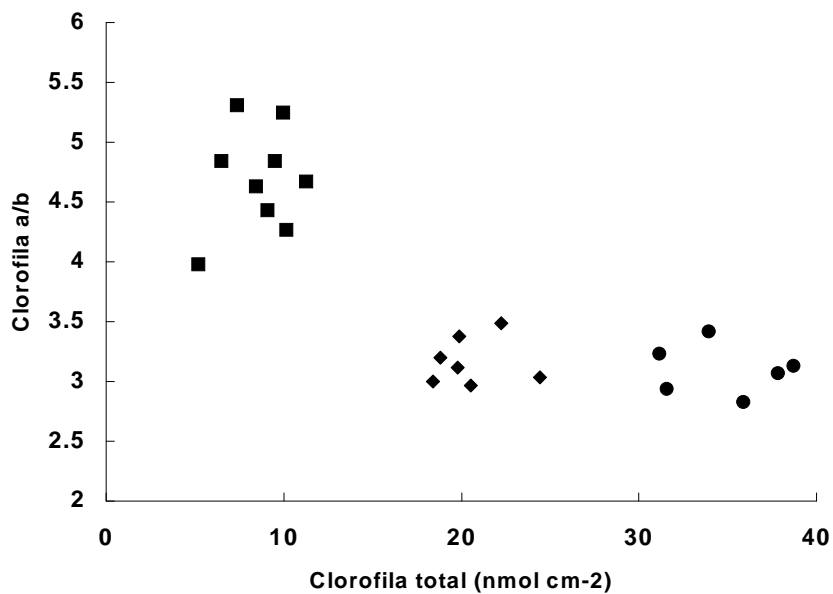


Figura 4.16: Variación de la relación Chl a/b en función de la concentración de clorofila total.

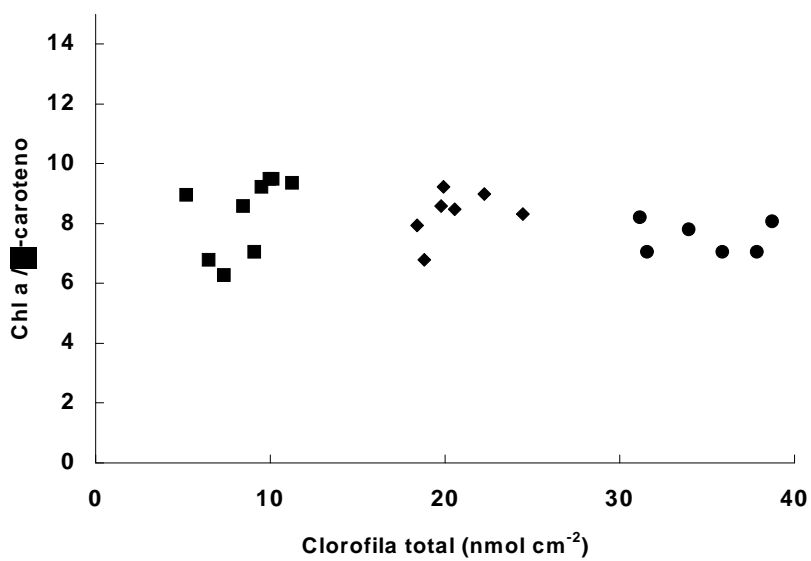


Figura 4.17: Relación entre clorofila a y β-caroteno en hojas de melocotonero con distintos grados de clorosis

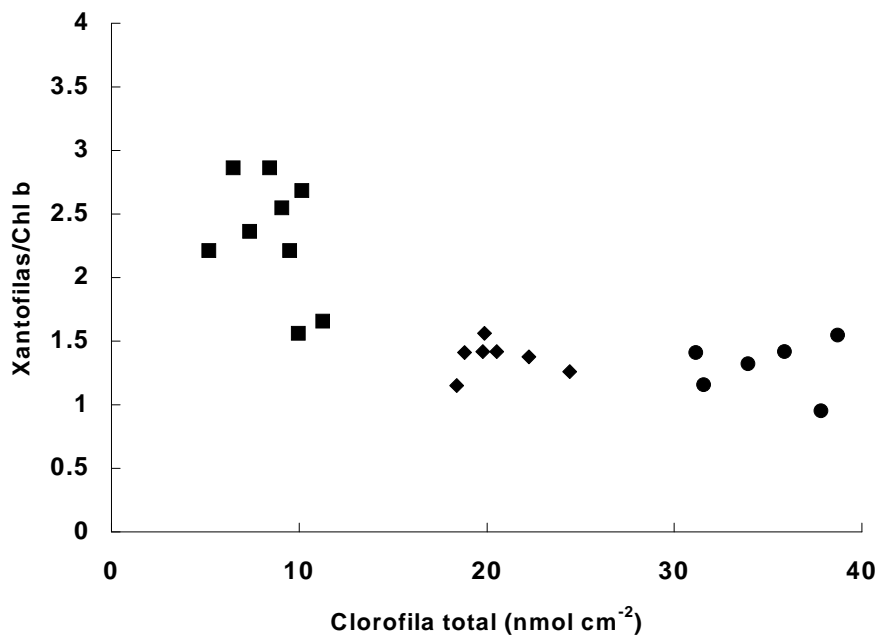


Figura 4.18: Variación de la relación xantofilas totales / Chl b en función de la concentración de clorofila total en hojas de melocotonero con distintos grados de clorosis.

Con los resultados expuestos en las Figura 4.16 y Figura 4.17, podemos deducir que, para clorosis no muy severas, la relación centros de reacción y antenas permanece prácticamente constante. Los centros de reacción contienen fundamentalmente Chl a y  $\beta$ -caroteno, mientras que en las antenas encontramos ambas clorofilas y xantofilas. En la Figura 4.18 se observa que, bajo condiciones de deficiencia de hierro severa, las estructuras de antena sufren graves alteraciones en su composición pigmentaria.

Se completó el estudio con un análisis de las proteínas tilacoidales mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida. La identificación de las bandas se realizó comparando sus pesos moleculares con los de proteínas conocidas usadas como estándar que se corrieron en la misma placa electroforética. En la Figura 4.19 se especifica el peso molecular de las proteínas utilizadas como estándar, además, se señalan las bandas identificadas. Los cambios que se produjeron en los citocromos y en proteínas asociadas a grupos “hemo” se detectaron por su actividad peroxidasa (ver apartado 3.6.3 de Materiales y Métodos). Mediante esta técnica de tñido con TMBZ se detectaron 8

polipéptidos de pesos moleculares 41, 38, 34, 33, 23, 20, 17 y 9 kDa. El de 41 kDa puede ser un citocromo tipo c unido covalentemente descrito por Bhaya y Castelfranco (1986). La banda de 38 kDa fue identificada por Nishio et al. (1985) como un citocromo f. Según Barber (1983), el citocromo f está asociado probablemente con las unidades de 33 y 34 kDa, mientras que el citocromo b<sub>6</sub> estaría unido a la apoproteína de 23.5 kDa. Todos estos resultados estarían de acuerdo con los que se muestran en la Figura 4.19. También podemos asignar a la banda de 20 kDa la descrita por Bhaya y Castelfranco (1986) como citocromo b<sub>6</sub>, y la banda de 9 kDa, que quedó teñida de forma más débil podría ser citocromo b<sub>559</sub> (Hankamer et al., 1997).

Posteriormente se procedió a teñir el gel con AgNO<sub>3</sub> para comprobar qué cambios se producían en el resto de polipéptidos. Según las bandas identificadas, no se encontraron cambios en el centro de reacción del PSII (D1 y D2), ni en los de la antena proximal (CP43, CP47). Sin embargo, si que se detectó una gran variación en las bandas correspondientes a proteínas de la antena extrínseca del PSII (24, 26 y 28 kDa) que disminuyeron desde las muestras control hasta las severamente deficientes. En cuanto al fotosistema I, los cambios que se encontraron fueron menores, se encontró un polipéptido que disminuía ligeramente en la zona de 110 kDa y que podría ser una apoproteína del “core-complex” del PSI, pero no se encontraron más cambios en la zona que correspondería a la antena en la región de 60-70 kDa.



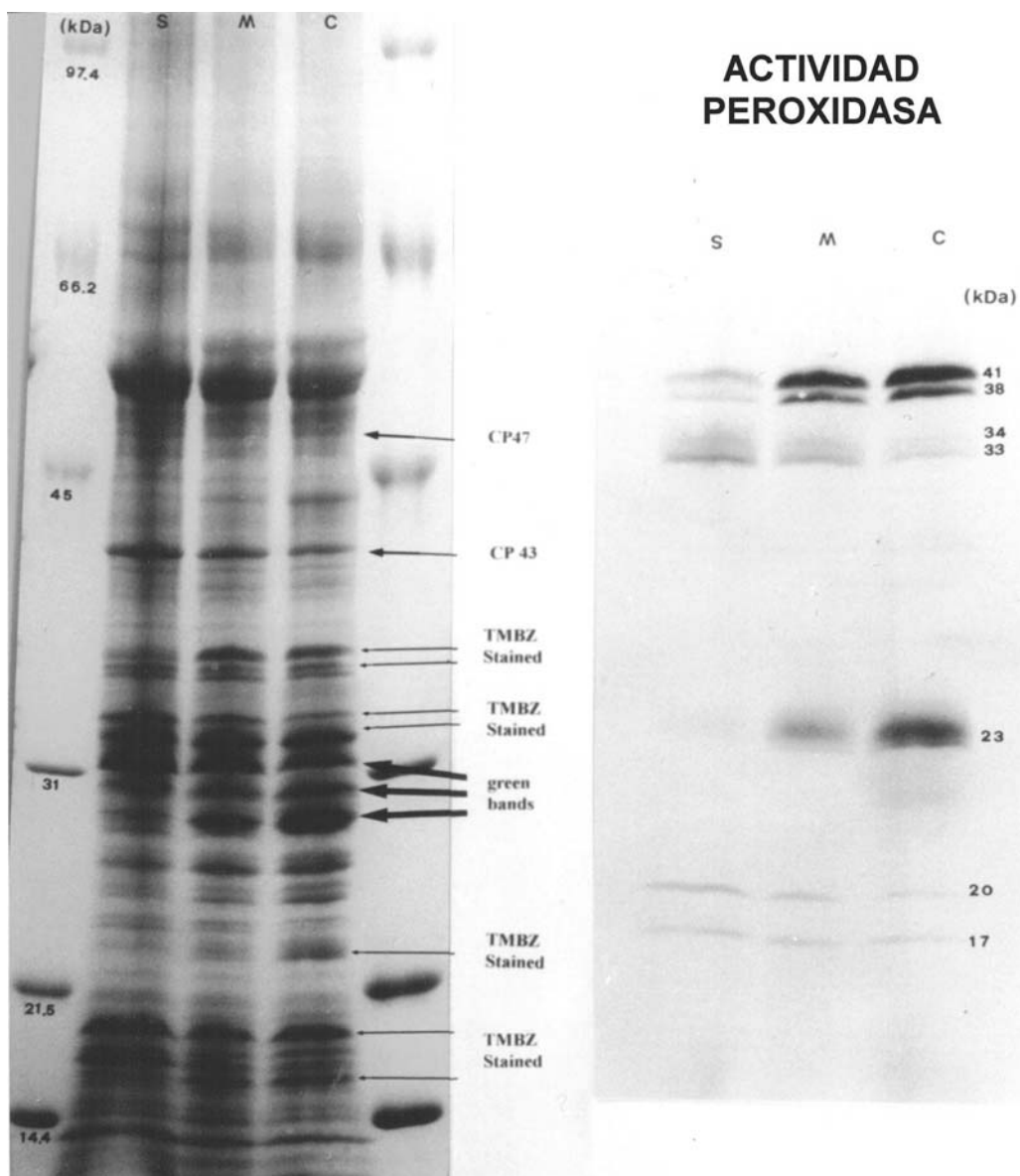


Figura 4.19: Electroforesis desnaturalizante de membranas tilacoidales de hojas de melocotonero en tres niveles de deficiencia de hierro (S: severa, M: media, C: control). En la parte de la derecha se muestra después de teñir con TMBZ para detectar la actividad peroxidasa, y en la de la izquierda, el mismo gel tras teñirlo con azul de Coomassie.

Como se ha dicho, la composición de los pigmentos fotosintéticos sí se vio afectada por la deficiencia, por lo tanto, parecía lógico pensar que también los parámetros de fluorescencia podrían estar afectados.

Tabla 4.9: Parámetros más importantes de cinéticas de fluorescencia para hojas viejas y jóvenes de melocotonero control y deficiente en hierro. Los valores son la media de 10 experimentos  $\pm$  error estándar.

	Control		- Fe	
	Viejas	Jóvenes	Viejas	Jóvenes
F <sub>0</sub>	1.02 $\pm$ 0.07	1.06 $\pm$ 0.10	2.17 $\pm$ 0.11	1.78 $\pm$ 0.01
F <sub>m</sub>	6.88 $\pm$ 0.05	5.21 $\pm$ 0.17	8.36 $\pm$ 0.14	5.39 $\pm$ 0.36
F <sub>v</sub>	5.86 $\pm$ 0.07	4.15 $\pm$ 0.21	6.19 $\pm$ 0.60	3.61 $\pm$ 0.01
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	0.85 $\pm$ 0.03	0.80 $\pm$ 0.00	0.74 $\pm$ 0.06	0.67 $\pm$ 0.00

Los dos datos que más llaman la atención en la Tabla 4.9 serían el aumento de F<sub>0</sub> y que el valor F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> se mantuvo constante. La explicación del aumento de F<sub>0</sub> es que para realizar este experimento no se utilizó luz en el rojo lejano por lo que se produce la reducción en la oscuridad del pool de plastoquinonas, como ya ha sido comentado en el apartado 4.2.2.1.2.

Cuando se produce la deficiencia de hierro, los cloroplastos sufren una serie de alteraciones encaminadas a salvar al máximo su capacidad fotosintética. Cuando la deficiencia es muy severa (Chl total < 15  $\mu\text{mol cm}^{-2}$ ), la estequiometría entre los diferentes pigmentos cambia (Figura 4.16, Figura 4.17 y Figura 4.18), por lo tanto, es lógico esperar cambios en los parámetros de fluorescencia (Tabla 4.9).

Después de estudiar los síntomas y las alteraciones que produce la deficiencia de hierro se procedió a trabajar en deficiencia de manganeso.

#### 4.2.3 Deficiencia de manganeso

La caracterización de la clorosis asociada a la deficiencia de Mn es el resultado de una disminución en la concentración de ambas clorofilas (Neena et al., 1999). La estructura de los cloroplastos en plantas deficientes en manganeso depende, en gran medida, de la intensidad de la deficiencia; así, carencias débiles no modifican la ultraestructura del cloroplasto (Cheniae y Martín, 1968), pero, las severas producen la desaparición de los grana tilacoidales (Mercer et al., 1962; Wang et al., 1992). Otros orgánulos celulares como pueden ser las mitocondrias no parecen afectados (Possingham et al., 1964). En los tejidos foliares, el manganeso está asociado con proteínas del sistema de producción de oxígeno y es indispensable para generar el flujo de energía fotosintética (del Río et al., 1983). El transporte electrónico fotosintético también se ve afectado por esta deficiencia, ya que impide el primer paso de la cadena transportadora de electrones (Edwards y Walkers, 1983). Disminuye también la reducción de CO<sub>2</sub>, la concentración de nitritos y sulfatos, aunque las tasas de transpiración y respiración parece que no se ven afectadas (Ohki et al., 1981). Además, el manganeso desempeña un papel importante en el metabolismo de las plantas, particularmente en procesos de activación de algunas enzimas (García y Galindo, 1991; Yu y Rengel, 1999), en la síntesis de clorofila y en la fotosíntesis (Campbell y Nable, 1988).

Con estos antecedentes y teniendo en cuenta los resultados descritos en el caso de deficiencia de hierro, sería de esperar que el estudio del ciclo VAZ aportase alguna información sobre este tipo de deficiencia, y si los pigmentos de este ciclo juegan algún papel de protección.

Al igual que en el estudio de la deficiencia de hierro, para caracterizar la de manganeso, se han utilizado dos tipos de plantas: soja en condiciones controladas y melocotonero en condiciones de campo.

##### 4.2.3.1 Soja (*Glycine max* L.)

La soja fue una de las plantas que resultaron especialmente sensibles a esta deficiencia, por lo que se utilizó para los experimentos en cámara de cultivo, de manera

que pudo evitarse la interferencia de otro tipo de alteraciones nutricionales y medioambientales.

En estudios preliminares, utilizando este tipo de material, se demostró que los síntomas visuales variaban en función de la edad de las hojas; por lo tanto, el experimento se llevó a cabo diferenciando hojas viejas y jóvenes y, en estas últimas, los síntomas visuales de la deficiencia de manganeso eran poco evidentes. De esta manera, el estudio se uniformó con el que se había hecho para la deficiencia de hierro. Los datos que se presentan son las medias de 7 ensayos en cámara de cultivo.

#### 4.2.3.1.1 Composición mineral

Se analizó la composición mineral de las hojas de soja control y deficientes en manganeso en dos estados de desarrollo (Tabla 4.10). Los resultados indicaron que los niveles de varios nutrientes (Mg, K, P, N y Cu), no estaban afectados por ninguno de estos factores mientras que el Ca fue el único macroelemento cuya concentración disminuyó en plantas deficientes respecto a las de control. En cuanto a los micronutrientes, el Zn aumentó en hojas jóvenes en todos los casos.

Tabla 4.10: Concentración de nutrientes en hojas de soja control y deficientes en manganeso. Los análisis se hicieron considerando dos estados de desarrollo de las hojas: viejas y jóvenes (medias  $\pm$  error estándar de 7 experimentos).

	Control		- Mn		Trat.	Edad
	Viejas	Jóvenes	Viejas	Jóvenes		
Ca	2.75 $\pm$ 0.04	1.31 $\pm$ 0.14	2.15 $\pm$ 0.30	0.81 $\pm$ 0.10	*	***
Mn	73.19 $\pm$ 8.00	48.69 $\pm$ 5.00	19.88 $\pm$ 2.60	13.38 $\pm$ 1.80	***	***
Zn	24.75 $\pm$ 2.60	34.56 $\pm$ 2.50	25.06 $\pm$ 2.70	34.50 $\pm$ 1.60	ns	**
Fe	207.00 $\pm$ 22.00	195.00 $\pm$ 18.00	233.00 $\pm$ 25.00	160.00 $\pm$ 19.00	ns	**

La concentración de Ca está dada en g 100 g<sup>-1</sup> peso seco y la del resto de los micronutrientes en mg kg<sup>-1</sup> de materia seca

## 4.2.3.1.2 Pigmentos fotosintéticos

Se estudió la composición de los pigmentos fotosintéticos mediante HPLC (Tabla 4.11) y se observó que la deficiencia de manganeso reduce la concentración foliar de clorofilas y de la mayoría de los carotenoides. Esta reducción fue constante en la mayoría de los casos, por lo que la estequiometría entre los pigmentos no varió. Sólo A y Z aumentaron en respuesta a esta deficiencia pero lo hicieron de forma muy leve.

Tabla 4.11: Concentración foliar ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) de pigmentos fotosintéticos de hojas de soja (*Glycine max* L.) control y deficientes en manganeso. Los análisis se hicieron considerando dos estados de desarrollo de las hojas: viejas y jóvenes (medias  $\pm$  error estándar de 7 experimentos)

	Control		- Mn		Trat.	Edad
	Viejas	Jóvenes	Viejas	Jóvenes		
Chl b	10.70 $\pm$ 0.44	7.28 $\pm$ 0.79	7.90 $\pm$ 0.63	4.77 $\pm$ 0.49	***	***
Chl a	35.17 $\pm$ 1.33	25.23 $\pm$ 4.11	27.27 $\pm$ 2.14	16.99 $\pm$ 1.79	***	***
$\beta$ -car	3.87 $\pm$ 0.42	2.93 $\pm$ 0.34	3.05 $\pm$ 0.40	2.05 $\pm$ 0.26	***	***
Chl a/b	3.29 $\pm$ 0.32	3.46 $\pm$ 0.25	3.45 $\pm$ 0.87	3.56 $\pm$ 0.39	n.s.	n.s.
VAZ/Chl T	0.058 $\pm$ 0.02	0.082 $\pm$ 0.04	0.062 $\pm$ 0.03	0.108 $\pm$ 0.03	n.s.	n.s.

El descenso en la concentración de todos los pigmentos fotosintéticos fue uniforme cuando comparamos las hojas deficientes con controles de la misma edad. Si sólo se tiene en cuenta la edad, se observa que la concentración fue siempre mayor en las hojas más viejas. Teniendo en cuenta ambos factores (tratamiento y edad), se apreció una variación significativa de todos los pigmentos, si bien las relaciones Chl *a/b* (Tabla 4.11) y VAZ/Chl total (Figura 4.20) no experimentaron cambios significativos.

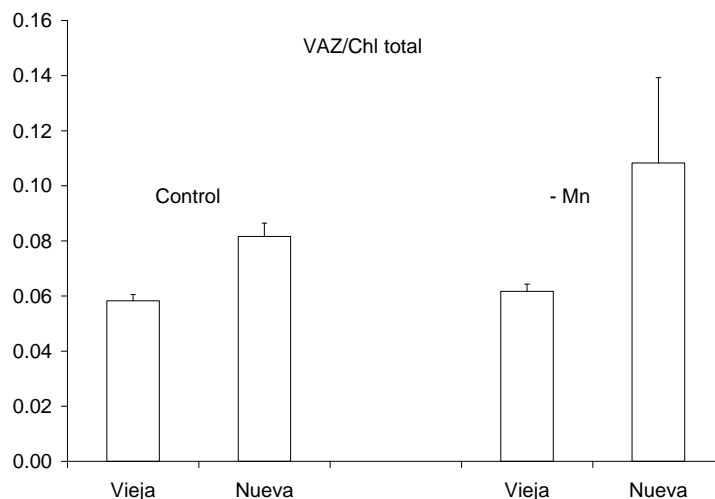


Figura 4.20: Variación de la relación VAZ/Chl total en hojas de soja control y deficientes en manganeso en dos estadios de desarrollo.

Los parámetros de fluorescencia de clorofila demostraron que la eficacia fotosintética resultó afectada por la deficiencia (Tabla 4.12). La relación  $F_v/F_m$  fue mayor en las hojas control, y las hojas deficientes más jóvenes fueron las que mostraron un menor valor de esta relación.

Tabla 4.12: Parámetros de fluorescencia en hojas de soja deficientes en Mn y control, en dos estadios de desarrollo. Los datos son la media de 7 repeticiones  $\pm$  error estandar.

	Control		- Mn	
	Viejas	Jóvenes	Viejas	Jóvenes
$F_0$	0.82 $\pm$ 0.05	0.43 $\pm$ 0.03	0.83 $\pm$ 0.09	0.81 $\pm$ 0.08
$F_m$	4.10 $\pm$ 0.21	2.27 $\pm$ 0.06	3.17 $\pm$ 0.25	2.13 $\pm$ 0.18
$F_v$	3.28 $\pm$ 0.15	1.85 $\pm$ 0.19	2.34 $\pm$ 0.08	1.31 $\pm$ 0.05
$F_v/F_m$	0.81 $\pm$ 0.07	0.80 $\pm$ 0.06	0.74 $\pm$ 0.06	0.62 $\pm$ 0.05

La deficiencia de manganeso sólo produjo una ligera disminución en el tamaño de las raíces sin modificar el tamaño de las hojas. En todos los casos la cantidad de materia seca de las hojas fue constante.

Con los datos obtenidos se puede resumir que la deficiencia de manganeso en soja no produce variaciones significativas ni en la composición mineral ni en la estequiometría de sus pigmentos fotosintéticos. Sin embargo, la relación Fv/Fm disminuye en hojas deficientes en manganeso de todas las edades estudiadas.

#### 4.2.3.2 Melocotonero (*Prunus persica* L. Batsch)

Tras el estudio de la deficiencia inducida de manganeso en plantas de soja cultivadas en hidropónico, y, dado que los parámetros de fluorescencia variaron significativamente, especialmente en hojas jóvenes, se pensó que podía ser interesante utilizar esta técnica con fines de diagnóstico precoz ya que, como se ha mencionado en el apartado 4.2.3.1, los síntomas visuales no se aprecian cuando la hoja es joven. Para esto se utilizaron árboles de melocotonero de una plantación localizada en El Temple (Huesca) de 11 años de edad. Los individuos con síntomas que hacían pensar en una deficiencia en manganeso, vivían en el mismo sitio que los que no presentaban signo alguno de alteraciones nutricionales, por lo que puede afirmarse que realmente el elemento estaba disponible en el suelo. Las muestras se tomaron durante la segunda quincena de julio, periodo recomendado en la bibliografía para realizar el estudio nutricional de esta especie en hemisferio norte (Reuter y Robinson, 1986; Panine, 1987).

Al igual que con las plantas de soja, se analizaron los nutrientes, la composición de pigmentos fotosintéticos y parámetros de fluorescencia. Se siguió utilizando la diferenciación entre hojas jóvenes y viejas. En la Figura 4.21 pueden apreciarse los síntomas visuales típicos de la deficiencia de manganeso en melocotonero que pueden resumirse como el desarrollo de clorosis intervenal en las hojas viejas. Sin embargo, las hojas jóvenes deficientes muestran un color verde homogéneo que en ocasiones puede ser más pálido que en hojas sanas. Por lo tanto, al no mostrar síntomas visuales de deficiencia las hojas jóvenes deficientes en Mn, las determinaciones se realizaron en las hojas de los brotes apicales de ramas con síntomas en sus hojas viejas.

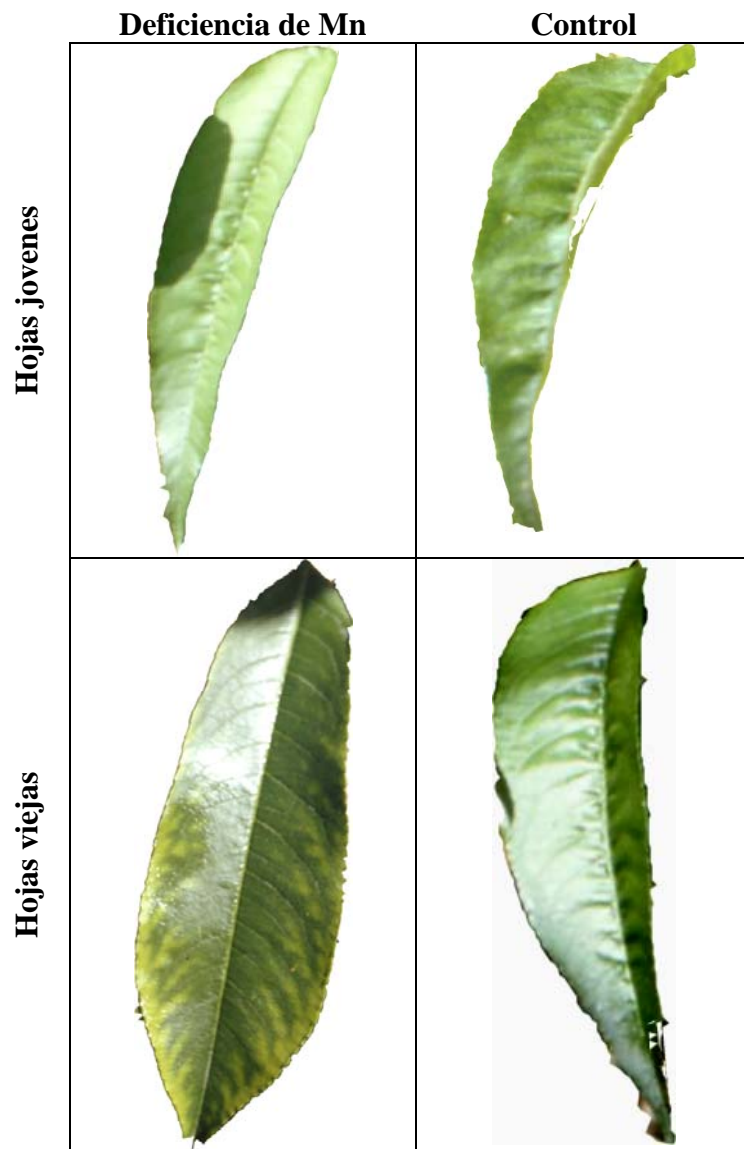


Figura 4.21: Aspecto de las hojas de melocotonero control y deficientes de manganeso, en los dos momentos de desarrollo en los que se ha hecho el experimento.



## 4.2.3.2.1 Composición mineral

En la Tabla 4.13 se muestra la concentración de Fe y Mn en hojas viejas y jóvenes de melocotonero. No se expone la concentración del resto de nutrientes, por no mostrar diferencias significativas con respecto al tratamiento y edad, y por encontrarse en el rango de suficiencia descrito en la bibliografía (Jones et al., 1991, Bergman, 1992).

Tabla 4.13: Concentración de hierro y manganeso ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en hojas de melocotonero control y deficientes en manganeso. Los análisis se hicieron diferenciando entre hojas: viejas y jóvenes (medias  $\pm$  error estándar de 10 ensayos)

	Control		- Mn	
	Viejas	Jóvenes	Viejas	Jóvenes
Fe	156.7 $\pm$ 9.53	89.35 $\pm$ 8.52	126.1 $\pm$ 13.5	93.5 $\pm$ 6.10
Mn	31.4 $\pm$ 1.50	20.75 $\pm$ 2.30	15.4 $\pm$ 0.90	15.8 $\pm$ 0.10

La concentración de manganeso en hojas deficientes jóvenes y viejas está claramente por debajo de  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  que es el valor crítico descrito en la literatura para hojas de *Prunus persica*. A menudo la deficiencia de manganeso induce desequilibrios en la concentración foliar de otros nutrientes (Marschner, 1995). En nuestro caso, se ha observado como las hojas deficientes muestran valores de Fe por debajo de los descritos como normales, lo que puede deberse a una inhibición en la toma de Fe por la planta o la competencia a nivel celular entre Fe y Mn (Marschner, 1995).

## 4.2.3.2.2 Pigmentos fotosintéticos

Al igual que en el caso de la soja, la concentración de clorofila por unidad de área y la de  $\beta$ -caroteno es menor en hojas deficientes en manganeso que en las de control. Sin embargo, la relación Chl a/b así como la relación entre el sumatorio de pigmentos del ciclo VAZ y la clorofila total no se vieron afectadas significativamente ni por la deficiencia de Mn ni por la edad de las hojas (Tabla 4.14). Como ya se ha expuesto, la deficiencia de manganeso no puede ser detectada por sus síntomas visuales en hojas

jóvenes y tampoco el estudio de la composición pigmentaria aporta información que permita discriminar si una hoja es deficiente (Figura 4.14).

Tabla 4.14: Concentración foliar de pigmentos fotosintéticos de hojas de melocotonero (*Prunus persica* L.) control y deficientes en manganeso. Los análisis se hicieron diferenciando entre hojas: viejas y jóvenes (medias  $\pm$  error estándar de 10 ensayos).

	Control		- Mn		Trat.	Edad
	Viejas	Jóvenes	Viejas	Jóvenes		
Chl a	46.34 $\pm$ 5.90	41.24 $\pm$ 5.9	31.61 $\pm$ 4.90	23.5 $\pm$ 4.90	*	n.s.
Chl b	15.60 $\pm$ 1.20	13.15 $\pm$ 4.11	13.11 $\pm$ 1.60	11.26 $\pm$ 1.60	*	n.s.
$\beta$ -car	8.03 $\pm$ 1.10	6.59 $\pm$ 1.10	4.30 $\pm$ 0.07	3.60 $\pm$ 0.90	*	n.s.
Chl a/b	2.95 $\pm$ 0.08	3.12 $\pm$ 0.08	2.93 $\pm$ 0.07	2.83 $\pm$ 0.07	n.s.	n.s.
VAZ / Chl	0.11 $\pm$ 0.011	0.14 $\pm$ 0.011	0.14 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.009	n.s.	n.s.

En el caso de la soja, los parámetros de fluorescencia, y sobre todo la relación Fv/Fm variaban de forma significativa. En la Tabla 4.15 podemos comprobar que también en el caso del melocotonero se produce esta circunstancia.

Tabla 4.15: Parámetros más importantes de fluorescencia para hojas viejas y jóvenes de melocotonero control y deficiente en manganeso. Los valores son la media de 10 experimentos  $\pm$  error estándar.

	Control		- Mn	
	Viejas	Jóvenes	Viejas	Jóvenes
F <sub>0</sub>	1.02 $\pm$ 0.07	1.06 $\pm$ 0.10	1.18 $\pm$ 0.11	1.33 $\pm$ 0.11
F <sub>m</sub>	6.88 $\pm$ 0.05	5.21 $\pm$ 0.17	5.36 $\pm$ 0.04	3.96 $\pm$ 0.13
F <sub>v</sub>	5.86 $\pm$ 0.07	4.15 $\pm$ 0.21	4.18 $\pm$ 0.20	2.63 $\pm$ 0.01
Fv/Fm	0.85 $\pm$ 0.03	0.80 $\pm$ 0.00	0.78 $\pm$ 0.04	0.66 $\pm$ 0.04

Con los resultados que se desprenden de estos experimentos en dos especies distintas, una en condiciones de cámara de cultivo y otra en condiciones de campo, se puede especular acerca de la manera en que la deficiencia de manganeso afecta a la fotosíntesis, y en concreto, al PSII.

En plantas superiores, los complejos captadores de luz del aparato fotosintético contienen clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides, mientras que los centros de reacción sólo contienen clorofila *a* y  $\beta$ -caroteno de (Thompson, 1987), por lo tanto las variaciones en el valor de las relaciones clorofila *a/b* pueden utilizarse para estimar cambios en el aparato fotosintético (Hale y Ocurtt, 1987). Por otra parte, variaciones en las relaciones entre carotenoides y clorofilas indicarían la alteración de la composición pigmentaria de la antena (Monge et al., 1985). Es decir, aunque la deficiencia de Mn induce descensos, en valores absolutos, en la concentración de todos los pigmentos, no se producen alteraciones estequiométricas entre ellos. Por lo tanto, el observado descenso en la eficacia fotosintética podría deberse, en nuestras condiciones de trabajo, a inhibiciones funcionales del PSII, más que a alteraciones estructurales. En este sentido, los datos de fluorescencia, tanto de soja como de melocotonero, sugieren una disminución de la actividad fotosintética (relación  $F_v/F_m$ ) que ya ha sido descrita por otros autores (Eyletters et al., 1998). Los bajos valores de  $F_v/F_m$  se deben al aumento de  $F_0$ , especialmente en las hojas más jóvenes deficientes en Mn (Val et al., 1995). Este aumento indica mayor contribución a la fluorescencia total de las estructuras de antena con respecto a los centros de reacción. Estas observaciones pueden explicarse teniendo en cuenta que la deficiencia de Mn induce una reducción de la funcionalidad de las partículas del centro de reacción del PSII y, por tanto, la capacidad de producción fotosintética es menor (Simpson y Robinson, 1984).

Una posible aplicación práctica de estos resultados consistiría en la predicción de la deficiencia de manganeso a partir de datos de fluorescencia en los árboles al principio de la estación. Podría pensarse en el uso de  $F_0/F_m$  en lugar de  $F_v/F_m$ , ya que se ha demostrado que uno de los parámetros que más se ve afectado por la deficiencia de manganeso es  $F_0$ . Así, Val et al. (1997), consideran valores de  $F_0/F_m > 0,3$  como referencia para la deficiencia de manganeso, lo que implica que más del 30 % de la

fluorescencia se debe a una contribución de la antena del PSII, mientras que en las plantas control, no más del 20 % se atribuye a  $F_0$ .

Todo este trabajo podría tener importantes repercusiones económicas, ya que el precio de mercado es mucho más alto para frutos de plantas que no presentan dicha deficiencia. Teniendo en cuenta esto y la posibilidad de conocer qué árboles van a ser deficientes al principio de la estación, se pueden aplicar tratamientos efectivos para corregir cuanto antes la deficiencia (Baekman y Halmo, 1999).

#### 4.2.4 Desequilibrios nutricionales en cerezo

En el apartado anterior se han comentado algunas deficiencias nutricionales típicas en los suelos arcillosos del valle del Ebro. Muchas de ellas no son debidas a que exista una carencia mineral en el suelo, sino que pueden deberse a que el individuo no sea capaz de absorberlos correctamente.

En trabajos anteriores realizados en la Estación Experimental de Aula Dei se encontraron variaciones nutricionales y de producción en árboles cultivados en las mismas condiciones, de la misma variedad, pero cuyo patrón o pie era diferente. En agricultura, el pie en el que se injerta una variedad es muy importante, porque a través de él la planta recibe los nutrientes y el agua que necesita para desarrollarse (Rom y Carlson, 1987). La limitación en la disponibilidad de nutrientes también puede afectar a la acumulación de biomasa, ya sea por disminución del tamaño de las hojas y, por tanto, de la superficie disponible para la fotosíntesis, o bien, por disminuir la capacidad fotosintética por unidad de área. Considerando estas modificaciones, se pueden usar los cambios en los parámetros fotosintéticos foliares para seleccionar variedades resistentes al estrés (Havaux et al., 1988).

En este trabajo se utilizó la variedad *Prunus avium* L. cv Van injertada sobre tres pies diferentes. Los patrones estudiados fueron: Adara (*Prunus cesarifera* L.), SL 64 (*Prunus mahaleb*) y Colt (*Prunus avium* x *Prunus pseudocerasus*).

Para esta plantación se disponen de los siguientes datos referidos al estado nutricional: La concentración de N, K y Mn es mayor en los árboles que se han injertado sobre la variedad Adara (Tabla 4.16), mientras que en los injertados en las otras variedades se encuentran síntomas de palidez en las hojas (Moreno et al., 1996; Betrán et al., 1997).

Tabla 4.16: Efecto del patrón de injerto en la composición foliar de cerezo (Van). Los resultados están expresados en porcentaje de materia seca para N, P y K. Las concentraciones de Fe y Mn se expresan en mg Kg<sup>-1</sup>.

	N	P	K	Fe	Mn
Adara	2.49 b	0.32 ab	2.61 c	73 a	49 b
SL 64	2.37 b	0.35 b	1.94 b	72 a	37 a
Colt	2.02 a	0.27 a	1.43 a	68 a	38 a

Fuente: Betrán et al., 1997

A menudo, las alteraciones en la composición mineral de los frutales tiene importantes repercusiones económicas al estar asociadas a cambios en la producción y/o en el tamaño de los frutos (Facteau et al., 1996; Moreno et al., 1996; Neilsen y Kappel, 1996). Muchas de estas deficiencias modifican directamente la composición de los pigmentos fotosintéticos de las hojas; por ejemplo, la deficiencia en hierro o en manganeso que se estudian en el apartado anterior (Madero et al., 1993; Pérez et al., 1993).

En este estudio, se hicieron medidas de fluorescencia y se recogieron muestras de hoja para el análisis por HPLC de los pigmentos fotosintéticos, y en particular de los pigmentos del ciclo VAZ. Las muestras se recogieron a medio día para conseguir que la radiación solar fuese máxima. El momento de recogida fue 60 días tras la plena floración, ya que los análisis de nutrientes disponibles correspondían a ese momento. Los parámetros de fluorescencia se usaron para conocer el estado de las plantas, es decir, se utilizó la capacidad fotosintética para conocer qué plantas estaban sometidas a una

posible situación de estrés. Asimismo, se estudio la variación en la concentración de pigmentos del ciclo VAZ como posible indicador de alteraciones en la fotosíntesis. El análisis de los pigmentos fotosintéticos y en particular de los componentes del ciclo VAZ, reveló diferencias significativas entre las hojas de árboles injertados sobre Adara y las de los injertados en los otros dos patrones. En general, la concentración de todos los pigmentos fue mayor en la variedad Adara, pero la relación Chl a/b se mantuvo constante en todos los casos (Tabla 4.17).

Tabla 4.17: Concentración foliar de pigmentos fotosintéticos ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) de hojas de cerezo (*Prunus avium* L. cv Van) injertado sobre los tres patrones. Los datos son medias  $\pm$  error estándar de 6 ensayos.

	Adara	SL 64	Colt
Chl b	6.60 $\pm$ 0.51a	4.66 $\pm$ 0.47 b	4.67 $\pm$ 0.47 b
Chl a	22.02 $\pm$ 1.64 a	15.55 $\pm$ 1.50 b	15.90 $\pm$ 1.50 b
$\beta$ -caroteno	4.48 $\pm$ 0.56 a	2.50 $\pm$ 0.51 b	2.84 $\pm$ 0.51 b
Chl a/b	3.35 $\pm$ 0.10 a	3.33 $\pm$ 0.09 a	3.41 $\pm$ 0.09 a
VAZ /Chl t	0.13 $\pm$ 0.01 a	0.15 $\pm$ 0.01 a	0.13 $\pm$ 0.01 a

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

Tampoco la relación entre la cantidad total de pigmentos del ciclo de las xantofilas y la clorofila total experimentó variaciones significativas. Sin embargo, si que lo hizo la composición relativa de estos pigmentos como se puede comprobar en la Figura 4.22. En el caso del Adara se encuentra la mayor proporción de violaxantina, concomitante con la menor de zeaxantina. Esto indica claramente que, desde el punto de vista de disipación de energía, el patrón Adara comunica propiedades a la parte aérea de la planta que le permiten una mejor adaptación al medio.

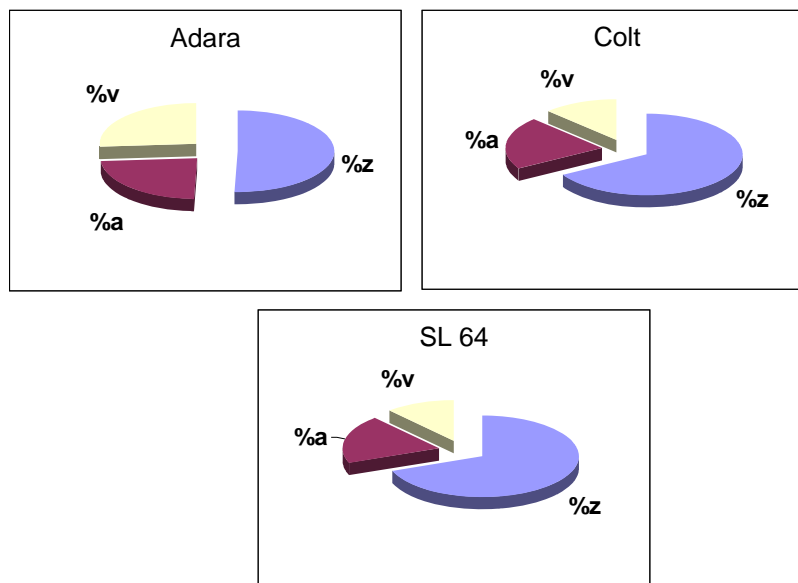


Figura 4.22: Composición de los pigmentos del ciclo VAZ en los tres pies en los que se había realizado el injerto.

Los datos obtenidos a partir de medidas de fluorescencia se resumen en la Tabla 4.18.

Tabla 4.18: Parámetros fotosintéticos en hojas de cerezo (*Prunus avium* L. cv Van) injertado en tres patrones distintos. Los datos son la medias  $\pm$  error estándar de 6 repeticiones.

	Patrón		
	Adara	SL 64	Colt
$F_0$	0.25 $\pm$ 0.006	0.26 $\pm$ 0.009	0.25 $\pm$ 0.007
$F_m$	0.94 $\pm$ 0.046	0.96 $\pm$ 0.016	1.05 $\pm$ 0.027
$F_v/F_m$	0.76 $\pm$ 0.003	0.72 $\pm$ 0.023	0.73 $\pm$ 0.007

Como puede observarse en la Tabla 4.18, las variedades SL 64 y Colt son las que tienen menor eficacia de conversión del exceso de energía luminosa, según los valores del parámetro  $F_v/F_m$ .

Con estos datos se puede concluir que el uso conjunto del análisis de pigmentos por HPLC y de la fluorescencia de clorofila podría permitir discriminar la idoneidad de los patrones para cerezo, desde el punto de vista de rendimiento fotosintético y, por tanto, de producción de biomasa.

Los primeros pasos en el estudio del comportamiento de los pigmentos fotosintéticos en *Prunus* injertados sobre Pollizos, se remontan a finales de los años 80 (Moreno et al., 1987, Val et al., 1989). Sin embargo, en aquel momento no era posible separar y cuantificar los pigmentos del ciclo VAZ, y, además, las técnicas de fluorescencia de clorofila estaban en sus albores. A la vista de estos resultados podría pensarse que de aplicar éstas técnicas, para la evaluación de la capacidad fotosintética, en el momento adecuado (cuando la planta se encuentra en fase de vivero tras los primeros meses del injerto) se dispondría de un método rápido de selección de patrones.



### **4.3 Variaciones de los pigmentos del ciclo VAZ a lo largo del año en siete especies leñosas mediterráneas**

#### **4.3.1 El encinar mediterráneo**

En los dos capítulos anteriores se ha analizado el papel protector del ciclo de las xantofilas (disipación del exceso de energía que alcanza el aparato fotosintético) frente a distintos tipos de estrés, que afectan la tasa de fotosíntesis de las plantas cultivadas. Hasta este punto de la Memoria, la disminución del rendimiento fotosintético fue provocada artificialmente o bien se conocían las causas de esta alteración. Sin embargo, en condiciones naturales son tantos los factores que pueden afectar la fotosíntesis, que es difícil discriminarlos en cada momento. Al contrario, hay muchos atributos ambientales que varían a la vez, algunos están mecánicamente ligados (altas intensidades de luz y calor) y otros varían de forma independiente (metales pesados en el suelo, ozono, etc.). En este capítulo, se analizan las variaciones de pigmentos fotosintéticos en especies leñosas mediterráneas que viven en condiciones naturales y se trata de encontrar relaciones entre dichas variaciones y los cambios ambientales a los que se ve sometida la planta a lo largo del año. El hecho de trasladar a plantas silvestres en condiciones naturales la información del comportamiento de los pigmentos fotosintéticos en condiciones de estrés provocadas artificialmente, permitirá comprobar si son ciertas o no las hipótesis obtenidas en condiciones controladas, que suelen simplificar mucho la realidad.

El clima es uno de los principales factores que actúan sobre la vegetación, afectando tanto a su composición florística (Elleberg, 1963) como a los caracteres morfológicos y funcionales de las especies que la conforman (Terradas y Savé, 1992). El clima mediterráneo se caracteriza porque se producen dos periodos anuales de estrés, debidos al frío invernal y a la sequía estival (Nahal, 1981). Esto hace que el periodo óptimo para el desarrollo de las plantas esté limitado a la primavera y al otoño (Mitrakos, 1980). Las especies que viven en este medio desarrollan mecanismos muy diversos para resistir el estrés ambiental, lo que se traduce en la existencia de una alta diversidad de comunidades y de estrategias funcionales desarrolladas para evitar las adversidades climáticas (Orshan, 1986). Debido estas características, se pensó que el clima mediterráneo resultaba un marco ideal para estudiar las respuestas de las plantas al estrés.

#### 4.3.2 Antecedentes

Los estudios que analizan las diversas estrategias de las plantas mediterráneas para hacer frente a las adversidades del ambiente se han centrado, sobre todo, en aspectos estructurales, morfológicos y fisiológicos. La información que se tenía al comienzo del estudio indicaba que las especies seleccionadas presentan diferentes estrategias para soportar el estrés hídrico, ya sea resistiéndolo o evitándolo (Levitt, 1980; Lo Gullo y Salleo, 1988; Tretiach, 1993). Según Castro-Díez (1996), *Quercus rotundifolia*, *Q. coccifera*, *Arbutus unedo* y *Buxus sempervirens* presentan cambios morfológicos y anatómicos como respuesta a la cantidad de precipitación que reciben al año. Sin embargo, en *Q. faginea*, *Pistacia lentiscus* y *P. terebinthus* la lluvia no parece jugar un papel decisivo, ya que utilizan reservas de agua acumuladas en horizontes profundos del suelo. Además, la forma de responder a la precipitación, en un gradiente climático, tampoco es la misma. Por un lado, *Arbutus unedo* y *Buxus sempervirens* reducen el tamaño de sus hojas a medida que disminuye la precipitación, para incrementar la eficiencia en el uso del agua; mientras que *Q. rotundifolia*, y *Q. coccifera* disminuyen el tamaño de los vasos del xilema para moderar el consumo de agua (Castro-Díez et al., 1997; Villar-Salvador et al., 1997).

Otro aspecto de la adaptación a los ambientes mediterráneos, es el estudio de la fenología de las especies, es decir, la forma en que las plantas organizan sus ciclos vitales cuando están sometidas a un periodo favorable corto y, además, discontinuo. La respuesta de las especies a las variaciones climáticas que se suceden a lo largo del año, se refleja claramente en su comportamiento fenológico (Kikuzawa, 1995). Sin embargo, la gran diversidad de patrones que pueden coexistir en una misma región climática, indica que no sólo están controlados por las características del clima (Lechowicz, 1984; Kikuzawa 1989). Otros factores, que pueden ser de origen filogenético (Lems, 1962; Johnson, 1992; Wright y Calderon, 1995; Diggle, 1997) juegan un importante papel en la organización del patrón fenológico de las especies (Kikuzawa, 1989; Rathcke y Lacey, 1995). Las características adaptativas que promueven la coexistencia de especies leñosas de diferente patrón fenológico pueden ser morfológicas (Borchert, 1994; Medina y Francisco, 1994; Kikuzawa, 1995) o fisiológicas (Baker et al., 1982; Chabot y Hicks, 1982; Rathcke y Lacey, 1985).

Por último, otra forma de caracterizar la adaptación de las plantas al clima mediterráneo, se centra en determinar los mecanismos que adoptan para proteger sus estructuras fotosintéticas del exceso de radiación en periodos en que la fotosíntesis está limitada, bien por falta de agua, o bien por bajas temperaturas. En la literatura se encuentran numerosos estudios que utilizan técnicas de fluorescencia o análisis de composición de pigmentos foliares para determinar el estrés al que está sometida una planta que vive en condiciones naturales. En las especies de hoja perenne, la fotosíntesis se “inhibe” durante los periodos fríos; algunos ejemplos pueden ser: *Pinus sylvestris* (Karpinski et al., 1994) y *Hedera helix* L. (Oberhuber y Bauer, 1991). La inhibición está asociada con una disminución de la eficacia fotoquímica del fotosistema II (PSII) que, más que un daño directo del fotosistema, parece ser una medida de protección que permite la recuperación de su actividad en los momentos favorables (Öquist y Ögren, 1985; Ottander et al., 1995).

Las hojas poseen distinta concentración de estas xantofilas según estén adaptadas a condiciones de sol o de sombra, invernales o estivales. Este fenómeno se ha descrito en numerosas especies, como, por ejemplo, los cambios estacionales que experimentan *Hedera helix*, (Oberhuber y Bauer, 1991) o algunas especies de trigo (Hurry et al., 1992).

También se han observado variaciones en las hojas medidas al amanecer y al mediodía en *Quercus suber* (Faria et al., 1996) y en plantas aclimatadas al sol frente a plantas que se han desarrollado en condiciones de sombra (Demmig-Adams y Adams, 1992a; Demmig-Adams et al., 1995). El hecho de que el ciclo de las xantofilas esté relacionado con procesos de fotoprotección asociados al frío invernal o al periodo de estrés hídrico estival ya se ha puesto de manifiesto para numerosas especies (Adams et al., 1995a; Xu et al., 1999). El aumento del total de xantofilas del ciclo del VAZ en invierno es debido a que la intensidad de luz recibida es mucho mayor de la que puede ser utilizada, ya que en esta época las temperaturas limitan severamente la utilización de la luz absorbida. Se especula que este ciclo pueda proporcionar fotoprotección en dichas condiciones, ya que la mayoría de los enzimas antioxidantes parecen operar con mucha lentitud a temperaturas tan bajas. Pero no sólo aumenta la cantidad total de pigmentos sino que, además, en el ciclo del VAZ domina la forma zeaxantina. Adams et al. (1995a), trabajando con ocho especies vegetales, encontró en los pigmentos del ciclo de las xantofilas la clave para que éstas tuviesen la flexibilidad de adaptarse a las condiciones climáticas en épocas en las que la intensidad de luz es superior a la que puede ser procesada por las clorofilas. De igual forma, Verhoeven et al. (1996) demuestran que, en perennifolios, la disminución de la eficacia fotosintética del fotosistema II está asociada con un aumento en la actividad del ciclo de las xantofilas. En cuanto a la respuesta al estrés hídrico del verano, Kypris et al. (1995), trabajando en *Phlomis fruticosa* L. *labiatae*, puso de manifiesto que los pigmentos fotosintéticos y, en particular, los componentes del ciclo de las xantofilas juegan un importante papel fotoprotector, aumentando su actividad respecto a otras épocas del año.

Con estos antecedentes, las preguntas que se plantearon al comienzo de este estudio fueron las siguientes:

¿Se puede encontrar una relación entre la concentración de pigmentos del ciclo de VAZ y los niveles de estrés en plantas que viven en condiciones naturales? (estos niveles de estrés se pueden cuantificar con temperaturas mínimas, con precipitaciones y con niveles de prolina)

¿La presencia de estos pigmentos se relaciona por igual con el estrés por bajas temperaturas invernales o con el estival?

Durante los periodos de máxima actividad fenológica, crecimiento vegetativo y desarrollo de frutos, la demanda de recursos por parte de la planta se incrementa. ¿Puede esto producir algún cambio en los niveles de los distintos pigmentos?

¿Responderán por igual los pigmentos de las distintas especies mediterráneas, que coexisten en el mismo hábitat, a los cambios estacionales?, o, por el contrario, ¿la respuesta de los pigmentos variará entre especies, en consonancia con otros aspectos adaptativos de las plantas? ¿Se podrían identificar "grupos de respuestas" asociados a ciertos grupos de especies que comparten otra serie de respuestas morfológicas, fisiológicas y fenológicas?

¿Hasta qué punto es reversible la pérdida de actividad fotosintética que las hojas sufren durante periodos de estrés?

Si suponemos que los pigmentos del ciclo de la zeaxantina sirven de protección al aparato fotosintético, ¿existe relación entre la concentración de pigmentos de VAZ y de clorofila? Esa relación, ¿es constante o difiere entre especies?

#### 4.3.3 Condiciones experimentales

Para llevar a cabo este estudio, se eligió un área dominada por bosques de *Quercus ilex* y sus etapas de degradación -comunidades de la clase *Quercetea ilicis* (Le Houerou, 1981). La relación de estos encinares con el clima ha atraído la atención de numerosos investigadores (Braun-Blanquet, 1936; Floret et al., 1990; Sala et al., 1994; Castro-Díez et al., 1998a). Los encinares, han estado sometidos a una intensa presión antrópica durante los últimos milenios, que les ha producido grandes perturbaciones, siendo la tala, el pastoreo y la quema las principales actividades que han conducido a su degradación. El área de estudio escogida sufre un abandono total en su explotación desde hace más de 30 años, y en los últimos años no se ha visto alterada por incendios forestales. Actualmente, el grado de perturbación en esta zona es muy bajo (Castro-Díez, 1996).

El experimento se planteó sobre siete especies muy abundantes y representativas de los encinares mediterráneos. Las especies elegidas para llevar a cabo este estudio fueron dos caducifolias de invierno (*Quercus ilex* y *Pistacia terebinthus*) y cinco perennifolias (*Q. rotundifolia*, *Q. coccifera*, *Arbutus unedo*, *Buxus sempervirens* y *P. lentiscus*), todas ellas muy abundantes en los encinares mediterráneos del NE de la Península Ibérica (Rivas-Martínez et al., 1991; Braun-Blanquet y Bòlos, 1957).

Se trató de comparar diferentes grados y formas de estrés climático que soportan estas especies en cada estación, analizando las variaciones en la concentración de pigmentos del ciclo VAZ. Las muestras se tomaron con una frecuencia mensual, diferenciando hojas de sol y de sombra. Los detalles de la toma de muestras se explican en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos.

Para hacer una estimación del estrés hídrico, y ante la complejidad de medir los potenciales hídricos, se consideró la concentración foliar de un marcador como es la prolina. Según han demostrado diferentes autores, este aminoácido es un buen indicador del efecto del estrés hídrico en algunas especies. Los aminoácidos presentes en la planta se degradan a prolina en condiciones de estrés hídrico y salino (Lansac et al., 1994).

Los resultados del experimento se detallan para cada especie por separado, aunque se darán algunos resultados generales para las del mismo género. Los datos obtenidos a partir del análisis foliar de pigmentos, nunca son absolutos, sino relativos, ya que reflejan los cambios de concentración de los pigmentos del ciclo VAZ, bien sean debidos a respuestas estacionales o a factores internos de la planta como pueden ser: crecimiento del fruto, nacimiento de nuevos brotes, etc. Todos estos procesos demandan recursos de otras partes de la planta, por lo que es posible que estos individuos se vean sometidos a situaciones de estrés que no dependan de los factores externos.

#### 4.3.4 Análisis fenológico de siete especies del encinar

La Figura 4.23 y la Figura 4.24 muestran los diagramas fenológicos de las siete especies durante el periodo de estudio. Las especies estudiadas difieren bastante en su comportamiento fenológico, por lo que fueron elegidas para este estudio.

El trazo oscuro coincide con los periodos en los que la fenofase se observa en más de uno de los 10 ejemplares de referencia. Si sólo se observa en uno o en algún otro de la población distinto de los de referencia, se indica la fenofase con trazo más claro. Para que se considere que una fenofase se está produciendo en un individuo es necesario que se exprese, por lo menos, en un 5 % del conjunto de sus ramas. Las fenofases estudiadas se describen a continuación

CVM = crecimiento vegetativo de los macroblastos. En el grupo de especies consideradas no se reconocen braquiblastos (Floret et al., 1989) por lo que sólo estudiamos el crecimiento vegetativo de los macroblastos. Se considera el inicio de esta fenofase cuando se observa, por lo menos, una parte de la primera hoja que emerge fuera de la yema. El final cuando termina la elongación del tallo.

FYF = formación de las yemas florales. Se considera el periodo desde que se comienza a ver la primera yema floral hasta que se ve la última, generalmente ya en estado de floración avanzada.

F = floración. Mientras se observan flores en antesis.

FF = formación de los frutos. Cuando se observa algún fruto en desarrollo o inmaduro. En el caso de *Arbustus unedo* y *Quercus coccifera*, los frutos están presentes durante más de un año, por lo que se representan en dos líneas.

DF = dispersión de frutos. Mientras se produce el desprendimiento de los frutos.

CH = caída de las hojas de macroblastos. Cuando se observa la caída significativa de hojas. En el grupo de especies considerado existe una especie marcescente (*Quercus faginea*), es decir, retiene en las ramas una parte del follaje seco tras la senescencia. En la población estudiada las hojas ya están totalmente secas en diciembre y, además, se han desprendido en gran parte. En enero ya queda poca hoja marcescente y en los meses siguientes hasta la brotación, la cantidad de hoja retenida es muy reducida. Por lo tanto, la caída de la hoja no coincide exactamente con su muerte, aunque la diferencia es escasa.





Figura 4.23: Diagrama de fenofases de *Quercus coccifera*, *Q. faginea* y *Q. rotundifolia* realizados durante los años 1997 y 1998 en las localidades de estudio (para más información ver Material y Métodos)

Figura 4.24: Diagrama de fenofases de *Arbutus unedo*, *Buxus sempervirens*, *Pistacia lentiscus*, *P. terebinthus* realizados durante los años 1997 y 1998 en las localidades de estudio (para más información ver Material y Métodos)

#### 4.3.5 Análisis de los parámetros elegidos para cada una de las especies

##### 4.3.5.1 *Quercus rotundifolia*

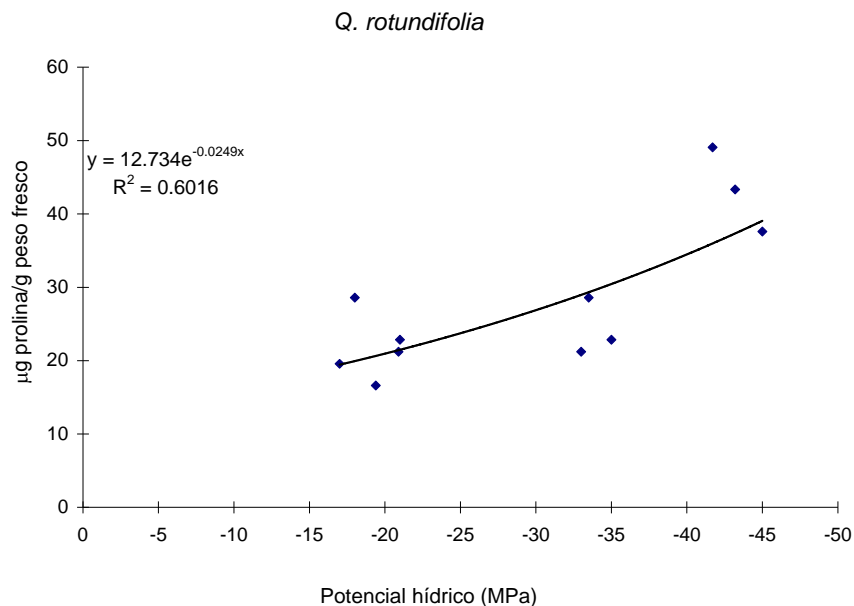
En el área de estudio, la especie dominante es *Quercus rotundifolia* (también denominada *Q. ilex* subsp. *ballota*). Los estudios fenológicos, realizados en esta misma zona, confirman que es una especie cuyos periodos de crecimiento de los macroblastos y floración se concentran en la primavera, produciéndose un importante solapamiento de fenofases (Castro-Díez y Montserrat-Martí, 1998). Sin embargo, la fructificación se produce en verano y en otoño, evitando la superposición con las fenofases citadas (Montserrat-Martí et al. en preparación; ver Figura 4.23 y Figura 4.24).

En trabajos anteriores con especies de este mismo género se encontraron respuestas de los pigmentos del ciclo VAZ a las variaciones climáticas producidas a lo largo del año (García-Plazaola et al., 1997). Según estos autores, la mayor concentración de pigmentos del ciclo VAZ se encontró al final del verano y en invierno, periodos en que la fotosíntesis estaba limitada por el estrés hídrico y por el frío respectivamente.

Antes de realizar al estudio de los pigmentos fotosintéticos de las plantas del encinar, se procedió a hacer un análisis más detallado de la relación existente entre la concentración foliar de prolina, los parámetros de fluorescencia y el potencial hídrico en plántulas de *Q. rotundifolia*.

Se dispuso de cincuenta macetas con plantas de *Q. rotundifolia* de 5 años de edad. En el momento de comenzar el experimento, se retiró el riego que, cada dos o tres días, se había aplicado durante todo el tiempo y se comenzó a controlar la evolución de las mismas hasta su muerte por sequía.

Los parámetros más evidentes para conocer del estado hídrico de las plantas a lo largo del ciclo de sequía, fueron el potencial hídrico medido a medio día ( $\Psi$  mediodía) y



al alba (Predawn water potential:  $\Psi$  alba).

Figura 4.25: Relación entre el potencial hídrico a medio día y la concentración foliar de prolina en macetas de *Q. rotundifolia* sometidas a un ciclo de sequía

Los valores de  $\Psi$  mediodía en torno a  $-50$  MPa, que aparecen en la Figura 4.25, corresponden a los últimos días del ciclo de sequía, en los que las plántulas estaban prácticamente muertas, sin embargo, la concentración de prolina acumulada en las hojas no es muy elevada. Por lo tanto, se puede decir, que en esta especie, el parámetro de la concentración foliar de prolina no proporciona información sobre el estado hídrico de las plantas, a no ser que el estado de déficit hídrico sea muy elevado. Estos datos están de acuerdo con los encontrados por Lansac et al. (1994), que no hallaron concentraciones de prolina elevadas en esta especie.

Con estos antecedentes no sorprenden los resultados mostrados en la Figura 4.26, donde se aprecia la baja concentración de prolina durante los dos años de muestreo. Las oscilaciones detectadas son de pequeña amplitud aunque se muestran amplificadas por el

fondo de escala (comparar la escala en el eje de abscisas en las Figura 4.25 y Figura 4.26). A pesar de esto, si se observan los datos correspondientes a 1998, se ven algunos cambios. Las concentraciones más elevadas corresponden a los periodos más fríos, no al verano. Parece que se produce un mínimo al principio del verano y va aumentando ligeramente hasta alcanzar el máximo al final de invierno.

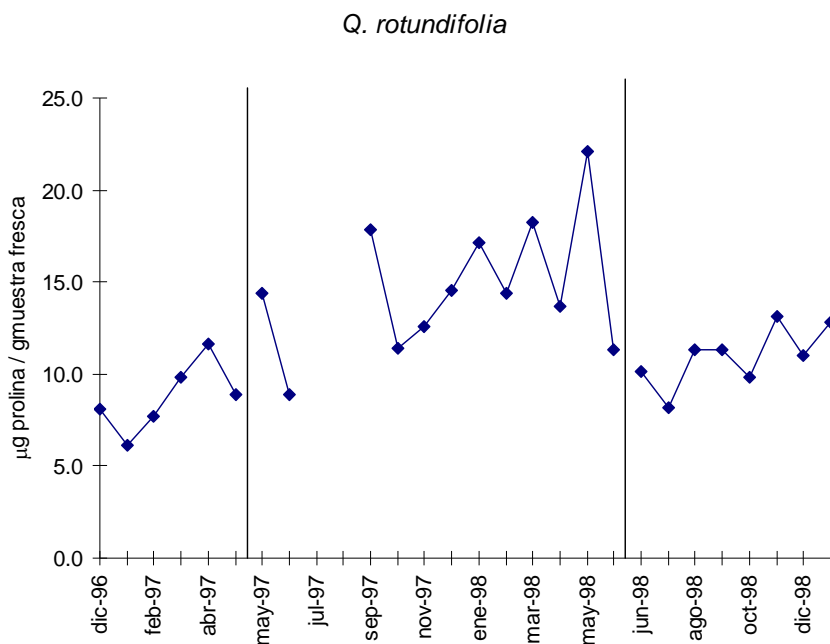


Figura 4.26: Variación de la concentración de prolina en las hojas de *Quercus rotundifolia* durante el periodo de muestreo. Las líneas verticales señalan el momento en que se han cogido hojas de la nueva cohorte.

Al analizar la variación estacional de la concentración foliar de los pigmentos fotosintéticos, lo más significativo es la diferencia de concentración de zeaxantina entre las hojas de sol y las de sombra. En la Figura 4.27 se aprecia como las hojas de sombra mantienen una concentración relativamente baja de zeaxantina durante todo el año. En el momento en que aparecen las hojas de la nueva cohorte, que están en fase de desarrollo, los valores son más elevados, porque aún no hay una clara diferenciación entre hojas de sol y de sombra. Sin embargo, las hojas de sol muestran más oscilación a lo largo del año, no pudiendo encontrarse un patrón de comportamiento muy claro. A pesar de que las

muestras fueron tomadas en la hora del día de máxima radiación solar, la intensidad de la luz en el momento del muestreo podría condicionar este dato.

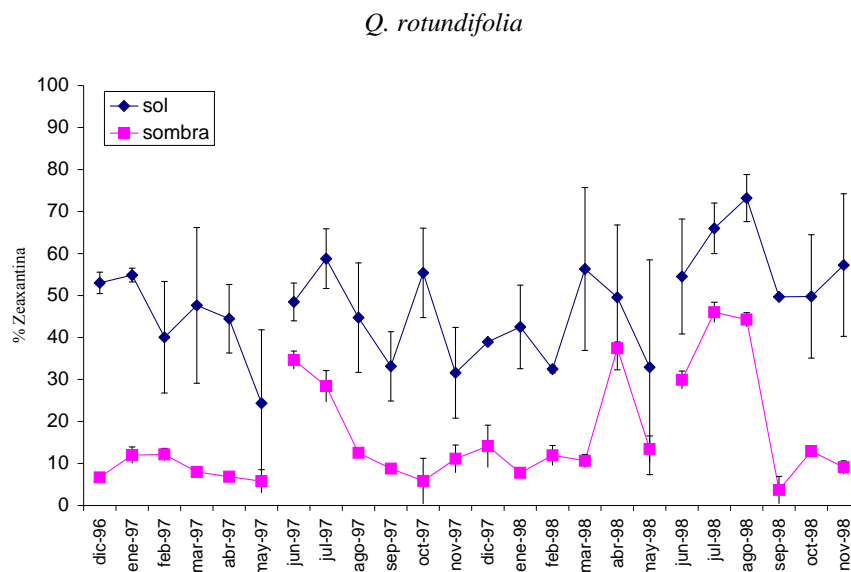


Figura 4.27: Variación del porcentaje de zeaxantina en hojas de *Quercus rotundifolia* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

En cuanto a la cantidad de pigmentos del ciclo de las xantofilas que estaría protegiendo a las clorofilas en un momento dado (expresado como VAZ/Chl total), alcanza el valor máximo al principio del ciclo de vida de las hojas. Esto puede ser debido a que la biosíntesis de xantofilas ocurre antes que la de clorofilas (Figura 4.28). Posteriormente, esta relación disminuye rápidamente durante el primer mes de vida de las hojas. Por otro lado, la cantidad es siempre mayor en las hojas de sol, que desde su nacimiento están sometidas a intensidades luminosas mucho más elevadas. En la Figura 4.28 también se aprecia que en los meses de invierno, tanto en las hojas de sombra como en las de sol, el valor de este índice es ligeramente superior al del resto del año. Este dato apoya el papel del ciclo de las xantofilas como mecanismo de protección en situaciones de frío que también ha quedado de manifiesto en otros trabajos (García-Plazaola et al.,

1997). Sin embargo, durante el verano, la magnitud del posible estrés hídrico no es suficiente para inducir aumentos de la concentración foliar de pigmentos del ciclo VAZ.

*Q. rotundifolia*

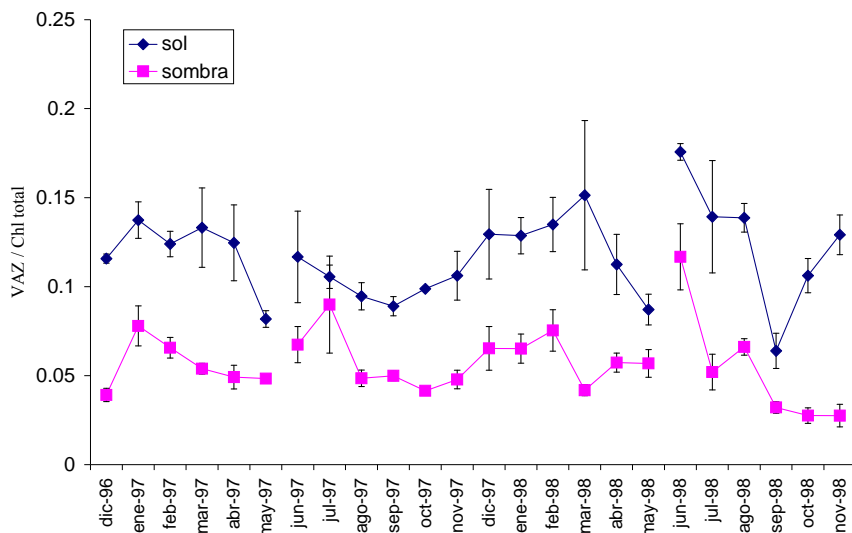


Figura 4.28: Variación de la relación entre la concentración total de pigmentos del ciclo VAZ y la de clorofilas producidas por las hojas de *Quercus rotundifolia* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

Los valores más elevados, hacen referencia al momento en que empiezan a brotar las nuevas hojas, ya que en el momento de salir contienen menos clorofila total. En la Figura 4.29 se muestra cómo la cantidad de clorofila aumenta a medida que se van formando las hojas nuevas.

A medida que las hojas se forman y, por tanto, se hacen más esclerófilas, también hay un aumento de la clorofila total por unidad de área. La variación a lo largo del año del peso específico de estas hojas tiene un patrón semejante al de la clorofila, por lo que se puede deducir que el proceso de formación de las hojas es lento (Castro-Díez et al., 1997). Además, la baja concentración de clorofilas que exhiben las hojas en formación, justificaría el descenso en la relación VAZ/Chl en los primeros meses de vida.

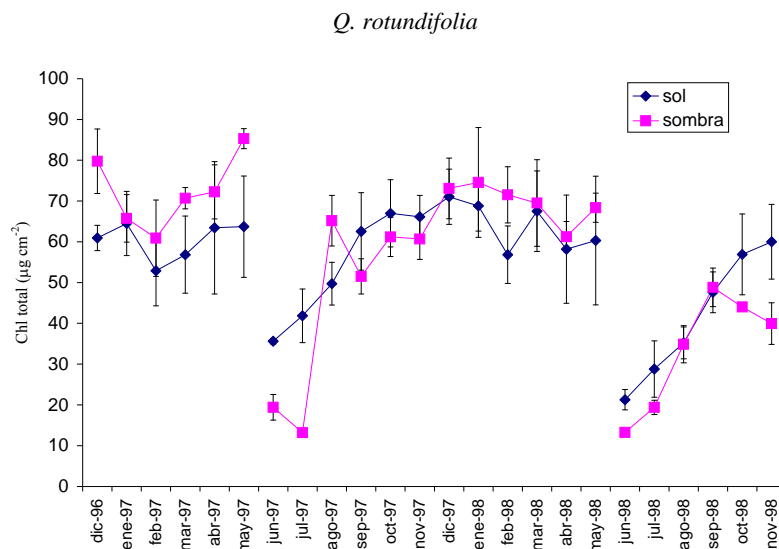


Figura 4.29: Variación de cantidad total de clorofilas en las hojas de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) de *Quercus rotundifolia* durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

La información registrada sobre la variación mensual de la concentración de prolina y pigmentos fotosintéticos, parece indicar que el periodo de máximo estrés encontrado para la carrasca es el invierno. Esta es también la época de menor actividad fenológica, por lo que la ordenación de las fenofases también es una medida para evitar el estrés.

El hecho de que una planta esclerófila mediterránea sea más sensible al frío invernal que al periodo seco estival ya se había descrito anteriormente. Karavatas y Manetas (1999) encontraron que, en cinco esclerófilos y en cinco malacófilos que crecían en una zona de clima mediterráneo, el valor  $F_v/F_m$  descendía considerablemente coincidiendo con las temperaturas mínimas de la época invernal, mientras que, en el periodo seco del verano, el descenso de este parámetro era menos pronunciado y sólo se producía, cuando la sequía se mantenía un tiempo extremadamente largo.

En todas las muestras se analizó el total de pigmentos fotosintéticos, aunque sólo se hace referencia a datos de pigmentos del ciclo VAZ y a las clorofilas. En el caso de la carrasca, y también en las otras dos especies del género *Quercus*, como se verá más

adelante, se observó un hecho digno de mención. La cromatografía por HPLC puso de manifiesto la existencia de un pigmento cuya presencia no se había detectado en ninguna de las otras especies descritas en este trabajo. La posición en el cromatograma y los espectros UV-Visible realizados (datos no mostrados), sugieren que podía tratarse de taraxantina. Este pigmento, cuya función todavía es desconocida, ha sido encontrado en especies arbóreas como el *Populus* (de las Rivas et al., 1989) y en especies cultivadas como la remolacha (Val et al., 1986). Como se puede apreciar en la Figura 4.30, la abundancia relativa de dicho pigmento, que aparece en el cromatograma entre la violaxantina y la zeaxantina, fue mayor en las hojas de sombra que en las de sol. Este resultado se repite en la coscoja y en el quejigo.

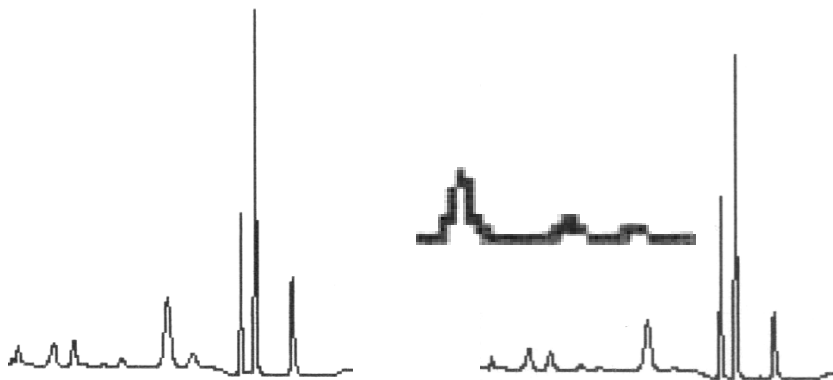


Figura 4.30: Separación por HPLC de pigmentos fotosintéticos de *Quercus rotundifolia*. El cromatograma de la izquierda corresponde a una muestra de sol y el de la derecha a una de sombra. En el centro se muestra ampliada la zona de violaxantina, taraxantina y anteraxantina de la muestra de sombra.

#### 4.3.5.2 *Quercus coccifera*

*Q. coccifera* (coscoja) es una planta capaz de sobrevivir en condiciones climáticas bastante extremas y es más heliófila que las otras dos especies del género *Quercus* estudiadas. Durante el periodo de sequía estival utiliza mecanismos para evitar la fotoinhibición que le permiten recuperar durante la noche los niveles de fluorescencia tras el descenso que sufren a lo largo del día (Werner et al., 1999).



Si comparamos los valores de la concentración foliar de prolina con los de potencial hídrico durante un ciclo de sequía en macetas con plántulas de esta especie, vemos que la variación no es gradual, sino que la planta debe encontrarse prácticamente deshidratada (-80 MPa) para que el estrés hídrico induzca aumentos significativos en la concentración de este aminoácido (Figura 4.31).

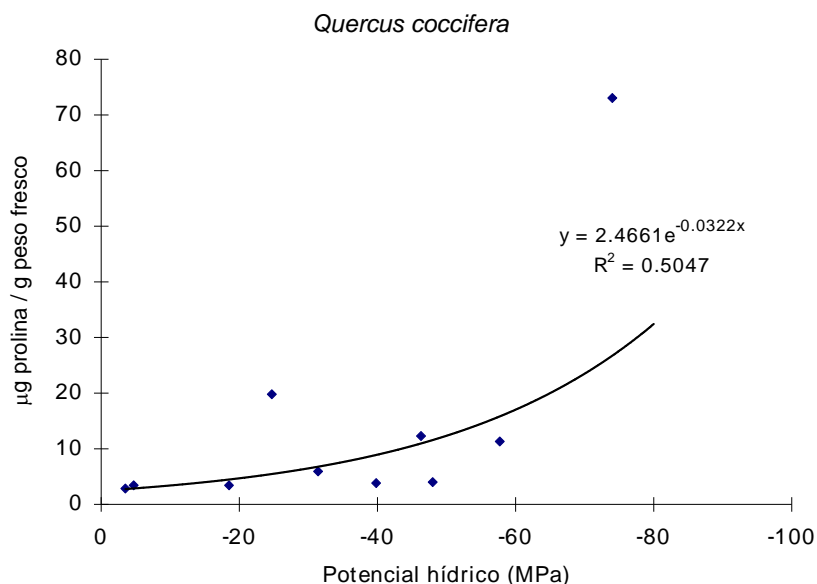


Figura 4.31: Relación entre la concentración de prolina y el potencial hídrico en plantas de *Quercus coccifera* cultivadas en maceta y sometidas a un ciclo de sequía. (Datos de A. Vilagrosa)

En la Figura 4.31, se representa la variación de la concentración de prolina durante los dos años del experimento. Es interesante indicar que los bajos valores de prolina obtenidos no pueden utilizarse como un indicador del estrés hídrico. El rango de variación observado en la gráfica (6-16 µg prolina/g peso fresco) es tan estrecho que las oscilaciones detectadas pueden ser debidas al inherente error de muestreo unido al método analítico utilizado. En otras palabras, con los datos disponibles no es posible deducir que la planta sufriese periodos de estrés hídrico a lo largo del año.

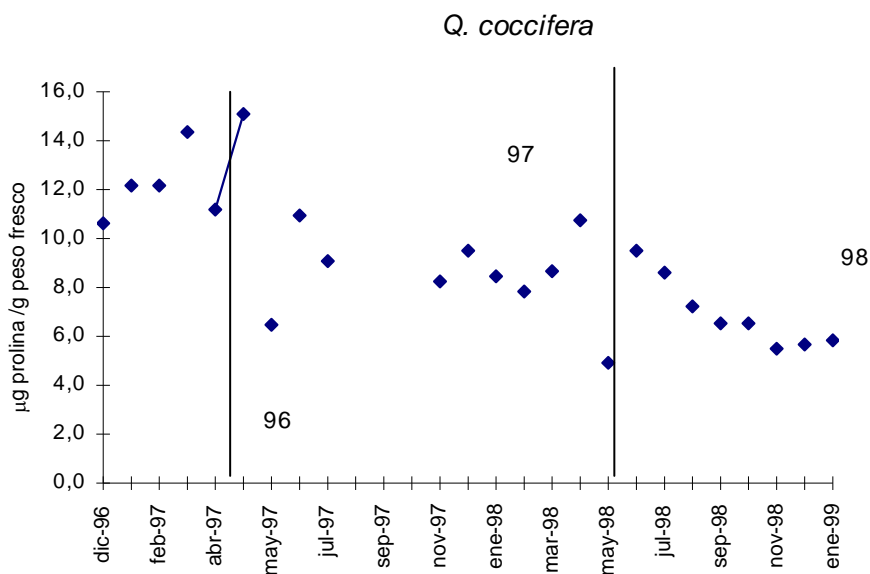


Figura 4.32: Variación de la concentración de prolina en las hojas de *Quercus coccifera* durante el periodo de muestreo en tres cohortes de hojas distintas.

Los porcentajes de zeaxantina no variaron significativamente durante el año (Figura 4.33), lo que puede significar que la planta no experimentase periodos de estrés grave. En el año 1997 las hojas nuevas aparecieron a partir de mayo. En este mes se apreció un pico bastante importante tanto en hojas de sol como en hojas de sombra. A diferencia de lo que ocurrió en otras especies, estas hojas tenían casi un mes de vida cuando se recogieron, por lo que ya pudo apreciarse una clara diferenciación entre las hojas de sol y las de sombra. El aumento de concentración de zeaxantina que experimentan tanto las hojas de sol como las de sombra en los meses de invierno y que se repite en todos los años estudiados, podría ser debido a una respuesta al frío invernal.

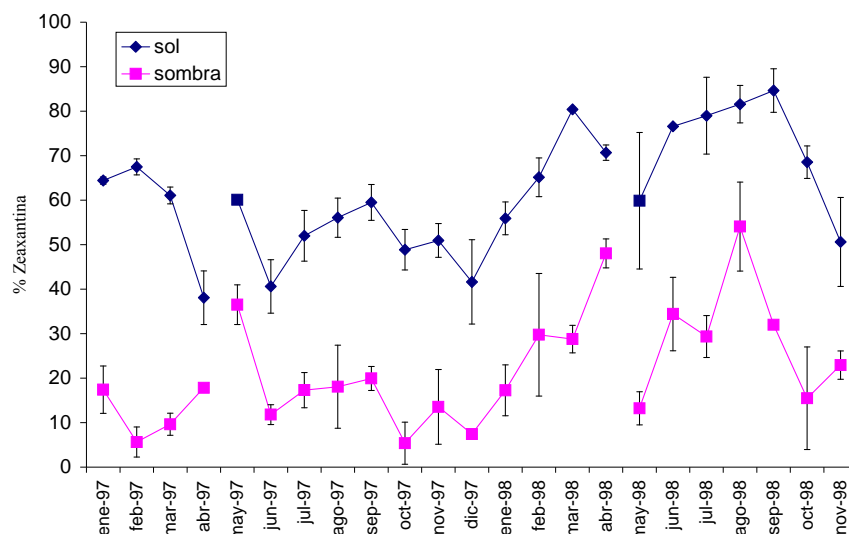
*Q. coccifera*

Figura 4.33: Variación del porcentaje de zeaxantina en hojas de *Q. coccifera* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

La relación VAZ/Chl, que como en el caso de la carrasca, utilizamos como indicador de la protección del ciclo a las clorofilas, no mostró cambios significativos en los meses más secos. Como pasaba con la otra especie esclerófila de este mismo género, hay un ligero aumento en la relación VAZ/Chl en los meses de invierno, durante los dos años de muestreo, tanto en las hojas de sol como en las de sombra (Figura 4.34). A partir de estos datos, podría deducirse que los mecanismos de adaptación de la coscoja le permiten soportar el periodo estival sin muchas dificultades, pero durante los meses de invierno soporta condiciones de estrés que dificultan la supervivencia en esta zona del territorio. La sensibilidad de la coscoja a las bajas temperaturas invernales se puede poner de manifiesto en su distribución altitudinal en el Pirineo. De las tres especies de *Quercus* estudiadas, que son las más abundantes en el territorio, es la que asciende menos (Villar et al., 1997). Por otra parte, esta planta, en invierno, debe mantener una cantidad de hojas suficiente para asegurar una cierta actividad fotosintética y, además, numerosas flores femeninas que fructificarán en el próximo otoño, unos 10 meses más tarde (Figura 4.23).

El aumento de la concentración de zeaxantina y de la relación VAZ/Chl que se observa al principio de la primavera, también aparece en la carrasca aunque mucho más atenuado, puede estar asociado con el momento en que se produce una mayor actividad tanto de reproducción como de crecimiento.

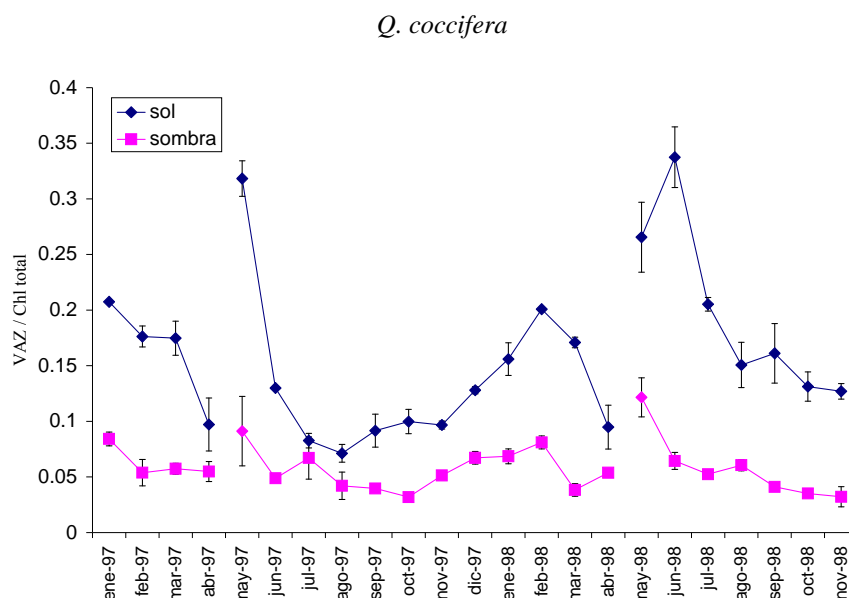


Figura 4.34 Variación de la relación entre la cantidad total de pigmentos del ciclo VAZ y la cantidad de clorofilas producidas por la hojas de *Q. coccifera* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

El proceso de desarrollo foliar de esta especie es extremadamente lento como se aprecia en la Figura 4.35. El valor máximo de la relación VAZ/Chl (Figura 4.34), coincide en el tiempo con el máximo de clorofila total. Este patrón temporal de síntesis de pigmentos apoya la hipótesis de que el ciclo de las xantofilas tiene un papel protector durante los primeros estadios del desarrollo de las hojas. En el caso de esta especie, este hecho se hace más evidente que en otras cultivadas, como *Heliantus annuus* en las que estos cambios se producen en pocos días (Gamon y Surfus, 1999).

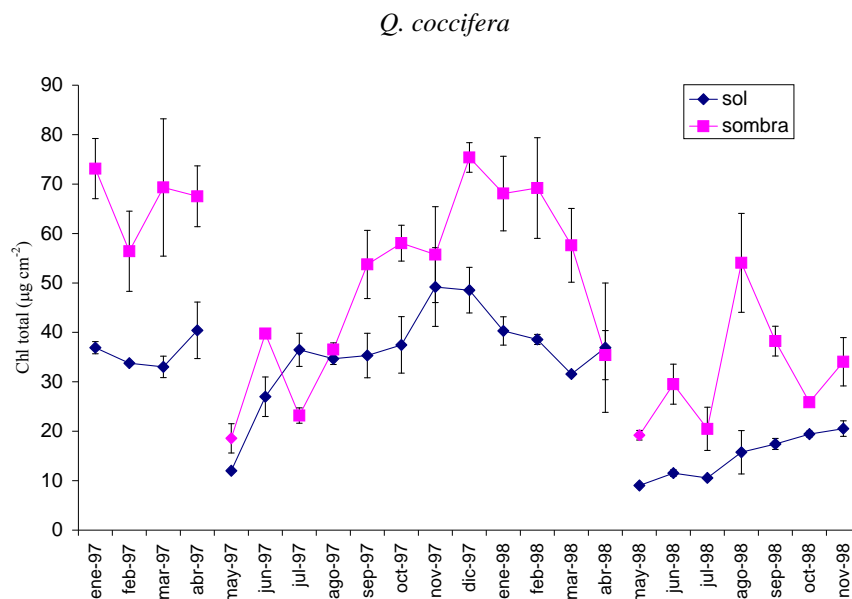


Figura 4.35: Variación de cantidad total de clorofilas producidas por las hojas de *Quercus coccifera* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

#### 4.3.5.3 *Quercus faginea*

Otra especie del género *Quercus* que también ha sido objeto de estudio es *Q. faginea*. Al ser caducifolio, durante el periodo de estrés invernal no tiene hojas, por lo que no es necesario que desarrolle sistemas de protección durante este tiempo.

En la Figura 4.36, se observa que la concentración foliar de prolina no fue elevada durante el periodo de muestreo. En este caso no se dispone de determinaciones del potencial hídrico, aunque cabe suponer que el comportamiento de esta especie sea similar al observado en las otras dos estudiadas del mismo género.

En los caducifolios, los pigmentos fotosintéticos varían rápidamente tras formarse las nuevas hojas (Gamon y Surfus, 1999). El aparato fotosintético se construye en un proceso que es muy rápido, ya que las hojas tienen que aprovechar un corto periodo favorable para su desarrollo.

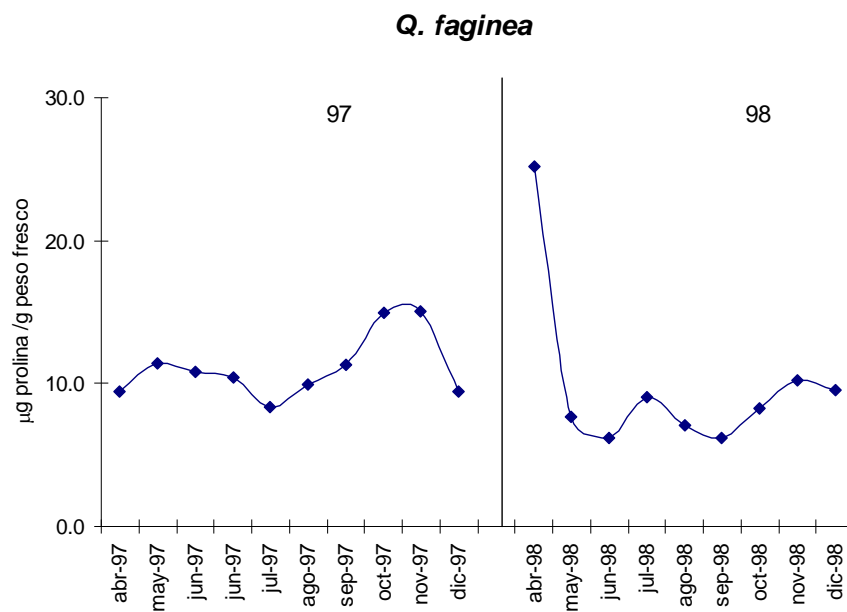


Figura 4.36: Variación de la concentración de prolina en las hojas de *Quercus faginea* a lo largo del periodo de muestreo.

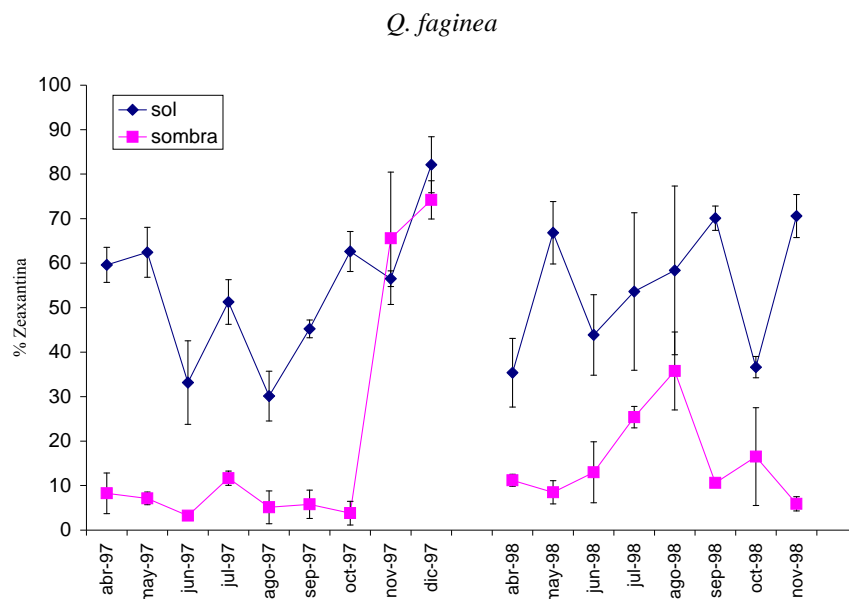


Figura 4.37: Variación del porcentaje de zeaxantina en hojas de *Q. faginea* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

Del estudio de los datos obtenidos tras el análisis de pigmentos, se puede concluir que sólo en los meses de verano se encuentra una mayor concentración de zeaxantina respecto a los otros dos componentes de ciclo (Figura 4.37). Al principio de la estación se produce un rápido aumento de la concentración foliar de clorofilas (Figura 4.39), mientras que los valores de la relación VAZ/Chl se mantienen prácticamente constantes, especialmente en las hojas de sombra. Sin embargo, al final del periodo vegetativo comienza el proceso de senescencia, con la consiguiente degradación de las clorofilas. En estos últimos estadios, el descenso de clorofilas es concomitante con el aumento de la relación VAZ/Chl.

La principal diferencia entre *Q. faginea* y las otras dos especies de *Quercus* estudiadas es que el quejigo es un caducifolio invernal, es decir, que carece de hojas durante los meses de máximo estrés por frío (Figura 4.23). Esta característica hace que siga unos patrones muy diferentes al resto de perennifolios del género.

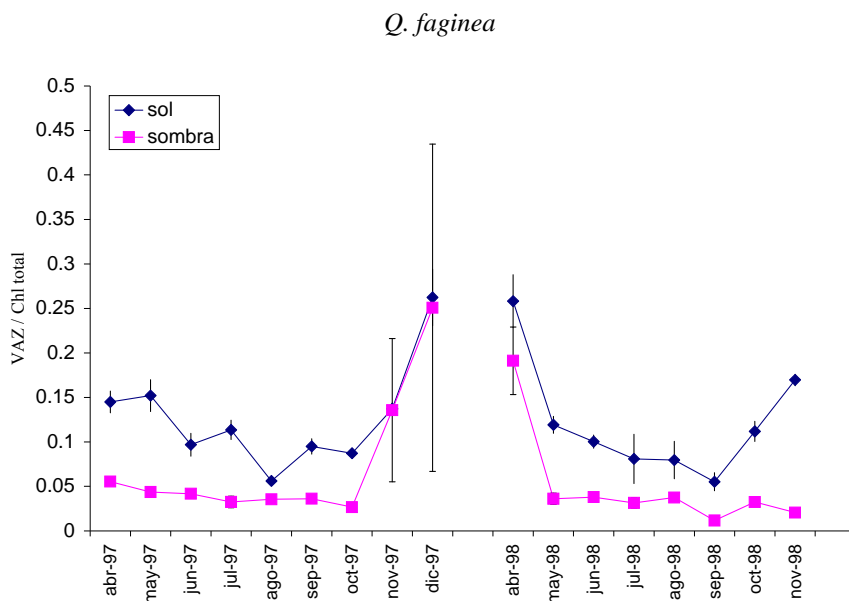


Figura 4.38: Variación de la relación entre la cantidad total de pigmentos del ciclo VAZ y la cantidad de clorofilas producidas por la hojas de *Q. faginea* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

Los datos correspondientes a los meses de noviembre y diciembre, en realidad son datos de hojas prácticamente secas, marcescentes. Los estudios realizados en hojas senescentes de esta misma especie, también muestran que conforme las hojas se van haciendo más viejas, aumenta la concentración de luteína,  $\beta$ -caroteno y clorofila *a*, excepto en los periodos de estrés hídrico (Demmig-Adams et al., 1988; Thayer y Björkman, 1990; Abadía et al., 1996). Cuando las hojas ya son senescentes, las clorofilas se degradan totalmente, y la mayor parte de los pigmentos que se extractan en acetona son carotenoides.



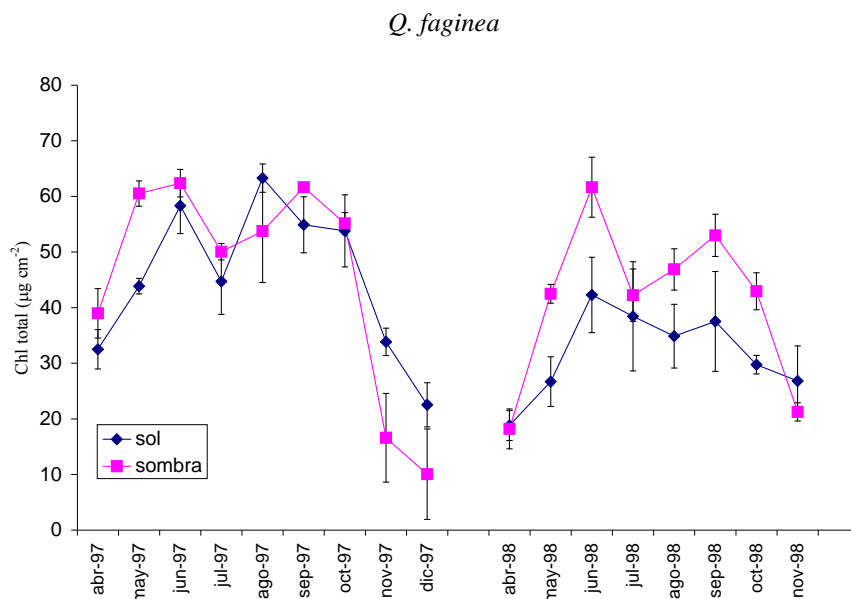


Figura 4.39: Variación de cantidad total de clorofilas producidas por las hojas de *Quercus faginea* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

En la Figura 4.39 se representa como varía la cantidad total de clorofilas durante el tiempo de vida de las hojas. La drástica disminución de la cantidad de clorofila total refleja el hecho de que las hojas se encuentran prácticamente muertas a partir de octubre.

#### 4.3.5.4 *Buxus sempervirens*

Las hojas del boj responden al estrés invernal, en condiciones de alta radiación solar, sintetizando nuevos carotenoides, que hacen que la coloración de las hojas sea rojiza y que desaparezcan la mayoría de las xantofilas y clorofilas que habitualmente se encuentran en las hojas verdes (Ida et al., 1995). Desde final de otoño o principios del invierno es frecuente encontrar bujados en solana que presentan un aspecto mucho más “seco” que los que cubren las laderas de umbría. Sin embargo, dicho aspecto deshidratado, es sólo un efecto óptico causado por la coloración rojiza de las hojas. Esto hace suponer que la síntesis de estos carotenoides no sólo es una respuesta al frío invernal, sino que también está influida por la luz que incide sobre la planta. Aunque, en

principio, todo apunta a que estos pigmentos son una medida de protección que usa la planta, las observaciones visuales que se han hecho a lo largo de este estudio pusieron de manifiesto que las hojas que cambiaban de color no volvían a reverdecer en primavera, sino que permanecían con aspecto rojizo hasta que caían. Es decir, si este fuese un mecanismo de protección frente al exceso de radiación, al cesar el estrés, el proceso debería ser reversible, desapareciendo el tinte rojo de las hojas. Sin embargo, en la zona de estudio no se ha producido esta circunstancia. Actualmente se está realizando el seguimiento de una serie de ejemplares de esta especie para estudiar las causas de este cambio de pigmentación y hasta qué punto es irreversible.

En la Figura 4.40 se observa cómo una hoja, que en su parte izquierda ha estado tapada por otra, permanece verde en esa región y casi roja en la parte que no ha estado protegida del sol. Las hojas no estaban pegadas, por lo que la temperatura era igual en toda la superficie de la hoja. Lo único que sí que diferenció ambas partes fue que una recibía una intensidad luminosa más elevada que la otra. En lugar de ser un proceso reversible, las observaciones posteriores de este hecho sugieren que las hojas envejecen de forma irreversible. Un hecho similar ha sido descrito en una variedad de trigo (*Triticum aestivum* cv. Lumai 5), sugiriendo que las hojas viejas, que no se han aclimatado al estrés hídrico que sufre la planta en invierno, no son capaces de sintetizar la suficiente cantidad de zeaxantina para proteger el aparato fotosintético, mientras que las hojas nuevas sintetizan más zeaxantina y son capaces de soportar mejor las condiciones de alta intensidad de luz en los momentos de sequía (Xu et al., 1999).



Figura 4.40: Detalle de una hoja de boj en noviembre de 1997 que había estado tapada por otra superior.

Como en el resto de las especies estudiadas, se analizó el contenido de prolina en las hojas durante el periodo de muestreo (Figura 4.41). En la gráfica se aprecian valores altos en invierno (noviembre-diciembre 97 y enero 99), así como en las hojas tiernas de 1998.

En el caso del boj, no se tienen valores comparativos de potencial hídrico, pero todo parece indicar que, salvo en los casos excepcionales, que se han comentado individualmente se produjo una mayor respuesta que en las otras especies, ya que los valores alcanzados ( $20-100 \mu\text{g prolina g}^{-1}$  peso fresco) fueron claramente superiores a los de las tres especies de *Quercus* ( $\approx 20 \mu\text{g prolina g}^{-1}$  peso fresco).

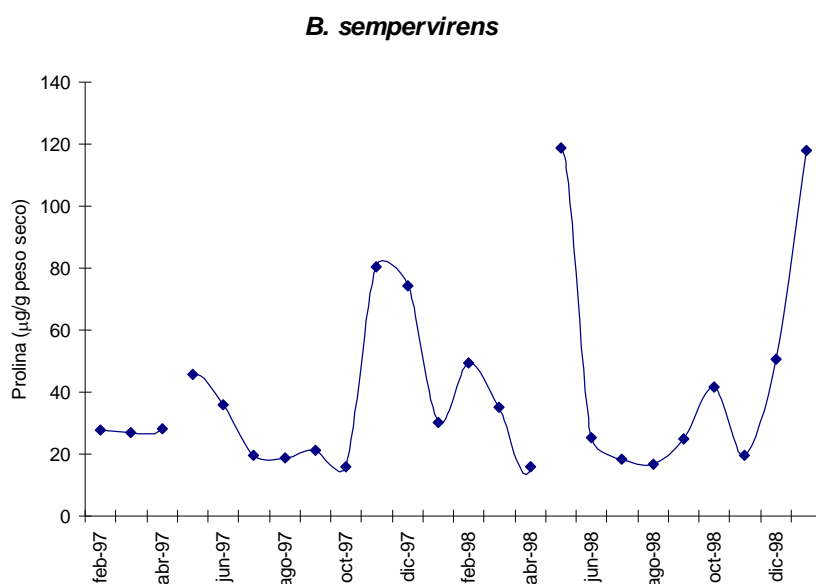


Figura 4.41: Variación de la concentración de prolina en las hojas de *Buxus sempervirens* durante el periodo de muestreo.

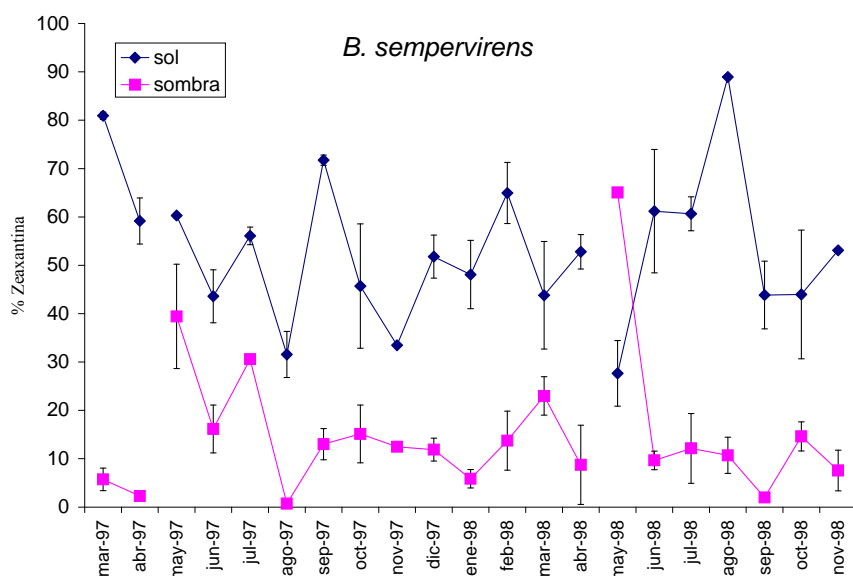


Figura 4.42: Variación del porcentaje de zeaxantina en hojas de *Buxus sempervirens* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

En la Figura 4.42 y en la Figura 4.43 se representan las variaciones de los pigmentos del ciclo VAZ y de la relación del total de xantofilas respecto a la cantidad total de clorofilas. El pico que aparece en la Figura 4.42, que corresponde a una elevada cantidad de zeaxantina en las hojas de sombra durante los meses de verano, hay que explicarlo si tenemos en cuenta los ejemplares que se han muestreado. Si bien todos se encuentran en una zona de sombra, y las hojas en la parte más sombría del arbusto, durante esos meses recibían una mayor intensidad de luz que en los de invierno, y no estaban completamente sombreados.

En el caso de las hojas de sombra, los valores excepcionalmente altos que se observan en el primer mes de vida de las hojas podrían deberse a que, en ese momento, las estructuras fotosintéticas no se encuentran totalmente desarrolladas. En los meses de verano, debido a la aparición de otros carotenoides que no se encuentran habitualmente en otras plantas superiores (Ida, et .a, 1995), la cantidad de pigmentos degradados que aparecen en los cromatogramas es mucho mayor, por lo que las relaciones entre el resto de los pigmentos también puede modificarse.

*B. sempervirens*

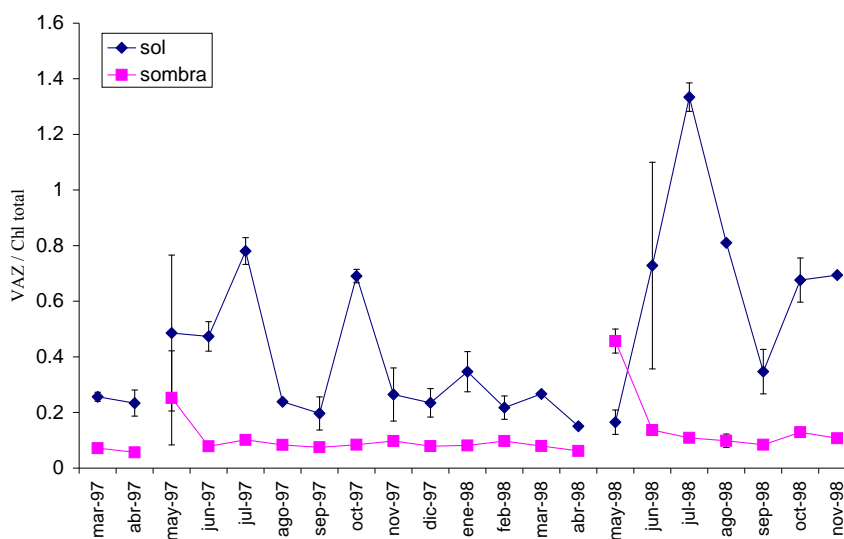


Figura 4.43: Variación de la relación entre la cantidad total de pigmentos del ciclo VAZ y la cantidad de clorofilas producidas por la hojas de *Buxus sempervirens* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

En las hojas de sombra no se produjo ningún tipo de variación en la relación VAZ/Chl total. El único valor que no se ajusta a esto es el correspondiente a las hojas recién nacidas, sobre todo en el año 1998, posiblemente porque las del año 1997 ya habían empezado a formarse en el momento de la toma de muestras. Este dato se puede comprobar con la determinación de la clorofila total que tiene las hojas en ese momento y que se representa en la Figura 4.44. Además de ser constante, la relación VAZ/Chl total es baja en todo momento si comparamos con las hojas de sol, pero relativamente elevada si se compara con las tres especies del género *Quercus* que se han descrito en los apartados anteriores.

Las hojas de sombra no presentan una coloración rojiza. Los valores de zeaxantina también son bajos, pues, salvo en las dos ocasiones en que las hojas eran muy jóvenes, en ningún caso superó el 30 %. La interpretación de estos datos será objeto de futuros trabajos.

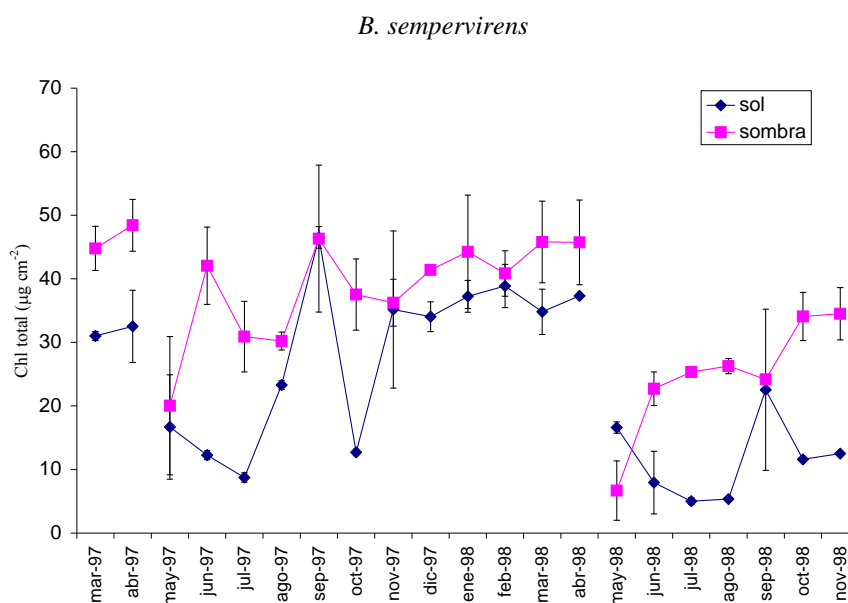


Figura 4.44: Variación de cantidad total de clorofilas producidas por las hojas de *Buxus sempervirens* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

4.3.5.5 *Arbutus unedo*

Las hojas de *Arbutus unedo* (madroño), alcanzan los máximos valores de concentración de prolina durante los periodos de frío que, presumiblemente, es cuando está más afectado por el estrés hídrico. En este caso no tenemos ninguna referencia de la relación que existe entre la concentración foliar de prolina y los niveles de potencial hídrico, pero si comparamos con las especies de las que si que tenemos referencias. Como se aprecia en la Figura 4.45, los valores más elevados corresponden a los dos inviernos más fríos registrados durante el periodo de estudio. Además, esta especie, desarrolla una buena parte de sus fenofases durante el invierno y mantiene los frutos en el árbol desde que se originan en otoño, hasta el otoño del año siguiente, por lo que no detiene su actividad durante el invierno(Figura 4.24). En cualquier caso, los niveles que se alcanzan no son muy elevados si comparamos con el resto de las especies. Esta planta vive en zonas abrigadas, por lo tanto, se supone que está afectada por el frío (Montserrat-Recoder, 1975).

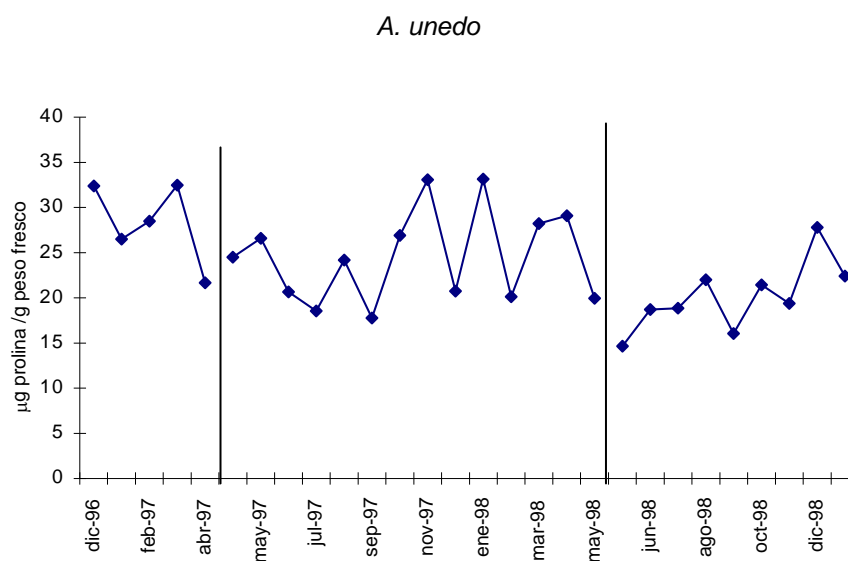


Figura 4.45: Variación de la concentración de prolina en las hojas de *Arbutus unedo* a lo largo del periodo de muestreo.

En cuanto a la composición de los pigmentos de esta especie, parece que, en los meses de verano, el ciclo VAZ proporciona una mayor protección a la planta, esto puede concluirse tanto por el aumento de la cantidad total de estos pigmentos, como considerando el porcentaje de zeaxantina respecto al total del ciclo.

*A. unedo*

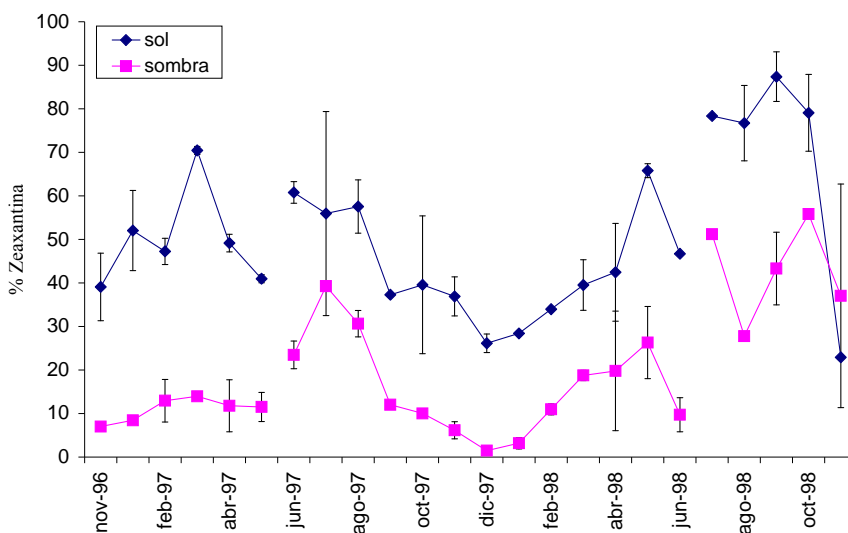


Figura 4.46: Variación del porcentaje de zeaxantina en hojas de *A. unedo* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

Sin embargo, en los momentos más fríos no parece que muestre ningún tipo de mecanismo de adaptación a través de los pigmentos fotosintéticos. El porcentaje de zeaxantina disminuye en el invierno (Figura 4.46), aunque la suma de pigmentos del ciclo VAZ es ligeramente superior durante este periodo (Figura 4.47). En los dos años se observó que este valor también es más elevado durante el periodo de formación de las hojas, que en el caso de esta especie no es muy largo. Si observamos la evolución de la concentración total de clorofila (Figura 4.48), vemos que el valor se estabiliza al cabo de cuatro meses desde que han aparecido las hojas nuevas.



*A. unedo*

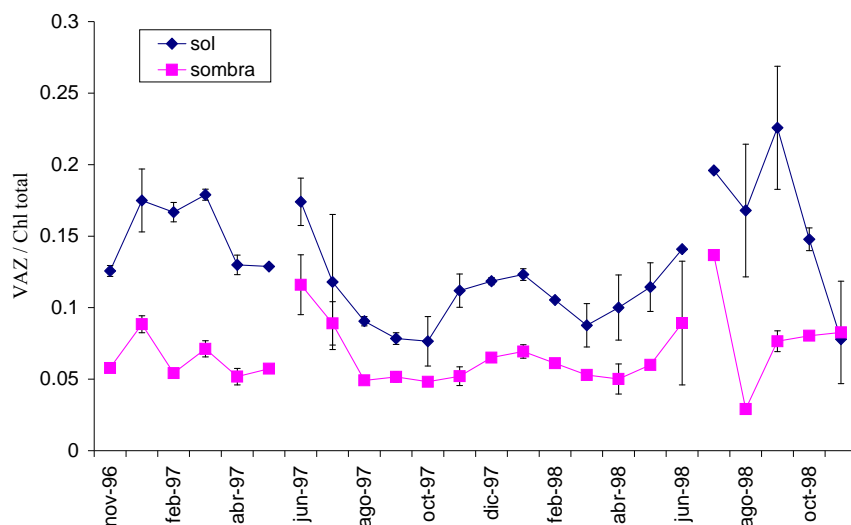


Figura 4.47: Variación de la relación entre la cantidad total de pigmentos del ciclo VAZ y la cantidad de clorofilas producidas por las hojas de sol de *Arbutus unedo* (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

*A. unedo*

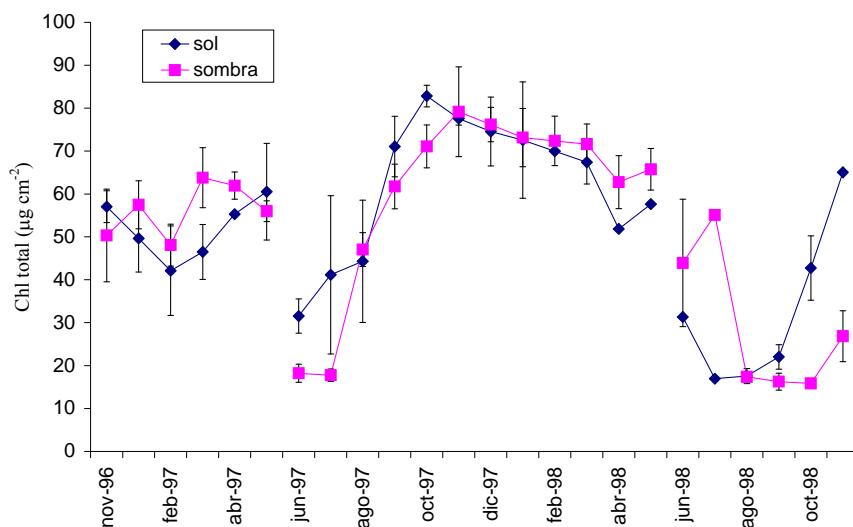


Figura 4.48: Variación de cantidad total de clorofilas producidas por las hojas de *Buxus sempervirens* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

4.3.5.6 *Pistacia lentiscus*

A partir de otros experimentos realizados en esta especie, sabemos que la concentración en prolina empieza a ser considerable a potenciales hídricos mucho más bajos que en el caso de la encina (*A. Vilagrosa*, comunicación personal). En la Figura 4.49 se muestran los resultados obtenidos al realizar un ciclo de sequía con macetas de *Pistacia lentiscus*. Aunque a potenciales hídricos superiores a  $-80$  MPa puede considerarse a la planta muerta, se ve una clara tendencia a aumentar el contenido de prolina cuando las condiciones de sequía aumentan.

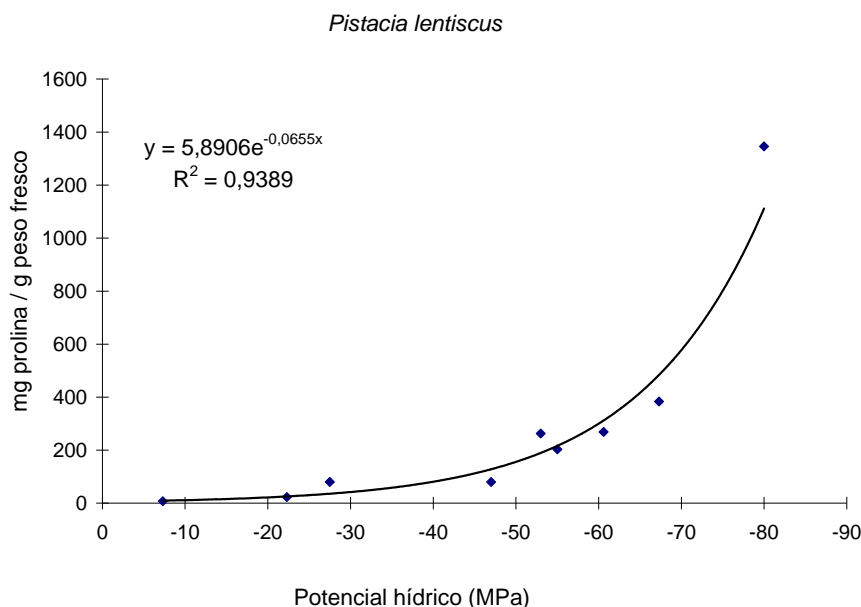


Figura 4.49: Relación entre el contenido en prolina y el potencial hídrico en hojas de *Pistacia lentiscus*. (*A. Vilagrosa*, comunicación personal).

Los valores de prolina obtenidos en el muestreo de campo (Figura 4.50), indican que no hay un aumento asociado con los periodos más secos, que corresponden a la época estival, sino que los aumentos más acusados durante todo el tiempo de estudio se pueden asociar a los periodos más fríos. En diciembre de 1996 se alcanzaron los valores absolutos mínimos de temperatura. La distribución altitudinal de la especie en el Pirineo (*Villar et al.*, 1997), la distribución más general de la especie (*Montserrat-Martí y*

Montserrat-Martí, 1988), así como con los resultados de los análisis de Castro-Díez et al., (1998b) que restringen la presencia de esta especie a las zonas de inviernos más suaves, coinciden con este dato, ya que indicarían que la planta en condiciones de frío tiene más dificultades para vivir.

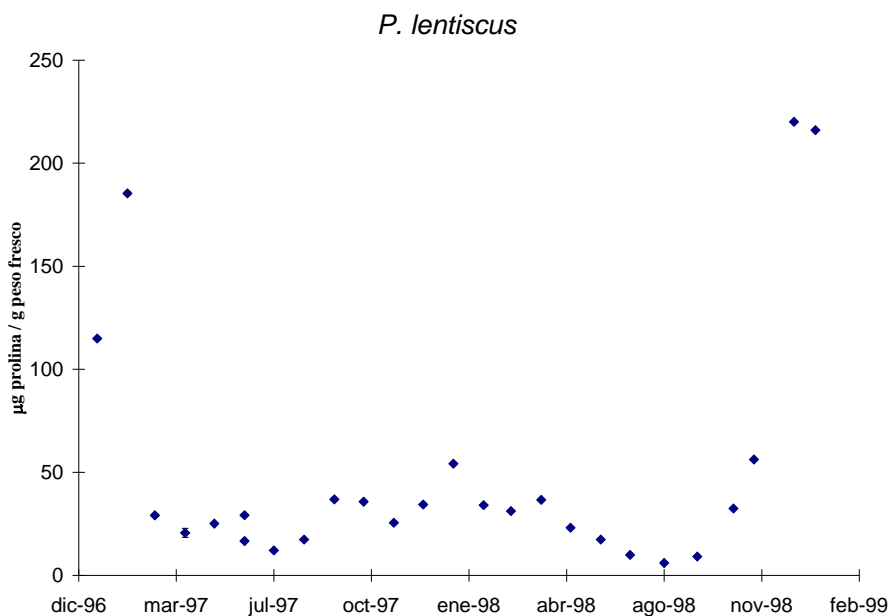


Figura 4.50: Variación de la concentración de prolina en las hojas de *Pistacia lentiscus* durante el periodo de muestreo.

En cuanto al análisis de pigmentos por HPLC, en la Figura 4.51 se muestra la respuesta del ciclo VAZ tanto a las variaciones estacionales como a la posición de las hojas a pleno sol o a la sombra. Por un lado, como se ha dicho al principio y ha sido demostrado por numerosos autores (Pfündel y Bilger, 1994; Demmig-Adams y Adams, 1996a), hay una variación en la concentración total de pigmentos del ciclo VAZ que refleja la adaptación al ambiente en que se han desarrollado las hojas. Esta diferencia es mínima en el momento en que nacen las hojas, pero varía rápidamente en el primer mes de vida. También se puede apreciar como hay variación de estos pigmentos en los diferentes meses del año.

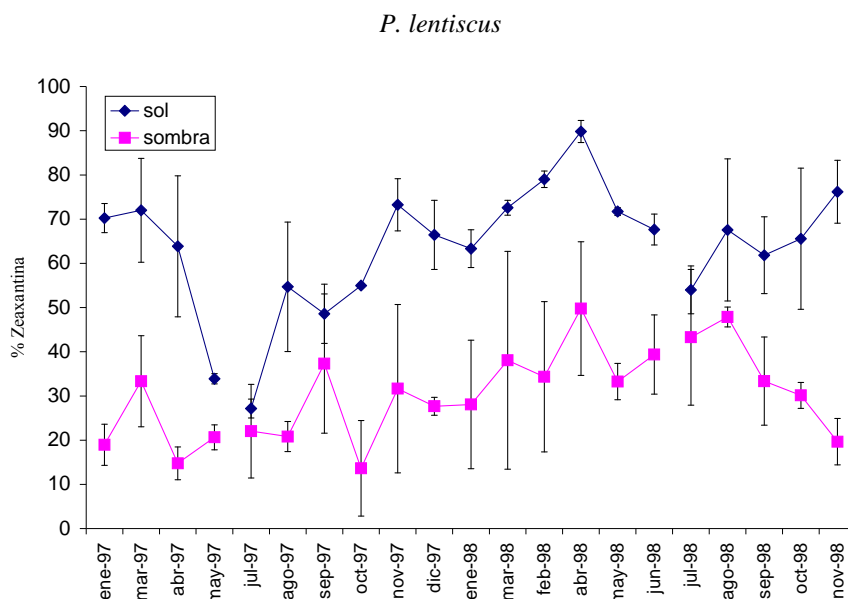


Figura 4.51: Variación del porcentaje de zeaxantina en hojas de sol de *Pistacia lentiscus* (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

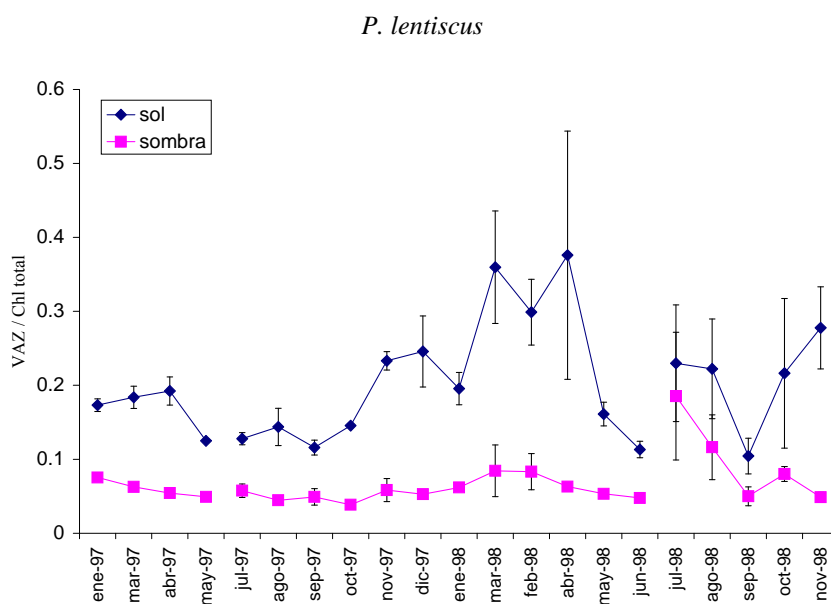


Figura 4.52: Variación de la relación entre la cantidad total de pigmentos del ciclo VAZ y la cantidad de clorofilas producidas por las hojas de sol de *Pistacia lentiscus* (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

También se puede cuantificar el efecto protector de este ciclo comparando la cantidad de xantofilas por unidad de clorofila. La Figura 4.52 muestra cómo las hojas de sombra presentan una menor concentración de pigmentos del ciclo VAZ por unidad de clorofila total. Esto es debido a que la intensidad de luz que reciben es muy pequeña y no necesitan disipar el exceso de energía. Sin embargo, en las hojas de sol la concentración es mucho mayor, aumentando de forma considerable durante los periodos en los que la actividad fenológica es mayor, es decir, durante la primavera y, de forma menos importante, durante el otoño (Figura 4.24).

*P. lentiscus*

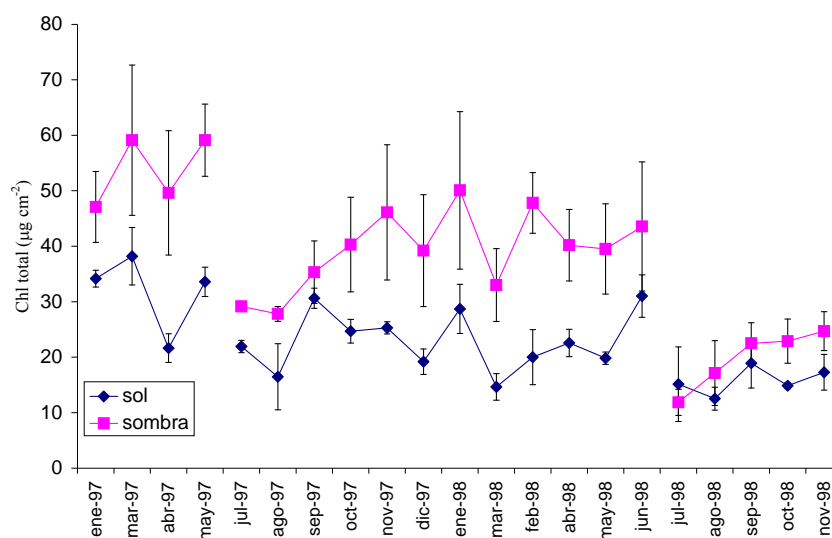


Figura 4.53: Variación de cantidad total de clorofilas producidas por las hojas de sol de *Pistacia lentiscus* (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

#### 4.3.5.7 *Pistacia terebinthus*

Los valores de la concentración foliar de prolina no fueron muy elevados y tampoco experimentaron variaciones marcadas a lo largo del año (Figura 4.54). Por otra parte, al no haber podido realizar el correspondiente ciclo de sequía, no existen datos de referencia de potencial hídrico.

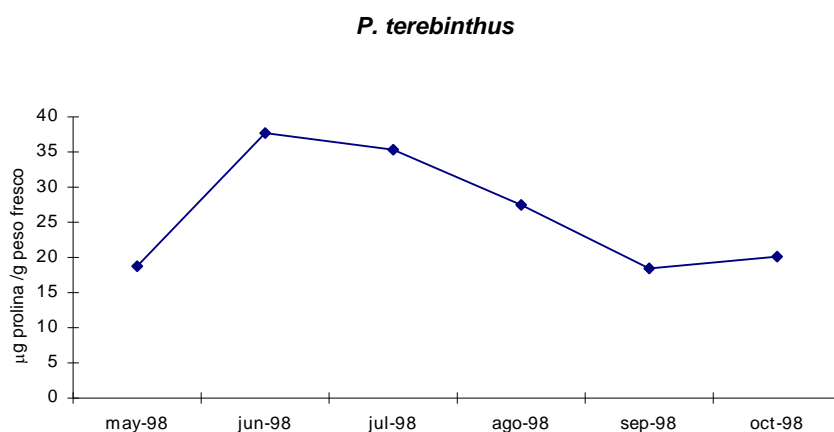
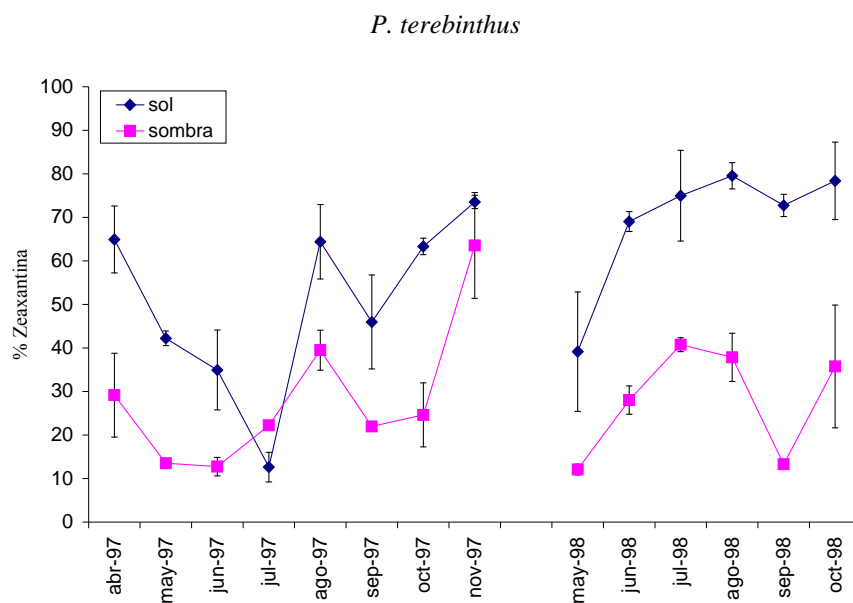


Figura 4.54: Variación de la concentración de prolina en las hojas de *Pistacia terebinthus* durante el segundo año del periodo de muestreo.

Como se aprecia en la Figura 4.54, los valores de concentración foliar de prolina más elevados se encontraron en los meses más calurosos, pero en todos los casos son menores que los encontrados para el lentisco.

Estos resultados son similares a los encontrados para lentisco, cuyos niveles de prolina tampoco responden de manera clara al estrés hídrico estival; probablemente, ambas especies compensan el aumento de aridez con una mayor capacidad de absorber el agua del suelo gracias a sus profundas raíces (Castro-Díez et al., 1998b).

En cuanto a los pigmentos fotosintéticos, parece que en los veranos y otoños de los dos años de muestreo, aumentó la protección proporcionada por los pigmentos del ciclo de las xantofilas. Esto se confirma al observar el aumento relativo de la zeaxantina



(Figura 4.55) y de la cantidad total de pigmentos del ciclo VAZ con relación al total de clorofilas (Figura 4.56).

Figura 4.55: Variación del porcentaje de zeaxantina en hojas de sol de *P. terebinthus* (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

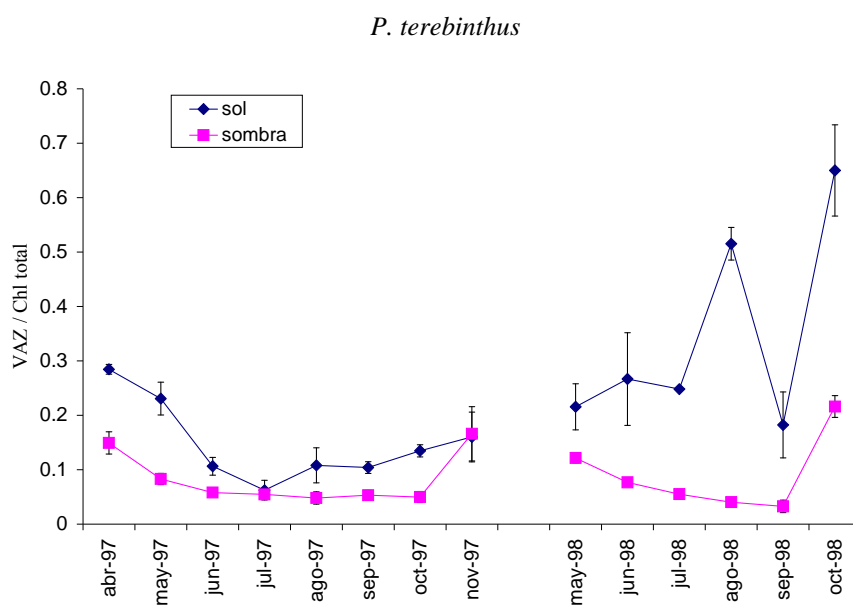


Figura 4.56: Variación de la relación entre la cantidad total de pigmentos del ciclo VAZ y la cantidad de clorofilas producidas por las hojas de sol de *P. terebinthus* (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.



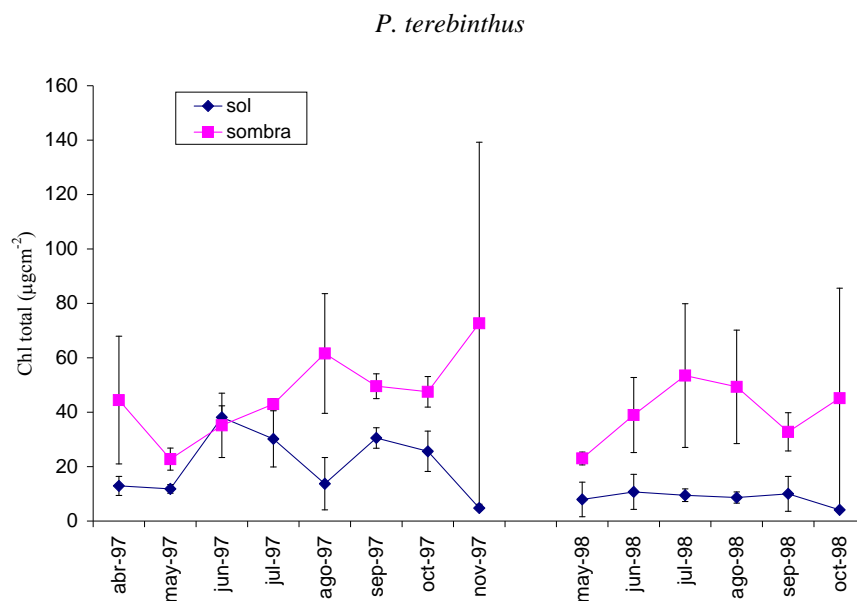


Figura 4.57: Variación de cantidad total de clorofilas producidas por las hojas de sol de *P. terebinthus* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones.

En la Figura 4.57 se observa cómo la cantidad de clorofila total permanece prácticamente constante durante todo el tiempo en que la planta conserva sus hojas. Esto está en consonancia con su naturaleza caducifolia, ya que forma las hojas en un periodo de tiempo muy breve. Los valores mínimos se encuentran durante el proceso de formación de las hojas y durante el periodo de senescencia.

#### 4.3.6 Interpretación conjunta de los resultados de todas las especies

Para concluir este capítulo, se realizará un análisis conjunto de los datos obtenidos. El grado de protección que los pigmentos del ciclo VAZ realizan sobre las clorofilas se trató de “cuantificar” calculando la correlación entre la cantidad total de clorofilas y la de pigmentos del ciclo de las xantofilas, ambas expresadas en ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ). Se parte de la distinción entre las hojas de sol y de sombra, ya que, desde un primer momento se encontraron diferencias importantes entre ellas. Ante estas dos condiciones de iluminación, la planta activa mecanismos de respuesta de forma que le permitan optimizar el rendimiento fotosintético. Las hojas de plantas desarrolladas en condiciones de gran luminosidad, normalmente son más gruesas, pequeñas y de mayor volumen que las hojas de plantas que crecen con bajas intensidades de luz. Aparte de estas diferencias morfológicas existen otras a escala fisiológica, destacando, en general, que las plantas de sol tienen mayor contenido de clorofila por unidad de área, menor resistencia a la difusión del  $\text{CO}_2$ , mayores tasas de fotosíntesis y su nivel de saturación de luz es más elevado. Por el contrario, las hojas de plantas de sombra contienen, en general, por unidad de área, mayor cantidad de: enzimas de carboxilación (RuBP carboxilasa y PEP carboxilasa en plantas  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_4$  respectivamente), transportadores electrónicos, unidades fotosintéticas y de complejos pigmento-proteína captadores de luz (Kramer y Kozlowsky, 1979).

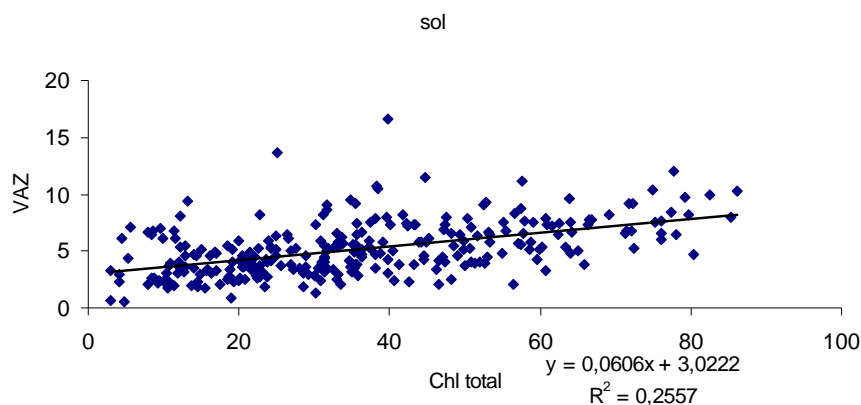


Figura 4.58. Relación entre clorofilas y pigmentos del ciclo VAZ en las hojas de sol de las siete especies.

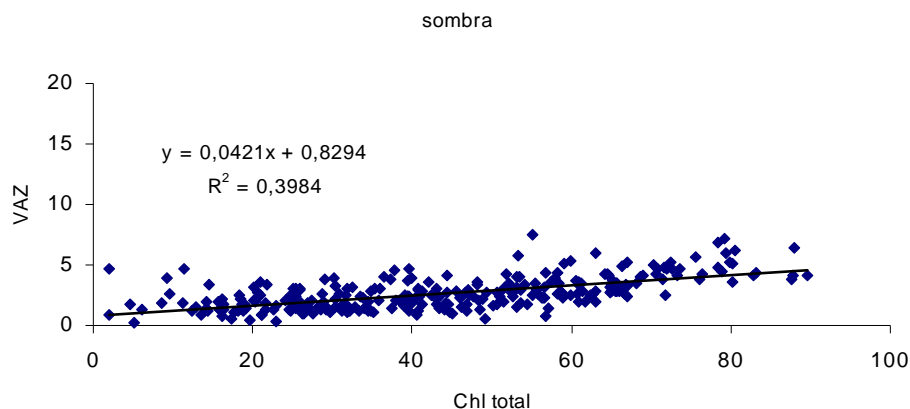


Figura 4.59: Relación entre clorofilas y pigmentos del ciclo VAZ en las hojas de sombra de las siete especies.

En la Figura 4.58 se muestran los resultados obtenidos con las hojas de sol y en la Figura 4.59 con las hojas de sombra. Como puede observarse, para una misma concentración de clorofila, la concentración de xantofilas en las hojas de sol es aproximadamente el doble que en las de sombra.

A la vista de estos datos, se pensó que podría existir relación entre ambos parámetros, pero que sería necesaria una separación por especies para poder establecer a qué se debe la dispersión de puntos que se observa en las dos figuras anteriores.

#### 4.3.6.1 Análisis comparativo de las especies del género *Quercus*

Si se comparan entre sí las tres especies del género *Quercus* que se han estudiado, se aprecia que el quejigo es la planta menos afectada por los cambios estacionales. En principio, el único estrés al que está sometido es el periodo seco del verano. Analizando la evolución de los pigmentos fotosintéticos a lo largo del periodo de vida de las hojas, no se observan variaciones en la cantidad total de xantofilas del ciclo VAZ con respecto a las clorofilas (Figura 4.38). En el caso de las hojas de sombra, parece que, desde el momento en que la cantidad de clorofilas indica que las hojas están totalmente desarrolladas (Figura 4.39), no encontramos variación en la cantidad de pigmentos de las xantofilas. El análisis de la concentración foliar de prolina (Figura 4.36) tampoco reveló que la planta estuviese

sometida a estrés hídrico, hecho que viene apoyado por la falta de cambios en el porcentaje de zeaxantina. Todos estos datos están de acuerdo con los estudios morfológicos realizados en esta misma especie, que parecen indicar que las variaciones climáticas no afectan ni a la anatomía del xilema, ni a las características morfológicas de las hojas, entre otros parámetros (Castro-Díez et al., 1997). Una de las explicaciones más lógicas para estas observaciones es que el quejigo debe poder acceder al agua que se localiza en el subsuelo profundo, gracias a poseer un sistema radicular muy desarrollado, y por lo tanto, no estaría afectado por la sequedad estival.

En cuanto a las otras dos especies, *Quercus rotundifolia* y *Q. coccifera*, presentan hojas durante todo el año y pueden mantener un cierto grado de actividad fisiológica durante el invierno.

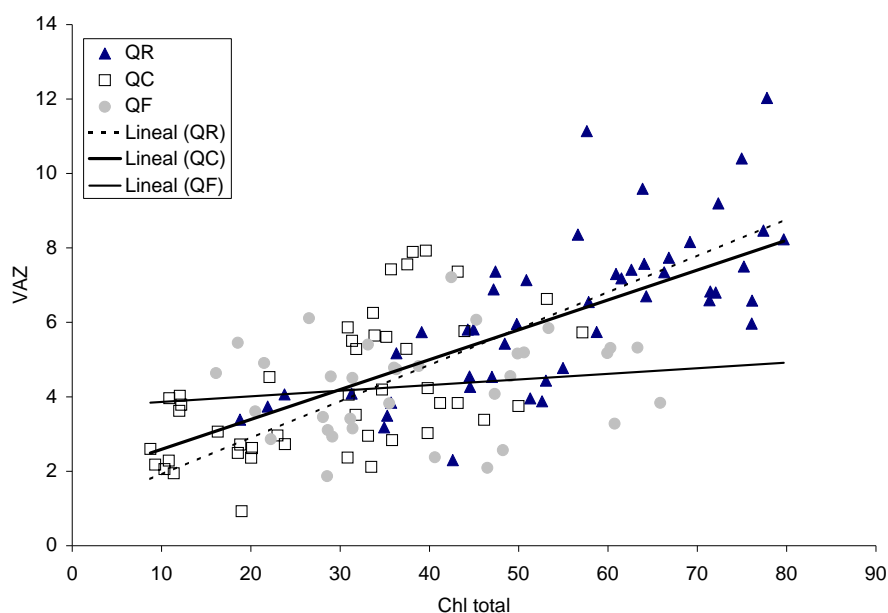


Figura 4.60: Relación entre la cantidad total de clorofilas y la de pigmentos del ciclo VAZ ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) en hojas de sol de las tres especies del género *Quercus*. Los símbolos negros corresponden a *Q. rotundifolia*, los grises a *Q. coccifera* y los blancos a *Q. faginea*

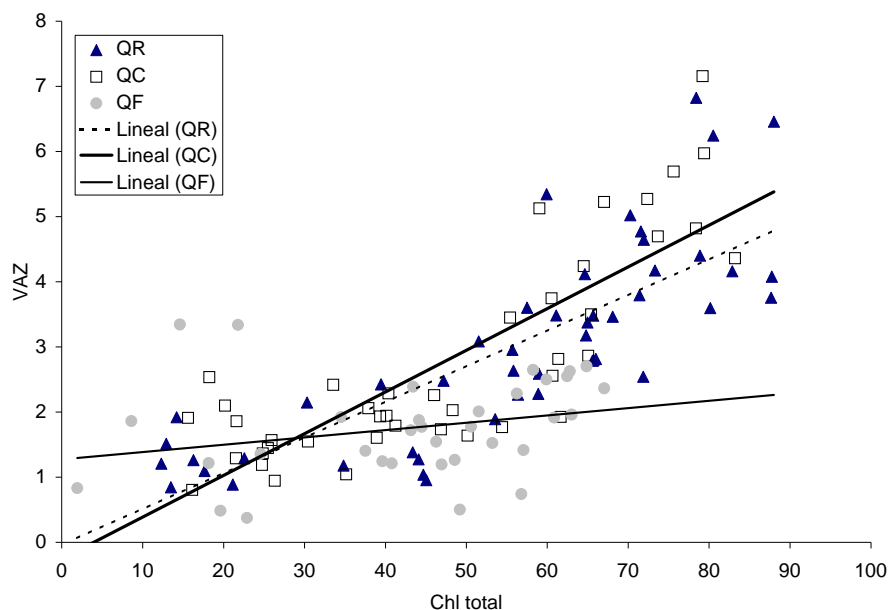


Figura 4.61: Relación entre la cantidad total de clorofilas y la de pigmentos del ciclo VAZ ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) en hojas de sombra de las tres especies del género *Quercus*. Los símbolos negros corresponden a *Q. rotundifolia*, los grises a *Q. coccifera* y los blancos a *Q. faginea*.

En la Figura 4.60 se representan las relaciones entre el total de pigmentos del ciclo de las xantofilas y las clorofilas totales, en las hojas de sol de las tres especies del género *Quercus* estudiadas. Llama la atención que las rectas sean similares para las dos perennifolias, mientras que para la especie caducifolia apenas varía la concentración de xantofilas cuando aumenta la de clorofilas. Este resultado se repite de forma aún más evidente en las hojas de sombra, como se aprecia en la Figura 4.61.

Las hojas del quejigo (*Quercus faginea*) se desarrollan con rapidez entre abril y junio, momento en que se alcanza el valor máximo de clorofila total. Viven hasta final de octubre, cuando disminuye la cantidad de clorofila y comienza la senescencia. Durante este corto periodo de tiempo, su funcionalidad no parece estar influenciada por las circunstancias climáticas, ni por la actividad fenológica. Sin embargo, en las especies perennifolias, las diferencias encontradas se producen a todos los niveles. La morfogénesis de las hojas es mucho más lenta, como se deduce al comparar la evolución de la cantidad total de clorofilas (Figura 4.29 y Figura 4.35). El máximo en la

concentración de clorofila se alcanza cuando las hojas tienen más de siete meses de vida. Por otra parte, estas hojas permanecen en la planta, por lo que tienen que padecer los efectos adversos del clima durante mucho más tiempo. Por lo tanto parece lógico pensar que, si la planta invierte energía en la formación de unas hojas muy resistentes (Poorter, 1994), también desarrolle mecanismos, como el del ciclo VAZ, para proteger la principal función que realizan las hojas, la fotosíntesis. El aumento de la longevidad de las hojas lleva consigo el aumento de situaciones de estrés al que pueden estar sometidas, por eso, las hojas más longevas, suelen tener asociados mecanismos de defensa contra esos potenciales tipos de estrés (Mooney y Gulmon 1982).

#### 4.3.6.2 Análisis del resto de las especies

Al igual que en el apartado anterior, se parte de la diferenciación de hojas de sol y hojas de sombra.

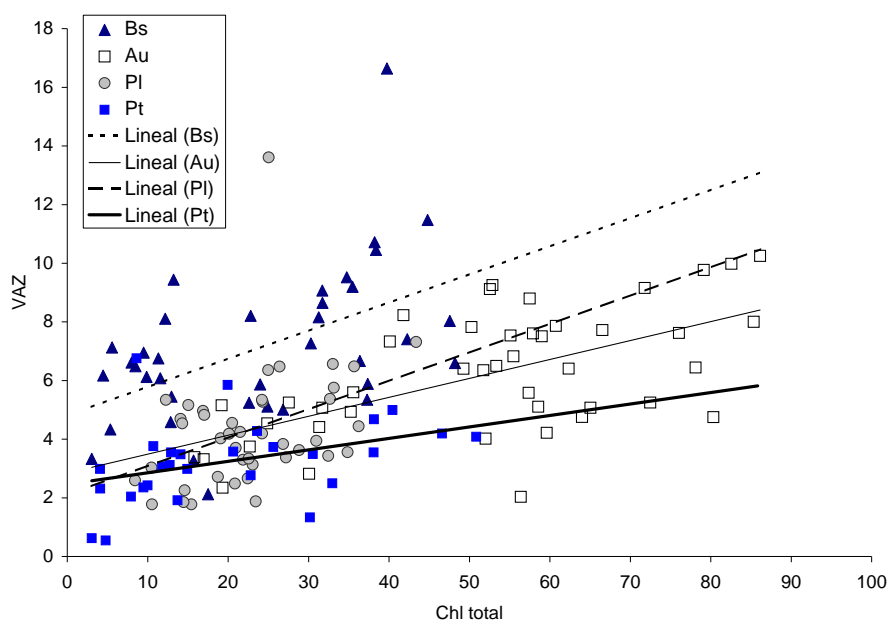


Figura 4.62: Relación entre la cantidad total de clorofilas y de pigmentos del ciclo VAZ ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) en las hojas de sol. Símbolos negros *Buxus sempervirens*, grises *Pistacia lentiscus*, cuadros blancos *Arbutus unedo* y cuadros negros *P. terebinthus*.

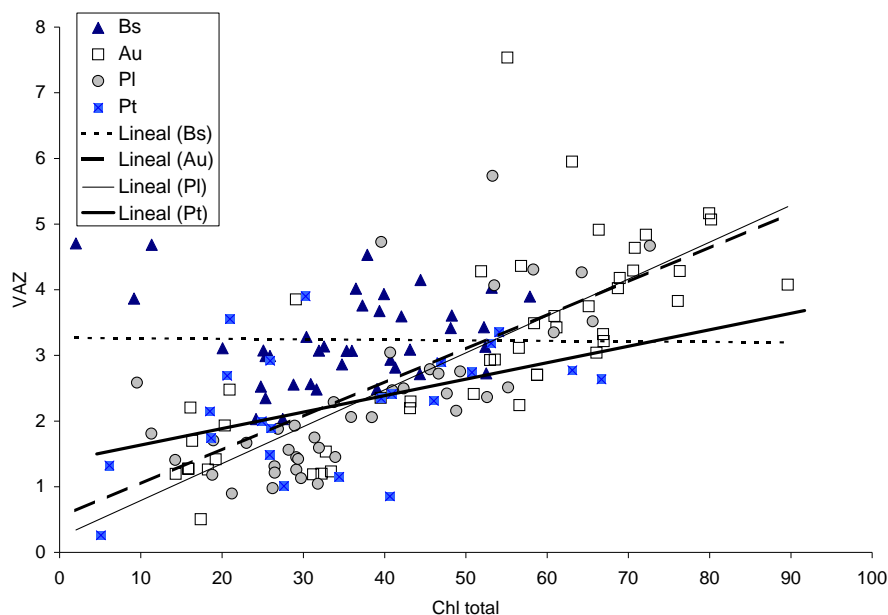


Figura 4.63: Relación entre la cantidad total de clorofilas y de pigmentos del ciclo VAZ ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) en las hojas de sombra. Símbolos negros *Buxus sempervirens*, grises *Pistacia lentiscus*, cuadros blancos *Arbutus unedo* y cuadros negros *P. terebinthus*.

La interpretación de la Figura 4.62 y la Figura 4.63, apoya los resultados que se han mencionado anteriormente, al describir de comportamiento de cada especie. En el caso del boj, se confirma el hecho de que las plantas de sombra no parecen sufrir ni los efectos de los periodos más secos ni la de los más fríos. Sin embargo, las hojas de sol se comportan de manera totalmente diferente. Manifiestan una ligera adaptación en cuanto que sintetizan más pigmentos del ciclo VAZ para proteger a la mayor cantidad de clorofila, pero también se protegen con otro tipo de pigmentos (Ida et al., 1995). En cuanto al resto de especies representadas en la Figura 4.62 y en la Figura 4.63, en condiciones de sol y de sombra respectivamente, se observa una relación directa entre la concentración de clorofila total y la de xantofilas. Sin embargo, la clorofila se distribuye por rangos dependiendo de la especie. Así, *Arbutus unedo* presenta los valores de mediana más elevados ( $55.29 \text{ mg cm}^{-2}$  en hojas de sol y  $56.53 \text{ mg cm}^{-2}$  en hojas de sombra). Este dato se justificaría porque sus hojas son mucho más gruesas que las del resto, y por lo tanto contienen más clorofila por unidad de superficie. *Pistacia terebinthus*, por el contrario, agrupa sus clorofilas en la zona de menor concentración

(14.5 mg cm<sup>-2</sup> en hojas de sol, 28.04 mg cm<sup>-2</sup> en hojas de sombra), lo que se corresponde con el corto periodo de vida de las hojas de esta especie que no permite el engrosamiento de sus estructuras parenquimáticas, hecho que se observa en gran número de caducifolios. Las medianas de las otras dos especies *Pistacia lentiscus* y *Buxus sempervirens*, se localizaron en la zona de 23 µg cm<sup>-2</sup> para las hojas de sol y 35 µg cm<sup>-2</sup> para las de sombra.

Para interpretar mejor las correlaciones calculadas entre clorofilas y xantofilas, se ha elaborado una tabla con los valores correspondientes a las ecuaciones de las rectas, los coeficientes de regresión y de correlación y el nivel de significación (Tabla 4.19).

Tabla 4.19: Relaciones lineales entre la concentración foliar de clorofilas totales y la de pigmentos del ciclo VAZ (µg cm<sup>-2</sup>). En la tabla se muestran los parámetros de las rectas y su nivel de significación.

Hojas de sol					Hojas de sombra					
R	R <sup>2</sup>	Cte.	Pte.	Sig.		R	R <sup>2</sup>	Cte.	Pte.	Sig.
0.728	0.531	0.935	0.0980	***	<b>QR</b>	0.798	0.636	-0.040	0.0549	***
0.573	0.328	1.785	0.0803	***	<b>QC</b>	0.821	0.674	-0.254	0.0640	***
0.164	0.027	3.712	0.0151	n.s.	<b>QF</b>	0.261	0.068	1.273	0.0112	n.s.
0.502	0.252	4.813	0.0962	**	<b>BS</b>	0.014	0.000	3.268	0.0008	n.s.
0.599	0.359	2.849	0.0645	***	<b>AU</b>	0.754	0.568	0.533	0.0515	***
0.380	0.145	2.107	0.0972	*	<b>PL</b>	0.739	0.547	0.230	0.0562	***
0.384	0.148	2.464	0.0391	*	<b>PT</b>	0.456	0.208	1.336	0.0245	*

El nivel de significación que se muestra en la Tabla 4.19, indica que, en casi todas las especies, excepto en los dos caducifolios y en las hojas de sombra de boj, hay una relación directa entre la cantidad de clorofilas y la de xantofilas que se sintetizan.

La pendiente de estas rectas podría asimilarse, desde un punto de vista funcional, a la respuesta de la planta para proteger el aparato fotosintético, es decir, valores altos de pendiente indicarían la necesidad de sintetizar mayor cantidad de pigmentos protectores



de las clorofilas. En muchas plantas, los cambios en la composición del aparato fotosintético (aclimatación), constituyen la parte más importante de las respuestas a las condiciones ambientales. En particular, se sabe que el desarrollo en condiciones alta intensidad luminosa, que es limitante para la fotosíntesis, tiene como resultado un aumento en la cantidad de complejos pigmento-proteína responsables de la captura de la luz, concretamente, de los componentes de la antena del PSII (Walters y Horton, 1999). El papel de la antena del PSII no sólo consiste en captar la luz, sino que es la responsable de regular el flujo de energía dentro del aparato fotosintético, alternando entre transferencia eficiente de energía y procesos de disipación de la misma (Horton et al., 1996). La zeaxantina se localiza, junto con las clorofilas, en la antena, por lo tanto, el resultado obtenido indica que las plantas con mayores valores de pendientes tienen mecanismos de adaptación más desarrollados.

La constante, que es el valor que toma la recta en el origen de ordenadas, correspondería a la cantidad mínima de pigmentos de protección que sintetizaría la hoja aunque la cantidad de clorofila fuese mínima. Un valor alto de dicha constante indicaría que la planta tiene capacidad de sintetizar gran cantidad de pigmentos de protección independientemente de las condiciones climáticas que vaya a sufrir durante el resto de su vida.

Las dos especies perennifolias del género *Quercus*, así como *Arbutus unedo* presentaron un comportamiento similar. Las hojas de sol de la carrasca mostraron la mayor respuesta que se corresponde con el máximo valor de pendiente encontrado en todas las especies estudiadas. El mecanismo de adaptación desarrollado por *Quercus rotundifolia* a las condiciones ambientales parece ser el más eficaz. La pendiente de la recta VAZ vs Chl es la más elevada, pero a la vez los valores de ordenada en el origen son los más bajos. Esto significaría que son capaces de desarrollar mecanismo de protección, pero sólo cuando la planta lo requiere. Por el contrario, *Pistacia terebinthus* y *Quercus faginea* presentaron valores de pendiente bajos concomitantes con elevados valores de ordenada en el origen, dispondrían de menor capacidad de adaptación, ya que inicialmente sintetizarían una gran cantidad de pigmentos de protección, aunque su presencia no fuese necesaria.

#### 4.3.7 Relaciones entre los parámetros climáticos y los pigmentos fotosintéticos

A pesar de que para cada especie se han descrito las variaciones estacionales del % Z y de la relación VAZ/Chl, se consideró hacer una estimación cuantitativa de su interacción con los parámetros climáticos. Para ello, se calcularon los correspondientes coeficientes de correlación lineal entre los dos parámetros mencionados y los utilizados para cuantificar el clima (precipitación total –P, medias mensuales de: temperatura máxima –T<sub>máx</sub> y mínima-T<sub>mín</sub>).

Se siguió utilizando la separación entre hojas de sol y de sombra porque, como se ha visto a lo largo de todo el trabajo, las diferencias de su comportamiento son muy notables.

En la Tabla 4.20 se muestran los resultados para las hojas de sol, y en la Tabla 4.21 para las de sombra.

Tabla 4.20: Coeficientes de correlación lineal entre los parámetros climáticos y % Z y VAZ/Chl de las hojas de sol de las siete especies estudiadas.

	QR	QC	QF	BS	AU	PL	PT
%Z							
P	-0.264	-0.345	0.204	-0.411*	-0.102	-0.433*	-0.338
T MÁX	0.321	0.290	-0.359	0.259	<b>0.600**</b>	-0.355	-0.046
T MÍN	0.293	0.154	-0.365	0.049	<b>0.525**</b>	-0.374*	-0.167
VAZ/Chl							
P	-0.395*	-0.041	0.349	-0.336	-0.024	-0.095	-0.353
T MÁX	-0.133	0.068	<b>-0.787**</b>	<b>0.510**</b>	0.209	-0.381*	-0.055
T MÍN	-0.284	-0.021	<b>-0.819**</b>	<b>0.480*</b>	0.157	-0.341	-0.262

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $0.05 < P < 0.005$

Tabla 4.21: Coeficientes de correlación lineal entre los parámetros climáticos y % Z y VAZ/Chl de las hojas de sombra de las siete especies estudiadas.

%Z	QR	QC	QF	BS	AU	PL	PT
P	-0.135	-0.022	0.396	0.286	-0.245	-0.260	-0.020
T MÁX	0.296	0.319	-0.402	0.066	<b>0.510**</b>	-0.133	-0.176
T MÍN	0.263	0.278	-0.393	0.069	<b>0.509**</b>	-0.170	-0.210
VAZ/Chl							
P	-0.027	0.418*	0.516*	0.284	-0.172	0.095	0.277
T MÁX	0.160	-0.132	<b>-0.656**</b>	0.093	0.177	-0.066	<b>-0.647**</b>
T MÍN	0.120	-0.134	<b>-0.651**</b>	0.111	0.210	-0.050	<b>-0.537*</b>

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $0.05 < P < 0.005$

A la vista de estas dos tablas, se puede decir que los pigmentos fotosintéticos considerados, así como las relaciones entre ellos, no mostraron ningún tipo de respuesta a la precipitación media mensual de los meses de estudio, tanto en hojas de sol como en las de sombra. Posiblemente, estas plantas no han sufrido un estrés hídrico muy importante durante el periodo estudiado, como también se ha comprobado a través de los valores de concentración foliar de prolina. Las épocas de sequía que padecieron en el verano, no fueron lo suficientemente importantes como para provocar un verdadero estrés hídrico.

En segundo lugar, la correlación positiva encontrada en *A. unedo*, entre el % Z y los valores de temperatura (máxima y mínima) tanto para hojas de sol como de sombra indica que esta es la única especie que responde a la variación de temperatura, sintetizando más zeaxantina conforme aumenta la temperatura (los valores máximos se encuentran en la época estival). El aumento de temperatura provoca un estrés en esta especie, que la planta contrarresta sintetizando más zeaxantina.

Las únicas correlaciones significativas del parámetro VAZ/Chl se encontraron para *Quercus faginea* y *Pistacia terebinthus*. El hecho de que sean muy significativas y de

signo negativo parece contradecir la explicación que se ha dado anteriormente indicando que, precisamente en estos dos caducifolios, no hay ajuste entre los pigmentos fotosintéticos y el clima. Sin embargo, considerando que estas dos especies tienen hojas durante un tiempo muy breve y, que en esta época la concentración de clorofila total (Figura 4.39 y Figura 4.57) sigue un patrón de variación similar al de la temperatura (Figura 3.2), es decir, mayores temperaturas corresponden con los valores más bajos de la relación VAZ/Chl, podemos decir que la interacción encontrada en ambas especies, es debida exclusivamente a los cambios de clorofila total, y no a variaciones de los pigmentos del ciclo VAZ.

En el caso de las hojas de sol de *Buxus sempervirens* si que se encontró relación, en este caso positiva, aunque con menor grado de significación. Como ya se ha mencionado con anterioridad este hecho parece estar relacionado con los problemas que tiene esta especie para vivir en laderas expuestas al sol. En estas hojas las clorofilas se degradan aumentando proporcionalmente la concentración de carotenoides y, a la vez, sintetizando nuevos pigmentos de protección (Ida et al., 1995).



## **5 CONCLUSIONES**



1. Los pH's óptimos de las enzimas responsables de la interconversión de V en Z (violaxantina desepoxidasa y zeaxantina epoxidasa), en maíz y remolacha, coinciden con los descritos para otras especies. La deficiencia de hierro no induce cambios en estos valores, a pesar de las modificaciones que se producen en el aparato fotosintético.
2. El tamaño de la antena fotosintética afecta a la cantidad de energía que se disipa a través del gradiente de pH. Sin embargo, la actividad del ciclo de las xantofilas, durante el período de relajación en la oscuridad, en hojas de cebada control y deficientes en antena, es igual para ambas, y más rápida que la encontrado en otras especies. Ambas observaciones sugieren que la actividad del ciclo VAZ está ligada a la antena más próxima al centro de reacción.
3. En condiciones de deficiencia de hierro severa ( $\text{Chl total} < 15 \mu\text{mol cm}^{-2}$ ), las hojas de melocotonero experimentan cambios en la composición de su aparato fotosintético, particularmente en las proteínas y pigmentos de la antena externa.
4. En las mismas condiciones de iluminación, las hojas de soja deficiente en hierro contienen mayor porcentaje de Z y A, que las de los controles. Esta diferencia es mucho más acusada en el caso de las hojas jóvenes. Asimismo, la concentración total de pigmentos VAZ respecto a la de clorofila, también es mayor, en este tipo de hojas.



5. La deficiencia de manganeso no produce alteraciones importantes en las relaciones estequiométricas de los pigmentos fotosintéticos, aunque disminuye su cantidad total por unidad de superficie. Los parámetros de fluorescencia indican que esta deficiencia afecta a la funcionalidad del centro de reacción del PSII, aumenta la contribución de la antena ( $F_0$ ) y disminuye la relación  $F_v/F_m$ . Los datos obtenidos en soja cultivada en condiciones controladas se confirmaron en melocotonero en condiciones de campo.
6. La fluorescencia de clorofila y la concentración foliar de pigmentos del ciclo VAZ podría ser una herramienta útil para seleccionar patrones para cerezo en función de las características medioambientales.
7. De las siete especies del encinar estudiadas, la concentración foliar de prolina sólo puede ser utilizada como marcador de estrés en Pl y Bs.
8. En plantas desarrolladas en condiciones silvestres, las hojas expuestas al sol sintetizan mayor cantidad de pigmentos del ciclo VAZ, por unidad de clorofila que las de sombra, siendo estas diferencias mayores incluso, que las encontradas entre distintas especies.
9. Las especies caducifolias (Qf y Pt) no mostraron ningún tipo de interacción entre la cantidad total de pigmentos del ciclo VAZ y la de clorofila. En el caso de las especies perennifolias, este hecho sólo se produce en hojas de Bs desarrolladas en condiciones de sombra.
10. En Pl y en Bs se ha encontrado un posible mecanismo de protección consistente en la aparición de nuevos pigmentos, que podrían actuar como filtro en condiciones de alta intensidad de luz y baja temperatura.
11. La concentración foliar de pigmentos fotosintéticos y, en particular la de los del ciclo VAZ, es una herramienta útil para evaluar el grado de adaptación de estas 7 especies al clima mediterráneo.

## **6 BIBLIOGRAFÍA**



- 
- Abadía, A., Gil, E., Morales, F., Montañés, L., Montserrat-Martí, G., Abadía, J. 1996. Marcescence and senescence in a submediterranean oak (*Quercus subpyrenaica* E.H. del Villar) - Photosynthetic characteristics and nutrient composition. *Plant Cell and Environment* 19: 685-694
- Abadía, A., Poc, A., Abadía, J. 1991. Could iron nutrition status be evaluated through photosynthetic pigment changes? *Journal of Plant Nutrition* 14: 987-999
- Abadía, A., Sanz, M., de las Rivas, J., Abadía, J. 1989. Photosynthetic pigments and mineral composition of iron deficient pear leaves. *Journal of Plant Nutrition* 12: 827-838
- Abadía, J., Morales, F., Abadía, A. 2000. Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-deficient leaves. *Plant and Soil* 215: 183-192
- Abadía, J., Abadía, A. 1993. Iron and plant pigments. En: *Iron chelation in plants and soil microorganisms*, Barton, L.L., Hemming, B.C. (eds.) pp. 327-343. Academic Press. New York
- Abadía, J. 1992. Leaf responses to Fe deficiency: a review. *Journal of Plant Nutrition* 15: 1699-1713
- Abadía, J., Nishio, J.N., Monge, E., Montañés, L., Heras, L. 1985. Mineral composition of peach leaves affected by iron chlorosis. *Journal of Plant Nutrition* 8: 697-707
- Abadía, J., Monge, E., Montañés, L., Heras, L. 1984. Extraction of iron from plant leaves by Fe (II) chelators. *Journal of Plant Nutrition* 7: 777-784
- Adams, W.W. III, Demmig-Adams, B., Logan, B.A., Barker, D.H., Osmond, C.B. 1999. Rapid changes in xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and photosystem II efficiency in two vines, *Stephania japonica* and *Smilax australis*, growing in the understory of an open Eucalyptus forest. *Plant Cell and Environment* 22: 125-136
- Adams, W.W. III, Demmig-Adams, B. 1995. The xanthophyll cycle and sustained thermal energy dissipation activity in *Vinca minor* and *Euonymus kiautschovicus* in winter. *Plant, Cell and Environment* 18: 117-127
- Adams, W.W. III, Demmig-Adams, B., Verhoeven, A.S., Barker, D.H. 1995a. Photoinhibition during winter stress - Involvement of sustained xanthophyll cycle-dependent energy dissipation. *Australian Journal of Plant Physiology* 22 (2): 261-276
- Adams, W.W. III, Hoehn, A., Demmig-Adams, B. 1995b. Chilling temperatures and the xanthophyll cycle. A comparison of warm-grown and overwintering spinach. *Australian Journal of Plant Physiology* 22 (1): 75-85

- Adams, W.W. III, Demmig-Adams, B. 1994. Carotenoid composition and down regulation of photosystem II in three conifer species during the winter. *Physiologia Plantarum* 92: 451-458
- Adamska, I. 1997. ELIPs-light-induced stress proteins. *Physiologia Plantarum* 100: 794-805
- Åkerlund, H.E., Arvidsson, P.O., Bratt, C., Carlsson, M., Mathis, P. 1995. Partial purification of the violaxanthin de-epoxidase [from spinach]. En: *Photosynthesis: from light to biosphere*. pp. 103-106. Vol. IV ed?
- Albrecht, M., Misawa, N., Sandmann, G. 1999. Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of the carotenoids beta-carotene and zeaxanthin. *Biotechnology Letters* 21: 791-795
- Anderson, J.M., Park, Y., Chow, W., Park, Y.I., Chow, W.S. 1998. Unifying model for the photoinactivation of Photosystem II in vivo under steady-state photosynthesis. *Photosynthesis Research* 56: 1-13
- Arnon, D.I. 1992. Conceptual evolution in photosynthesis: the quest for a common denominator. En *Trends in photosynthesis research*. Barber, J., Guerrero, M.G., Medrano, H. (eds.) Intercept Limited. Andover
- Arvidsson, P.O., Bratt, C.E., Carlsson, M., Åkerlund, H.E. 1996. Purification and identification of the violaxanthin deepoxidase as a 43 kDa protein. *Photosynthesis Research* 49: 119-129
- Audran, C., Borel, C., Frey, A., Sotta, B., Meyer, C., Simonneau, T., Marion-Poll, A. 1998. Expression studies of the zeaxanthin epoxidase gene in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiology* 118: 1021-1028
- Baekman, U., Halmo, S. 1999. Manganese deficiency can now be relieved with new manganese-containing solid fertilizers. *Landbonyt Erhvervsjordbruget* 6: 32-33
- Baker, N.R. 1991. A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 81: 563-570
- Baker, G.A., Rundel, P.W., Parsons, D.J. 1982. Comparative phenology and growth in three chaparral shrubs. *Botanic Gazeta* 143: 94-100
- Barber, J. 1995. Molecular basis of the vulnerability of photosystem II to damage by light. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 201-208
- Barber, J., Champan, D.J., Telfer, A. 1987. Characterization of a PS II reaction centre isolated from the chloroplasts of *Pisum sativum*. *FEBS Letters* 220: 67-73.

- 
- Barber, J. 1983a. Membrane conformational changes due to phosphorylation and the control of energy transfer in photosynthesis. *Photobiochemical Photobiophysical* 5: 181-190
- Barber, J. 1983b. Photosynthetic electron transport in relation to thylakoid membrane composition and organization. *Plant, Cell and Environment* 6: 311-322
- Barber, J. 1982. Influence of surface charges on thylakoid structure and function. *Annual Review of Plant Physiology* 33: 261-295
- Barry, P., Young, A.J., Britton, G. 1991. Accumulation of pigments during the greening of etiolated seedlings of *Hordeum vulgare* L. *Journal of Experimental Botany* 42: 229-234
- Bassi, R., Sandona, D., Croce, R. 1997. Novel aspects of chlorophyll a/b-binding proteins. *Physiologia Plantarum* 100: 769-779
- Bassi, R., Pineau, B., Dainese, P., Marquardt, J. 1993. Carotenoid binding proteins of photosystem II. *European Journal of Biochemistry* 212: 297-303
- Bassi, R., Hinz, U., Barbato, R. 1985. The role of the light harvesting complex and photosystem II in thylakoid stacking in the chlorina-f2 barley mutant. *Carlsberg Research Communication* 50: 347-367
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207
- Belkhodja, R. 1998. Evaluación de la tolerancia a estreses ambientales en plantas cultivadas mediante técnicas de fluorescencia de clorofila, análisis de pigmentos y contenido mineral. Tesis Doctoral. Escuela Técnica superior de ingeniería agraria. Lleida
- Belkhodja, R., Morales, F., Sanz, M., Abadía, A., Abadía, J. 1998. Iron deficiency in peach trees: effects on leaf chlorophyll and nutrient concentrations in flowers and leaves. *Plant and Soil* 203: 257-268
- Bergmann, W. 1992. Nutritional disorders of plants. Gustav Fischer Jena Stuttgart New York
- Betrán, J.A., Val, J., Montanés-Millán, L., Monge, E., Montanés, L., Moreno, M.A. 1996. Influence of rootstock on the mineral concentrations of flowers and leaves from sweet cherry. *Acta Horticulturae* 448: 163-167
- Bhaya, D., Castelfranco, P.A. 1986. Synthesis of a putative c-type cytochrome by intact, isolated pea chloroplasts. *Plant Physiology* 81: 960-964

- Bigus, H.J., Voss, P., Krause-Bonte, J., Stransky, H., Gauglitz, G., Hager, A. 1995. Light-dependent assembly of pigment-protein complexes in etiolated leaves of *Phaseolus coccineus* L. monitored by semiautomatic gel electrophoresis, fluorescence spectroscopy and pigment analysis. *Journal of Plant Physiology* 147 (3-4): 408-418
- Bilger, W., Björkman, O. 1994. Relationships among violaxanthin deepoxidation, thylakoid membrane conformation, and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching in leaves of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta* 193: 238-246
- Bilger, W., Björkman, O. 1991. Temperature dependence of violaxanthin de-epoxidation and non-photochemical fluorescence quenching in intact leaves of *Gossypium hirsutum* L. and *Malva parviflora* L. *Planta* 184: 226-234
- Björkman, O., Powles, S.B. 1984. Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. *Planta* 161: 490-504
- Björkman, O. 1981. Responses to different quantum flux densities. En: *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series Vol. 12A. Physiological plant ecology I. Responses to the physical environment*. Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Ziegler, H. (eds.) pp. 57-107
- Bolle-Jones, E.W., Notton, B.A. 1953. The relative proportions of the chloroplast pigments as influenced by different levels of iron and potassium supply. *Plant and Soil* 5: 87-100
- Borchert, R. 1994. Soil and stem water storage determine phenology and distribution of tropical dry forest trees. *Ecology* 75: 1437-1449
- Botrill, D.E., Possingham, J.V., Kriedmann, P.E. 1970. The effect of nutrient deficiencies on photosynthesis and respiration in spinach. *Plant and Soil* 32: 424-438
- Bouvier, F., Keller, Y., d' Harlingue, A., Camara, B. 1998. Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annum* L.). *Biochimica et Biophysica Acta, Lipids and Lipid Metabolism* 3: 320-328
- Bradbury, M., Baker, N.R. 1984. A quantitative determination of photochemical and non-photochemical quenching during the slow phase of the chlorophyll fluorescence induction curve of bean leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* 765: 275-281
- Braun-Blanquet, J., Bolòs, O. 1957. Les groupements végétaux du Bassin Moyen de l'Ebre et leur dynamisme. *Annales de la Estación Experimental de Aula Dei* 5 (1-4): 1-266.
- Braun-Blanquet, J. 1936. La chênaie d'Yeuse méditerranéenne (*Quercion ilicis*). *SIGMA Mem. Soc. Sci. Nat. Nîmes*, Comm. 45

- 
- Briantais, J.M. 1994. Light-harvesting chlorophyll a-b complex requirement for regulation of Photosystem II photochemistry by non-photochemical quenching. *Photosynthesis Research* 40: 287-294
- Brinda, A.S. 1980. Iron chlorosis in horticultural and field crops. *Annual Review of Plant Science* 11: 221-312
- Buch, K., Stransky, H., Bigus, H.J., Hager, A. 1994. Enhancement by artificial electron acceptors of thylakoid lumen acidification and zeaxanthin formation. *Journal of Plant Physiology* 144: 641-648
- Bugos, R.C., Chang, S.H., Yamamoto, H.Y. 1999. Developmental expression of violaxanthin de-epoxidase in leaves of tobacco growing under high and low light. *Plant Physiology* 121: 207-213
- Bugos, R.C., Hieber, A.D., Yamamoto, H.Y. 1998. Xanthophyll cycle enzymes are members of the lipocalin family, the first identified from plants. *Journal of Biological Chemistry* 273: 15321-15324
- Bugos, R.C., Yamamoto, H.Y. 1996. Molecular cloning of violaxanthin de-epoxidase from romaine lettuce and expression in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 6320-6325
- Campbell, L.C., Nable, R.O. 1988. Physiological functions of manganese in plants. En: *Manganese in Plants and Soil*, Graham, R.D., Hannam, R.J., Uren, N.C. (eds.) pp. 139-154. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht
- Castro-Díez, P., Montserrat-Martí, G. 1998. Phenological pattern of fifteen Mediterranean phanerophytes from *Quercus ilex* communities of NE-Spain. *Plant Ecology* 139: 103-112
- Castro-Díez, P., Villar-Salvador, P., Guerrero-Campo, J., Pérez-Rontomé, C., Montserrat-Martí, G. 1998a. Morpho-anatomical changes of *Quercus ilex* communities along a climatic gradient in the NE Iberian Peninsula. *Homenatge a Doctor Oriol de Bolos: pioner en l'estudi de la vegetació. Acta Botanica Barcinonensia* 45: 577-586
- Castro-Díez, P., Villar-Salvador, P., Pérez-Rontomé, C., Maestro-Martínez, M., Montserrat-Martí, G. 1998b. Leaf morphology, leaf chemical composition and stem xylem characteristics in two *Pistacia (Anacardiaceae)* species along a climatic gradient. *Flora* 193: 195-202
- Castro-Díez, P., Villar-Salvador, P., Pérez-Rontomé, C., Maestro-Martínez, M., Montserrat-Martí, G. 1997. Leaf morphology and leaf chemical composition in three *Quercus (Fagaceae)* species along a rainfall gradient in NE Spain. *Trees-Structure and Function* 11: 127-134
-



- Castro-Díez, P. 1996. Variaciones estructurales y funcionales de los fanerófitos dominantes en las comunidades de encinar a lo largo de un gradiente climático atlántico- mediterráneo. Tesis doctoral. Universidad de León. León
- Chabot, B.F., Hicks, D.J. 1982. The ecology of leaf life spans. *Annual Review of Ecological Systems* 13: 229-259
- Chang, T., Cho, Y., Ryu, J., Kim, I., Lim, T., Kim, M.Y. 1998. A cause of leaf chlorosis in peach trees (*Prunus persica*). *Journal of the Korean Society for Horticultural Science* 39: 721-726
- Cheniae, G., Martin, I.F. 1968. Sites of manganese function in photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 153: 819-837
- Chitnis, P.R., Xu, Q., Chitnis, V.P., Nechushtai, R. 1995. Function and organization of photosystem I polypeptides. *Photosynthesis Research* 44: 23-40
- Chitnis, P.R., Thornber, J.P. 1988. The major light-harvesting complex of photosystem II: aspects of its molecular and cell biology. *Photosynthesis Research* 16: 41-63
- Chow, W.S., Miller, C., Anderson, J.M. 1991. Surface charges, the heterogeneous lateral distribution of the two photosystems, and thylakoid stacking. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1057 (1): 69-77
- Chua, N.H., Gillham, N.W. 1977. The sites of synthesis of the principal thylakoid membrane polypeptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Cellular Biology* 74: 441-452
- Clayton, R.K. 1965. Reaction centres of photosynthetic bacteria. *Science* 149: 1346-1347
- Cramer, W.A., Soriano, G.M., Zhang, H., Ponomarev, M.V., Smith, J.L. 1997. The cytochrome b<sub>6</sub>f complex. Novel aspects. *Physiologia Plantarum* 100: 852-862
- Damm, I., Knoetzel, J., Grime, L.H. 1987. On the protective role of carotenoids in the PSI reaction centre and LHCI complexes of the thylakoid membrane. En: *Progress in photosynthesis research* Vol. II Biggins, J. (ed.) pp. 351-354. Martinus Nijhoff. Dordrecht
- de las Rivas, J., Abadía, A., Abadía, J. 1989. A new reversed phase-HPLC method resolving all major higher plant photosynthetic pigments. *Plant Physiology* 91: 190-192
- del Rio, L.A., Lyon, D.S., Olah, I., Glick, B., Salin, M.L. 1983. Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. *Planta* 158: 216-224
- Delapelaire, P., Chua, N.H. 1981. Electrophoretic purification of chlorophyll a/b protein complexes from *Chlamydomonas reinhardtii* and spinach and analysis of their polypeptide compositions. *Journal of Biological Chemistry* 256: 9300-9307

- 
- Demmig, B., Winter, K., Kruger, A., Czygan, F.C. 1987. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant-physiology* 84(2): 218-224
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W. III. 1996a. Chlorophyll and carotenoid composition in leaves of *Euonymus kiautschovicus* acclimated to different degrees of light stress in the field. *Australian Journal of Plant Physiology* 23: 649-659
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W. III. 1996b. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis (Review). *Trends in Plant Science* 1(1): 21-26
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A.M., Adams, W.W. III. 1996. In vivo functions of carotenoids in higher plants. *FASEB Journal* 10: 403-412
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W. III., Logan, B.A., Verhoeven, A. S. 1995. Xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and flexible photosystem II efficiency in plants acclimated to light stress. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 249-260
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W. III. 1992a. Carotenoid composition in sun and shade leaves of plants with different life forms. *Plant, Cell and Environment* 15: 411-419
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W. III. 1992b. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 599-626
- Demmig-Adams, B. 1990. Zeaxanthin-associated energy dissipation and the susceptibility of various organisms to light stress. En: *Current Research in photosynthesis* Vol. II, Baltscheffsky, M. (ed.) pp. 357-364. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht
- Demmig-Adams, B., Winter, K., Kruger, A., Czygan, F.C. 1988. Zeaxanthin and the heat dissipation of excess light energy in *Nerium oleander* exposed to a combination of high light and water stress. *Plant Physiology* 87: 17-24
- Diggie, P.K. 1997. Heteroblasty and the evolution of flowering phenologies. *International Journal of Plant Science* 160: 123-134
- Eckstein, K., Robinson, J.C. 1996. Physiological responses of banana (*Musa Aaa cavendish* sub-group) in the subtropics. 6. Seasonal responses of leaf gas exchange to short-term water stress. *Journal of Horticultural Science* 71 (5): 679-692
- Edwards, G., Walkers, D. 1983. C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>: Mechanisms and cellular and environmental regulation of photosynthesis Oxford:
- Ellenberg, H. 1963. Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen. Fischer. Jena
-

- Eskling, M., Arvidsson, P.O., Akerlund, H.E. 1997. The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiologia Plantarum* 100: 806-816
- Eyletters, M., Bitaud, C., Lannoye, R., Garab, G. 1998. Comparative effects of iron, manganese and boron deficiencies in vine-leaf (*Vitis vinifera*) based on polyphasic chlorophyll a fluorescence transient. *Photosynthesis: mechanisms and effects* Budapest: Hungary, 3781-3784
- Falk, S., Król, M., Maxwell, D.P., Rezansoff, D.A., Gray, G.R., Huner, N.P.A. 1994a. Changes in *in vivo* fluorescence quenching in rye and barley as a function of reduced PSII light harvesting antenna size. *Physiologia Plantarum* 91: 551-558
- Falk, S., Bruce, D., Huner, N.P.A. 1994b. Photosynthetic performance and fluorescence in relation to antenna size and absorption cross-sections in rye and barley grown under normal and intermittent light conditions. *Photosynthesis Research* 42: 145-155
- Faria, T., Silverio, D., Breia, E., Cabral, R., Abadía, A. 1998. Differences in the response of carbon assimilation to summer stress (water deficits, high light and temperature) in four Mediterranean tree species. *Physiologia Plantarum* 102: 419-428
- Faria, T., García-Plazaola, J.I., Abadía, A., Cerasoli, S., Pereira, J.S., Chaves, M.M. 1996. Diurnal changes in photoprotective mechanisms in leaves of cork oak (*Quercus suber*) during summer. *Tree Physiology* 16 (1-2): 115-123
- Fernández López, J.A., Almela, L., López Roca, J.M. 1991. Determination of carotenoids, chlorophylls and pheophytins by normal-phase high-performance liquid chromatography. *Photosynthetica* 25: 81-86
- Floret, C., Galan, M.J., Floc'h, E.I., Leprince, F., Romane, F. 1989. France. En: *Plant phenomorphological studies in Mediterranean type ecosystems*. Orshan, G. (ed.) pp. 9-97. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht
- Floret, C., Galan, M.J., LeFloc'h, E., Orshan, E., Romane, F. 1990. Growth forms and phenomorphology traits along an environmental gradient: tools for studying vegetation? *Journal of Vegetation Science* 1: 71-80
- Frank, H.A., Cua, A., Chynwat, V., Young, A., Gosztola, D., Wasielewski, M.R. 1996. The lifetimes and energies of the first excited singlet states of diadinoxanthin and diatoxanthin -

- the role of these molecules in excess energy dissipation in algae. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1277: 243-252
- Frank, H.A., Cua, A., Chynwat, V., Young, A., Gosztola, D., Wasielewski, M.R. 1996. The lifetimes and energies of the first excited singlet states of diadinoxanthin and diatoxanthin - the role of these molecules in excess energy dissipation in algae. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1277: 243-252
- Frey, A., Audran, C., Marin, E., Sotta, B., Marion-Poll, A. 1999. Engineering seed dormancy by the modification of zeaxanthin epoxidase gene expression. *Plant Molecular Biology* 39: 1267-1274
- Gamon, J. A., Surfus, J. S. 1999. Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer. *Variation in leaf structure* 143 (Special issue): 105-117
- García, A. L., Galindo, L. 1991. Chlorophyllase activity as biochemical indicator of Mn and Fe deficiencies in citrus. *Photosynthetica* 25: 351-357
- García-Plazaola, J.I., Artetxe, U., Becerril, J.M. 1999. Diurnal changes in antioxidant and carotenoid composition in the Mediterranean sclerophyll tree *Quercus ilex* (L) during winter. *Plant Science Limerick* 143: 125-133
- García-Plazaola, J.I., Faria, T., Abadía, J., Abadía, A., Chaves, M.M., Pereira, J.S. 1997. Seasonal changes in xanthophyll composition and photosynthesis of cork oak (*Quercus suber* L.) leaves under Mediterranean climate. *Journal of Experimental Botany* 48: 1667-1674
- Genty, B., Harbinson, J., Briantais, J.M., Baker, N.R. 1990. The relationship between non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and the rate of photosystem II photochemistry in leaves. *Photosynthesis Research* 25: 249-257
- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87-92
- Ghanotakis, D.F., Yocum, C.F. 1986. Purification and properties of an oxygen-evolving reaction center complex from photosystem II membranes. *FEBS* 197: 244-248
- Gilmore, A.M. 1997. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiologia Plantarum* 99: 197-209
- Gilmore, A.M., Hazlett, T.L., Debrunner, P.G., Govindjee. 1996. Photosystem II chlorophyll a fluorescence lifetimes and intensity are independent of the antenna size differences between barley wild-type and chlorina mutants: photochemical quenching and xanthophyll

- cycle-dependent nonphotochemical quenching of fluorescence. *Photosynthesis Research* 48 (1-2): 171-187
- Gilmore, A.M., Yamamoto, H.Y. 1993. Linear models relating xanthophylls and lumen acidity to non-photochemical fluorescence quenching. Evidence that antheraxanthin explains zeaxanthin-independent quenching. *Photosynthesis Research* 35: 67-78
- Gilmore, A.M., Yamamoto, H.Y. 1992. Dark induction of zeaxanthin-dependent nonphotochemical fluorescence quenching mediated by ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89: 1899-1903
- Golbeck, J.H. 1994. Photosystem I in cyanobacteria. En: *The molecular biology in cyanobacteria*. Bryant, D.A. (ed.) pp. 319-360. Kluwer Academic Press. Dordrecht
- Goss, R., Richter, M., Wild, A. 1997. Pigment composition of PSII pigment protein complexes purified by anion exchange chromatography. Identification of xanthophyll cycle pigment binding proteins. *Journal of Plant Physiology* 151: 115-119
- Gounaris, K., Barber, J. 1985. Isolation and characterization of a photosystem II reaction centre lipo protein complex. *FEBS Letters* 188: 68-72
- Govindjee. 1995. Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 131-160
- Green, B.R. ,1988. The chlorophyll-protein complexes of higher plant photosynthetic membranes of Just what green band is that. *Photosynthesis Research* 15: 3-32
- Greene, R.M., Geider, R.J., Kilber, Z., Falkowski, P.G. 1992. Iron-induced changes in light harvesting and photochemical energy conversion processes en eukariotic marine algae. *Plant Physiology* 100: 565-575
- Gruszecki, W.I., Strzalka, K., Bader, K.P., Radunz, A., Schmid, G.H. 1996. Involvement of the xanthophyll cycle in regulation of cyclic electron flow around photosystem II. *Zeitschrift für Naturforschung. Section C, Biosciences* 51 (1-2): 47-52
- Guardia, M.D. de la, Alcantara, E., De la Guardia, M.D. 1996. Ferric chelate reduction by sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves: influence of light, oxygen, iron-deficiency and leaf age. *Journal of Experimental Botany* 47: 669-675
- Guikema, J.A., Sherman, L.A. 1980. Electrophoretic profiles of cyanobacterial membranes polypeptides showing heme-dependent peroxidase activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 637: 189-201

- 
- Hager, A., Holocher, K. 1994. Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. *Planta* 192: 581-589
- Hager, A. 1980. The reversible, light-induced conversions of xanthophylls in the chloroplast. En: *Pigments in plants*. Czygan, F.C. (ed.) pp. 57-59. Fischer. Stuttgart. New York
- Hager, A. 1975. Die Reversiblen, lichtabhängigen Xanthophyllum-Wandlungen in Chloroplasten. *Ber. Deutsch. Bot. Ges* 88: 27-44
- Hager, A., Stransky, H. 1970a. Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyll - Cyclus in verschiedenen Algenklassen. I. Methoden zur Identifizierung der Pigmente. *Arch. Mikrobiol.* 71: 132 - 163
- Hager, A., Stransky, H. 1970b. Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyll - Cyclus in verschiedenen Algenklassen. III. Grünalgen. *Arch. Mikrobiol.* 72: 68 - 83
- Hager, A., Stransky, H. 1970c. Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyll - Cyclus in verschiedenen Algenklassen. V. Einzelne Vertreter der Cryptophyceae, Euglenophyceae, Bacillariophyceae, Chrysophyceae und Phacophyceae. *Arch. Mikrobiol.* 73: 77- 89
- Hager, A. 1966. Die Zusammenhänge zwischen lichtinduzierten Xanthophyll-Umwandlungen und Hill-Reaktion . *Ber. Deutsch. Bot. Ges* 79: 94-107
- Hale, M.G., Orcutt, D.M. 1987. *The physiology of plants under stress*. Wiley Interscience. New York
- Hames, B.D. 1981. An introduction to polyacrilamide gel electrophoresis. En: *Gel electrophoresis of proteins*. Hames, B.D., Rickwood, D. (eds.) pp. 1-92. IRL Press. Oxford
- Hankamer, B., Barber, J., Boekema, E.J. 1997. Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 641-671
- Hare, P.D., Cress, W.A. 1996. Tissue-specific accumulation of transcript encoding Delta1-pyrroline-5-carboxylate reductase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* 19: 249-256
- Härtel, H., Lokstein, H., Grimm, B., Rank, B. 1996. Kinetic studies on the xanthophyll cycle in barley leaves. Influence of antenna size and relations to nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching. *Plant Physiology* 110: 471-482
-

- Härtel, H., Lokstein, H. 1995. Relationship between quenching of maximum and dark-level chlorophyll fluorescence in vivo: Dependence on Photosystem II antenna size. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1228: 91-94
- Havaux, M., Niyogi, K.K. 1999. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 8762-8767
- Havaux, M. 1998. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science* 3: 147-151
- Havaux, M., Gruszecki, W.I. 1993. Heat-induced and light-induced chlorophyll-a fluorescence changes in potato leaves containing high or low levels of the carotenoid zeaxanthin - Indications of a regulatory effect of zeaxanthin on thylakoid membrane fluidity. *Photochemistry and Photobiology* 58: 607-614
- Havaux, M., Greppin, H., Strasser, R.T. 1991. Functioning of photosystems I and II in pea leaves exposed to heat stress in the presence or absence of light. Analysis using in vivo fluorescence, absorbance, oxygen and photoacoustic measurements. *Planta* 186: 88-98
- Havaux, M., Strasser, R.J., Greppin, H. 1990. In vivo photoregulation of photochemical and nonphotochemical deactivation of photosystem II in intact plant leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 28: 735-746
- Havaux, M., Ernez, M., Lannoye, R. 1988. Screening of varieties of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) and bread wheat (*Triticum aestivum* L.) for drought adaptation by measuring in vivo chlorophyll fluorescence quenching. *Agronomie*: 8 (3): 193-199
- Havir, E.A., Tausta, S.L., Peterson, R.B. 1997. Purification and properties of violaxanthin de-epoxidase from spinach. *Plant Science* 123: 57-66
- Heras, L., Sanz, M y Montañés, L. 1976. Corrección de la clorosis férrica en melocotonero y su repercusión sobre el contenido mineral, relaciones nutritivas y rendimientos. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei* 13 (3-4): 261-289
- Horton, P., Ruban, A.V., Walters, R.G. 1996. Regulation of light harvesting in green plants (Review). *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 655-684
- Horton, P., Ruban, A.V., Walters, R.G. 1994. Regulation of light harvesting in green plants. Indication by nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology* 106: 415-420

- 
- Horton, P., Ruban, A.V., Rees, D., Pascal, A.A., Noctor, G., Young, A.J. 1991. Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHCII chlorophyll-protein complex. *FEBS Letters* 292: 1-4
- Howe, G., Merchant, S. 1992. The biosynthesis of membrane and soluble c-type cytochromes of *C. reinhardtii* is dependent upon multiple, common gene products. *EMBO Journal* 11: 2789-2801
- Hundle, B.S., O'Brien, D.A., Beyer, P., Kleinig, H., Hearst, J.E. 1993. In vitro expression and activity of lycopene cyclase and beta-carotene hydroxylase from *Erwinia herbicola*. *FEBS Letters* 315: 329-334
- Hurry, V.M., Król, M., Öquist, G., Huner, N.P.A. 1992. Effect of long-term photoinhibition on growth and photosynthesis of cold-hardened spring and winter wheat. *Planta* 188: 369-375
- Ida, K., Masamoto, K., Maoka, T., Fujiwara, Y., Takeda, S., Hasegawa, E. 1995. The leaves of the common box, *Buxus sempervirens* (*Buxaceae*), become red as the level of a red carotenoid, anhydroeschscholtzanthin, increases. *Journal of Plant Research* 108: 369-376
- Jahns, P., Krause, G.H. 1994. Xanthophyll cycle and energy-dependent fluorescence quenching in leaves from pea plants grown under intermittent light. *Planta* 192: 176-182
- Johnson, S.D. 1992. Climatic and phylogenetic determinants of flowering seasonality in the Cape flora. *Journal of Ecology* 81: 567-572
- Jones, H.E., Quarmby, C., Harrison, A. 1991. A root bioassay test for nitrogen deficiency in forest trees. *Forest Ecology Management* 42: 267-282
- Joyce, P.A., Aspinall, D., Paleg, L.G. 1992. Photosynthesis and the accumulation of proline in response to water deficit. *Australian Journal of Plant Physiology* 19: 249-261
- Karavatas, S., Manetas, Y. 1999. Seasonal patterns of photosystem II photochemical efficiency in evergreen sclerophylls and drought semi-deciduous shrubs under Mediterranean field conditions. *Photosynthetica* 36: 41-49
- Karpinski, S., Karpinska, B., Wingsle, G., Hallgren, J.E. 1994. Molecular responses to photooxidative stress in *Pinus sylvestris*. I. Differential expression of nuclear and plastid genes in relation to recovery from winter stress. *Physiologia Plantarum* 90: 358-366
- Katyal, J.C., Sharma, B.D. 1980. A new technique of plant analysis to resolve iron chlorosis. *Plant and Soil* 55: 105-119
-



- Kautsky, H., Appel, W., Amann, H. 1960. Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation. XIII. Die Fluoreszenzkurve und die Photochemie der Planze. *Biochemische Zeitschrift* 332: 227-292
- Kikuzawa, K. 1995. Leaf phenology as an optimal strategy for carbon gain in plants. *Canadian Journal of Botany* 73: 158-163
- Kikuzawa, K. 1989. Ecology and evolution of phenological pattern, leaf longevity and leaf habitat. *Evolutionary Trends in Plants* 3: 105-110
- Knoetzel, J., Simpson, D. 1991. Expression and organization of antenna proteins in the light- and temperature sensitive barley chlorina - 104. *Planta* 185: 111-123
- Königer, M., Harris, G.C., Virgo, A., Winter, K. 1995. Xanthophyll-cycle pigments and photosynthetic capacity in tropical forest species: a comparative field study on canopy, gap and understory plants. *Oecologia* 104: 280-290
- Koroleva, O.Y. 1996. Cold acclimation of the photosynthetic apparatus in an arctic species, *oxyria digyna*. *Russian Journal of Plant Physiology* 43(3): 319-324
- Kramer, D.M., Sacksteder, C.A., Cruz, J.A. 1999. How acidic is the lumen? (Review). *Photosynthesis Research* 60: 151-163
- Kramer, P.J., Kozlowski, T.T. 1979. Physiology of woody plants Academic Press. New York
- Krause, G.H., Carouge, N., Garden, H. 1999. Long-term effects of temperature shifts on xanthophyll cycle and photoinhibition in spinach (*Spinacia oleracea*). *Australian Journal of Plant Physiology* 26: 125-134
- Krause, G.H., Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. The basis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349
- Krause, G.H. 1988. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiologia Plantarum* 74: 566-574
- Krause, G.H., Weis, E. 1988. The photosynthetic apparatus and chlorophyll fluorescence: an introduction. En: *Applications of chlorophyll fluorescence un photosynthesis research, stress physiology, hydrobiology and remote sensing*. Lichtenthaler, H.K. (ed.) pp. 3-12. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Krause, G.H., Weis, E. 1984. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynthesis Research* 5: 139-157

- 
- Krauss, N., Hinrichs, W., Witt, I., Fromme, P., Pritzkow, W., Dauter, Z., Betzel, C., Wilson, K.S., Witt, H.T., Saenger, W. 1993. Three-dimensional structure of system I of photosynthesis at 6Å resolution. *Nature* 361: 326-331
- Król, M., Ivanov, A.G., Jansson, S., Kloppstech, K., Huner, N.P.A. 1999. Greening under high light or cold temperature affects the level of xanthophyll-cycle pigments, early light-inducible proteins, and light-harvesting polypeptides in wild-type barley and the Chlorina f2 mutant. *Plant Physiology* 120: 193-203
- Kuhlbrandt, W. 1984. Threedimensional structure of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex, *Nature* 307: 478-480
- Kyparissis, A., Petropoulou, Y., Manetas, Y. 1995. Summer survival of leaves in a soft-leaved shrub (*Phlomis fruticosa* L., *Labiatae*) under Mediterranean field conditions: avoidance of photoinhibitory damage through decreased chlorophyll contents. *Journal of Experimental Botany* 46: 1825-1831
- Ladygin, V.G., Semenova, G.A. 1993. The influence of iron deficiency on the composition of chlorophyll-protein complexes and the ultrastructure of pea chloroplasts. *Russian Journal of Plant Physiology* 40: 723-731
- Lagarde, D., Vermaas, W. 1999. The zeaxanthin biosynthesis enzyme beta-carotene hydroxylase is involved in myxoxanthophyll synthesis in *Synechocystis* sp PCC 6803. *FEBS Letters* 454: 247-251
- Lansac, A.R., Zaballos, J.P., Martín, A. 1994. Seasonal water potential changes and proline accumulation in mediterranean shrubland species. *Vegetatio* 113: 141-154
- Larcher, W. 1987. Stress bei Pflanzen. *Naturwissenschaften* 74: 158-167
- Le Houérou, H.N. 1981. Impact of man and his animals on Mediterranean vegetation. En: *Mediterranean-type shrublands*, Di Castri, F., Goodall, D.W., Specht, R.L. (eds.) pp. 479-522. Elsevier. Amsterdam
- Lechowicz, M.J. 1984. Why do temperate deciduous trees leaf out at different times? Adaptation and ecology of forest communities. *The American Naturalist* 124: 821-842
- Lee, A.I.C., Thornber, J.P. 1995. Analysis of the pigment stoichiometry of pigment-protein complexes from barley (*Hordeum vulgare*). The xanthophyll cycle intermediates occur

- mainly in the light-harvesting complexes of photosystem I and photosystem II. *Plant Physiology* 107: 565-574
- Lems, K. 1962. Adaptive radiation in the *Ericaceae*. I. Shoot development in the *Andromedaeae*. *Ecology* 43: 524-528
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Water, radiation, salt, and other stresses. 2 ed. Vol. 2. Academic Press. New York
- Li, J. 1985. Light-harvesting chlorophyll a/b protein: three dimensional structure of a reconstituted membrane lattice in negative stain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 386-390
- Lichtenthaler, H.K. 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. En: *Vegetation Stress*. Lichtenthaler, H.K. (ed.) pp. 4-14. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart
- Lichtenthaler, H.K., Schindler, C., Murata, N. 1992. Studies on the photoprotective function of zeaxanthin at high-light conditions. *Research in Photosynthesis* Vol. IV. Proceedings of the IXth International Congress on Photosynthesis, Nagoya, Japan, 517-520
- Lo Gullo, M.A., Salleo, S. 1988. Different strategies of drought resistance in three Mediterranean sclerophyllous trees growing in the same environmental conditions. *New Phytology* 108: 267-276
- Loewenstein, N.J., Pallardy, S.G. 1998. Drought tolerance, xylem sap abscisic acid and stomatal conductance during soil drying: a comparison of canopy trees of three temperate deciduous angiosperms. *Tree Physiology* 18: 431-439
- Logan, B.A., Barker, D.H., Adams, W.W. III, Demmig-Adams, B. 1997. The response of xanthophyll cycle-dependent energy dissipation in *Alocasia brisbanensis* to sunflecks in a subtropical rainforest. *Australian Journal of Plant Physiology* 24: 27-33
- Lokstein, H., Härtel, H., Hoffmann, P., Voitke, P., Renger, G. 1994. The role of light-harvesting complex II in excess excitation energy dissipation: An in-vivo fluorescence study on the origin of high-energy quenching. *Journal of Photochemistry and Photobiology B - Biology* 26: 175-184
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*: 265-275
- Ludlow, M.M., Björkman, O. 1984. Paraheliotropic leaf movement in *Siratro* as a protective mechanism against drought-induced damage to primary photosynthetic reactions: damage by excessive light and heat. *Planta* 161: 505-518

- 
- Madero, P., Pequerul, A., Pérez, C., Val, J., Monge, E. 1993. Specificity of iron in some aspects of soybean (*Glycine max* L.) physiology. En: Optimization of plant nutrition, Frago, M.A.C., van Beusichem, M.L. (eds.) pp. 497-502. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht
- Marden, J. B., Barber, J. 1989. The molecular anatomy and function of thylakoid proteins. *Plant, Cell and Environment* 12: 595-614
- Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B., Hugueney, P., Frey, A., Marionpoll, A. 1996. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the aba locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Journal* 15 (10): 2331-2342
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition for higher plants. Academic Press. San Diego
- Martinez, C.A., Maestri, M., Lani, E.G. 1996. In vitro salt tolerance and proline accumulation in Andean potato (*Solanum* spp.) differing in frost resistance. *Plant Science* 116: 177-194
- Martinez, S.E., Huang, D., Szczepaniak, A., Cramer, W.A., Smith, J.L. 1994. Crystal structure of chloroplast Cyt f reveals a novel Cyt fold and unexpected heme ligation. *Structura* 2: 95-105
- Martínez-Ferri, E., Balaguer, L., Valladares, F., Chico, J.M., Manrique, E. 2000. Energy dissipation in drought-avoiding and drought-tolerant tree species at midday during the Mediterranean summer. *Tree Physiology* 20: 131-138
- Martín-Pevel, P., Garnard, J., Gautier, P. 1987. Plant analysis as a guide to the nutrient requirements of temperate and tropical crops. Lavoisier Publisher. Paris
- Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Tolbert, N.E., Bieber, L.L. 1969. Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. *Methods in Enzymology* 72: 296-303
- Maslova, T.G., Popova, I.A., Korniyushenko, G.A., Koroleva, O.Y. 1996. Violaxanthin cycle in photosynthesis: history and current concept. *Russian Journal of Plant Physiology* 43: 383-393
- Maury, P., Mojayad, F., Berger, M., Planchon, C. 1996. Photochemical response to drought acclimation in two sunflower genotypes. *Physiologia Plantarum* 98 (1): 57-66
- Medina, E., Francisco, M. 1994. Photosynthesis and water relations of savanna tree species differing in leaf phenology. *Tree Physiology* 14: 1367-1381
- Mengel, K., Kirkby, E.A. 1979. Principles of plant nutrition. International Potash Institute. Berne.

- Mercer, F.V., Nittim, M., Possingham, J.V. 1962. The effect of manganese deficiency on the structure of spinach chloroplasts. *Journal of Cell Biology* 15: 379-381
- Miki, W., Otaki, N., Yokoyama, A., Kusumi, T. 1996. Possible origin of zeaxanthin in the marine sponge, *Reniera japonica*. *Experientia* 52 (1): 93-96
- Miller, G.W., Pushnik, J.C., Welkie, G.W. 1984. Iron chlorosis, a world wide problem, the relation of chlorophyll biosynthesis to iron. *Journal of Plant Nutrition* 7: 1-22
- Mitrakos, K. A. 1980. A theory for Mediterranean plant life. *Acta Oecologica* 1: 245-252
- Monge, E., Montanés, L., Val, J., Heras, L. 1991. El hierro modulador de la estructura y función del cloroplasto. *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* 1: 85-108
- Monge, E., Val, J., Heras, L., Abadía, J. 1987. Photosynthetic pigment composition of higher plants grown under iron stress. En: *Progress in photosynthesis research* Vol. IV Biggins, J. (ed.) pp. 201-204. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht
- Monge, E., Val, J., Heras, L. 1985. Stoichiometry of photosynthetic pigments in higher plants in relation to iron deficiency. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei* 17: 239-251
- Montserrat-Martí, J., Montserrat Martí, G. 1988. Hypothesis on the postglacial dynamics of thermo-mediterranean plants on the Southern slopes of the Pyrenees. *Monografías del Instituto Pirenaico de Ecología* 4: 649-660.
- Montserrat-Recoder, P., Gastón-Nicolás, R., Gómez-García, D., Montserrat-Martí, G., Villar-Pérez, L. 1988. *Enciclopedia temática de Aragón. Flora*. Ediciones Moncayo, S.A. Zaragoza
- Montserrat-Recoder, P. 1975. Enclaves florísticos mediterráneos en el Pirineo. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Biología)* 2: 363-376
- Mooney, H.A., Gulmon, S.L. 1982. Constraints on leaf structure and function in reference to herbivory. *BioScience* 32: 198-206
- Morales, F., Abadía, A., Abadía, J. 1998. Photosynthesis, quenching of chlorophyll fluorescence and thermal energy dissipation in iron-deficient sugar beet leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 25: 403-412
- Morales, F., Abadía, A., Belkhodja, R., Abadía, J. 1994. Iron deficiency-induced changes in the photosynthetic pigment composition of field-grown pear (*Pyrus communis* L.) leaves. *Plant, Cell and Environment* 17: 1153-1160

- 
- Morales, F., Abadía, A., Abadía, J. 1991. Chlorophyll fluorescence and photon yield of oxygen evolution in iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Plant Physiology* 97: 886-893
- Morales, F., Abadía, A., Abadía, J. 1990. Characterization of the xanthophyll cycle and other photosynthetic pigment changes induced by iron deficiency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant-physiology* 94 (2): 607-613
- Moreno, M.A., Montañés, L., Tabuenca, M.C., Cambra, R. 1996. The performance of Adara as a cherry rootstock. *Scientia Horticulturae*: 882.
- Moreno, M.A., Val, J., Monge, E., Tabuenca, M.C. 1987. Relación patrón-injerto. Pigmentos fotosintéticos en melocotonero (*Prunus persica*) injertados sobre Pollizo de Murcia (*Prunus Insititia*). *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei* 18: 229-237
- Nahal, I. 1981. The mediterranean climate from a biological viewpoint. En: *Mediterranean-type shrublands*. Di-Castri, F., Goodall, D.W., Specht, R.L. (eds.) pp. 63-86. Elsevier. Amsterdam
- Nanba, O., Satoh, K. 1987. Isolation of a photosystem II reaction centre containing D1 and D2 polypeptides and cytochrome b<sub>559</sub>. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* 84: 109-112
- Neena, K., Chatterjee, C., Sharma, C.P., Khurana, N. 1999. Impact of manganese stress on physiology and quality of pea (*Pisum sativum*). *Indian Journal of Agricultural Sciences* 69: 332-335
- Nielsen, G., Kappel, F. 1996. "Bing" Sweet cherry leaf nutrition is affected by rootstock. *HortScience* 31: 1169-1172
- Nilsen, E.T., Orcutt, D.M. 1996. Physiology of plants under stress. Abiotic factors. John Wiley and Sons. New York
- Ninot, J.M., Romo, A., Sesé, J.A. 1993. Macizo del Turbón y Sierra de Sis. Flora, paisaje vegetal e itinerarios (Prepirineo aragonés). Naturaleza en Aragón. Gobierno de Aragón. Departamento de Agricultura, Ganadería y Montes. Zaragoza
- Nishio, J.N., Abadía, J., Terry, N. 1985. Chlorophyll-proteins and electron transport during iron nutrition-mediated chloroplast development. *Plant Physiology* 78: 296-299
- Nobel, P.S. 1991. Photochemistry of Photosynthesis. En: *Physiochemical and Environmental Plant Physiology*. pp. 245-296. Academic Press, Inc. San Diego, California

- Oberhuber, W., Bauer, H. 1991. Photoinhibition of photosynthesis under natural conditions in ivy (*Hedera helix* L.) growing in an understory of deciduous trees. *Planta* 185: 545-553
- Ogawa, T., Obata, F., Shibata, K. 1966. The pigment-proteins in spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 112: 223-234
- Ohki, K., Wilson, D. O., Andersson, O. E. 1981. Manganese deficiency and toxicity sensitivities in soybean cultivars. *Agronomical Journal* 72: 713-716
- Öquist, G., Ogren, E. 1985. Effects of winter stress on photosynthetic electron transport and energy distribution between the two photosystems of pine as assayed by chlorophyll fluorescence kinetics. *Photosynthesis Research* 7: 19-30
- Orshan, G., 1989. Plant pheno-morphological studies in Mediterranean type ecosystems. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht
- Orshan, G. 1986. Plant form as describing vegetation and expressing adaptation to environment. *Annali di Botanica* 44: 7-38
- Ottander, C., Campbell, D., Öquist, G. 1995. Seasonal changes in photosystem II organisation and pigment composition in *Pinus sylvestris*. *Planta* 197: 176-183
- Owens, T.G. 1996. Processing of excitation energy by antenna pigments. En: *Advances in photosynthesis: Photosynthesis and environment*, Baker, N.R. (ed.) pp. 1-23. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Paleg, L.G., Aspinall, D. 1981. The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Academic Press. Sidney
- Panine, M. 1987. Peaches. En: *Plant analysis as a guide to the nutrient requirements of temperate and tropical crops*. Martín-Pevel P., Garnasd, J., Gautier, P. (eds.) pp. 249-262. Lavoisier Publisher. Paris
- Park, Y.I., Chow, W.S., Anderson, J.M. 1995. The quantum yield of photoinactivation of photosystem II in pea leaves is greater at low than high photon exposure. *Plant and Cell Physiology* 36: 1163-1167
- Penev, S. 1995. Leaf chemical composition of chlorotic fruit trees. *Rasteniev"dni Nauki* 32:278-280
- Pérez-Rontomé, C., Madero, P., Pequerul, A., Val, J., Monge, E. 1993. Specificity of manganese in some aspects of soybean (*Glycine max* L.) physiology. En: *Optimization of plant nutrition*, Fragoso, M.A.C., van Beusichem, M.L. (eds.) pp. 503-507. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht

- 
- Peter, G., Thornber, J.P. 1991a. Biochemical evidence that the higher plant photosystem II core complex is organized as a dimer. *Plant Cell Physiol* 32: 1237-1250
- Peter, G.F., Thornber, J.P. 1991b. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *Journal of Biological Chemistry* 266: 16745-16754
- Pfündel, E., Bilger, W. 1994. Regulation and possible function of the violaxanthin cycle (Review). *Photosynthesis Research* 42 (2): 89-109
- Pinta, M., DeWeale, G. 1975. Etalons végétaux por l'analyse foliare. En: *Le contrôle de l'alimentation des plantes cultivées*, Kozman, P. (ed.) pp. 159-172. Akademiai Kiado. Budapest
- Platt-Aloia, K.A., Thomson, W.W., Terry, N. 1983. Changes in plastid ultrastructure during iron nutrition-mediated chloroplast development. *Protoplasma* 114: 85-92
- Poorter, H. 1994. Construction costs and payback time of biomass: A whole plant perspective. En: *A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions*, Roy, J., Garnier, E. (eds.) pp. 111-127. SPB Academic Publishing. The Hague
- Pospisil, P. 1997. Mechanisms of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in higher plants (Review). *Photosynthetica* 34: 343-355
- Possingham, J.V., Vesk, M., Mercer, F.V. 1964. The fine structure of leaf cells of manganese deficient spinach. *Journal of Ultrastructure Research* 11: 68-83
- Pugnaire, F.I., Haase, P., Incoll, L.D., Clark, S.C. 1996. Response of the tussock grass *Stipa tenacissima* to watering in a semi-arid environment. *Functional Ecology* 10 (2): 265-274
- Quílez, R. 1994. Cambios inducidos por la deficiencia de hierro y la mutación LCM en la organización del aparato fotosintético de *Beta vulgaris* L. Universidad de Zaragoza. Zaragoza
- Ramalho, J.C., Pons, T.L., Groeneveld, H.W., Azinheira H.G., Nunes, M.A. 2000. Photosynthetic acclimatation to high light conditions in mature leaves of *Coffea arabica* : role of xanthophylls, quenching mechanisms and nitrogen nutrition. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 43-51
- Ramalho, J.C., Pons, T.L., Groeneveld, H.W., Nunes, M.A. 1997. Photosynthetic responses of *Coffea arabica* leaves to a short-term high light exposure in relation to N availability. *Physiologia Plantarum* 101: 229-239



- Rathcke, B.J., Lacey, E.P. 1985. Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of Ecological Systems* 16: 179-214
- Reuter, D.J., Robinsson, J.B. 1986. Plant analysis. An interpretation manual. Inkata Press. Melbourne
- Richter, M., Goss, R., Wagner, B., Holzwarth, A.R. 1999. Characterization of the fast and slow reversible components of non-photochemical quenching in isolated pea thylakoids by picosecond time-resolved chlorophyll fluorescence analysis *Biochemistry* 38: 12718-12726
- Rivas-Martínez, S., Báscones, J.C., Díaz, T.E., Fernández-González, F., Loidi, J. 1991. Vegetación del Pirineo occidental y Navarra. *Itinera Geobotanica* 5: 5-456
- Rockholm, D.C., Yamamoto, H.Y. 1996. Violaxanthin de-epoxidase. Purification of a 43-kilodalton lumenal protein from lettuce by lipid-affinity precipitation with monogalactosyldiacylglyceride. *Plant Physiology* 110: 697-703
- Rom, R.C., Carlson, R.F. 1987. Rootstocks for fruit crops. John Wiley and Sons. New York
- Ruban, A.V., Horton, P. 1999. The xanthophyll cycle modulates the kinetics of nonphotochemical energy dissipation in isolated light-harvesting complexes, intact chloroplasts, and leaves of spinach. *Plant Physiology* 119: 531-542
- Ruban, A.V., Young, A.J., Pascal, A.A., Horton, P. 1994. The effects of illumination on the xanthophyll composition of the photosystem II light-harvesting complexes of spinach thylakoid membranes. *Plant Physiology* 104: 227-234
- Ruffle, S.V., Donnelly, D., Blundell, T.L., Nugent, J.H.A. 1992. A three-dimensional model of the photosystem II reaction centre of *Pisum sativum*. *Photosynthesis Research* 34 (2): 287-300
- Rufner, R., Barker, A.V. 1984. Ultrastructure of zinc-induced iron deficiency in mesophyll chloroplasts of spinach and tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 109: 164-168
- Sala, A., Sabaté, S., Gracia, C., Tenhunen, J.D. 1994. Canopy structure within a *Quercus ilex* forested watershed: variations due to location, phenological development, and water availability. *Trees* 8: 254-261
- Sapozhnikov, D.J. 1969. Transformations of xanthophylls in the chloroplasts. En: *Progress in Photosynthesis Research* Vol.II Metzner, H. (ed.) pp. 694-700
- Sapozhnikov, D.I., Krasovskaya, T.A., Maevskaya, A.N. 1957. Changes in the interrelationship of the basic carotenoids of the plastids of green leaves under the action of light. *Dokl. Akad.Nauk. UssR* 113: 465-467

- 
- Sarry, J.E., Montillet, J.L., Sauvaire, Y., Havaux, M. 1994. The protective function of the xanthophyll cycle in photosynthesis. *FEBS Letters* 353: 147-150
- Schäfer, C., Schmid, V., Roos, M. 1994. Characterization of high-light-induced increases in xanthophyll cycle pigment and lutein contents in photoautotrophic cell cultures. *Journal of Photochemistry and Photobiology B - Biology*. 22: 67-75
- Scheller, H.V., Naver, H., Moller, B.L. 1997. Molecular aspects of photosystem I. *Physiologia Plantarum* 100: 842-851
- Schindler, C., Lichtenthaler, H.K. 1996. Photosynthetic CO<sub>2</sub>-assimilation, chlorophyll fluorescence and zeaxanthin accumulation in field grown maple trees in the course of a sunny and a cloudy day. *Journal of Plant Physiology* Special issue: vegetation stress II *Journal of Plant Physiology* 148 (3-4): 399-412
- Scholander, P.F., Hammel, H.T., Hemmingsen, E.A., Bradstreet, E.D. 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339-346
- Schreiber, U. 1986. Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorimeter. *Photosynthesis Research* 9: 261-272
- Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* 10: 51-62
- Schubert, H., Kroon, B.M.A., Matthijs, H.C.P. 1994. In vivo manipulation of the xanthophyll cycle and the role of zeaxanthin in the protection against photodamage in the green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Biological Chemistry* 269: 7267-7272
- Schwanz, P., Polle, A. 1998. Antioxidative systems, pigment and protein contents in leaves of adult mediterranean oak species (*Quercus pubescens* and *Q. ilex*) with lifetime exposure to elevated CO<sub>2</sub>. *New Phytologist* 140: 411-423
- Seibert, M. 1993. Biochemical, biophysical and structural characterization of the isolated photosystem II reaction center complex. En: *The photosynthetic reaction centre*. Norris, J., Deisenhofer, J. (eds.) pp. 27-41 Academic Press. New York
- Sharma, C.P., Neena, K., Chatterjee, C., Khurana, N. 1995. Manganese stress changes physiology and oil content of linseed *Linum usitatissimum* L. *Indian Journal of Experimental Biology* 33: 701-704

- Siefermann, D., Yamamoto, H.Y. 1975. Light-induced de-epoxidation of violaxanthin in lettuce chloroplasts. IV. The effects of electron-transport conditions on violaxanthin availability. *Biochimica et Biophysica Acta* 387: 149-158
- Simpson, D.J., Robinson, S.P. 1984. Freeze-fracture ultrastructure of thylakoid membranes in chloroplasts from manganese-deficient plants. *Plant Physiology* 74: 735-741
- Singh, T.N., Aspinall, D., Paleg, L. G. 1973. Stress metabolism. IV. The influence of (2-chloroethyl) - trimethylammonium chloride and gibberellic acid on the growth and proline accumulation of wheat plants during water stress. *Australian Journal of Biological Science* 26: 77-86
- Spiller, S., Terry, N. 1980. Limiting factors in photosynthesis. *Plant Physiology* 65: 121-125
- Stewart, G.R., Lee, J.A. 1974. The role of proline accumulation in Halophytes. *Planta* 120: 279-289
- Stuhlfauth, T., Scheuermann, R., Fock, H.P. 1990. Light energy dissipation under water stress conditions. Contribution of reassimilation and evidence for additional processes. *Plant-physiology* 92 (4): 1053-1061
- Tabuenca, M.C., Moreno, M.A. 1988. Rootstock scion incompatibility. The performance of a plum as a rootstock for various fruit tree species. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei* 19: 251-263
- Takabe, T. 1987. Biosynthesis of chloroplast Rieske iron- sulfur protein: function and biogenesis iron-sulfur protein in cytochrome b/f complex. Iron-sulfur Protein Res., (Pap. Int Symp. Front. Iron-Sulfur Protein Res.) pp: 270-277. (Matsubara, H., Katsube, Y., Wade, K., eds.) Fac. Sci. Technol., Meijo Univ., Nagoya, Japan 468.
- Takahashi, Y., Rahire, M., Breyton, C., Popot, J.L., Joliot, P., Rochaix, J.D. 1996. The chloroplast *ycf7* (*petL*) open reading frame of *C. reinhardtii* encodes a small functionally important subunit of the cytochrome  $b_6f$  complex. *EMBO Journal* 15: 3498-3506
- Tardy, F., Havaux, M. 1997. Thylakoid membrane fluidity and thermostability during the operation of the xanthophyll cycle in higher-plant chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* 2: 179-193
- Tardy, F., Havaux, M. 1996. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, light-harvesting system and photoinhibition resistance of a zeaxanthin-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B - Biology* 34 (1): 87-94

- 
- Terradas, J., Savé, R. 1992. The influence of summer and winter stress and water relationships on the distribution of *Quercus ilex* L. *Vegetatio* 99-100: 137-145
- Terry, N., Abadía, J. 1986. Function of iron in chloroplasts. *Journal of Plant Nutrition* 9: 609-646
- Terry, N. 1980. Limiting factors in photosynthesis. I. Use of iron stress to control photochemical capacity in vivo. *Plant Physiology* 65: 114-120
- Thayer, S.S., Björkman, O. 1992. Carotenoid distribution and deepoxidation in thylakoid pigment-protein complexes from cotton leaves and bundle-sheath cells of maize. *Photosynthesis Research* 33: 213-225
- Thayer, S.S., Björkman, O. 1990. Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynthesis Research* 23: 331-343
- Thoiron, S., Pascal, N., Briat, J.F. 1997. Impact of iron deficiency and iron re-supply during the early stages of vegetative development in maize (*Zea mays* L.). *Plant, Cell and Environment* 20: 1051-1060
- Thomas, F.M., Brandt, T., Hartmann, G. 1998. Leaf chlorosis in pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) on calcareous soils resulting from lime-induced manganese/iron-deficiency: soil conditions and physiological reactions. *Angewandte Botanik* 72: 28-36
- Thompson, L.K. 1987. Irradiation stress. En: *The physiology of plants under stress*, ed. Hale, M.G., Orcutt, D.M. (eds.) pp. 103-116. Wiley Interscience. New York
- Tranquillini, W. 1982. Frost-drought and its ecological significance. En: *Physiological plant ecology. Encyclopedia of plant physiology II. Water relations and carbon assimilation*. Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Ziegler, H. (eds.) Vol. 11 pp. 379-400. Springer. Berlin
- Tretiach, M. 1993. Photosynthesis and transpiration of evergreen Mediterranean and deciduous trees in an ecotone during a growing season. *Acta Oecologica* 14: 341-360
- Val, J., Monge, E., Montanés, L., Sanz, M. 1997. Manganese deficiency in peach trees: prognosis and fruit quality. *Acta Horticulturae* 448: 345-350
- Val, J., Sanz, M., Montañés, L., Monge, E. 1995. Application of chlorophyll fluorescence to study iron and manganese deficiencies in peach tree. En: *Mineral nutrition of deciduous fruit plants*. *Acta Horticulturae*, Tagliavini, M., Nielsen, G.H., Millard, P. (eds.) pp. 201-209 ISHS. Belgium
- Val, J., Monge, E., Baker, N. R. 1994. An improved HPLC method for rapid analysis of the xanthophyll cycle pigments. *Journal of Chromatographic Science* 32: 286-289
-

- Val, J., Moreno, M.A., Tabuenca, M.C., Monge, E. 1989. Photosynthetic pigments in young non-bearing pear and quince trees. *Acta Horticulturae* 256: 119-125
- Val, J., Monge, E., Heras, L., Abadia, J. 1987. Changes in photosynthetic composition in higher plants as affected by iron nutrition status. *Journal of Plant Nutrition* 10: 995-1001
- Val, J., Abadía, J., Heras, L., Monge, E. 1986. Higher plant photosynthetic pigment analysis. Determination of carotenoids and chlorophylls. *Journal of Micronutrient Analysis* 17: 239-251
- Val, J., Heras, L., Monge, E. 1985. Nuevas ecuaciones para la determinación de pigmentos fotosintéticos en acetona. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei* 17: 231-238
- Valladares, F., Sánchez-Hoyos, A., Manrique, E. 1995. Diurnal changes in photosynthetic efficiency and carotenoid composition of the lichen *Anaptychia ciliaris* - Effects of hydration and light intensity. *Bryologist* 98 (3): 375-382
- Verhoeven, A.S., Adams, W.W. III., Demmig-Adams, B. 1999a. The xanthophyll cycle and acclimation of *Pinus ponderosa* and *Malva neglecta* to winter stress. *Oecologia* 118: 277-287
- Verhoeven, A.S., Adams, W.W. III, Demmig-Adams, B., Croce, R., Bassi, R. 1999b. Xanthophyll cycle pigment localization and dynamics during exposure to low temperatures and light stress in *Vinca major*. *Plant Physiology* 120: 727-737
- Verhoeven, A.S., Demmig-Adams, B., Adams, W.W. III. 1997. Enhanced employment of the xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in spinach exposed to high light and N stress. *Plant Physiology* 113: 817-824
- Verhoeven, A.S., Adams, W.W. III., Demmig-Adams, B. 1996. Close relationship between the state of the xanthophyll cycle pigments and photosystem II efficiency during recovery from winter stress. *Physiologia Plantarum* 96 (4): 567-576
- Vershinin, A.O., Kamnev, A.N. 1996. Xanthophyll cycle in marine macroalgae. *Botanica Marina* 39 (5): 421-425
- Villar, L., Sesé, J.A., Ferrández, J.V. 1997. Flora del Pirineo aragonés. Ediciones La Val de Onsera. Huesca
- Villar-Salvador, P., Castro-Díez, P., Pérez-Rantomé, C., Montserrat-Martí, G. 1997. Stem xylem features in three *Quercus* (*Fagaceae*) species along a climatic gradient in NE Spain. *Trees-Structure and Function* 12: 90-96

- 
- Walker, D. 1988. Some aspects of the relationship between chlorophyll a fluorescence and photosynthetic carbon assimilation. En: *Applications of chlorophyll fluorescence in photosynthesis research, stress physiology, hydrobiology and remote sensing*. Lichtenthaler, H.K. (ed.) pp. 13-20. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Walters, R.G., Horton, P. 1999. Structural and functional heterogeneity in the major light-harvesting complexes of higher plants. *Photosynthesis Research* 61: 77-89
- Walters, R.G., Ruban, A.V., Horton, P. 1994. Higher plant light-harvesting complexes LHCIa and LHCIc are bound by dicyclohexylcarbodiimide during inhibition of energy dissipation. *European Journal of Biochemistry* 226 (3): 1063-1069
- Wang, Q.Y., Hu, C.H., Wang, Z.L., Yan, M.J., Zhai, N.C. 1992. Effects of trace element deficiency on chloroplast structure and function in maize. *Scientia Agricultura Sinica* 25: 32-36
- Watanabe, S., Yamada, M. 1985. Development on lipid synthesis from CO<sub>2</sub> in avena leaves during greening of etiolated seedlings. *Plant and Cell Physiology* 26 (3): 515-524
- Werner, C., Correia, O., Beyschlag, W. 1999. Two different strategies of Mediterranean macchia plants to avoid photoinhibitory damage by excessive radiation levels during summer drought. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* 20: 15-23
- White, M.J., Green, B.R. 1988. Intermittent-light chloroplasts are not developmentally equivalent to chlorina f2 chloroplasts in barley. *Photosynthesis Research* 15: 195-203
- Wollman, F.A., Kuras, R., Choquet, Y. 1995. Epistatic effect in thylakoid protein synthesis: The example of Cyt f. En: *Proceedings of the Xth International Congress on Photosynthesis*, Mathis, P. (ed.) Kluwer Academic Press. Dordrecht
- Wright, S.J., Calderon, O. 1995. Phylogenetic patterns among tropical flowering phenologies. *Journal of Ecology* 83: 937-948
- Xu, C., Li, D., Zou, Q., Zhang, J. 1999. Effect of drought on chlorophyll fluorescence and xanthophyll cycle components in winter wheat leaves with different ages. *Acta Phytophysiologica Sinica* 25: 29-37
- Yamamoto, H.Y. 1979. Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants. *Pure and Applied Chemistry* 51: 639-648
- Yamamoto, H.Y., Nakayama, T.O.M., Chichester, C.O. 1962. Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 97: 168-173

- Young, A.J., Frank, H.A. 1996. Energy transfer reactions involving carotenoids - quenching of chlorophyll fluorescence (Review). *Journal of Photochemistry and Photobiology B - Biology* 36: 3-15
- Young, D.A., Voris, B.P., Maytin, E.V., Colbert, R.A. 1983. Very-high-resolution two-dimensional electrophoretic separation of proteins on giant gels. *Methods in Enzymology* 91: 190-214
- Yu, Q., Rengel, Z. 1999. Micronutrient deficiency influences plant growth and activities of superoxide dismutases in narrow-leafed lupins. *Annals of Botany* 83: 175-182
- Zhu, J., Gómez, S.M., Mawson, B.T., Jin, X., Zeiger, E. 1997. The coleoptile chloroplast: distinct distribution of xanthophyll cycle pigments, and enrichment in photosystem II. *Photosynthesis Research* 51: 137-147

**7 ANEXO**





## 7.1 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1: Resumen de la precipitación y la temperatura media durante los años de estudio y media de la zona de estudio en los últimos 30 años.....	59
Tabla 3.2. Pesos moleculares y coeficientes de calibración para los pigmentos fotosintéticos separados por HPLC. ....	79
Tabla 4.1: Variación de la concentración de zeaxantina en las dos soluciones tampón de trabajo (pH 5.3 y 7.5) en tilacoides de remolacha incubados en oscuridad a diferentes tiempos.....	100
Tabla 4.2: Concentración foliar de pigmentos fotosintéticos ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) en hojas de cebada control y mutante (chlorina f2). Los datos son la media de 7 repeticiones $\pm$ SE....	109
Tabla 4.3: Relación entre los componentes del ciclo de las xantofilas y la clorofila total ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) en cebada control y mutante. Los datos son la media de 7 repeticiones $\pm$ SE .....	109
Tabla 4.4: Concentración de nutrientes en hojas de soja control y deficientes en hierro. Los análisis se hicieron considerando dos estados de desarrollo de las hojas: viejas y jóvenes (medias $\pm$ error estándar de 7 ensayos) .....	120
Tabla 4.5: Concentración foliar de pigmentos fotosintéticos ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) en hojas de soja control y deficientes en hierro. Los datos se expresan como la media de 7 repeticiones $\pm$ SE. ....	121
Tabla 4.6: Parámetros de fluorescencia en hojas de soja deficientes en Fe y control, en dos estadios de desarrollo. Los datos son la media de 7 repeticiones $\pm$ SE.....	123
Tabla 4.7: Concentración de nutrientes ( $\text{mg kg}^{-1}$ de peso seco) en hojas de melocotonero control y deficientes en hierro. Los análisis se hicieron considerando dos estados de desarrollo de las hojas: viejas y jóvenes (medias $\pm$ error estándar de 10 ensayos)	124
Tabla 4.8: Concentración foliar de pigmentos fotosintéticos ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) de hojas de melocotonero control y deficientes en hierro. Los valores son la media de 10 ensayos $\pm$ error estándar. ....	128

---

Tabla 4.9: Parámetros más importantes de cinéticas de fluorescencia para hojas viejas y jóvenes de melocotonero control y deficiente en hierro. Los valores son la media de 10 experimentos $\pm$ error estándar. ....	133
Tabla 4.10: Concentración de nutrientes en hojas de soja control y deficientes en manganeso. Los análisis se hicieron considerando dos estados de desarrollo de las hojas: viejas y jóvenes (medias $\pm$ error estándar de 7 experimentos). ....	135
Tabla 4.11: Concentración foliar ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) de pigmentos fotosintéticos de hojas de soja ( <i>Glycine max</i> L.) control y deficientes en manganeso. Los análisis se hicieron considerando dos estados de desarrollo de las hojas: viejas y jóvenes (medias $\pm$ error estándar de 7 experimentos).....	136
Tabla 4.12: Parámetros de fluorescencia en hojas de soja deficientes en Mn y control, en dos estadios de desarrollo. Los datos son la media de 7 repeticiones $\pm$ error estándar. ....	137
Tabla 4.13: Concentración de hierro y manganeso ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en hojas de melocotonero control y deficientes en manganeso. Los análisis se hicieron diferenciando entre hojas: viejas y jóvenes (medias $\pm$ error estándar de 10 ensayos).....	140
Tabla 4.14: Concentración foliar de pigmentos fotosintéticos de hojas de melocotonero ( <i>Prunus persica</i> L.) control y deficientes en manganeso. Los análisis se hicieron diferenciando entre hojas: viejas y jóvenes (medias $\pm$ error estándar de 10 ensayos). ....	141
Tabla 4.15: Parámetros más importantes de fluorescencia para hojas viejas y jóvenes de melocotonero control y deficiente en manganeso. Los valores son la media de 10 experimentos $\pm$ error estándar. ....	141
Tabla 4.16: Efecto del patrón de injerto en la composición foliar de cerezo (Van). Los resultados están expresados en porcentaje de materia seca para N, P y K. Las concentraciones de Fe y Mn se expresan en $\text{mg Kg}^{-1}$ . ....	144
Tabla 4.17: Concentración foliar de pigmentos fotosintéticos ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) de hojas de cerezo ( <i>Prunus avium</i> L. cv Van) injertado sobre los tres patrones. Los datos son medias $\pm$ error estándar de 6 ensayos. ....	145

---

Tabla 4.18: Parámetros fotosintéticos en hojas de cerezo ( <i>Prunus avium</i> L. cv Van) injertado en tres patrones distintos. Los datos son la medias $\pm$ error estándar de 6 repeticiones.....	146
Tabla 4.19: Relaciones lineales entre la concentración foliar de clorofilas totales y la de pigmentos del ciclo VAZ ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ). En la tabla se muestran los parámetros de las rectas y su nivel de significación.....	195
Tabla 4.20: Coeficientes de correlación lineal entre los parámetros climáticos y % Z, VAZ/Chl y Chl a/b de las hojas de sol de las siete especies estudiadas.....	197
Tabla 4.21: Coeficientes de correlación lineal entre los parámetros climáticos y % Z, VAZ/Chl y Chl a/b de las hojas de sombra de las siete especies estudiadas.....	198

## 7.2 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Representación esquemática de las tres etapas de la fotosíntesis. La absorción de la luz produce la excitación de los pigmentos fotosintéticos. Los electrones son transferidos a través de una serie de moléculas, el  $\text{NADP}^+$  se reduce a NADPH; la formación de ATP también está acoplada a la transferencia de electrones. Las reacciones bioquímicas de la fotosíntesis se pueden llevar a cabo en la oscuridad y requieren 3 moles de ATP y 2 moles de NADPH por molécula de  $\text{CO}_2$  transformada en carbohidratos (Fuente: Nobel, 1991). ..... 3

Figura 1.2: Esquema de una célula vegetal con sus diferentes componentes. .... 5

Figura 1.3: Representación tridimensional de un cloroplasto. En el corte se ven las pilas de tilacoides que forman los grana. .... 7

Figura 1.4: Detalle de los apilamientos del tilacoide en el interior del cloroplasto. En la parte superior se muestran las representaciones esquemáticas y en la inferior, a la izquierda, la microfotografía electrónica de barrido en una muestra criofracturada y en la parte inferior derecha los apilamientos observados por microscopía de transmisión. .... 9

Figura 1.5: Detalle de la disposición superficial de los componentes funcionales de la cadena de transporte electrónico fotosintético (parte superior). En el esquema inferior se aprecia cómo están embebidos en la matriz lipídica de la membrana. De izquierda a derecha están representados el fotosistema II, el citocromo  $b_6f$ , el fotosistema I y la ATP asa. En azul se observa la plastocianina que se encuentra libre en el interior de la membrana. .... 10

Figura 1.6: Esquema de la transferencia de energía luminosa, a través de la antena, hasta los centros de reacción. .... 12

Figura 1.7: Estructura tridimensional del PSII. En el esquema se muestra una sección transversal de 15 Å. D1 está coloreada de azul, D2 de rojo, las clorofilas son verdes, las feofitinas amarillas,  $Q_A$  es azul claro,  $Q_B$  naranja, y el bicarbonato gris (Ruffle et al., 1992). .... 15

Figura 1.8: Representación del transporte lineal de electrones en la fotosíntesis. ....	16
Figura 1.9: Esquema de la distribución de los componentes del complejo citocromo $b_6f$ en la membrana del tilacoide. Embebidos en la membrana están el citocromo $b_6$ (rosa pálido), la subunidad IV (amarillo) y otras tres subunidades denominadas PetL, PetM y PetG (marrón claro). Una de ellas lleva unida la molécula de Chl a (verde). Hacia el lado del lumen se encuentran el citocromo f (rosa) y la proteína de Rieske (naranja). (Adaptado de Cramer et al., 1997). ....	17
Figura 1.10: Modelo esquemático del PSI en plantas superiores (Adaptado de Scheller et al., 1997). ....	18
Figura 1.11: Estructura de la molécula de clorofila .....	20
Figura 1.12: Esquema del flujo de energía fotónico en una hoja. ....	23
Figura 1.13: Reacciones fotoquímicas que se producen en el PSII. ....	25
Figura 1.14: Principio del análisis de quenching por el método de los pulsos saturantes. Dependiendo de las condiciones de la luz se pueden distinguir 5 estados diferentes que corresponden a los diferentes niveles de fluorescencia en la curva ( $F_0$ , $F_m$ , $F'_m$ , $F_s$ y $F'_0$ ). LM: luz modulada de medida; PS: pulso saturante; LA: luz actínica (blanca); FR: luz en el rojo lejano. ....	28
Figura 1.15: Estructura de la molécula de zeaxantina, anteraxantina y violaxantina. ....	34
Figura 1.16: Esquema simplificado de la organización de la membrana del tilacoide, en el que se indica la conexión entre la fotosíntesis y el ciclo de las xantofilas. Adaptado de Eskling et al. (1997). ....	36
Figura 3.1: Precipitación media de los últimos 30 años (área sombreada) y datos de la precipitación durante el periodo de estudio (barras verticales). Los datos corresponden a la estación del Servicio Meteorológico Nacional de Ayerbe (Huesca). ....	60

Figura 3.2: Temperatura máxima (cuadrados) y mínima (triángulos) del periodo de estudio y medias de los últimos 30 años (área sombreada). Los datos corresponden a la estación del Servicio Meteorológico Nacional de Ayerbe (Huesca).....	60
Figura 3.3: Fotografía de las tres especies del género <i>Quercus</i> estudiadas. ....	61
Figura 3.4: Fotografía de cuatro especies estudiadas.....	62
Figura 3.5: Cámara de cultivo con plantas de remolacha control (derecha) y clorótica (izquierda) en su tercera semana de desarrollo. ....	65
Figura 3.6. Cromatograma típico de los pigmentos estudiados tras su separación por HPLC. Los picos que se cuantificaron fueron:1- neoxantina, 2-violaxantina, 3- anteraxantina, 4-luteína, 5-zeaxantina, 6-clorofila b, 9- clorofila a, 12-β-caroteno. 80	
Figura 3.7: Esquema del sistema de luz modulada. ....	85
Figura 3.8: Fluorescencia de clorofila durante la iluminación con luz actínica y recuperación en la oscuridad del quenching no fotoquímico. ....	87
Figura 3.9. Pinza para hojas, suministrada con el fluorímetro PEA. ....	88
Figura 3.10. Esquema del sensor utilizado en la medida de fluorescencia con el fluorímetro portátil.....	89
Figura 3.11. Diagrama de una cámara de presión tipo Scholander, utilizada para determinar el potencial hídrico de los tallos. La presión va aumentando en el interior de la cámara hasta que empieza a salir agua por el extremo del corte del tallo. En ese momento la presión medida es igual y opuesta a la que tienen las hojas.....	90
Figura 4.1. Modelo de interconversión de violaxantina a zeaxantina, vía anteraxantina y localización de los principales componentes del aparato fotosintético en la membrana tilacoidal (adaptado de Hager y Holocher, 1994).....	97
Figura 4.2: Tilacoides de remolacha resuspendidos en soluciones de pH 5.3 y 7.5 y sometidos a distintos tratamientos tanto en la luz como en la oscuridad para comprobar la variación de la concentración de zeaxantina. ....	99

- 
- Figura 4.3: Variación de la concentración de Z (expresado en % respecto al resto de los componentes del ciclo VAZ) en discos de hojas de remolacha resuspendidos en la solución tampón del pH correspondiente durante 4 horas, tanto en oscuridad como iluminados. .... 102
- Figura 4.4: Variación de la concentración de Z (expresado en % respecto al resto de los componentes del ciclo VAZ) en discos de hojas de maíz resuspendidos en la solución tampón del pH correspondiente durante 4 horas, tanto en oscuridad como iluminados. .... 103
- Figura 4.5: Variación de la concentración de Z (expresado en % respecto al resto de los componentes del ciclo VAZ) en discos de hojas de remolacha clorótica resuspendidos en la solución tampón del pH correspondiente durante 4 horas, tanto en oscuridad como iluminados. .... 105
- Figura 4.6: Variación de la concentración de Z (expresado en % respecto al resto de los componentes del ciclo VAZ) en discos de hojas de maíz clorótico resuspendidos en la solución tampón del pH correspondiente durante 4 horas, tanto en oscuridad como iluminados. .... 106
- Figura 4.7: Variación del porcentaje de zeaxantina después de 10 minutos de luz saturante y 20 minutos de relajación, para tres intensidades diferentes..... 110
- Figura 4.8: Ejemplo de fluorescencia emitida por una hoja de cebada control (superior) y mutante (inferior). La primera parte corresponde al tiempo de iluminación y la parte final al tiempo de oscuridad aplicando pulsos saturantes para determinar el NPQ.110
- Figura 4.9: Comparación del NPQ en hojas de cebada control y deficiente en antena... 111
- Figura 4.10: Evolución del porcentaje de zeaxantina durante el tiempo de relajación. .. 112
- Figura 4.11: Manifestación de la clorosis de hierro en hojas de melocotonero. .... 118
- Figura 4.12: Relación entre la concentración de los pigmentos del ciclo VAZ y la cantidad de clorofila total en hojas de soja de plantas control y deficientes en hierro en dos estados de desarrollo. .... 122
-



Figura 4.13: Comparación del estado del ciclo VAZ entre plantas control y cloróticas de soja. ....	122
Figura 4.14: Aspecto de las hojas de melocotonero control y deficientes de hierro, en los dos momentos de desarrollo en los que se ha hecho el experimento. ....	126
Figura 4.15: Hierro activo extraído con $\alpha,\alpha'$ bipyridilo y evolución del oxígeno fotosintético en las hojas en función de la concentración de clorofila total. Las muestras se agruparon en control (símbolos negros), ligeramente deficientes (gris) y con deficiencia muy severa en hierro (blancos). ....	127
Figura 4.16: Variación de la relación Chl a/b en función de la concentración de clorofila total. ....	129
Figura 4.17: Relación entre clorofila a y $\beta$ -caroteno en hojas de melocotonero con distintos grados de clorosis ....	129
Figura 4.18: Variación de la relación xantofilas totales / Chl b en función de la concentración de clorofila total en hojas de melocotonero con distintos grados de clorosis. ....	130
Figura 4.19: Electroforesis desnaturalizante de membranas tilacoidales de hojas de melocotonero en tres niveles de deficiencia de hierro (S: severa, M: media, C: control). En la parte de la derecha se muestra después de teñir con TMBZ para detectar la actividad peroxidasa, y en la de la izquierda, el mismo gel tras teñirlo con azul de Coomassie. ....	132
Figura 4.20: Variación de la relación VAZ/Chl total en hojas de soja control y deficientes en manganeso en dos estadios de desarrollo. ....	137
Figura 4.21: Aspecto de las hojas de melocotonero control y deficientes de manganeso, en los dos momentos de desarrollo en los que se ha hecho el experimento. ....	139
Figura 4.22: Composición de los pigmentos del ciclo VAZ en los tres pies en los que se había realizado el injerto. ....	146

- 
- Figura 4.23: Diagrama de fenofases de *Quercus coccifera*, *Q. faginea* y *Q. rotundifolia* realizados durante los años 1997 y 1998 en las localidades de estudio (para más información ver Material y Métodos)..... 156
- Figura 4.24: Diagrama de fenofases de *Arbutus unedo*, *Buxus sempervirens*, *Pistacia lentiscus*, *P. terebinthus* realizados durante los años 1997 y 1998 en las localidades de estudio (para más información ver Material y Métodos)..... 157
- Figura 4.25: Relación entre el potencial hídrico a medio día y la concentración foliar de prolina en macetas de *Q. rotundifolia* sometidas a un ciclo de sequía ..... 158
- Figura 4.26: Variación de la concentración de prolina en las hojas de *Quercus rotundifolia* durante el periodo de muestreo. Las líneas verticales señalan el momento en que se han cogido hojas de la nueva cohorte. .... 159
- Figura 4.27: Variación del porcentaje de zeaxantina en hojas de *Quercus rotundifolia* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones..... 160
- Figura 4.28: Variación de la relación entre la concentración total de pigmentos del ciclo VAZ y la de clorofilas producidas por las hojas de *Quercus rotundifolia* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones. .... 161
- Figura 4.29: Variación de cantidad total de clorofilas en las hojas de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) de *Quercus rotundifolia* durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones. .... 162
- Figura 4.30: Separación por HPLC de pigmentos fotosintéticos de *Quercus rotundifolia*. El cromatograma de la izquierda corresponde a una muestra de sol y el de la derecha a una de sombra. En el centro se muestra ampliada la zona de violaxantina, taraxantina y anteraxantina de la muestra de sombra. .... 163
- Figura 4.31: Relación entre la concentración de prolina y el potencial hídrico en plantas de *Quercus coccifera* cultivadas en maceta y sometidas a un ciclo de sequía. (Datos de A. Vilagrosa) ..... 164

Figura 4.32: Variación de la concentración de prolina en las hojas de *Quercus coccifera* durante el periodo de muestreo en tres cohortes de hojas distintas..... 165

Figura 4.33: Variación del porcentaje de zeaxantina en hojas de *Q. coccifera* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones. .... 166

Figura 4.34 Variación de la relación entre la cantidad total de pigmentos del ciclo VAZ y la cantidad de clorofilas producidas por la hojas de *Q. coccifera* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones. .... 167

Figura 4.35: Variación de cantidad total de clorofilas producidas por las hojas de *Quercus coccifera* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones..... 168

Figura 4.36: Variación de la concentración de prolina en las hojas de *Quercus faginea* a lo largo del periodo de muestreo. .... 169

Figura 4.37: Variación del porcentaje de zeaxantina en hojas de *Q. faginea* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones. .... 170

Figura 4.38: Variación de la relación entre la cantidad total de pigmentos del ciclo VAZ y la cantidad de clorofilas producidas por la hojas de *Q. faginea* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones. .... 171

Figura 4.39: Variación de cantidad total de clorofilas producidas por las hojas de *Quercus faginea* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones..... 172

Figura 4.40: Detalle de una hoja de boj en noviembre de 1997 que había estado tapada por otra superior. .... 174

Figura 4.41: Variación de la concentración de prolina en las hojas de *Buxus sempervirens* durante el periodo de muestreo. .... 175

- 
- Figura 4.42: Variación del porcentaje de zeaxantina en hojas de *Buxus sempervirens* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones..... 175
- Figura 4.43: Variación de la relación entre la cantidad total de pigmentos del ciclo VAZ y la cantidad de clorofilas producidas por la hojas de *Buxus sempervirens* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones..... 176
- Figura 4.44: Variación de cantidad total de clorofilas producidas por las hojas de *Buxus sempervirens* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones. .... 177
- Figura 4.45: Variación de la concentración de prolina en las hojas de *Arbutus unedo* a lo largo del periodo de muestreo. .... 178
- Figura 4.46: Variación del porcentaje de zeaxantina en hojas de *A. unedo* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones. .... 179
- Figura 4.47: Variación de la relación entre la cantidad total de pigmentos del ciclo VAZ y la cantidad de clorofilas producidas por las hojas de sol de *Arbutus unedo* (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones. .... 180
- Figura 4.48: Variación de cantidad total de clorofilas producidas por las hojas de *Buxus sempervirens* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) a lo largo de un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones. .... 180
- Figura 4.49: Relación entre el contenido en prolina y el potencial hídrico en hojas de *Pistacia lentiscus*. (A. Vilagrosa, comunicación personal). .... 181
- Figura 4.50: Variación de la concentración de prolina en las hojas de *Pistacia lentiscus* durante el periodo de muestreo..... 182
-

Figura 4.51: Variación del porcentaje de zeaxantina en hojas de sol de *Pistacia lentiscus* (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones..... 183

Figura 4.52: Variación de la relación entre la cantidad total de pigmentos del ciclo VAZ y la cantidad de clorofilas producidas por las hojas de sol de *Pistacia lentiscus* (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones..... 183

Figura 4.53: Variación de cantidad total de clorofilas producidas por las hojas de sol de *Pistacia lentiscus* (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones..... 184

Figura 4.54: Variación de la concentración de prolina en las hojas de *Pistacia terebinthus* durante el segundo año del periodo de muestreo. .... 185

Figura 4.55: Variación del porcentaje de zeaxantina en hojas de sol de *P. terebinthus* (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones..... 186

Figura 4.56: Variación de la relación entre la cantidad total de pigmentos del ciclo VAZ y la cantidad de clorofilas producidas por las hojas de sol de *P. terebinthus* (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones. .... 187

Figura 4.57: Variación de cantidad total de clorofilas producidas por las hojas de sol de *P. terebinthus* de sol (símbolos oscuros) y de sombra (claros) durante un periodo de dos años. Los datos son la media de tres repeticiones..... 188

Figura 4.58. Relación entre clorofilas y pigmentos del ciclo VAZ en las hojas de sol de las siete especies..... 189

Figura 4.59: Relación entre clorofilas y pigmentos del ciclo VAZ en las hojas de sombra de las siete especies. .... 190

Figura 4.60: Relación entre la cantidad total de clorofilas y la de pigmentos del ciclo VAZ ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) en hojas de sol de las tres especies del género *Quercus*. Los

- 
- símbolos negros corresponden a *Q. rotundifolia*, los grises a *Q. coccifera* y los blancos a *Q. faginea* ..... 191
- Figura 4.61: Relación entre la cantidad total de clorofilas y la de pigmentos del ciclo VAZ ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) en hojas de sombra de las tres especies del género *Quercus*. Los símbolos negros corresponden a *Q. rotundifolia*, los grises a *Q. coccifera* y los blancos a *Q. faginea*. ..... 192
- Figura 4.62: Relación entre la cantidad total de clorofilas y de pigmentos del ciclo VAZ ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) en las hojas de sol. Símbolos negros *Buxus sempervirens*, grises *Pistacia lentiscus*, cuadros blancos *Arbutus unedo* y cuadros negros *P. terebinthus*..... 193
- Figura 4.63: Relación entre la cantidad total de clorofilas y de pigmentos del ciclo VAZ ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) en las hojas de sombra. Símbolos negros *Buxus sempervirens*, grises *Pistacia lentiscus*, cuadros blancos *Arbutus unedo* y cuadros negros *P. terebinthus*. ..... 194