

*Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas  
Facultad de Biología  
Universidad de la Habana  
Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, INCA*

**EFEECTO DE LAS ALTAS TEMPERATURAS EN LA  
ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA, Y  
PROCESOS RELACIONADOS CON ÉSTA, EN  
PLANTAS DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum*  
Mill.).**

*Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias  
Biológicas*

**Autor. MSc. Daymi Mercedes Camejo López  
Tutores. Dr. Walfredo Torres de la Noval  
Dr. Juan José Alarcón Cabañero**

**La Habana, 2005**

*Dedicatoria*

*A la memoria de mi hermano Antonio **B. Monzón López**,  
a quien la vida **m** le dio la oportunidad de ver el final*

No quisiera concluir sin antes **agradecer**, muy brevemente, la ayuda y colaboración que he recibido en estos años de trabajo de tesis.

Mis agradecimientos a:

Mi tutor de tesis y de profesión **Dr. Walfredo Torres de la Noval**, por los largos años dedicados a mi formación profesional. Sus exigencias, en ocasiones incomprendidas, se convirtieron en el mayor aporte a mi formación científico-profesional. Gracias por todo el tiempo dedicado a la revisión minuciosa del trabajo de tesis. Muchas gracias por darme el orgullo de contar con un buen tutor y consejero.

Y mi tutor de tesis **Dr. Juan José Alarcón Cabañero** por aceptarme como su estudiante de doctorado, aun cuando sólo conocía mi nombre y el tema de investigación que me proponía se convertía en un reto. Gracias por el tiempo dedicado a la discusión y revisión del trabajo de tesis, por sus opiniones siempre bienvenidas y por la ayuda brindada hasta los pasos finales de impresión del documento. Muchas gracias por no sentir la ausencia de un tutor.

El **Dr. Arturo Torrecillas** por abrir no solo las puertas de su laboratorio a mi investigación sino por ofrecerme su amistad: Le agradezco la oportunidad de contar con toda la riqueza material y personal que contenía su laboratorio, y por la ayuda brindada, soportada solo por la única ilusión de obtener un buen trabajo. Gracias por la hospitalidad de usted y su familia.

La **Dr. Francisca Sevilla Valenzuela**, para quien mis palabras no logran agradecer su ayuda y colaboración en la investigación, para quien siempre abrió las puertas de su laboratorio sin compromiso ni interés alguno, para quien dedicó tiempo a la revisión y discusión de los resultados de este trabajo de tesis. Muchas gracias por tenerla dicha de trabajar con su grupo de investigación.

La **Dra. Miriam Núñez** por sus consejos sabios, por las sugerencias ofrecidas en cada revisión de este documento, por seguir tan de cerca este trabajo de tesis. Gracias por los señalamientos y elogios en cada presentación y sobre todo por su ejemplo de dedicación y amor al trabajo.

La **Dra. Inés Reinaldo** y el **Dr. Donald Morales** por la revisión del trabajo de tesis y sus opiniones, las que hoy hacen posible la presentación de este trabajo. Gracias a el **Dr. José Dell'Amico** y el **Dr. Pedro Rodríguez** por incluirme en su proyecto de investigación, lo que contribuyó al desarrollo exitoso del trabajo experimental. Muchas gracias al **Dr. Pedro Rodríguez** por su amistad.

La **Dra. Rosa Rodés** y el **Dr. Eduardo Ortega**, para quienes mis palabras no alcanzan expresar mi agradecimiento por tenerla dicha de contar con sus sugerencias, las que se convirtieron en nuevos retos a alcanzar. Muchas gracias por darme la oportunidad de interrumpir sus horas de ocio.

El **Dr. Ramiro Valdés** por su ayuda incondicional y las excepcionales sugerencias brindadas no solo para el trabajo de tesis sino para vida profesional. Para el **Dr. Roberto de Arma**, profesor; maestro, seguidor y defensor de la fisiología vegetal; gracias por tener el orgullo de contar con sus opiniones y recomendaciones.

A la **Dr. María Caridad Nápoles** por todo el apoyo institucional brindado, por contar con sus experiencias, traducidas en consejos y sobre todo por mostrarme una sincera amistad que trascenderá momentos tan breves como este trabajo de tesis.

Todo el personal del laboratorio del departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, en especial a **Elisa, Marisol, Jorge Luis Menéndez (Yoyi), Idamel, Wicho, Lisbet, Daymi Costales** y **Luis Miguel**. Gracias a **Mantea Mora**, queridamente llamada **Mara**, y **Gisela Martínez** por ser tan buenas amigas. Gracias a todos mis compañeros del departamento de matemática por ser excepcionales y muy solidarios, al **Dr. Alberto Caballero Núñez** imprescindible en cada análisis de los datos y por contar con su ayuda tanto profesional como familiar. A **Barbarita, Yamila** y **María Mariana** por la ayuda brindada en la impresión y fotocopia del trabajo de tesis.

*Ni agradecimiento al departamento de Riego y Salinidad del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, muy en especial a Dra. María de Jesús (Quechu) por hacerme sentir parte de su familia. A la Dra. María Fernanda Ortuño, Dra. María Ángeles Morales y la Lic. Alejandra por su ayuda en la obtención de los resultados. Gracias a María Fe por ofrecerme su amistad. Al Dr. Emilio Nicolás por su solidaridad y por simplificar los agobios adicionales de la marcha experimental. Muchas gracias por el tiempo dedicado al análisis y procesamiento de los datos y por contar con su ayuda. A todos mis compañeros del departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal por hacerme parte de su grupo, a la Dr. Ana Jiménez por guiar y ampliar mis conocimientos en el campo de la bioquímica vegetal y por disponer siempre de sus criterios y sugerencias. A Loby, Marianne y Beluca, gracias por sentirse parte de mi tesis y lograr que el laboratorio se convirtiera en un lugar agradable.*

*Gracias a todos mis amigos por tener la dicha de contar con su preocupación, su ayuda material y la más importante emocional:*

*Para todos los miembros del Consejo Científico del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas y de la Facultad de Biología, muchas gracias por sus sugerencias que solo tributaron a mejorar el trabajo de tesis.*

*Para mi Madre y mi hermano Antonio, mi eterno agradecimiento por todos los años dedicados a mi educación y todo el cariño que siempre he tenido en demasía. A mi hermano Maykel por contar con su cariño, ayuda y responsabilidad, lo que hizo posible que hoy este trabajo se trajera a la consideración de éste tribunal. Para toda mi familia gracias por ayudarme en este momento tan difícil de mi vida personal y profesional.*

*Para mi esposo Alberto Caballero Martínez, gracias por prescindir de mi presencia en momentos importantes de su vida, por tanta paciencia y amor, por comprender y tolerar todas mis angustias, por tener en quien confiar, por tener siempre un amigo.*

*Mi agradecimiento al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas y a su director José Roberto Martín Triana por ser excepcionalmente confiado en los jóvenes que acoge.*

*Hoy muchas gracias a todos los presentes, a los oponentes y al Tribunal de Grado.*

*MUCHAS GRACIAS*

## SÍNTESIS

Plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*. Mill) crecieron en condiciones controladas de temperatura, intensidad luminosa y humedad relativa. Cuando las plantas presentaron treinta días de edad se expusieron a distintos tratamientos de alta temperatura; para evaluar la funcionalidad del aparato fotosintético. Se observó que la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> se modificó de forma diferenciada en los genotipos estudiados, y ésta no estuvo relacionada, en todos los casos, con limitaciones estomáticas. Los resultados permitieron establecer que ante el incremento de la temperatura el genotipo termo-sensible (valorado a partir de la funcionalidad del aparato fotosintético) respondió con un incremento en la conductancia estomática, mientras que los que mostraron una moderada y eficiente termo-tolerancia respondieron con un cierre estomático. Por otra parte, se demostró que la capacidad de carboxilación de la Rubisco, dependiente de las propiedades cinéticas de la enzima y del transporte de electrones, se redujo en aquellos tratamientos que provocaron una reducción en la fotosíntesis neta. Del mismo modo, el análisis de fluorescencia de clorofila constituyó un indicador sensible de las afectaciones en la cadena transportadora de electrones. No se encontró una relación entre termo-tolerancia y capacidad antioxidante; sin embargo se comprobó que no todos los sistemas antioxidantes enzimáticos presentan similar susceptibilidad al incremento de la temperatura. La actividad de la enzima Superóxido Dismutasa demostró ser extremadamente sensible al incremento de la temperatura, aunque las modificaciones detectadas en las isoformas de la Fe-SOD parecen relacionarse con la protección de los cloroplastos, en ambos genotipos. Por el contrario, la actividad de la Ascorbato Peroxidasa y la Catalasa mostraron una mayor estabilidad ante el incremento de la temperatura. De forma general, se demostró que la forma de aplicar el estrés modula la respuesta del aparato fotosintético, independientemente de la tolerancia del genotipo. Se propone un modelo biológico para el estudio de la tolerancia al calor en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*. Mill).

## Listado de Abreviaturas

A	Tasa de asimilación de CO <sub>2</sub>
gl	Conductancia estomática
Tr	Transpiración
Ci	Concentración interna de CO <sub>2</sub>
Vcmax	Velocidad máxima de carboxilación de la enzima Rubisco
Jmax	Velocidad máxima de transporte electrónico
Ac	Tasa de carboxilación limitada por la enzima Rubisco
Aq	Tasa de carboxilación limitada por la regeneración del sustrato
FS <sub>II</sub>	Fotosistema II
qP	Quenching fotoquímico
qN	Quenching no fotoquímico
Fo	Fluorescencia inicial
Fm	Fluorescencia máxima
Fv	Fluorescencia variable
Fv/Fm	Eficiencia fotoquímica del FS <sub>II</sub>
Ψh	Potencial hídrico
Ψp	Potencial de turgencia
SOD	Superóxido dismutasa
Cu/Zn-SOD	Superóxido dismutasa cupro zinc
Fe-SOD	Superóxido dismutasa férrica
Mn-SOD	Speróxido dismutasa manganesa
APX	Ascorbato peróxidasa
CAT	Catalasa
MDA	Malondialdehido

## 1- INTRODUCCIÓN

La emisión de gases a la atmósfera, particularmente el anhídrido carbónico, el metano, el clorofluorcarbono y el óxido nitroso se incrementan en nuestros días por la actividad humana. Los modelos de circulación global predicen que estos gases atmosféricos son los responsables del aumento, en la actualidad y en un futuro, de la temperatura media global estimándose incrementos de 0,3°C por década, durante los próximos cien años, con una incertidumbre de 0,2 a 0,5% (Houghton *et al.*, 1990). El anhídrido carbónico producido por los combustibles fósiles es el más común de los llamados "gases de invernadero", a cuya concentración en la atmósfera se le atribuye el calentamiento terrestre.

El incremento de la temperatura ambiental constituye una de las mayores limitaciones en el desarrollo de los cultivos en un ambiente tropical (Mariamma *et al.*, 1997). La respuesta diferencial de los procesos de la fotosíntesis y la respiración bajo condiciones de temperaturas supraóptimas reviste fundamental importancia, ya que de su balance dependerá la mayor o menor disponibilidad de asimilatos que se destinen para las diferentes funciones de la planta.

La fotosíntesis, como todos los procesos fisiológicos, depende de la temperatura, existiendo una temperatura óptima, a la cual su capacidad es máxima; temperaturas superiores o inferiores a la óptima resultan en una reducción en los valores de fotosíntesis. Diferentes componentes del aparato fotosintético y procesos metabólicos asociados a éste son sensibles a las altas temperaturas. Se ha señalado que el fotosistema II es sensible al calor (Havaux y Tardy, 1996; Heckathorn *et al.*, 1997), pero puede aclimatarse al estrés de calor (Havaux, 1993). Recientemente se ha señalado que una proteína de choque térmico localizada en los cloroplastos protege al fotosistema II de los daños provocados por las altas temperaturas (Heckathorn *et al.*, 1998).

Sin embargo, se debe señalar que la dependencia de los distintos componentes del aparato fotosintético con la temperatura, no es necesariamente la misma en todas las especies de plantas. Cambios breves de temperatura (de minutos a horas) pueden afectar en mayor o menor medida la fotosíntesis (Makino *et al.*, 1994). Existen evidencias que confirman que la exposición de las plantas a condiciones de estrés de

calor reversible y rápida reducen la activación de la enzima Rubisco dependiente de la luz, inhibiendo la actividad de la enzima Rubisco activasa (Feller *et al.*, 1998). Estudios recientes han señalado que la reducción de la actividad de la Rubisco es el sitio primario de acción de las altas temperaturas (Weis, 1981; Feller *et al.*, 1998 y Law y Crafs-Brandner, 1999).

Es conocido que en las plantas, los niveles de especies reactivas de oxígeno, como el superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, se incrementan durante periodos de estrés ambiental (Doke *et al.*, 1994; Asada, 1994; Foyer *et al.*, 1997; Dat *et al.*, 1998). El incremento en las especies reactivas de oxígeno es una respuesta típica de las plantas al estrés abiótico y biótico (Foyer *et al.*, 1997). Este fenómeno es particularmente crítico en los tejidos fotosintéticos, donde la concentración de oxígeno interno se mantiene a niveles elevados, y la producción de especies reactivas de oxígeno se ve favorecida en condiciones de temperaturas adversas. Diferentes sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos sirven como primera línea de defensa contra los metabolitos potencialmente citotóxicos de oxígeno. La enzima Superóxido Dismutasa es la enzima encargada de eliminar el superóxido presente en la célula, y su acción enzimática resulta en la formación de peróxido de hidrógeno. Las enzimas Catalasa, Ascorbato Peroxidasa y una variedad de peroxidases no específicas, catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno.

En varios de los trabajos desarrollados con la finalidad de evaluar el efecto de las altas temperaturas en los aspectos de la fisiología y bioquímica de plantas de tomate (*Lycopersicon*), se han encontrado una respuesta diferencial entre genotipos, atendiendo a su tolerancia ante esta condición de estrés (Dinar y Rudich, 1985; Iglesias, 1994; Florido *et al.*, 1996). Es de señalar que la mayoría de las variedades de tomate, además de ser originarias de zonas frescas, han sido mejoradas en zonas templadas, por lo que ellas no fructifican si la temperatura del día y la noche llegan a 30 y 23°C, respectivamente, y tales condiciones son frecuentes en los trópicos, donde como consecuencia el tomate es un cultivo difícil de desarrollar (Villareal, 1982).

En la actualidad, estudios disímiles se han centrado en la búsqueda de soluciones o alternativas que permitan atenuar el efecto de los Cambios Globales en la producción agrícola. En Cuba, se desarrolla un programa de Mejoramiento Genético, por vía clásica y biotecnológica para la obtención de nuevos genotipos de tomate que resulten

tolerantes a condiciones climáticas adversas, para así propiciar el cultivo del mismo en épocas donde las altas temperaturas, la alta intensidad luminosa, la humedad y las enfermedades, no permiten su cultivo.

Dada la importancia del cultivo del tomate en Cuba, así como la necesidad de contar con un criterio biológico que suministre mayor información sobre el sistema en el momento de la selección, en el trabajo se planteó la siguiente **problemática**: *¿En qué medida los componentes estomático y mesofílico, así como el metabolismo oxidativo, están involucrados en los mecanismos de tolerancia al calor de plantas de tomate?*

Teniendo en cuenta la problemática existente, se propuso la siguiente **hipótesis** de trabajo: *Los componentes estomático y mesofílico, así como el metabolismo oxidativo, participan en diferente medida en los mecanismos de tolerancia al calor de diferentes genotipos de tomate.*

Para confirmar o refutar la misma se planteó como **objetivo general**: *Determinar los efectos que provocan distintas condiciones de alta temperatura en la actividad fotosintética, y el metabolismo oxidativo, en diferentes genotipos de tomate, asociándolos a los mecanismos de termotolerancia.*

Los **objetivos específicos** propuestos para cumplimentar el objetivo general fueron los siguientes:

- 1- *Evaluar la termotolerancia del aparato fotosintético de plantas expuestas a distintas condiciones de alta temperatura, en tres genotipos de tomate.*
- 2- *Determinar algunas variables fisiológicas y bioquímicas relacionadas con las funciones fotosintéticas, que expliquen los mecanismos de tolerancia en cada genotipo.*
- 3- *Determinar el efecto de una temperatura moderadamente elevada en condiciones de oscuridad, sobre las funciones fotosintéticas y el metabolismo oxidativo, de plantas expuestas a una condición de alta temperatura.*
- 4- *Evaluar el efecto de un período breve de alta temperatura foliar en la funcionalidad del aparato fotosintético.*

Las **novedades científicas** logradas en este trabajo fueron:

- 1- *Se describe por primera vez, la tolerancia del aparato fotosintético de un genotipo nuevo de tomate y uno silvestre termotolerante.*

- 2- *Se demuestra que la termotolerancia y la aclimatación del proceso de fotosíntesis del genotipo mejorado y silvestre, respectivamente, están diferencialmente controladas por la velocidad máxima de carboxilación de la enzima Rubisco y el transporte electrónico.*
- 3- *Se hace uso de técnicas novedosas (fluorescencia de clorofilla) para localizar a que nivel de la cadena transportadora de electrones se estableció la tolerancia o la susceptibilidad al calor, en los genotipos de tomate estudiados.*
- 4- *Se propone un modelo biológico para el estudio de los mecanismos de tolerancia a las altas temperaturas del aparato fotosintético, en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*. Mill).*

**Importancia teórica:** *En el desarrollo de este trabajo se determinó que la tolerancia o aclimatación del componente mesofílico define la tolerancia al calor de la fotosíntesis en las especies estudiadas. Se demostró que los sistemas antioxidantes enzimáticos estudiados no están relacionados con la tolerancia del aparato fotosintético, excepto la isoenzima Fe-SOD la que parece tener un papel protector en los cloroplastos. Se logró obtener un modelo biológico para explicar la tolerancia de las funciones fotosintéticas al calor, en plantas de tomate de la especie *Lycopersicon esculentum*. Mill.*

**Importancia práctica:** *Los resultados de este trabajo constituyen un conocimiento biológico útil a tener en cuenta a la hora de obtener y seleccionar nuevos genotipos de tomate tolerantes a las altas temperaturas. Se propone el análisis de la fluorescencia de clorofila **a** como un método rápido y no destructivo para la selección de nuevos genotipos tolerantes al calor, en condiciones de campo. Se demuestra que el genotipo *Amalia*, el cual está ampliamente introducido en la producción nacional, es moderadamente tolerante a condiciones de alta temperatura, lo cual favorece su siembra en épocas no óptimas.*

Los resultados de este trabajo han sido publicados en diferentes revistas y presentados en congresos científicos y formaron parte del proyecto “Efecto del estrés abiótico inducido por los Cambios Globales en la biología de dos especies económicamente importante”, correspondiente al Programa Nacional de Ciencia y Técnica.

Esta tesis fue predefendida ante el Consejo Científico de la Facultad de Biología, Universidad de la Habana.

## 2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Estrés por altas temperaturas. Aspectos generales.

Las plantas superiores son incapaces de mantener sus células, tejidos u órganos a una temperatura óptima constante (a diferencia de los animales) y atendiendo a la elevada dependencia que presentan los procesos fisiológicos y bioquímicos con ésta, las plantas se afectan profundamente por cambios en la temperatura ambiente.

Fitter y Hay (1989) señalaron que la temperatura de una hoja depende de:

- La hora del día (variación regular diurna).
- Mes del año (variación regular estacional).
- Nubosidad y velocidad del viento (variación irregular a corto plazo).
- Posición dentro del follaje (hojas de “sol” y de “sombra”).
- Altura sobre la superficie del suelo.
- Formas y dimensiones de la hoja (a lo que se pudiera agregar el ángulo de inserción con relación al tallo).

Mientras que la temperatura de la raíz depende, además de los dos primeros aspectos, de:

- Profundidad por debajo de la superficie del suelo.
- Propiedades del suelo y la transferencia de calor a través del mismo (por ejemplo: contenido de humedad, densidad, color, cubierta vegetal).

Los anteriores aspectos ponen de manifiesto la gran variabilidad térmica a la que puede estar sometida una planta en su ciclo de vida.

La respuesta de la intensidad con que transcurre cualquier proceso fisiológico o bioquímico ante un rango de temperaturas se representa por una curva asimétrica (Verwijst y von Fircks, 1994), de la cual se pueden destacar tres temperaturas fundamentales: la mínima y la máxima, a las cuales el proceso cesa completamente, y la temperatura óptima, donde se logra la mayor intensidad del proceso. Algunos autores señalan, la existencia de un rango óptimo de temperatura, en la que la intensidad del proceso fisiológico o bioquímico se encuentra dentro del 90 % de la intensidad máxima. Otros, sin embargo, han identificado una condición de estrés cero, la cual se establece cuando existen las condiciones óptimas para el crecimiento y desarrollo de la planta, y

ésta puede variar según la especie en cuestión (Hale y Orcutt, 1987 y Maham *et al.*, 1995).

Esta respuesta característica de los organismos vivos está dada por el hecho de que la temperatura afecta los procesos en dos formas sustancialmente antagónicas. Primero, a medida que la temperatura de la célula vegetal se eleva, la velocidad del movimiento (vibracional, rotacional y traslacional) de las moléculas se incrementa, provocando un aumento en la intensidad de los procesos. Sin embargo, virtualmente todos los procesos del vegetal están catalizados por enzimas, y éstas dependen de una estructura y disposición espacial determinada para su normal funcionamiento, que se pierde cuando la temperatura aumenta más allá del rango óptimo. De esta forma, cuando la temperatura aumenta por encima de la temperatura óptima, la intensidad de los procesos disminuye.

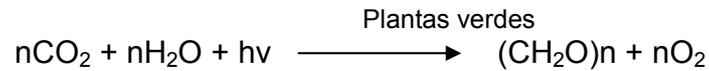
Levitt (1980) señaló cuatro efectos fundamentales que produce el aumento de la temperatura por encima del rango óptimo (estrés por altas temperaturas), estos son:

- La respuesta diferenciada de las velocidades de reacción, debido a diferencias en la energía de activación de las mismas.
- Desnaturalización y agregación de las proteínas.
- Hiperfluidez de los lípidos de las membranas.
- Descomposición química directa.

Todos ellos se traducen en daños al vegetal en dependencia de la rapidez de su aparición, entre los que se encuentran: la inhibición del crecimiento (Wheeler *et al.*, 1997, Leithold *et al.*, 1997), el agotamiento de las reservas (Aloni *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1991), la acumulación de elementos tóxicos (Asada, 1999), lesiones bioquímicas (Rank *et al.*, 1991), descomposición de proteínas, eflujo de iones (Gong *et al.*, 1998) y pérdida de la semipermeabilidad de la membrana (Tudela y Tadeo, 1993).

## **2.2 Fotosíntesis. Aspectos generales**

La fotosíntesis es uno de los procesos fundamentales en la vida de nuestro planeta, por la cual la energía luminosa se convierte en energía química. La fotosíntesis es un proceso de óxido-reducción en el que el donador de electrones (el agua) se oxida, y un aceptor se reduce (ya sea el anhídrido carbónico u otro compuesto adecuado).



En plantas superiores, los cloroplastos son orgánulos subcelulares donde se realiza el proceso de fotosíntesis. Su tamaño es generalmente grande (5-10µm de diámetro) lo que permite observarlo al microscopio óptico, mientras que los detalles de la organización estructural requieren la utilización de técnicas más avanzadas de la microscopía electrónica.

En la estructura interna de los cloroplastos se puede observar una serie de estructuras laminares de doble membrana bañadas por una matriz (estroma) y todo ello rodeado de una doble membrana que constituye la envoltura del cloroplasto. Estas laminillas del cloroplasto reciben el nombre de “tilacoides” y se disponen paralelamente entre sí con respecto al eje mayor del cloroplasto. Los tilacoides se organizan en un conjunto de sacos aplanados, de manera que su interior está intercomunicado. Estos sacos se empaquetan formando apilamientos que reciben el nombre de “grana”. El interior de los tilacoides recibe el nombre de “lumen” (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

Esta organización estructural de los cloroplastos garantiza el adecuado funcionamiento de la fotosíntesis, tanto los pigmentos como los sistemas transportadores de electrones y la formación de ATP se encuentran en las membranas de los tilacoides (Azcón-Bieto y Talón, 2000). En el estroma se localizan las enzimas que llevan a cabo la conversión de CO<sub>2</sub> en carbohidratos usando la energía química y el poder reductor producido (ATP y NADP H<sup>+</sup>) en los tilacoides.

Los avances en la comprensión de los procesos involucrados en la fotosíntesis han conducido a un incremento en el uso de modelos basados en los procesos que determinan la asimilación de CO<sub>2</sub>. Estos modelos están fundamentados en mecanismos biofísicos y requieren del cálculo de muchas variables y parámetros. A principio de la década de los 80 un grupo de investigadores desarrollaron modelos fisiológicos de la fotosíntesis de la hoja completa, basados en la cinética enzimática, en la cadena de transporte electrónico y en los requerimientos de energía necesarios para la generación de la ribulosa bifosfato (RuBP) (Farquhar *et al.*, 1980; von Caemmerer y Farquhar, 1981; Farquhar y von Caemmerer, 1982). A partir de estos modelos desarrollados,

Farquhar *et al.*, (1980) describieron los procesos que limitan la asimilación del CO<sub>2</sub>, partiendo del conocimiento general de que la reducción fotosintética del carbono y la oxidación fotorespiratoria del carbono están unidas por una enzima común, ribulosa bifosfato carboxilasa / oxigenasa (Rubisco). La velocidad de carboxilación y oxigenación de esta enzima esta dada, según Farquhar (1979) por:

$$V_c = V_{cmax} \times \frac{C_i}{1 + C_i/K_c + O_i/K_o} \frac{1}{1 + R/K' r}$$

$$V_o = V_{omax} \frac{1 + C_i/K_c + O_i/K_o}{1 + R/K' r}$$

donde  $V_{cmax}$  y  $V_{omax}$  son las velocidades máximas de carboxilación y oxigenación, respectivamente,  $C_i$  y  $O_i$  son las presiones parciales de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, respectivamente, en equilibrio con su concentración disuelta en el estroma de los cloroplastos;  $K_c$  y  $K_o$  son las constante de Michaelis-Menten para el CO<sub>2</sub> y el O<sub>2</sub>,  $R$  es la concentración de RuBP libre y  $K' r$  es la constante de Michaelis-Menten para la RuBP.

A partir de estos modelos, Farquhar *et al.* (1980) concluyeron que diferentes factores pueden limitar los valores de carboxilación de la enzima “*in vivo*” entre los que señalan, primeramente, las presiones relativas de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, las que determinan la carboxilación y oxigenación de la enzima; segundo, la cantidad de enzima activada presente, la que determina la velocidad máxima de carboxilación ( $V_{cmax}$ ); y tercero, los valores de regeneración del aceptor RuBP, que determinan la concentración libre de RuBP. La regeneración de la RuBP está usualmente limitada por el suplemento de NADP H<sup>+</sup> y ATP.

Los valores de producción de NADP H<sup>+</sup> y ATP dependen de los valores de transporte electrónico fotosintético ( $J$ ), definido según (Farquhar *et al.*, (1980) como:

$$J = 0,5 (1 - f) I$$

donde  $I$  es el flujo de fotones absorbidos y  $f$  la fracción de luz perdida por absorción de otros componentes, la que depende de la temperatura y el flujo de cuantos. Dos electrones más dos protones son requeridos para convertir el NADP<sup>+</sup> a NADPH+H<sup>+</sup>. El valor potencial de producción de NADP H<sup>+</sup> es  $J/2$ . Sin embargo, en la práctica, el flujo de electrones y la producción de NADP H<sup>+</sup> están limitados, en ocasiones, por la disponibilidad de ADP y NADP<sup>+</sup> (Farquhar *et al.*, 1980).

### 2.2.1 Clorofilas y pigmentos

Los pigmentos fotosintéticos, clorofilas y carotenoides pertenecen al grupo de los lípidos isoprenoides de las plantas.

Las clorofilas de las plantas superiores son: la clorofila **a** (MM = 893,4), que es la mayoritaria, y la clorofila **b** (MM = 907,4) que se encuentra en menor cantidad. Las clorofilas **a** y **b** poseen una cadena fitol que está unida a un anillo de porfirina que contiene un átomo de Mg en su centro y unas cadenas laterales que le dan su carácter lipídico. La relación entre ambas clorofilas depende de la condición ambiental y de crecimiento, siendo entre 3 y 4 en las plantas que han crecido bajo alta intensidad de luz y de 2,5 a 3 en las plantas que crecieron en condiciones de poca intensidad de luz (Lichtenthaler, 1987).

Los carotenoides, por su parte, pueden dividirse en dos grupos: el primero formado por el  $\alpha$ -caroteno y el  $\beta$ -caroteno, que no contienen átomos de oxígeno en su estructura y un segundo grupo que incluye a los carotenoides llamados xantofilas, los cuales contienen oxígeno en forma de uno o varios grupos hidroxilos o epóxidos, entre ellos se encuentran la violaxantina, anteraxantina, zeaxantina, luteína, neoxantina y el epóxido de leuteína (Lichtenthaler, 1987; Siefermann-Harms, 1985).

Los carotenoides que aparecen en mayor cantidad en los cloroplastos funcionales de las plantas superiores son el  $\beta$ -caroteno, luteína, violaxantina y neoxantina. Ellos funcionan no solo como pigmentos accesorios captadores de luz, como es el caso de la luteína y la neoxantina los cuales amplían el rango de absorción de longitudes de ondas utilizables para la fotosíntesis, sino que algunos presentan funciones protectoras en el aparato fotosintético, como es el caso del  $\beta$ -caroteno y la violaxantina, anteraxantina y zeaxantina que conforman el ciclo de las Xantofilas, a los cuales se le han asignados un papel en la protección de la fotooxidación de la clorofila **a** (De las Rivas *et al.*, 1993).

Sus proporciones pueden variar por diversas causas, entre ellas estrés ambiental. La zeaxantina, que se produce por la de-epoxidación de la violaxantina vía anteraxantina, se presenta en plantas expuestas a altas intensidades de luz y estrés nutricional (Abadía, 1992). En condiciones de intensidades luminosas altas y un gradiente de pH elevado a través de las membranas de los tilacoides, la presencia de la zeaxantina y posiblemente la anteraxantina, formadas a partir de la violaxantina, facilita

la disipación térmica del exceso de energía de excitación en el fotosistema II (Horton *et al.*, 1996; Demmig-Adams y Adams, 1996). Si bien es conocida la función fotoprotectora de las xantofilas en el aparato fotosintético en condiciones de altas intensidades luminosas (Adams y Demmig-Adams, 1994; Thiele *et al.*, 1996; Horton *et al.*, 1996; Havaux, 1998; Barker *et al.*, 1998), las bases moleculares exactas de esta protección aun están por esclarecer (Montané *et al.*, 1997).

Los pigmentos fotosintéticos son compuestos solubles en grasas por lo que su extracción se puede realizar mediante solventes orgánicos como acetona, metanol o etanol, o bien en soluciones acuosas de dichos solventes, sin que excedan en un contenido de agua del 5 al 20%. Con contenidos mayores de agua no se extraen completamente los compuestos más apolares, tales como el  $\beta$ -caroteno. En los procedimientos de extracción, hay que tener en cuenta la alta sensibilidad de los carotenoides y las clorofilas a la destrucción por la luz, por lo que se recomienda su extracción en condiciones de poca luz.

### **2.2.2 Fotosistema II (FS<sub>II</sub>)**

El fotosistema II es un macro-complejo que, por su actividad bioquímica, puede ser denominado agua-plastoquinona óxido-reductasa, ya que enzimáticamente cataliza la oxidación del agua y la reducción de la plastoquinona, ambas fotoinducidas (Azcón-Bieto y Talón, 2000). En él suceden dos procesos de especial significación para el conjunto de la fotosíntesis: 1- La separación primaria de cargas, consecuencia de la transducción de energía luminosa en energía redox, es decir, la transformación del flujo fotónico en flujo electrónico. Con la primera separación de carga se inicia el transporte electrónico fotosintético. 2- La hidrólisis del agua, que da electrones y protones y también da lugar el oxígeno molecular liberado como producto residual de la reacción.

#### **2.2.2.1 Heterogeneidad del FSII**

En los años 70, se realizaron experiencias que demostraron mediante el análisis de la curva de fluorescencia variable una cierta heterogeneidad en el FS<sub>II</sub> (Melis y Homann, 1976) revelando la presencia de un componente rápido (FS<sub>II $\alpha$</sub> ) y otro lento (FS<sub>II $\beta$</sub> ), con

distinto tamaño de antena fotosintética y distintos potenciales redox del aceptor primario de electrones.

En 1983 Anderson y Melis demostraron que el grana contiene principalmente FS<sub>IIα</sub>, mientras que los tilacoides del estroma están enriquecidos en FS<sub>I</sub> y FS<sub>IIβ</sub>. Los centros FS<sub>IIβ</sub> tienen un menor tamaño de antena, carecen del “pool” de plastoquinona funcional y son considerados como precursores de las unidades α. Posteriormente encontraron que un 32% del FS<sub>II</sub> en las hojas presentaban una reoxidación muy lenta de la Q<sub>A</sub> y una antena con unas características similares a la de los centros del FS<sub>IIβ</sub> (Chylla y Whitmarsh, 1989). Se ha demostrado, además, la importancia de estos dos tipos de centros en la adaptación a distintos regímenes de luz (Harrison y Allen, 1993).

La heterogeneidad de los FS<sub>II</sub> está modulada por la intensidad lumínica, por la capacidad del sistema de utilizarla fotoquímicamente y por la temperatura (González *et al.*, 2001).

#### 2.2.2.2 Antena del Fotosistema II

Los componentes del sistema de antena del FS<sub>II</sub> se pueden dividir en tres grupos: 1- la antena interna (CP<sub>43</sub> y CP<sub>47</sub>) que no contienen clorofila **b**; 2- el complejo mayoritario de antena (LHC<sub>II</sub>) que contiene clorofila **a** y **b**; y 3- los complejos minoritarios de antena (CP<sub>29</sub>, CP<sub>26</sub> y CP<sub>24</sub>) que contienen clorofila **a** y **b**.

Las proteínas CP<sub>43</sub> y CP<sub>47</sub> son codificadas por genes cloroplásticos, tienen masas moleculares aparentes de aproximadamente 46 y 51 kDa, respectivamente y se unen entre 20-25 moléculas de clorofila **a**. El CP<sub>43</sub> contiene un solo β-caroteno y el CP<sub>47</sub> 2 β-caroteno (Sofrová *et al.*, 1992). Además de atribuirle un papel en la captación de la luz, se ha sugerido que actúan en el anclaje con el resto de las proteínas del FS<sub>II</sub>. Estos polipéptidos parecen tener 6 regiones que atraviesan la membrana y un largo “loop” hidrofílico en el lado del lumen tilacoidal (Debus, 1992).

El LHC<sub>II</sub> (denominado LHC<sub>IIb</sub> por Peter y Thornber, 1991) contiene cerca del 30% de la proteína y aproximadamente la mitad de la clorofila de los tilacoides. Su función en los tilacoides es de antena captadora de luz en el proceso de la fotosíntesis y de contribuir al apilamiento de los tilacoides para formar el grana. El LHC<sub>II</sub> presenta máximos de absorción en el rojo entre 675 y 653 nm aproximadamente y tiene una relación **a/b** de 1,0-1,4. El LHC<sub>II</sub> contiene de 12-15 moléculas de clorofila por polipéptidos y una relación clorofila / carotenoide de 5-6 (Bassi *et al.*, 1993). El

complemento pigmentario más aproximado para este complejo consiste en 8 moléculas de clorofila *a*, 6 clorofila *b*, 2 luteína y 1 neoxantina. Los bajos niveles de violaxantina encontrados en LHC<sub>II</sub> no son compatibles con la presencia de este pigmento en cantidades estequiométricas, lo que sugiere que no es un verdadero constituyente del LHC<sub>II</sub> y que su presencia se debe a contaminación por parte de otros polipéptidos. El LHC<sub>II</sub> se encuentra normalmente en forma trimérica (masa molecular de 72 kDa) constituida por tres subunidades de 28, 27 y 25 kDa aproximadamente y se encuentran en distinta estequiometría. El LHC<sub>II</sub> es muy heterogéneo.

Los polipéptidos están codificados por una familia de genes nucleares denominados Cab genes (Di Paolo *et al.*, 1990; Chitnis y Thornber, 1988). Estos genes son traducidos en los ribosomas dando lugar a precursores que, posteriormente, madurarán y se integrarán en el complejo tilacoidal. Los genes que codifican para LHC<sub>II</sub> se codifican en tres tipos: los de tipo I, codifican polipéptidos muy relacionados y altamente conservados entre las distintas especies; los de tipo II son algunos diferentes de los de tipo I, contienen un intrón y codifican polipéptidos algo menor; y los de tipo III que se encuentran en algunas especies como el maíz, cebada, tomate y espinaca (Jansson *et al.*, 1992).

Las apoproteínas del LHC<sub>II</sub> tienen secuencias de aminoácidos muy similares (Chua y Blomberg, 1979; Bennett, 1983) y parecen encontrarse formando trímeros. Con un 44% de contenido de  $\alpha$ -hélice (Kühlbrandt y Wang, 1991).

Una de las características del LHC<sub>II</sub> es su capacidad de fosforilarse en presencia de la luz (Allen *et al.*, 1981; Barber, 1982). Se ha propuesto que esta fosforilación está regulada por una proteína-quinasa cuya actividad está controlada por el estado redox de la plastoquinona de una manera que, al fosforilarse el LHC, se produce la transición del estado 1 al estado 2 y el LHC se desplaza hacia las membranas del estroma transfiriendo la energía de excitación al FS<sub>I</sub> en vez de al FS<sub>II</sub> (Bassi *et al.*, 1988). La acción de una fosfatasa permite la eliminación del fosfato del LHC<sub>II</sub> y su retorno al grana (estado 1) (Hsu *et al.*, 1993).

Los complejos minoritarios de antenas CP<sub>29</sub>, CP<sub>26</sub> y CP<sub>24</sub> contienen entre un 5 y 10% de la clorofila en el FS<sub>II</sub>. Todos ellos parecen estar codificados por genes nucleares.

El complejo aislado de CP<sub>29</sub> (LHCIIa según la nomenclatura de Thornber *et al.*, 1991) contiene de 10 a 12 moléculas de clorofila por proteína, y tiene una relación clorofila **a/b** entre 3 y 3.2. Este polipéptido presenta un máximo de absorción en el rojo a 677 nm, con una masa molecular aparente de 29-31,5 kDa (Henryson *et al.*, 1989). Según Peter y Thornber, 1991, este complejo contiene por cada 10 moléculas de clorofila **a**, aproximadamente 4 moléculas de clorofila **b**, 2 luteína, 2 violaxantina y 1 neoxantina.

El complejo CP<sub>26</sub> (LHCIIc según Thornber *et al.*, 1991) contiene una relación clorofila **a/b** de 1,7 y tiene un máximo de absorción en el rojo a 676 nm. Este complejo parece estar constituido por dos apoproteínas de 28 y 29 kDa (Bassi *et al.*, 1987; Dunahay *et al.*, 1987); y tiene un complemento pigmentario de 10 moléculas de clorofila **a**, 6 moléculas de clorofila **b**, 3 luteínas, 1 violaxantina y 2 neoxantina (Peter y Thornber, 1991a).

El complejo CP<sub>24</sub> (LHCd según Thornber *et al.*, 1991) tiene una relación clorofila **a/b** de 1-1,6 y consta de una apoproteína de aproximadamente 20 kDa cuyo extremo N-terminal ha sido secuenciado (Morishige *et al.*, 1990). Contiene aproximadamente 13 moléculas de clorofila y posee por cada 10 clorofila **a**, 11 clorofila **b**, 3 luteína; 0,5 violaxantina y 0,5 neoxantina (Peter y Thornber, 1991a).

Además de los anteriores complejos minoritarios de antena, Peter y Thornber, (1991a), han descrito uno más, al que denominaron LHCIIe. Este complejo contiene un 3% de la clorofila total del FS<sub>II</sub>, presenta una relación clorofila **a/b** de 1,4 y su apoproteína tiene una masa molecular de aproximadamente 13 kDa. Este complejo contiene aproximadamente 8 moléculas de clorofila y un alto contenido de xantofilas. El componente pigmentario estimado de este polipéptido es de 7 clorofila **b**, 10 luteína, 15 violaxantina y 5 neoxantina de 10 clorofila **a**.

### 2.2.2.3 Complejo interno del FS<sub>II</sub>

Numerosos autores han aislado el centro de reacción del FS<sub>II</sub> (Namba y Satoh, 1987; Ghanotakis *et al.*, 1989). Los principales componentes de este complejo son las proteínas D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, el citocromo b<sub>559</sub> y un polipéptido de 4,8 kDa (Ikeuchi y Inoue, 1988). Todos sus componentes son codificados por genes cloroplásticos. Las proteínas D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> son proteínas hidrofóbicas que forman un heterodímero, ambas contienen al P<sub>680+</sub>, mientras que la D<sub>1</sub> contiene a la tirosina donadora (Z), la feofitina aceptor y el sitio de

Q<sub>B</sub>. La proteína D<sub>2</sub> contiene el sitio Q<sub>A</sub>, un donador, D (se cree que es una tirosina, Debus *et al.*, 1988), y una feofitina.

Cuando el P<sub>680</sub> (donador primario de FS<sub>II</sub>) se oxida tiene lugar la separación de cargas y la formación de un par de radicales (clorofila<sup>+</sup> y la feofitina<sup>-</sup>). Entonces el electrón puede ser transferido al Q<sub>A</sub> o bien recombinarse con P<sub>680</sub> para dar lugar al estado basal o triplete del P<sub>680</sub>, respectivamente. A continuación se produce la transferencia de electrones a Q<sub>B</sub>, regulada por el anión HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> produciéndose Q<sub>B</sub>H<sub>2</sub>.

A partir de la secuencia primaria de las proteínas D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, se ha deducido que contienen cinco hélices que atraviesan la membrana (Sayre *et al.*, 1986). Los residuos de tirosina D y Z se encuentran cerca del lado luminal de la membrana. Los análisis de pigmentos revelan que el heterodímero D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> contiene de 6 a 12 moléculas de clorofila **a** (Debus, 1992). Se piensa que los aminoácidos implicados en la unión de las quinonas (Q<sub>A</sub> y Q<sub>B</sub>) están cerca del lado estromal de la membrana. El citocromo b<sub>559</sub> aparece en todos los organismos capaces de liberar oxígeno en el proceso de fotosíntesis. Algunos autores plantean la existencia de dos citocromos b<sub>559</sub> por FS<sub>II</sub> (Shuvalov *et al.*, 1989), mientras que otros sugieren que existe solamente un citocromo b<sub>559</sub> (Gounaris *et al.*, 1990). Las dos subunidades de 9 y 4 kDa tienen un solo residuo de histidina que se ha relacionado con la unión del grupo hemo (Babcock, 1987). A pesar de ser una proteína pequeña, el citocromo b<sub>559</sub> es una proteína transmembrana (Vallon *et al.*, 1989). Se ha encontrado el requerimiento mínimo de cuatro iones Mn<sup>2+</sup> para una actividad completa de la fotólisis del agua (Ghanotakis y Yocum, 1990). Aunque no se conoce bien la proteína encargada de la unión del manganeso, se ha comprobado que la eliminación del CP<sub>47</sub> y CP<sub>43</sub> y la proteína intrínseca de 33 kDa causa una desestabilización del Mn, lo que indica que estas proteínas pueden estar implicadas en la unión del Mn o, de forma indirecta, estabilizando dicha unión.

#### 2.2.2.4 Proteínas Intrínsecas del FS<sub>II</sub>

Las proteínas intrínsecas que regulan la función del sistema que desprende oxígeno; son tres polipéptidos de masa molecular aparente 33, 23 y 17 kDa. Estas proteínas carecen de grupos prostéticos por lo que se descarta su implicación en la captación de luz y en la transferencia de electrones. Las tres proteínas son codificadas por genes nucleares y se encuentran situadas en el lado luminal de la membrana tilacoidal. La

proteína de 33 kDa, además de estar involucrada en la estabilización de Mn, su presencia es necesaria para la unión de la proteína de 23 kDa e indirectamente de la proteína de 17 kDa. Estudios electrónicos han revelado que las tres proteínas forman estructuras tetraméricas que sobresalen de la superficie luminal de la membrana de los tilacoides (Simpson y Andersson, 1986).

La proteína de 33 kDa está presente en todos los organismos oxigénicos, mientras que las otras dos proteínas intrínsecas (17 y 23 kDa) se observan en plantas y algas verdes pero no en cianobacterias. Igualmente se ha mostrado, que en el caso de que se hayan eliminado las proteínas de 17 y 23 kDa, el desprendimiento de oxígeno puede darse a altas concentraciones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Ghanotakis *et al.*, 1984).

Además de los polipéptidos anteriormente mencionados cuya localización y función es bastante conocida, existen ciertos polipéptidos del  $\text{FS}_{\text{II}}$  cuya función aun se desconoce.

## 2.3 Fluorescencia de clorofila

La luz absorbida por las moléculas de clorofilas en una hoja puede experimentar una de las siguientes transformaciones: 1- ser usada para dirigir la fotosíntesis (fotoquímica), 2- ser disipada como calor, 3- ser reemitida como luz (fluorescencia de clorofila) (Maxwell y Jonson, 2000). Estos tres procesos en la planta ocurren de forma competitiva, por lo que el incremento en la eficiencia de uno puede resultar en un decrecimiento en la productividad de los dos restantes. Por tal razón, las determinaciones de las distintas variables de fluorescencia de clorofila brindan información sobre los cambios en la eficiencia fotoquímica y la disipación por calor (Fracheboud, 2000).

Los cambios en la fluorescencia de clorofila se observaron por primera vez en los años 60 (Kautsky *et al.*, 1960). Ellos encontraron que plantas provenientes de la oscuridad, al ser expuestas a la luz, incrementaban la producción de fluorescencia en un período de tiempo de unos segundos. Este incremento en la fluorescencia de clorofila se explicó como consecuencia de una reducción sucesiva de los aceptores de electrones del  $\text{FS}_{\text{II}}$ ,  $\text{Q}_A$ ,  $\text{Q}_B$  y el pool de plastoquinonas (PQ). En la oscuridad los aceptores primarios de electrones de la vía fotosintética están completamente oxidados

$Q_A$ ,  $Q_B$ ; por lo que se dice que el centro de reacción está “abierto”. Cuando el  $FS_{II}$  absorbe luz el primer aceptor de electrones  $Q_A$  acepta un electrón y éste no está disponible para aceptar el siguiente hasta que el electrón capturado no sea captado por el siguiente aceptor de electrones. El punto donde  $Q_A$ ,  $Q_B$  y  $PQ$  están completamente reducidos se denomina centro de reacción “cerrado”.

Cuando una hoja proveniente de la oscuridad es iluminada con una luz roja (>680 nm), los valores de fluorescencia inicial ( $F_o$ ) son recogidos en pocos milisegundos, momento en que el centro de reacción del  $FS_{II}$  está abierto, y la emisión de fluorescencia recogida representa los procesos de captación de energía en los pigmentos antenas del  $FS_{II}$ . Esta emisión de fluorescencia es independiente de los procesos fotoquímicos.

Los valores de fluorescencia máxima ( $F_m$ ) son recogidos cuando todos los aceptores de electrones del  $FS_{II}$  están completamente reducidos, mientras que la diferencia entre  $F_m$  y  $F_o$  ( $F_v$ ) brinda información sobre el estado redox de los aceptores de electrones del  $FS_{II}$  y la relación  $F_v/F_m$  ha sido considerada como un buen indicador de la eficiencia fotoquímica, con valores óptimos cercanos a 0,83 para muchas especies de plantas (Björkman and Demmig, 1987; Johnson *et al.*, 1993). Valores por debajo de éste pueden ser obtenidos en plantas expuestas a condiciones de estrés, indicando, particularmente, el fenómeno de fotoinhibición.

Sin embargo, luego de alcanzar los valores máximos de fluorescencia de clorofila, ésta comienza a descender nuevamente en pocos minutos. Este fenómeno es denominado “quenching” de fluorescencia (Maxwell y Johnson, 2000) y es explicado fundamentalmente por dos vías. La primera relacionada con un incremento en la tasa de transporte de electrones lejos del  $FS_{II}$ , debido principalmente a una activación inducida por la luz de las enzimas involucradas en el metabolismo del carbono y la apertura estomática. Este “quenching” es referido como “quenching” fotoquímico ( $qP$ ). La segunda vía está relacionada con un incremento en la eficiencia con la cual la energía es convertida a calor. Este proceso es denominado “quenching” no-fotoquímico ( $qN$ ) (van Kooten y Snel, 1990, 1990).

El “quenching” fotoquímico es un indicador de la proporción de centro de reacción del  $FS_{II}$  abierto. Los cambios en el  $qP$  es debido a un cierre en el centro de reacción, como consecuencia de una saturación de la fotosíntesis por la luz.

El  $qN$  está linealmente relacionado con la disipación por calor, y en una planta típica su valor está en el rango de 0 a 1. Este término es ampliamente utilizado en estudios en el laboratorio, por la necesidad de requerir de medidas de  $Fm$  en hojas adaptadas a la oscuridad. Otro término para cuantificar el “quenching” no fotoquímico es  $QNP$  (Bilger y Björkman, 1990), el cual es ampliamente utilizado en condiciones de campo, donde la variable de fluorescencia de clorofila  $Fm$  está referida a plantas adaptadas a la luz ( $Fm'$ ). Este parámetro cae en la escala entre 0,5 y 3,5 a intensidades de luz saturantes. Es importante destacar que tanto el  $QNP$  como el  $qN$  miden cambios en la disipación de energía relativa a estados adaptados a la oscuridad.

Para lograr apreciar el significado fisiológico del “quenching” no fotoquímico es necesario comprender los procesos que contribuyen a éste. Bajo muchas condiciones el componente que mayor contribuye al  $QNP$  es el quenching energético ( $qE$ ) y se ha señalado que es esencial en la protección de la hoja contra daños inducidos por la luz (Horton *et al.*, 1996). Este proceso requiere de un bajo pH en el lumen de los tilacoides e involucra la formación de la zeaxantina inducida por la luz. Un segundo proceso que contribuye al  $QNP$  es el denominado quenching de transición ( $qT$ ) (Walters y Horton, 1991). Este proceso incluye la fosforilación reversible del complejo captador de luz y se ha señalado su importancia en la distribución de energía luminosa entre los fotosistemas I y II. Tanto el  $qE$  como el  $qT$  son difícilmente distinguidos a partir de la cinética de relajación, sin embargo, el  $qT$ , generalmente, tiene una pequeña contribución al “quenching” no fotoquímico y está presente a bajas intensidad de luz. Un tercer proceso es incluido en la relajación de fluorescencia y es el quenching fotoinhibitorio ( $qI$ ). Este evento está referido a procesos de protección y a daños en el centro de reacción del FS<sub>II</sub> (Osmond, 1994).

En la actualidad, las mediciones de fluorescencia de clorofila *a*, se han convertido en un método ampliamente usado en los estudios de fisiología vegetal para obtener información semicuantitativa y rápida del proceso de fotosíntesis, no sólo al nivel de laboratorio sino en el campo.

## **2.4 Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco)**

La enzima Rubisco (EC 4.1.1.39) es una enzima bifuncional con actividad carboxilasa y oxigenasa. Es una proteína hexadecamérica la cual no solo involucra la interacción del genoma nuclear y cloroplástico, sino que también requiere de la síntesis de dos proteínas: la chaperona plastídica y la enzima Rubisco activasa.

La enzima Rubisco constituye el 50% de la proteína soluble de las hojas de las plantas y, de hecho, se considera la proteína más abundante en la naturaleza. Se trata de una proteína de masa molecular 550 000 Da, compuesta por ocho subunidades mayores de masa molecular 55 000 Da y ocho menores de masa molecular de 14 000 Da. Cada subunidad mayor contiene un centro activo, de modo que existen ocho sitios activos por molécula de enzima Rubisco (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

Se considera una enzima de baja eficiencia, aunque la enzima con ocho sitios activos muestra una afinidad por el CO<sub>2</sub> (constante de Michaelis-Menten, K<sub>M</sub>=12 μM) 90 o 100 veces superior a la afinidad por el O<sub>2</sub> (K<sub>M</sub>=250 μM).

La cantidad de enzima Rubisco presente en los cloroplastos no es un factor limitante en condiciones normales. Sin embargo, en condiciones de estrés que limiten la síntesis proteica, bien por falta de componentes esenciales, bien por inhibición de la transcripción o transducción genética, este factor puede limitar la tasa fotosintética.

## **2.5 Estrés por altas temperaturas. Proceso de fotosíntesis**

La fotosíntesis, como todos los procesos fisiológicos, depende de la temperatura. Las plantas, usualmente, tienen un óptimo de temperatura para la cual el valor neto de fijación de dióxido de carbono es máximo. Temperaturas superiores al óptimo resultan en una reducción en los valores de fotosíntesis.

Los efectos de la temperatura sobre la fotosíntesis se han investigado ampliamente, estableciéndose, de forma general, que en las plantas C<sub>3</sub> se afecta el proceso a temperaturas superiores a 35°C, resultando las plantas C<sub>4</sub> y CAM más tolerantes, esto permite la expansión y diversificación de estas plantas hacia regiones más cálidas. Ehleringer y Monson (1993), señalaron que las dicotiledóneas C<sub>4</sub> se expanden y diversifican hacia áreas cálidas con una aridez progresivamente superior y las monocotiledóneas C<sub>4</sub> a zonas con una precipitación superior en el verano.

Los daños producidos por el estrés de calor incluyen cambios estructurales y funcionales en la célula. Los procesos bioquímicos y fisiológicos que se afectan con las altas temperaturas, principalmente, son la activación de las enzimas fotosintéticas, con su efecto en la reducción en la fijación de CO<sub>2</sub>, la integridad de las membranas, la fosforilación y el transporte de electrones en los cloroplastos, la conductividad estomática a la difusión del CO<sub>2</sub> y la traslocación de los compuestos producidos en el proceso. Sus efectos en el crecimiento y la sobrevivencia dependen de la intensidad y duración del estrés de calor. Un período prolongado a una temperatura moderadamente alta puede ser tan dañino como una breve exposición a temperaturas extremas (Georgieva, 1999).

Entre todas las funciones de la célula, la actividad fotosintética de los cloroplastos resulta ser la más sensible al calor, considerándose el sitio primario de daño los componentes del sistema fotosintético localizado en las membranas de los tilacoides, siendo el más probable el FS<sub>II</sub> (Havaux, 1993; Stefanov *et al.*, 1996; Giardi *et al.*, 1997 y Heckathorn *et al.*, 1997). Un aumento en la temperatura foliar provoca una reducción en la actividad del FS<sub>II</sub> relacionada con la disociación de los complejos captadores de luz (LHCII) del núcleo central del FS<sub>II</sub> y su posterior migración (estado de transición) hacia las regiones no apresadas de las membranas de los tilacoides (Georgieva, 1999).

Investigaciones recientes han demostrado que la actividad del FS<sub>I</sub> parece ser mucho más estable al calor que la del FS<sub>II</sub> (Havaux, 1993). Se ha encontrado que en condiciones de temperaturas moderadamente elevadas se estimula la actividad del FS<sub>I</sub> “*in vivo*” e “*in vitro*” (Sayed *et al.*, 1994). Esta estimulación parece estar asociada con un incremento en la capacidad del transporte cíclico a través del FS<sub>I</sub>, lo cual pudiera ser un proceso adaptativo para producir ATP, en condiciones donde la actividad del FS<sub>II</sub> disminuye severamente. Esta síntesis de ATP puede ser importante para la sobrevivencia de las plantas y necesaria para los procesos de reparación de daños provocados por el estrés de calor (Janssen y Van Hasselt, 1994).

Entre las reacciones del FS<sub>II</sub>, el proceso de lisis del H<sub>2</sub>O es particularmente sensible al calor (Enamy *et al.*, 1994). El complejo que desprende oxígeno contiene 4 átomos de Mn por FS<sub>II</sub>, que sirven como oxidante directo del agua (Georgieva, 1999). Las proteínas de 33, 23 y 17 kDa asociadas con la superficie del lumen del complejo del centro de reacción del FS<sub>II</sub> tienen un papel importante en el desprendimiento de

oxígeno. Se ha demostrado que la inactivación por calor del complejo que desprende oxígeno está directamente relacionada con la proteína de 33 kDa pero no con el  $Mn^{2+}$  (Enemy *et al.*, 1994).

La inhibición en la fijación de  $CO_2$ , por las altas temperaturas, ha sido abordada en muchas especies de plantas (Makino *et al.*, 1994, Law y Crafts-Brandner, 1999). Diversos componentes del aparato fotosintético y procesos metabólicos asociados, son sensibles a las altas temperaturas; sin embargo, el  $FS_{II}$  es térmicamente sensible, pero puede aclimatarse al calor (Havaux, 1993a). Se ha encontrado recientemente que existe una proteína de choque térmico localizada en el cloroplasto que protege al  $FS_{II}$  de los daños de las altas temperaturas (Heckathorn *et al.*, 1998).

La exportación de asimilatos es otro de los procesos metabólicos sensibles al estrés por altas temperaturas. Jiao y Grodzinski (1996) señalaron que el estrés de calor, en una atmósfera rica en  $CO_2$ , inhibió la exportación de asimilatos en un grado mayor que la fotosíntesis. Sin embargo, en estudios con diferentes especies de plantas, se observó una inhibición en la fotosíntesis neta y no en la exportación de asimilatos (Leonardos *et al.*, 1996). Esta respuesta diferenciada establece que las altas temperaturas afectan en mayor o menor medida uno u otro proceso fisiológico o bioquímico, en dependencia de la especie.

La actividad del ciclo de Calvin es otro de los componentes afectados por el estrés de calor, señalándose la activación de la enzima Rubisco como el sitio primario de inhibición (Feller *et al.*, 1998). La estrecha relación entre el estado de activación de la enzima Rubisco y la fotosíntesis en respuesta a intensidades de luz variables (Seeman *et al.*, 1990) o el contenido de enzima activasa alterado (Andrews *et al.*, 1995; Eckardt *et al.*, 1997) indican el papel fundamental de la enzima activasa en la regulación de la fijación de  $CO_2$  fotosintético. Recientemente se ha señalado que el estrés de calor perturba las propiedades estructurales de la enzima activasa e inhiben la misma por destrucción de las interacciones de sus subunidades (Crafts-Brandner *et al.*, 1997 y Law y Crafts-Brandner, 1999).

Los efectos inhibitorios del tratamiento de calor y la aparición de picos de fluorescencia de la clorofila *a* reflejan un proceso de desorganización de las membranas cloroplásticas, donde el calor provoca la desintegración del grana, seguida por un incremento en el contenido lipídico de la membrana tilacoidal.

## 2.6 Producción de especies reactivas de oxígeno en los cloroplastos.

En las células vegetales los cloroplastos constituyen probablemente los orgánulos más expuestos a la acción de los radicales libres del oxígeno en virtud de la elevada presión parcial de oxígeno existente en su interior, como resultado de la lisis del agua en el FS<sub>II</sub>.

En 1951, Mehler y posteriormente Epel y Neuman (1973), utilizando el metilviológeno como donador de electrones, demostraron que la reducción del O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reacción de Mehler) puede considerarse como una reacción total que comprende la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> como intermediario y posteriormente la dismutación del mismo a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta fue la primera indicación del desprendimiento y reducción del oxígeno, en presencia de luz, en tilacoides, y se estableció al oxígeno como un oxidante de Hill. Este proceso se encuentra asociado con el fotosistema I (FS<sub>I</sub>) y se ha observado en algas, cloroplastos intactos y tilacoides aislados de cloroplastos, entre otros (Badger y Schreiber, 1993, Mir *et al.*, 1995, Li y Calvin, 1997).

En membranas de tilacoides aislados, el O<sub>2</sub> es principalmente fotorreducido en el interior de la membrana, probablemente cerca del centro FeS o en el centro A/B del FS<sub>I</sub> (Asada, 1994, Asada *et al.*, 1998). Otra vía alternativa de generación de radicales superóxido en los cloroplastos es la autooxidación de la ferredoxina estromática, según la ecuación:



De ahí, la ferredoxina es reducida por el [4Fe-4S] A/B en el complejo del FS<sub>I</sub>, una vez fotorreducida dona sus electrones al NADP<sup>+</sup>, catalizado por una NADP / Fd reductasa unida al tilacoide. Un posible candidato de mediador en el estroma para la fotorreducción del O<sub>2</sub> es la flavodeshidrogenasa. La flavodeshidrogenasa y otras enzimas cloroplásticas tales como Fd/NADP<sup>+</sup> reductasa, glutatióna reductasa y la monodeshidroascorbato reductasa, estimulan la fotoproducción del superóxido en los tilacoides (Asada, 1999).

El radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> puede actuar indistintamente como agente oxidante o reductor, y por lo tanto puede producir modificaciones en una gran cantidad de variedades de moléculas

de importancia biológica. Se ha postulado que el flujo de  $O_2^-$  generado por radiolisis o enzimáticamente, puede provocar distintos procesos degradativos “*in vitro*”, entre los que se incluyen: peroxidación de lípidos (Kurganova *et al.*, 1997), ruptura y degradación de DNA (Rowley y Halliwell, 1983), despolimerización de polisacaridos (Wong *et al.*, 1981), entre otros.

La verdadera peligrosidad del radical  $O_2^-$  es indirecta y radica en su capacidad para llevar a cabo la lisis reductora del peróxido de hidrógeno, mediante una reacción tipo Fenton o de Haber-Weiss catalizada por trazas de metales, dando lugar a la producción del radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ).

El radical  $OH\cdot$  es uno de los oxidantes más potentes que se conoce, puede atacar y dañar a todo tipo de moléculas presentes en los sistemas biológicos. Este radical posee una velocidad de reacción elevada, fundamentalmente con los lípidos de membranas, ácidos nucleicos y proteínas, produciendo una reacción en cadena de radicales secundarios de reactividad variable que amplifica la reactividad del radical inicial (Halliwell, 1989). Se ha sugerido que el daño molecular producido por el radical  $OH\cdot$  no se debe a un proceso de difusión al azar de los mismos en el interior de la célula, sino que la destrucción molecular ocurre en aquellas localizaciones celulares de unión metálica en las que se produce la reacción tipo Fenton o de Haber-Weiss. Es decir, la extensión y naturaleza del daño celular depende de la presencia de  $H_2O_2$  y de la disponibilidad de sales de hierro y cobre (Saltman, 1989). Se ha observado la existencia de una reserva de hierro débilmente ligado a complejos fosfatados como el ATP, carbohidratos, citrato, ácidos nucleicos y proteínas, que podrían estar implicados en la conversión catalítica de  $H_2O_2$  a radical  $HO\cdot$  (Nagy y Floyd, 1984, Halliwell y Gutteridge, 1986). Se ha demostrado que la producción de  $OH\cdot$  dependiente de  $O_2^-$  tiene lugar en presencia de reductores como glutatión y  $NAD(P)H^+$ . Sin embargo, se ha demostrado que el ascorbato a concentraciones fisiológicas puede actuar reemplazando parcialmente al  $O_2^-$  en su función reductora de los iones férricos (Halliwell y Gutteridge, 1985), aunque la concentración de ascorbato, en determinadas circunstancias, va a depender de la producción celular del  $O_2^-$ , debido a la rapidez con que este último puede actuar oxidando al ascorbato.

## 2.7 Sistemas antioxidantes de defensa

En los sistemas biológicos, los mecanismos de defensa antioxidantes de mayor importancia pueden ser de dos tipos: enzimáticos y no enzimáticos (Walker y Mckersie, 1993). Estos mecanismos, aunque actúan independientemente, se encuentran relacionados entre sí y le permiten a la célula vivir en armonía con el oxígeno.

Los distintos compartimientos celulares están equipados de un complejo y completo sistema de defensa antioxidante que le permite controlar la producción de especies de oxígeno activado. Estos sistemas tienden a impedir, fundamentalmente, la formación de los radicales nocivos de hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ), mediante la eliminación de sus precursores: los radicales superóxido y peróxido de hidrógeno.

### 2.7.1 Sistemas antioxidantes no enzimáticos

Los sistemas antioxidantes no enzimáticos se diferencian en tres grupos fundamentalmente:

- Reductores liposolubles, asociados a membranas:  $\alpha$ -tocoferol y carotenoides.
- Reductores hidrosolubles: Glutathion, ascorbato y cisteína.
- Quelantes de metales.

Los carotenoides actúan secuestrando directamente al oxígeno singlete y al mismo tiempo absorben el exceso de energía de excitación de la clorofila (Asada *et al.*, 1998). Protegen también a las membranas de la peroxidación lipídica. Dentro de los carotenoides, el  $\beta$ -caroteno es un antioxidante no estequiométrico que actúa como atrapador físico del oxígeno singlete utilizando su energía para interconvertir la forma *cis* del  $\beta$ -caroteno, en la forma *trans* y viceversa.

En las plantas sometidas a determinada situación de estrés ambiental, como por ejemplo: estrés hídrico, salino, nutricional o de temperatura, un exceso de absorción de energía luminosa podría dañar el aparato fotosintético. Se ha propuesto que uno de los mecanismos implicados en la disipación del exceso de energía lo constituye la actividad denominada “ciclo de las xantofilas” que ocurre al nivel de las membranas de los tilacoides. En este ciclo, y al nivel del  $\text{FS}_{\text{II}}$ , se produce una disipación de energía de forma paralela a la transformación de violaxantina a zeaxantina (Asada, 1999). En esta

reacción de de-epoxidación, la violaxantina de-epoxidasa utiliza como donante de electrones a la fracción de ascorbato cloroplastídico ligado a la membrana tilacoidal.

Por tanto, la presencia de zeaxantina permite a la clorofila excitada volver a su estado fundamental, produciéndose en este paso una disipación de energía en forma de calor (Demmig-Adams y Adams, 1992).

Por otro lado, los reductores hidrosolubles incluyen a compuestos como el ácido ascórbico, glutatión, glucosa, manitol, cisteína y ácido úrico. El ácido ascórbico y el glutatión, son antioxidantes de bajo peso molecular presentes en las plantas a concentración milimolar.

### **2.7.2 Sistemas antioxidantes enzimáticos**

La actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) constituye una de las defensas primarias de mayor importancia, llevando a cabo la dismutación de los radicales  $O_2^-$  a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (Monk *et al.*, 1989). Esta enzima se caracteriza porque su sustrato es un radical libre.



Dentro de este sistema antioxidante se distinguen tres isoenzimas fundamentales, atendiendo al grupo prostético metálico ligado a su centro activo. El primer grupo contiene cobre y zinc (Cu/Zn-SOD) y otros dos grupos que contienen hierro (Fe-SOD) y manganeso (Mn-SOD) como grupo prostético. Estas metaloenzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, y la presencia de un tipo u otro está estrechamente relacionada con el nivel evolutivo del organismo que la presenta y también con el orgánulo con el que está asociada (Parker *et al.*, 1984).

Cu/Zn SOD: de todas las enzimas superóxido dismutasa, son las más estudiadas, y por tanto las que mejor se conocen en cuanto a sus propiedades moleculares, estructuras, características cinéticas y mecanismos de acción enzimático. Las Cu/Zn-SOD son enzimas fundamentalmente eucarióticas y han sido aisladas en un amplio rango de organismos. Se encuentran localizadas generalmente en el citoplasma y los cloroplastos y en principio parecían ser proteínas ácidas, con puntos isoeléctricos (pI) comprendidos entre 4 y 6. Sin embargo, se han encontrado algunas con puntos isoeléctricos bastante básicos, como es el caso de las enzimas de *Photobacterium*

*leiognathi* (pI = 8,25) (Puget y Michelson, 1974) y *Brucella abortus* (pI = 8,6) (Beck *et al.*, 1990). Las Cu/Zn-SODs son en general enzimas bastante estables, sin embargo presentan la característica de ser sensibles al cianuro. La actividad de la mayoría de ellas resulta ser inhibida de forma reversible en un 90% por concentración de  $\text{CN}^-$  (1mM), propiedad que se utiliza para diferenciarlas de la familia de las manganeso y ferro-enzimas que no son afectadas por este inhibidor (Crapo *et al.*, 1978). Las Cu/Zn-SODs también son inhibidas irreversiblemente por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , propiedad que comparten con la Fe-SOD (Hodgson y Fridovich, 1975).

Mn SOD: son enzimas poco estudiadas y han sido aisladas tanto en procariontas como eucariontas, localizándose fundamentalmente en la matriz celular y mitocondrial, respectivamente. Las Mn-SODs son proteínas ácidas con puntos isoeléctricos comprendidos entre 4-5, aunque recientemente se ha encontrado en arroz una Mn-SOD con pI = 9 (Kanematsu y Asada, 1989). Aunque su estabilidad no ha sido estudiada tan sistemáticamente, suelen ser menos estables que las Cu/Zn-SODs. También se ha comprobado que son menos estables a temperaturas superiores de  $50^\circ\text{C}$  y, en general, se inactivan rápidamente a pH ligeramente ácidos ( $\text{pH} < 5$ ) (Sevilla *et al.*, 1982). Las Mn-SODs son resistentes al  $\text{CN}^-$  y al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo que permite diferenciarlas de las Cu/Zn-SODs y de las Fe-SODs, son la únicas SODs que no se inactivan con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Fe SOD: Es una enzima fundamentalmente de organismos procarióticos, aunque se ha detectado su presencia en algunos organismos superiores (Kanematsu y Asada, 1979; Bridges y Salin, 1981). Estas isoenzimas presentan muchos puntos en común con las Mn-SODs, tanto en lo que se refiere a las homologías encontradas en las secuencias de aminoácidos, como en su sensibilidad frente al pH y la temperatura. Así mismo, tienen punto isoeléctrico ácidos al igual que las Mn-SODs. Las Fe-SODs son resistentes al  $\text{CN}^-$  pero son inactivadas irreversiblemente por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo que permite diferenciarlas de las Cu/Zn-SODs y Mn-SODs.

De forma general, todas estas isoenzimas de la SOD son codificadas en el núcleo y transportadas a los orgánulos por una secuencia amino terminal.

Una ayuda importante frente a la toxicidad potencial del  $\text{O}_2^-$  lo constituye las enzimas catalasa y peroxidasas, las que catalizan la reducción divalente del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $2\text{H}_2\text{O}$ , impidiendo de esta forma la generación de radicales  $\text{OH}^\cdot$ . Esta colaboración adquiere mayor relevancia si se considera que niveles elevados de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueden

ocasionar daños sobre determinados orgánulos celulares e inactivar, entre otras enzimas, a las SODs que contienen hierro o cobre y zinc como grupos prostéticos.

**Peroxidasas:** Entre las peroxidasas se destaca la ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11) la cual es la encargada de remover el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado en los cloroplastos, microsomas y citoplasma. Esta enzima oxida el ascorbato, presente en centro de reacción, a radicales monodehidroascorbato. Estos radicales son dismutados espontáneamente a ascorbato y deshidroascorbato

**Catalasa:** La enzima catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) esta localizada en los peroxisomas, su función en este orgánulo es remover el peróxido de hidrógeno formado durante la fotorrespiración. En los glioxisomas remueve el peróxido de hidrógeno formado durante la  $\beta$  oxidación de los ácidos grasos (Monk *et al.*, 1989).

## **2.8 Interés del estudio del tomate**

El género *Lycopersicon* se originó en una estrecha banda en el oeste de Sudamérica, a partir de donde se extendió a otras áreas de Hispanoamérica. Esta hortaliza no fue conocida en Europa hasta después de la colonización de los españoles a América, no existiendo referencia anterior a las descripciones encontradas en los herbarios europeos del siglo XVI (Nuez *et al.*, 1996).

El tomate *Lycopersicon esculentum* es una especie cultígena que por sus características biológicas ha servido durante mucho tiempo como un modelo excelente para estudios fisiológicos y bioquímicos (Rick, 1987).

Las investigaciones referentes al efecto de las altas temperaturas en el cultivo del tomate refieren que éstas influyen marcadamente en la producción del cultivo, por ser uno de los factores que gobiernan el crecimiento y el desarrollo de la planta (Bose y Ghosh, 1995). El crecimiento y desarrollo del tomate transcurre entre límites de temperaturas de 15 a 29°C, pero las condiciones óptimas se establecen a temperaturas de 20 a 24°C. De hecho, tanto valores de temperaturas bajas como elevadas influyen negativamente sobre la planta. Para un desarrollo eficiente de todos los procesos, en el ciclo de vida de la planta del tomate, es necesario una diferenciación de temperatura de al menos 6°C entre el día y la noche (Gent, 1990).

Se ha señalado que las altas temperaturas producen modificaciones en las funciones de la planta, llegando a inhibir la fotosíntesis (Mattew *et al.*, 1990) y desorganizando los sistemas enzimáticos (Florida, 1999) necesarios para el desarrollo de su vida. En este sentido, se plantea que a temperaturas de 37°C o superiores se esperan alteraciones que afectan desde el punto de vista económico, pues mientras que la fotosíntesis puede detenerse por un período y posteriormente reanudarse, estas condiciones causan serios daños en las estructuras reproductoras, lo que trae consecuencias en el cuajado de los frutos y disminución de la producción (Cuartero *et al.*, 1995).

Las altas temperaturas afectan la fotosíntesis provocando modificaciones en la distribución de la energía de excitación entre los fotosistemas, en la actividad del ciclo de Calvin y otros procesos tales como, fotorrespiración y productos de síntesis (Weis y Berry, 1988; citados por Pastenes y Horton, 1996). Las plantas de tomate expuestas a altas temperaturas pueden mostrar una disminución en la fijación de CO<sub>2</sub>, una reducción en la concentración interna de CO<sub>2</sub>, variaciones en el contenido de pigmentos fotosintéticos, una reducción de la conductividad estomática, y una acelerada senescencia de las plantas (Mattew *et al.*, 1990).

Por otra parte se ha señalado que las altas temperaturas en tomate modifican los valores de consumo de oxígeno e incrementan la actividad deshidrogenasa, de modo que temperaturas no letales producen serios daños en la actividad funcional del sistema respiratorio (Iglesias, 1994). Es conocido que la reorganización del proceso de respiración es fundamental para la adquisición de determinada resistencia a las altas temperaturas ya que se requiere de cierta cantidad de energía para los procesos de adaptación y reparación (Iglesias, 1994).

La composición aminoacídica, también, se altera con las altas temperaturas. En hojas de tomate se ha señalado la acumulación de prolina libre después de la exposición al calor, observándose que los genotipos más tolerantes acumulan mayor cantidad que los susceptibles (Basra *et al.*, 1992). Del mismo modo, estos autores encontraron que las altas temperaturas reducen la cantidad de prolina libre en anteras y polen, debido quizás a su mayor acumulación en hojas, lo que conlleva a una disfunción del polen y por tanto a una reducción del potencial productivo. A las altas temperaturas,

también se le atribuye un efecto adverso sobre el crecimiento del tubo polínico, la germinación y el desarrollo del embrión (Cuartero *et al.*, 1995).

Las altas temperaturas retardan la formación de los racimos, reduce el número de flores por racimos (Abdul-Baki, 1991) y el tamaño de las flores. En el estado de floración, la temperatura óptima es de 13-17°C durante la noche y 23°C durante el día (Gómez *et al.*, 2000). Por su parte la fructificación se daña a 26/20°C (día /noche) y se interrumpe severamente por encima de 35/26°C (día /noche) (Stevens y Rick, 1987). Se plantea que uno de los indicadores más importantes de tolerancia al calor en el cultivo del tomate, lo constituye la capacidad de fructificación en condiciones de altas temperaturas nocturnas, señalándose que aquellas variedades que muestran mayor capacidad para la fructificación bajo altas temperaturas y condiciones adversas de humedad resultan las más adecuadas para su producción en los trópicos (Cuartero *et al.*, 1995).

En la actualidad, la mayoría de las variedades de tomate, además de ser originarias de zonas frescas, se han mejorado en zonas templadas, por lo que ellas no fructifican si la temperatura del día y la noche llegan a 30 y 23°C, respectivamente. Tales condiciones son frecuentes en los trópicos, donde en consecuencia el tomate es un cultivo difícil de desarrollar (Villareal, 1982).

En Cuba la producción del tomate se realiza, fundamentalmente, en la llamada “estación seca” (noviembre-abril), en la cual se presentan las condiciones climáticas más favorables. En el período primavera-verano, “estación lluviosa”, la interacción de las altas temperaturas con la alta intensidad luminosa es la responsable de la baja fructificación del tomate y provoca, a su vez, efectos negativos sobre el crecimiento (Cuba MINAGRI, 1984). La humedad, es otro de los factores ambientales que afecta la producción de tomate (Bakker, 1990). De ahí, que la producción final y la calidad del fruto es el resultado de varios procesos como el crecimiento vegetativo, la floración, el cuajado y crecimiento del fruto los cuales son afectados por la temperatura, la intensidad luminosa y la humedad.

En Cuba, se desarrolla un programa de Mejoramiento Genético, por vía clásica y biotecnológica, para la obtención de nuevas variedades de tomate que resulten tolerantes a condiciones climáticas adversas, para así propiciar el cultivo del mismo en época donde las altas temperaturas, la alta intensidad luminosa, la humedad, y las

enfermedades, no permiten su cultivo. De ahí, que el estudio de la fisiología y la obtención de criterios biológicos para la selección de plantas, resulta de gran interés, ya que son más objetivos y suministran una mayor información sobre el sistema, a la vez que contribuyen al conocimiento para una mejor adaptación a la condición de estrés.

## **3- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 Condiciones de cultivo**

Semillas de tres genotipos de tomate (*Lycopersicon esculentum*. Mill) se pre-germinaron en placas de Petri con agua destilada. Cuando emergieron las radículas, las semillas se transfirieron a recipientes plásticos de 14 y 12 cm de diámetro y altura, respectivamente; rellenos con turba y perlita (2:1, v/v).

Las plantas crecieron en condiciones controladas de temperatura 25/20°C, día /noche, intensidad luminosa de 250  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , humedad relativa del 60% y fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Las mismas se regaron en días alternos con solución nutritiva (Hoagland y Arnon, 1950).

Los distintos experimentos considerados en el trabajo se replicaron dos veces para comprobar la veracidad de los resultados. A lo largo del documento se tendrán en cuenta los ensayos donde variaron las condiciones controladas de crecimiento.

### **3.2 Efecto de diferentes tiempos de exposición a la alta temperatura en el funcionamiento del aparato fotosintético de tres genotipos de tomate.**

#### **3.2.1 Material vegetal y tratamientos**

Plantas de tres genotipos de tomate, Campbell-28, variedad comercial con altos rendimientos en condiciones óptimas (Gómez *et al.*, 1997), Amalia, variedad obtenida en el Programa de Mejoramiento Genético del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, y caracterizada como una variedad con buen comportamiento productivo en condiciones no óptimas de siembra (Álvarez *et al.*, 1997) y Nagcarlang, tipo silvestre señalado en la literatura como tolerante a las altas temperaturas (Stevens, 1979; Villareal y Lai, 1979; Bar-Tsur *et al.*, 1985; Tomato Genetic Cooperative Report, 1994), crecieron en las condiciones controladas descritas en el epígrafe 3.1.

Cuando las plantas alcanzaron treinta días se expusieron a 45°C por a) 2 horas y b) 3 horas, en condiciones de luz. Previo a la imposición de los tratamientos, las plantas se iluminaron por dos horas, para la activación de las funciones fotosintéticas, a la

temperatura de 25°C e intensidad luminosa de 250  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Las plantas mantenidas en las condiciones normales de crecimiento (epígrafe 3.1) se consideraron control.

Cada tratamiento estuvo conformado por diez plantas y las evaluaciones fisiológicas y bioquímicas se realizaron inmediatamente después de concluidos los tratamientos de temperatura. Las variables fisiológicas se determinaron en condiciones de temperatura de 25°C.

### **3.2.2 Evaluaciones realizadas y sus metodologías**

#### **3.2.2.1 Medida del estado hídrico de las plantas**

Las medidas de potencial hídrico foliar ( $\Psi_h$ ) y potencial osmótico foliar ( $\Psi_s$ ) se realizaron en cuatro plantas de cada genotipo por tratamiento, para comprobar que el estado hídrico de las mismas era adecuado.

Para las medidas del  $\Psi_h$  se utilizó una cámara de presión tipo Scholander-Hammel modelo 3000 (Soil Moisture Equipment Co., Santa Barbara, CA, USA). Según la metodología de Scholander *et al.* (1965), las hojas se envolvieron en una bolsa de plástico y se colocaron rápidamente en la cámara (Turner, 1988), donde la presión se incrementó a razón de 0,03 MPa  $\text{s}^{-1}$ , utilizando gas de nitrógeno.

El  $\Psi_s$  se midió con un osmómetro de presión de vapor modelo 5 500 (Wescor Inc., Logan, UT, USA). Las hojas recién cortadas y envueltas en papel de aluminio se introdujeron en nitrógeno líquido. Antes de realizar las medidas, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se colocaron en una jeringuilla, y en el jugo celular extraído se midió el potencial osmótico de acuerdo a Gucci *et al.* (1991). El potencial de turgencia ( $\Psi_p$ ) se estimó por la diferencia del potencial hídrico y el osmótico.

#### **3.2.2.2 Variables del intercambio gaseoso de las plantas**

Las determinaciones de la fotosíntesis neta ( $A$ ) y la conductancia estomática ( $g$ ) se realizaron con ayuda de un analizador de gases infrarrojo portátil Licor modelo Li-6 200 (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA), en la tercera hoja del ápice a la base, en condiciones controladas de temperatura a 25°C e intensidad luminosa de 250  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , en una superficie foliar de 1,75  $\text{cm}^2$ . Las determinaciones se realizaron

sobre cinco plantas de cada genotipo por tratamiento, haciéndose dos repeticiones por determinación.

### 3.2.2.3 Variables de fluorescencia de clorofila *a* de las plantas

Las determinaciones de las variables de fluorescencia de clorofila *a* se realizaron sobre cinco plantas de genotipo por tratamiento, haciéndose dos repeticiones por determinación; con un fluorímetro portátil Opti-Sciences, modelo OS 30 (Opti-Sciences Inc., Tyngsboro, MA, USA). Las medidas se realizaron en las mismas hojas donde se determinó el intercambio gaseoso, en una superficie foliar de 1,5 cm<sup>2</sup>. Previo a las mediciones de fluorescencia las plantas se mantuvieron en la oscuridad, al menos 20 minutos, para garantizar que todos los centros de reacción del FS<sub>II</sub> estuviesen en estado “abierto”. La fluorescencia inicial (*F<sub>o</sub>*) se obtuvo al hacer incidir una onda modulada de luz roja en la superficie de la hoja. La emisión de fluorescencia máxima (*F<sub>m</sub>*) se midió después de un pulso de saturación de luz blanca de 2 600 μmol fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR). Los valores de fluorescencia *F<sub>o</sub>*, *F<sub>m</sub>* se leyeron directamente del fluorímetro. La fluorescencia variable (*F<sub>v</sub>*) se estimó a partir de los valores de *F<sub>o</sub>* y *F<sub>m</sub>* (*F<sub>m</sub>*-*F<sub>o</sub>*). La eficiencia fotoquímica del FS<sub>II</sub> (*F<sub>v</sub>*/*F<sub>m</sub>*), así como la nomenclatura usada fue según lo establecido por Van Kooten y Snel (1990).

### 3.2.2.4 Contenido de pigmentos fotosintéticos foliares

La extracción de pigmentos se desarrolló siguiendo la metodología de Arnon (1949). El material vegetal utilizado fueron hojas colectadas a partir de tres plantas de cada genotipo por tratamiento, tomándose material suficiente para la realización de dos repeticiones por determinación. El extracto se obtuvo a partir de 0,20 gramos de hojas lavadas y cortadas en tiras, las que se maceraron en un mortero con acetona al 80% (v/v) y se filtró a través de dos capas de malla de plástico y posteriormente al vacío. El extracto vegetal colectado se llevó a un volumen final de 25 mL con acetona al 80% (v/v) y finalmente se leyó en un espectrofotómetro (Spekol, mod. 11) a las siguientes longitudes de ondas: 665 nm para clorofila *a*, 649 nm para clorofila *b*, 652 nm para clorofilas totales y 440 nm para carotenoides.

La concentración de los pigmentos del extracto se calculó a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \text{clorofilas totales (mg/L)} &= (D_{(652)} / 34,2) \times 1000 \\ \text{clorofila } \mathbf{a} \text{ (mg)} &= (11,63 \times D_{(665)}) - (2,39 \times D_{(649)}) \\ \text{clorofila } \mathbf{b} \text{ (mg)} &= (20,11 \times D_{(649)}) - (5,18 \times D_{(665)}) \\ \text{carotenoides (mg/L)} &= (4,695 \times D_{(440)}) - (0,268 \times \text{clorofilas totales}) \end{aligned}$$

donde D constituye la absorbancia a la longitud de onda que se señala. A partir de los valores de clorofila **a** y **b** se calculó la relación clorofila **a/b**. Finalmente, los resultados del contenido de pigmentos se expresaron de manera uniforme considerando la masa fresca foliar (mg g<sup>-1</sup> MF).

### 3.2.2.5 Estimación de la funcionalidad de las membranas celulares

Se empleó el método conductimétrico para evaluar el daño producido por los tratamientos en las membranas celulares, siguiendo la metodología empleada por Lafuente *et al.* (1991). Se obtuvieron discos foliares de 0,6 cm de diámetro a partir de tres plantas de cada genotipo por tratamiento, colectándose material suficiente para realizar dos repeticiones por determinación, los que se lavaron tres veces con agua desionizada para eliminar los iones externos que pudieron ser liberados luego del corte. Posteriormente, se dejaron reposar en 20 mL de agua desionizada, durante 20 horas a 20°C. Transcurrido este tiempo, se midió el eflujo de electrolitos de los discos, tanto de las plantas tratadas como las plantas control, en un conductímetro CyberScan 200. En la fase final se sometieron los discos a muerte total del tejido; por calentamiento a 100°C durante quince minutos, para luego medir la conductividad final de la solución.

El porcentaje de electrolitos difundidos fuera de la membrana celular se calculó siguiendo la fórmula:

$$\% \text{ de electrolitos} = C_1 / C_2 \times 100$$

donde C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> son las lecturas conductimétricas previas y posteriores al tratamiento de muerte total, respectivamente.

### **3.3 Efecto de la aplicación de una temperatura moderada en la oscuridad y un choque de calor en condiciones luminosas, sobre la actividad fotosintética y el metabolismo oxidativo, en dos genotipos de tomate.**

#### **3.3.1 Material vegetal y tratamientos**

Las plantas de tomate de los genotipos Amalia y Nagcarlang se desarrollaron bajo las condiciones normales de crecimiento descritas en el epígrafe 3.1. A los treinta días se les impusieron diferentes tratamientos de temperatura.

Un grupo de plantas se sometió a la temperatura moderada de  $35\pm 0,6^{\circ}\text{C}$ , en condiciones de oscuridad por un período de cuatro horas durante tres días consecutivos, al terminar esta condición, las plantas se regresaron a las condiciones normales de crecimiento (Moderada).

Por otra parte, plantas de la anterior condición y de las que se desarrollaban normalmente, se sometieron a la temperatura de  $45\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas en condiciones de luz, Moderada+Choque y Choque, respectivamente. El tiempo esperado para imponer el tratamiento Choque en las plantas que recibieron el tratamiento Moderada fue de 20 horas. Estas plantas se iluminaron por dos horas ( $250 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) antes del tratamiento de temperatura a  $45^{\circ}\text{C}$ .

Un grupo de plantas de las condiciones normales de crecimiento sirvió de control, de manera que se analizaron cuatro tratamientos: Control, Moderada, Choque, Moderada+Choque. Cada tratamiento estuvo conformado por veinte plantas por genotipo.

Las evaluaciones fisiológicas y bioquímicas se realizaron 20 horas después de retornadas las plantas a las condiciones normales de crecimiento en el tratamiento llamado Moderada, mientras que las evaluaciones realizadas en las plantas que recibieron de algún modo el tratamiento de Choque (Choque, Moderada+Choque) se realizaron inmediatamente después de concluido el estrés.

#### **3.3.2 Evaluaciones realizadas y sus metodologías**

##### **3.3.2.1 Medida del estado hídrico de la planta**

Las determinaciones del potencial hídrico foliar ( $\Psi_h$ ), potencial osmótico foliar ( $\Psi_s$ ) y potencial de turgencia ( $\Psi_p$ ) se realizaron en tres plantas de cada genotipo por tratamiento, para verificar el estado hídrico de las plantas, siguiendo la metodología descrita en el epígrafe 3.2.2.1.

### 3.3.2.2 *Temperatura foliar y del suelo*

Las mediciones de la temperatura foliar de las plantas expuestas a las distintas condiciones de temperatura se realizaron, en tres plantas de cada genotipo por tratamiento, a través de un sensor de temperatura ubicado en la cámara de medición del Licor, modelo Li-6 400 (LI-COR INC., Lincoln, NE, USA). La temperatura del suelo, al nivel de la raíz, se determinó ubicando un termómetro de mercurio en el sustrato de tres macetas por tratamiento.

### 3.3.2.3 *Variables del intercambio gaseoso de las plantas. Análisis de las curvas de asimilación de CO<sub>2</sub> a diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> (Curvas (A/Ci))*

Las distintas variables que describen el intercambio gaseoso (fotosíntesis neta,  $A$ ; conductancia estomática,  $g_i$  y transpiración,  $Tr$ ) se determinaron utilizando un analizador de gases por infrarrojo portátil Licor 6 400, en la tercera hoja del ápice a la base, en dos plantas de cada genotipo por tratamiento. El comportamiento de las variables del intercambio gaseoso ante los distintos tratamientos se determinó siguiendo sus variaciones en un rango de concentración de CO<sub>2</sub> externa ( $C_a$ ) de 100 a 1 200  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , según la metodología descrita por Long y Bernacchi (2003). Se partió de valores de  $C_a = 350 \mu\text{mol mol}^{-1}$  que disminuyeron hasta  $100 \mu\text{mol mol}^{-1}$ . A partir de este valor,  $C_a$  se fijó nuevamente en  $350 \mu\text{mol mol}^{-1}$  y de ahí su concentración se incrementó hasta  $1 200 \mu\text{mol mol}^{-1}$  ( $C_a = 350, 250, 200, 150, 100, 350, 500, 750, 1 000, 1 200 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ). Para todas las curvas se comprobó que el valor de las variables de intercambio gaseoso ( $A$ ,  $g_i$  y  $Tr$ ) para  $C_i$  correspondiente a  $C_a = 350 \mu\text{mol mol}^{-1}$  fuera el mismo para las dos veces que se midió esta concentración. Las determinaciones se realizaron en condiciones constantes de flujo de gases ( $400 \mu\text{mol s}^{-1}$ ), intensidad de luz ( $Q = 1 800 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y superficie foliar ( $2 \text{ cm}^2$ ). Antes de comenzar las medidas se esperó a que la hoja se adaptara a las condiciones de la cámara de medición, de forma

que  $A$ ,  $g_i$  y  $C_i$  fueran completamente estables. Las medidas no se registraron hasta que el coeficiente de variación de  $A$  y  $C_i$  fue inferior a 0,1.

Las curvas  $A/C_i$  se analizaron según el modelo bioquímico de asimilación de  $\text{CO}_2$  propuesto por Farquhar *et al.* (1980), quienes propusieron que  $A$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) se define por la siguiente ecuación:

$$A = \min [A_c, A_q, A_p] - R_d,$$

donde  $A_c$  es la tasa de carboxilación limitada por la cantidad, estado de activación y propiedades cinéticas de la enzima Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigena (Rubisco);  $A_q$  es la tasa de carboxilación limitada por la tasa de regeneración de la Ribulosa Bisfosfato (RuBP),  $A_p$  es la tasa de carboxilación limitada por la regeneración de RuBP dependiente de la utilización de la triosa fosfato y  $R_d$  es la tasa de respiración mitocondrial.

En condiciones de luz saturante y  $C_i$  inferiores a  $250 \mu\text{mol mol}^{-1}$  la tasa de carboxilación de la enzima Rubisco está limitada por la cantidad, estado de activación y propiedades cinéticas de la enzima, descrita por la siguiente expresión:

$$A_c = V_{cmax} \frac{C_i - \Gamma^*}{C_i + K_c [1 + (O_i / K_o)]}$$

donde  $V_{cmax}$  es la velocidad máxima de carboxilación y obedece a la cinética competitiva de Michaelis-Menten con respecto al  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$ ,  $\Gamma^*$  es el punto de compensación de  $\text{CO}_2$  en ausencia de respiración mitocondrial,  $K_c$  y  $K_o$  son las constantes de Michaelis-Menten para el  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ , respectivamente y  $C_i$  y  $O_i$  son las presiones parciales internas del  $\text{CO}_2$  y el  $\text{O}_2$ , respectivamente. De los parámetros claves del modelo,  $V_{cmax}$  y  $J_{max}$  pueden variar entre especies, mientras que los parámetros  $K_c$ ,  $K_o$  y  $\Gamma^*$  varían con la temperatura y se refieren a las propiedades intrínsecas de la enzima Rubisco, los cuales son generalmente asumidos como constantes entre especie. En el experimento las variaciones de  $K_c$ ,  $K_o$  y  $\Gamma^*$  con la temperatura no se consideraron ya que las determinaciones de las curvas  $A/C_i$  se realizaron a temperatura de  $25^\circ\text{C}$ .

Cuando la carboxilación es limitada solamente por la regeneración de la RuBP vía transporte de electrones, la tasa de carboxilación, entonces puede ser expresada por:

$$Aq = \frac{J(Ci - \Gamma^*)}{4(Ci + 2\Gamma^*)}$$

donde  $J$  es la tasa potencial de transporte de electrones y el factor 4 indica que el transporte de cuatro electrones generan suficiente ATP y NADP H<sup>+</sup> para la regeneración de la RuBP en el Ciclo de Calvin (Farquhar y von Caemmerer, 1982). La tasa potencial de transporte de electrones es dependiente de la intensidad luminosa,  $Q$ , acorde a la expresión empírica de Smith (1937).

$$J = \alpha Q \left( 1 + \frac{\alpha^2 Q^2}{J_{max}^2} \right)^{1/2}$$

donde  $\alpha$  es la eficiencia de conversión de la energía y  $J_{max}$  es la tasa de transporte electrónico a máxima saturación de luz.

Finalmente cuando la utilización de las triosas fosfato restringe la carboxilación, la condición limitante puede ser descrita como:

$$Ap = \frac{3UTP}{(1 - \Gamma^*/Ci)}$$

donde UTP es la tasa de utilización de la triosas fosfato. Esta limitación comienza a ser importante cuando la utilización de las triosas fosfato para la producción de almidón y azúcar decae para mantenerse con la producción de triosas fosfato en el ciclo de Calvin y como resultado la disponibilidad de fósforo inorgánico comienza a limitar la asimilación de CO<sub>2</sub> (Harley y Sharkey, 1991; Harley *et al.*, 1992). Esta situación es poco probable, aunque existen evidencias recientes que señalan que las limitaciones impuestas a la asimilación de CO<sub>2</sub> por la utilización de las triosas fosfato pueden ser comunes bajo condiciones de elevada  $Ci$  y alta irradiación (Harley *et al.*, 1992). En esta experimentación no se tendrá en cuenta la limitación impuesta por la utilización de las triosas fosfato ya que no se observó en todos los tratamientos una caída en los valores de  $A$  para  $Ci$  elevada.

#### 3.3.2.4 Variables de la fluorescencia de la clorofila *a* en las plantas

Las determinaciones de fluorescencia de clorofila *a* se realizaron con el Licor 6 400, en hojas con similar estado de desarrollo a las empleadas para el intercambio gaseoso. Se emplearon cuatro plantas de cada genotipo por tratamiento, las que se incubaron en la oscuridad durante 20 minutos, previo al comienzo de las mediciones de fluorescencia. Las variables temperatura de la hoja (25°C) y concentración de CO<sub>2</sub> (350 μmol mol<sup>-1</sup>) se mantuvieron constantes. Los valores de *F<sub>o</sub>* se obtuvieron al hacer incidir en la superficie de la hoja una onda modulada de luz roja, mientras que los valores de *F<sub>m</sub>* se lograron después de un pulso de saturación de luz blanca (>8 000 μmol fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) de 0,8 segundos de duración. Los valores de *F<sub>v</sub>* se estimaron a partir de los valores de *F<sub>o</sub>* y *F<sub>m</sub>*. La nomenclatura utilizada fue según lo establecido por Maxwell y Johnson (2000), donde la relación *F<sub>v</sub>*/*F<sub>m</sub>* es considerada la eficiencia fotoquímica del FS<sub>II</sub>, el quenching fotoquímico, *q<sub>P</sub>*, es la proporción de centros de reacción de FS<sub>II</sub> abierto, el quenching no fotoquímico, *q<sub>N</sub>*, es la disipación de energía por vías no fotoquímicas.

#### 3.3.2.5 Actividad antioxidante enzimática

##### 3.3.2.5.1 Extracción de enzimas foliares

Todo el procedimiento de extracción se llevó a cabo a 4°C. Para la extracción de las enzimas se colectaron hojas de cuatro plantas de cada genotipo por tratamiento, las que se lavaron, cortaron y homogenizaron durante 2 ó 3 minutos en tampón fosfato potásico (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,8); empleando una relación masa / volumen de 1/2. Todos los tampones contenían ácido etileno-diamino tetra-acético (EDTA.Na<sub>2</sub>) (0,1 mmol L<sup>-1</sup>), cisteína (5 mmol L<sup>-1</sup>), polivinil pirrolidona 1% (m/v) (PVP), fenilmetilsulfonilfluoruro (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) (PMSF) y Tritón X-100 (0,2 % v/v). Para la extracción de la enzima Ascorbato Peroxidasa se incluyó en el tampón de extracción ácido ascórbico (20 mmol L<sup>-1</sup>) y se omitió el EDTA.Na<sub>2</sub>.

Los extractos se filtraron a través de una capa de malla de plástico y se centrifugaron a 15.000 x g durante diez minutos, los sobrenadantes se colectaron y se filtraron a través de una columna de Sephadex G 50 PD 10 (Pharmacia Biotech AB),

equilibrada con los respectivos tampones de extracción. Los extractos se almacenaron a -20°C, excepto el de la enzima Ascorbato Peroxidasa, actividad que se determinó inmediatamente.

### 3.3.2.5.2 Actividad de la enzima Superóxido Dismutasa

Se determinó la actividad total de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) y de las isoformas presentes en el extracto.

Para la determinación de la actividad SOD total, se empleó el método del citocromo "c", basado en la inhibición, por la SOD, de la reducción del mismo por los radicales libres  $O_2^-$  generados por el sistema enzimático xantina-xantina oxidasa (McCord y Fridovich, 1969). El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 3 ml de una mezcla de reacción que contenía citocromo "c" (1 mmol L<sup>-1</sup>), xantina (1 mmol L<sup>-1</sup>), tampón fosfato potásico (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,8), EDTANa<sub>2</sub> (0,1 mmol L<sup>-1</sup>), y 25-100 µL de la muestra. La reducción del citocromo "c" se siguió por registro continuo a 550 nm en un espectrofotómetro de doble haz, termostatado a 25°C (Shimadzu modelo UV-260).

Una unidad de actividad SOD se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir una inhibición del 50 % en la velocidad inicial de reducción del citocromo "c" en la reacción a 25°C (McCord y Fridovich, 1969). La actividad enzimática, en U<sub>SOD</sub> mL<sup>-1</sup>, se calculó a partir del porcentaje de inhibición producido por la muestra, según la expresión:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{A_{550}/\text{min}(\text{control}) - A_{550}/\text{min}(\text{problema})}{A_{550}/\text{min}(\text{control})} \times 100$$

$$\text{Unidades de SOD/ml} = \frac{\% \text{ inhibición}}{50\% \cdot V} \times f$$

donde A es la absorbancia a la longitud de onda que se señala, V es el volumen de la muestra utilizada expresada en mL y f es el factor de dilución empleado. La actividad de la enzima finalmente se expresó en U<sub>SOD</sub> mg<sup>-1</sup> de proteína.

Para la identificación de las isoenzimas presentes en el extracto se utilizó la técnica cromatográfica de isoelectroenfoco, utilizando geles de Acrilamida / Bis de 30% (37,5:1 m/m). La preparación de los geles fue a partir de una solución madre que

contenía 9,7% de acrilamida y 0,3% de bis-acrilamida, a la que se le añadió anfolitos (Pharmacia) al 30% (v/v), con rango de pH entre 4-6 y 1,25 mL de glicerol. La mezcla se desgasificó y finalmente para la gelificación se añadieron 12,5  $\mu\text{L}$  de N,N,N',N' tetrametilolileno diamino (TEMED) y una solución de persulfato de amonio al 10% (m/v).

Las muestras, para los desarrollos electroforéticos, se diluyeron convenientemente en sacarosa al 60% (m/v) y se les añadió anfolitos al 40% (v/v). El volumen de muestra aplicada garantizó una concentración de 200  $\mu\text{g}$  de proteína. Se utilizó una solución de rojo de metilo como indicador de la formación del gradiente de pH.

El desarrollo electroforético se llevó a cabo a 4°C, con un pre recorrido a 250 V durante treinta minutos, y cada treinta minutos se incrementó en 50 V hasta alcanzar 450 V. El tiempo posterior de la corrida se efectuó a voltaje constante de 450 V, durante cuatro horas. Este tiempo fue el óptimo para la formación del gradiente de pH y para la focalización de las SODs presentes en los diferentes extractos.

La actividad SOD se detectó en los geles por el método fotoquímico de Weisiger y Fridovich (1973), basado en la reducción del nitro azul tetrazolio (NBT) por los radicales libres  $\text{O}_2^-$  generados por la acción de la luz sobre una solución de riboflavina y TEMED.

La identificación de la actividad de las distintas isoenzimas de la SOD se efectuó mediante el uso de inhibidores específicos (KCN y  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Una vez acabado el desarrollo electroforético, los geles se incubaron en tampón fosfato potásico (50  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,8), EDTA. $\text{Na}_2$  (0,1  $\text{mmol L}^{-1}$ ) en presencia de KCN (2  $\text{mmol L}^{-1}$ ) para inhibir la actividad Cu/Zn-SOD y en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5  $\text{mmol L}^{-1}$ ) para inhibir la actividad Cu/Zn-SOD y Fe-SOD. Una vez lavados los geles con el mismo tampón, se efectuó el revelado fotoquímico de la actividad de la SOD por el método del NBT descrito anteriormente.

La cuantificación de las actividades de las distintas isoformas se realizó utilizando un analizador de imagen (Gen Tools, Syngene, 1998). Conocidos los porcentajes de actividad de las isoenzimas, la actividad de cada isoenzima se obtuvo multiplicando la actividad total de la SOD determinada según el método de McCord y Fridovich (1969), por los respectivos porcentajes.

### 3.3.2.5.3 Actividad de la enzima Ascorbato Peroxidasa

La actividad de la enzima Ascorbato Peroxidasa (APX) se determinó según el método de Hossain y Asada (1984), basado en la medida, a 290 nm, de la oxidación del ácido ascórbico. La mezcla de reacción se efectuó en un volumen final de 1 mL, que contenía tampón de N-2- hidroxietilpiperazina-N'- ácido etanosulfónico (HEPES-NaOH, 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,6), ascorbato (0,22 mmol L<sup>-1</sup>), y 20-100 µL de muestra, convenientemente diluida. La reacción a 25°C se inició añadiendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3 mmol L<sup>-1</sup>), siguiéndose la oxidación del ascorbato durante un minuto, a intervalos de diez segundos tras la adición del peróxido de hidrógeno, frente a un blanco constituido por el tampón de reacción y la muestra, sin el peróxido de hidrógeno. La actividad enzimática, expresada en µmol minuto<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup> se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción con un coeficiente de extinción molar para el ácido ascórbico de 2,8 mM cm<sup>-1</sup> (Hossain y Asada, 1984). Finalmente la actividad APX se expresó en nmoles min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

#### 3.3.2.5.4 Actividad de la enzima Catalasa

La actividad de la enzima Catalasa (CAT) se desarrolló según el método espectrofotométrico descrito por Aebi (1984), basado en la medida de la disminución de la absorbancia a 240 nm motivada por la desaparición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El ensayo se efectuó a 25°C en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-240), equipado con un accesorio de termoestabilización y empleando 900 µL de una mezcla de reacción que contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v) y tampón fosfato potásico (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0). La reacción se inició por la adición de 25-100 µL de muestra, convenientemente diluida con el tampón de reacción, que contenía Tritón X-100 al 0,1% (v/v). Como blanco se empleó la solución tampón. La actividad enzimática, expresada en µmol minuto<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción con un coeficiente de extinción molar para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 39,58 M cm<sup>-1</sup> (Del Río *et al.*, 1978). Finalmente la actividad se expresó en mmol minuto<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

#### 3.3.2.6 Estado oxidativo de las plantas

##### 3.3.2.6.1 Contenido de peróxido de hidrógeno foliar

Para la determinación del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 0,5 gramos de tejido foliar, proveniente de tres plantas de cada genotipo por tratamiento, se maceraron en 1 mL de tampón HEPES-NaOH (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) y EDTA.Na<sub>2</sub> (1 mmol L<sup>-1</sup>). El extracto se

filtró a través de cuatro capas de malla de plástico y se centrifugó a 15. 000 x g durante diez minutos. Este procedimiento se llevó a cabo a 4°C y de manera rápida, para reducir la pérdida de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la extracción. El sobrenadante se utilizó inmediatamente para la determinación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

El contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se determinó por un ensayo de peroxidasa acoplada, usando 4 -aminoantipirina y fenol como sustrato donador (Gómez *et al.*, 2004).

Para el ensayo se tomaron 200 µL del extracto a los que se les añadió 4 mL de una solución preparada en tampón fosfato potásico (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,9), que contenía: 4-aminoantipirina (5 mmol L<sup>-1</sup>), fenol (2,5 mmol L<sup>-1</sup>), peroxidasa (2 x 10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup>) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>), igualándose los volúmenes a 10 mL con agua ultrapura (milli-Q), agitando bien la mezcla. Transcurrido cinco minutos, a temperatura ambiente, se efectuó la lectura a 505 nm, frente a un blanco con agua ultra pura (milli Q).

Se realizó una curva patrón de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con un intervalo de concentración desde 0,62 a 10,0 µmol L<sup>-1</sup>, a partir de una solución madre de peróxido de hidrógeno de 20 µmol L<sup>-1</sup>. Los valores de densidad óptica del extracto se interpolaron sobre la recta patrón y se obtuvo la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nmol mL<sup>-1</sup>.

#### 3.3.2.6.2 Contenido de malondialdehído en las plantas

El índice de peroxidación lipídica se estimó siguiendo la metodología descrita por Buege y Aust (1972), basada en la medida a 535 nm, del contenido en malondialdehído (MDA). El extracto vegetal se obtuvo a partir de 2 gramos de tejido foliar, de tres plantas de cada genotipo por tratamiento, homogenizado con tampón fosfato potásico (100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0) y PMSF (0,1 mmol L<sup>-1</sup>). Éste se filtró a través de dos capas de malla de plástico y se centrifugó a 14. 000 x g durante diez minutos, colectándose el sobrenadante para la determinación de MDA.

Para el ensayo se tomaron 200 µL de las soluciones de la curva patrón y volúmenes de 200 µL del extracto y se les añadió 1 mL de un reactivo que contenía ácido tricloroacético al 15% (m/v), ácido tiobarbitúrico al 0,375% (m/v) y butilhidroxitolueno al 0,01% (m/v), preparado en HCl (0,25 N), agitando bien la mezcla. Posteriormente, la mezcla se calentó durante quince minutos a 95°C con agitación. Se dejó enfriar y se centrifugó a 2 000 x g durante cinco minutos, efectuándose la lectura frente a un blanco de agua ultrapura (Mili-Q).

Se realizó una curva patrón de malondialdehído dimetil acetal con un intervalo de concentración de 0,05 a 5,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a partir de una solución madre de 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Los valores de densidad óptica del extracto se interpolaron sobre la recta patrón y se obtuvo la concentración de MDA  $\text{nmol mL}^{-1}$ , la concentración de malondialdehído se expresó en  $\text{nmol de MDA mg}^{-1}$  proteína.

#### 3.3.2.6.3 Contenido de proteínas solubles: *totales y modificadas oxidativamente*

El extracto vegetal se obtuvo a partir de 1 gramo de tejido foliar, con una representación de tres plantas de cada genotipo por tratamiento, el que se homogenizó con tampón fosfato potásico (100  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0) y un inhibidor de proteasa. El extracto se filtró a través de dos capas de plástico y centrifugó a 14.000 g durante quince minutos, colectándose el sobrenadante para la determinación de las proteínas.

La concentración de proteínas solubles totales se determinó por el método de Bradford (1976), empleando albúmina de suero bovino (ASB) como patrón de calibración en un rango de 4 a 100  $\mu\text{g}$ , preparadas a partir de una solución madre de 800  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y determinándose la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas se expresó en  $\text{mg mL}^{-1}$ .

La cuantificación de las proteínas modificadas oxidativamente (carbonil proteínas) se realizó siguiendo la metodología descrita por Prasad (1996). Las muestras se incubaron durante quince minutos con sulfato de estreptomicina al 10% (m/v) en tampón fosfato potásico (100  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,4). Después de centrifugadas a 2 000 x g durante diez minutos, el sobrenadante se mezcló con dinitrofenil hidracina (DNPH) (20  $\text{mmol L}^{-1}$ ) en HCl (2  $\text{mol L}^{-1}$ ) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. El blanco fue incubado con HCl (2  $\text{mol L}^{-1}$ ). Las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) y el precipitado se enjuagó tres veces con 500  $\mu\text{L}$  de etanol / etilacetato (1:1 v/v). El precipitado se resuspendió finalmente en 600  $\mu\text{L}$  de guanidina (6  $\text{mol L}^{-1}$ ) y se leyó la absorbancia a 360 nm. El contenido de carbonil proteínas se calculó usando un coeficiente de absorción molar para hidrazonas alifáticas de 22 000  $\text{M cm}^{-1}$  (Prasad, 1996). La concentración de proteínas modificadas oxidativamente se expresó en  $\text{nmol mg}^{-1}$  proteína.

### **3.4 Efecto del período breve de exposición a diferentes temperaturas foliares en la funcionalidad del aparato fotosintético, en dos genotipos de tomate.**

#### **3.4.1 Material vegetal, condiciones de cultivo y tratamientos**

Plantas de los genotipos de tomate Amalia y Nagcarlang, crecieron en condiciones controladas de temperatura de 25/18°C, día /noche, humedad relativa del 40% e intensidad luminosa de 165  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . El resto de las condiciones fueron similares a las descritas en el epígrafe 3.1.

Treinta días después de la emisión de la radícula, la tercera o cuarta hoja, numeradas del ápice a la base, se colocó en la cámara de medición del Licor 6 400, quedando encerrada en ella un área foliar de aproximadamente 2  $\text{cm}^2$ . Las temperaturas de 25 y 35°C se establecieron en la sección foliar, durante diez minutos, con la ayuda del equipo. A partir de este tiempo se evaluaron las distintas variables que describen el funcionamiento del aparato fotosintético.

#### **3.4.2 Variables evaluadas y sus metodologías**

##### **3.4.2.1 Variables del intercambio gaseoso de las plantas. Análisis de las curvas de asimilación de $\text{CO}_2$ a diferentes concentraciones de $\text{CO}_2$ (Curvas $A/C_i$ )**

Las determinaciones de  $A$ ,  $g_i$  y  $T_r$ , se realizaron inmediatamente después de que en las hojas se alcanzaran los valores de temperatura anteriormente señalados. La metodología seguida para la determinación de estas variables fue la empleada en el epígrafe 3.3.2.3.

El análisis de las curvas  $A/C_i$  se realizó según lo descrito en el epígrafe 3.3.2.3. En el experimento las variaciones de  $K_c$ ,  $K_o$  y  $\Gamma^*$  se consideraron teniendo en cuenta la temperatura a la cual se determinaron las curvas  $A/C_i$ .

##### **3.4.2.2 Variables de la fluorescencia de clorofila *a* en las plantas**

La determinación de la fluorescencia de clorofila *a* se realizó en hojas similares a las escogidas para las medidas del intercambio gaseoso, sobre cuatro plantas de cada

genotipo por tratamiento, siguiendo la metodología descrita en el epígrafe 3.3.2.4. Las variables de fluorescencia  $F_o$ ,  $F_m$ ,  $F_v/F_m$ ,  $qP$  y  $qN$  se leyeron directamente del equipo. Los valores de  $F_v$  se estimaron a partir de los valores de  $F_o$  y  $F_m$ .

### 3.5 Análisis estadístico

El montaje de los experimentos se realizó con un diseño completamente aleatorizado. Los datos de las variables fisiológicas (asimilación de  $\text{CO}_2$ , conductancia, y fluorescencia de clorofila) y bioquímicas (contenido de pigmentos, eflujo de electrolitos, actividad SOD, APX, CAT y contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , MDA y proteínas totales y modificadas oxidativamente) se sometieron a un análisis de varianza de clasificación simple para efectos fijos y en caso de diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan (1951). Se comprobó en todos los casos que existía normalidad en los valores y homogeneidad de varianza.

Los puntos de las curvas  $A/C_i$ ,  $g_i/C_i$ ,  $Tr/C_i$ , representan el valor medio de las dos determinaciones realizadas para cada valor de  $C_i$ , con su error estándar. Los valores de  $V_{cmax}$  y  $J_{max}$  se estimaron a partir del ajuste de las curvas  $A/C_i$  mediante el análisis de regresión no-lineal de mínimos cuadrados, a Q saturante y  $C_i < 250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , en el caso de  $V_{cmax}$ ;  $C_i > 250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , en el caso de  $J_{max}$ . A partir de estos se obtuvieron las curvas  $A_c$  y  $A_q$ , para todo el rango de concentraciones internas de  $\text{CO}_2$  ensayados en el experimento.

## 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Efecto de diferentes tiempos de exposición a la alta temperatura en el funcionamiento del aparato fotosintético de tres genotipos de tomate.

#### 4.1.1 Medida del estado hídrico de la planta

Los valores del potencial hídrico foliar ( $\Psi_h$ ) y del potencial de presión ( $\Psi_p$ ) determinados en las plantas expuestas a los distintos tratamientos de temperatura, en los tres genotipos, se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Potencial hídrico foliar,  $\Psi_h$  (MPa) y de presión,  $\Psi_p$  (MPa), de hojas de plantas de tres genotipos de tomate expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25°C y 45°C, durante 2 y 3 horas). Los valores representan la media de cuatro determinaciones  $\pm$  el error estándar y letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. (no significativo (ns), \*  $p < 0,05$ ).

Genotipos	Tratamientos	$\Psi_h$	$\Psi_p$
Campbell-28	Control	-0,58 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,02
	45°C-2 horas	-0,64 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,03
	45°C-3 horas	-0,55 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,001
significación		ns	ns
Amalia	Control	-0,43 $\pm$ 0,01 b	0,43 $\pm$ 0,01
	45°C-2 horas	-0,31 $\pm$ 0,006 a	0,52 $\pm$ 0,09
	45°C-3 horas	-0,33 $\pm$ 0,02 a	0,68 $\pm$ 0,05
significación		*	ns
Nagcarlang	Control	-0,57 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,02
	45°C-2 horas	-0,62 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,02
	45°C-3 horas	-0,63 $\pm$ 0,008	0,33 $\pm$ 0,09
significación		ns	ns

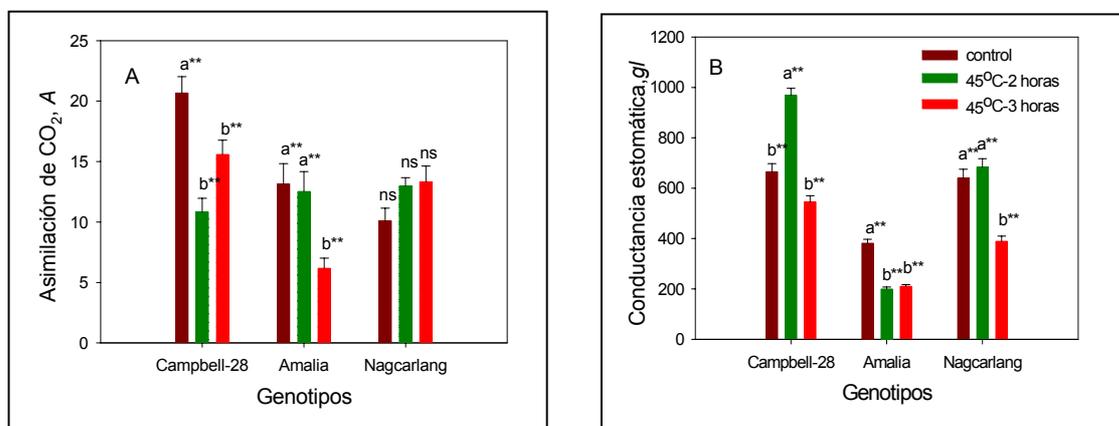
Las variables hídricas analizadas mostraron un comportamiento particular en cada genotipo. No se observaron modificaciones significativas en los valores de potencial  $\Psi_h$

y de  $\Psi_p$  en las plantas que recibieron los distintos tratamientos de temperatura en los genotipos Campbell-28 y Nagcarlang. Por el contrario, en el genotipo Amalia, las plantas tratadas con calor incrementaron significativamente los valores de  $\Psi_h$ , lo que refleja un estado hídrico favorable en estas plantas. Las variaciones en los  $\Psi_h$  no tuvieron un efecto significativo en los valores de potencial de presión,  $\Psi_p$ .

Es de destacar que en el experimento ninguna de las condiciones de temperatura impuestas provocaron un estado hídrico desfavorable en las plantas de los genotipos estudiados, lo que permite confirmar que las mismas no sufrieron deshidratación por los tratamientos impuestos, por lo que todas las afectaciones observadas en el aparato fotosintético y otras funciones fueron provocadas sólo por procesos asociados al estrés de alta temperatura.

#### 4.1.2 Variables del intercambio gaseoso de las plantas

La asimilación de  $\text{CO}_2$  (A) y las tasas de conductancia estomática ( $g_l$ ) se vieron modificadas por la alta temperatura y el tiempo de exposición de forma diferenciada en cada genotipo (Figura 1).



**Figura 1.** Asimilación de  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (A) y conductancia estomática ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (B); de plantas de tres genotipos de tomate expuestas a distintos tratamientos de temperatura ( $25^\circ\text{C}$  y  $45^\circ\text{C}$ , durante 2 y 3 horas). Las barras verticales representan el error estándar y letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. (no significativo (ns),  $**p < 0,01$ ).

En el genotipo Campbell-28 se encontró una reducción significativa del 48 y 25% en la tasa de asimilación neta en las plantas tratadas por 2 y 3 horas, respectivamente. Sin embargo, en Amalia se pudo comprobar por primera vez, que exposiciones breves (no

superior a 2 horas) no afectan los valores de asimilación de CO<sub>2</sub>, mientras que para exposiciones superiores (3 horas) esta variable se reduce en más de un 50% (Figura 1A). Resultados anteriores señalan, que en el cultivo del tomate, temperaturas de 40°C son suficientes para provocar reducciones significativas en los valores de fijación de CO<sub>2</sub> (Starck *et al.*, 1993).

El genotipo silvestre Nagcarlang no experimentó afectaciones en los valores de asimilación de CO<sub>2</sub> en ninguna de las condiciones de temperatura (Figura 1A).

Se debe señalar, la elevada tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> presentada por las plantas control del genotipo Campbell-28 en relación con el resto de los genotipos, lo cual pudiera estar asociada al potencial productivo de este genotipo. Por su parte, el genotipo Amalia, aun cuando presenta un alto potencial productivo, mostró valores de asimilación intermedios y con mayor similitud a los detectados en el genotipo silvestre Nagcarlang, lo cual pudiera estar relacionado con la eficiencia de los sitios de consumo, en particular los frutos.

Los cambios en la tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub> reflejan alteraciones en el componente estomático y/o mesofílico del aparato fotosintético, donde el componente estomático depende de la resistencia que imponen los estomas al intercambio gaseoso, mientras que la capacidad mesofílica depende de la actividad de la enzima Rubisco y la capacidad del transporte electrónico para regenerar la RuBP (von Cammerer y Farquhar, 1981).

La Figura 1B muestra el efecto de los distintos tratamientos en el componente estomático, expresado a través de los valores de conductancia estomática ( $g_l$ ). Los valores de  $g_l$  detectados en los distintos genotipos no estuvieron, en todos los casos, relacionados con los valores de  $A$ .

Un incremento en los valores de  $g_l$  caracterizó la respuesta del genotipo Campbell-28 ante el incremento de la temperatura durante 2 horas, condición que provocó las mayores afectaciones en los valores de fijación de CO<sub>2</sub> fotosintética y una reducción no significativa del potencial hídrico ( $\Psi_h$ ) foliar. Esta apertura estomática ante el incremento de la temperatura favorece la disipación de energía (calor) por esta vía. Sin embargo, tal situación no puede ser prolongada en el tiempo, porque provocaría un desbalance hídrico en las plantas, de ahí que una reducción en los valores  $g_l$ , similar a

las plantas control, se haya registrado en las plantas expuestas a 45°C-3 horas (Figura 1B).

El comportamiento de los estomas ante el incremento de la temperatura, del genotipo Campbell-28, permite inferir que la reducción en los valores de  $A$  no se debió a modificaciones en el componente estomático (Makino *et al.*, 1994; Heckathorn *et al.*, 1997; Xiong *et al.*, 1999), sino a afectaciones mesofílicas, probablemente en la activación de la enzima Rubisco (Feller *et al.*, 1998, Law y Crafts-Brandner, 1999) u otras enzimas del Ciclo de Calvin como la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup> y la fru-1,6-bifosfatasa (Loggini *et al.*, 1999).

Por su parte, una reducción significativa en los valores de  $g_l$  ante el incremento de la temperatura caracterizó la respuesta de los genotipos Amalia y Nagcarlang, con la particularidad que éste último lo hizo solamente en las plantas estresadas durante 3 horas (Figura 1B). Es de notar, que en el genotipo Amalia la respuesta estomática detectada en las plantas tratadas no se correspondió con los valores de potencial hídrico ( $\Psi_h$ ) de las mismas, al concluir el periodo de estrés. Teniendo en cuenta los resultados, no se puede justificar a simple vista, que el cierre estomático fue consecuencia de un estado hídrico desfavorable en las plantas. De ahí, que se propongan dos hipótesis para explicar la respuesta estomática de las plantas al calor. La primera considera que ante el incremento brusco de la temperatura del aire, la tasa de transpiración de las plantas se eleva, y como consecuencia una pérdida excesiva de agua provoca un estado hídrico desfavorable en las plantas, permitiendo de esta manera un cierre estomático. Este mecanismo de respuesta se propone su acción en los primeros minutos u horas de implantado el estrés, ya que con el tiempo, el estado hídrico de la planta puede recuperarse por el adecuado abastecimiento de agua. Sin embargo, en el experimento las plantas se expusieron a 45°C durante 2 y 3 horas, momento en que se hicieron las determinaciones de las variables hídricas y de conductancia estomática y donde la posible acción de este mecanismo no pudo ser detectado. La segunda hipótesis considera que ante el incremento de la temperatura del aire, la diferencia de presión de vapor entre la hoja y el aire se incrementa, permitiendo un desbalance hídrico foliar localizado al nivel de las células del aparato

estomático, lo cual justifica un cierre estomático. Bajo estas condiciones se descarta un desbalance hídrico de las plantas.

De forma general, se plantea que la respuesta estomática detectada en los genotipos Amalia y Nagcarlang, en condiciones de alta temperatura, sugiere la acción de mecanismos de tolerancia encaminados a la preservación del estado hídrico de las plantas, en condiciones donde los procesos de evapotranspiración se ven favorecidos. Sin embargo, no se debe descartar el efecto inhibitorio que ejerce el cierre estomático en el proceso de asimilación de CO<sub>2</sub> en plantas C<sub>3</sub>, donde una limitada difusión del CO<sub>2</sub> a los espacios intercelulares reduce la relación de la actividad carboxilasa / oxigenasa de la enzima Rubisco, lo que se traduce en un incremento en el proceso de fotorrespiración (Berry y Björkman, 1980). Tal situación pudiera estar presente en las plantas expuestas a 45°C-3 horas en el genotipo Amalia donde las reducciones en los valores A se relacionaron con modificaciones en el componente estomático.

Estudios realizados en diferentes cultivos reflejan la heterogeneidad de la respuesta estomática que no responde solamente al incremento de la temperatura, sino que otros factores tales como el estado hídrico de la planta, la diferencia de presión de vapor entre la hoja y el medio, entre otros, pueden generar diferentes comportamientos estomáticos (Starck *et al.* 1993, Xiong *et al.* 1999, Law y Crafts-Brandner 1999, Xiong *et al.*, 2000).

Si bien no se encontró una clara relación entre la respuesta estomática y la asimilación de CO<sub>2</sub> en los genotipos estudiados, sí se comprobó que el genotipo de mayor susceptibilidad (Campbell-28) respondió con un incremento en la  $g_l$  mientras que los genotipos de moderada y alta tolerancia (Amalia y Nagcarlang) respondieron con un cierre estomático.

Shabala (1996) describió dos temperaturas críticas en la respuesta estomática a las altas temperaturas, la primera incluye la apertura estomática y la segunda genera un cierre estomático. Por otra parte, señala que los valores de este momento crítico pueden depender de los cambios en la temperatura ambiente. En los genotipos estudiados, la relación entre la respuesta estomática y la capacidad de asimilación de

CO<sub>2</sub> no es evidente. Sin embargo, se puede concluir, de los resultados, que los diferentes momentos críticos en la respuesta estomática, descritos por Shabala (1996), no sólo dependen de los cambios en la temperatura ambiente sino también de la especie o genotipo y del tiempo de exposición.

La respuesta diferenciada en la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> y el comportamiento estomático en cada genotipo sugiere que diferentes mecanismos de respuesta a la alta temperatura se activaron de forma diferenciada para una misma condición de estrés, dependiendo del genotipo.

#### 4.1.3 Variables de fluorescencia de clorofila a de las plantas

Las reacciones involucradas en la captura de luz en el FS<sub>II</sub> se vieron diferencialmente modificadas por los distintos tratamientos ensayados. La respuesta de los genotipos Campbell-28 y Amalia se caracterizó por un incremento en los valores de Fo con la temperatura. La termotolerancia del genotipo silvestre Nagcarlang fue evidente a través de la estabilidad térmica en los elementos involucrados en la captación de luz (Tabla 2).

**Tabla 2.** Fluorescencia inicial (Fo), fluorescencia máxima (Fm) y eficiencia fotoquímica del FS<sub>II</sub>, (Fv/Fm) de plantas de tres genotipos de tomate expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25°C y 45°C, durante 2 y 3 horas). Los valores representan la media de cuatro determinaciones ± el error estándar y letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. (no significativo (ns) \* p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001).

Genotipos	Tratamientos	Fo	Fm	Fv/Fm
Campbell-28	Control	324,2± 6,4 b	1595,2±31,2	0,80± 0,0 a
	45°C-2 horas	422,0± 24,5 a	1357,7±23,9	0,69± 0,0 b
	45°C-3 horas	405,0± 22,6 a	1478,0±37,6	0,73± 0,1 b
significación		*	ns	*
Amalia	Control	342,7± 8,3 b	1648,0±25,2	0,80± 0,1 a
	45°C-2 horas	830,7± 7,4 a	1684,2±36,3	0,51± 0,0 b
	45°C-3 horas	895,3± 9,2 a	1645,6±37,2	0,43± 0,0 b
significación		*	ns	***
Nagcarlang	Control	366,0± 17,6	1561,0±43,6	0,77± 0,0
	45°C-2 horas	333,2± 14,3	1517,2±24,2	0,78± 0,0
	45°C-3 horas	373,0± 14,0	1553,3±25,5	0,76± 0,0
significación		ns	ns	ns

El incremento en los valores de  $F_o$  en los genotipos Campbell-28 y Amalia indica que la alta temperatura ejerció su efecto sobre el  $FS_{II}$ , disminuyendo su capacidad funcional relacionada con la captación y migración de energía en los centros de reacción, como resultado de una disociación física de los Complejos Captadores de Luz (LHC) o en el centro de reacción del  $FS_{II}$  (Havaux, 1993). Los resultados coinciden con trabajos previos, llevados a cabo en diferentes especies, que señalan un incremento en los eventos directamente dependientes de la luz ( $F_o$ ) con el incremento de la temperatura (Armond *et al.*, 1980; Bukhov *et al.*, 1990; Cao y Govindjee, 1990; Havaux, 1993; Goltsev *et al.*, 1994, Georgieva *et al.*, 2000).

La emisión de fluorescencia máxima ( $F_m$ ), la cual tiene lugar cuando todos los aceptores primarios de electrones están reducidos y es dependiente de los eventos fotoquímicos primarios, no se modificó por las distintas condiciones de estrés de calor en los genotipos estudiados.

Por su parte, la eficiencia fotoquímica del  $FS_{II}$ , determinada mediante la relación  $F_v/F_m$  se modificó con el incremento de la temperatura de forma particular en cada genotipo (Tabla 2). En las plantas del genotipo Campbell-28 estresadas durante 2 horas se detectó una disminución del 14%, mientras que las plantas estresadas durante 3 horas presentaron reducciones del 9%. En el genotipo Amalia, el tiempo de exposición a la alta temperatura incrementó las afectaciones notadas en la  $F_v/F_m$ , llegando a ser de un 47% en las plantas estresadas durante 3 horas (Tabla 2). Las afectaciones en la funcionalidad del  $FS_{II}$  por las altas temperaturas se han señalado en plantas de maíz (Heckathorn, Coleman y Hallberg, 1997). Existen evidencias de que los estreses ambientales, como bajas y altas temperaturas, limitan la habilidad de las plantas para utilizar la energía solar e incrementan la respuesta fotoinhibitoria (Krause, 1994, Stefanov *et al.*, 1996, Georgieva *et al.*, 2000).

Como indican las distintas variables de fluorescencia analizadas, la reducción detectada en la eficiencia fotoquímica, en los genotipos Campbell-28 y Amalia, es explicada por afectaciones en los valores de captación de energía ( $F_o$ ). En cambio, los eventos fotoquímicos primarios de transferencia de energía desde el centro de reacción

del FS<sub>II</sub> a los aceptores primarios de electrones no tuvieron un efecto significativo en la eficiencia del FS<sub>II</sub>.

En el genotipo Campbell-28 la magnitud de las afectaciones en la eficiencia fotoquímica del FS<sub>II</sub> ( $Fv/Fm < 50\%$ ) no permite justificar los valores reducidos de asimilación fotosintética encontradas en las plantas tratadas, si se tiene en cuenta que esto solamente es posible si cerca del 50% del complejo del FS<sub>II</sub> es inactivado (Öquist y Malmber, 1989; How-Yeon *et al.*, 1999). Los resultados encontrados en los genotipos Campbell-28 (ambos tratamientos) y Amalia (45°C-3horas) permiten sugerir que el incremento en los valores de  $F_o$  parece operar como un mecanismo de disipación de energía para evitar la sobreexcitación de la cadena transportadora de electrones, evitando afectaciones severas en la eficiencia fotoquímica que comprometan los valores de asimilación de CO<sub>2</sub>. Algunos estudios previos señalan que el efecto de las altas temperaturas en los centros de reacción del FS<sub>II</sub> resulta de la acción sobre una proteína denominada D<sub>1</sub>, (Rintamaki *et al.*, 1994; Asada *et al.*, 1998), la cual es fosforilada y posteriormente degradada, lo que ocasiona su inactivación. La síntesis de *novo* de la proteína D<sub>1</sub> es un proceso rápido, lo que sugiere que la degradación de la misma bajo condiciones de exceso de fotones es una emergencia para evitar la sobre-reducción de los transportadores de electrones intersistemas y protegerlos de la fotoinhibición (Asada *et al.*, 1998).

Una situación contraria se encontró en las plantas tratadas con calor durante 3 horas en el genotipo Amalia, donde las afectaciones fotoquímicas (47%) parecen influir en los valores reducidos de asimilación encontrados en estas plantas. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de afectaciones en las enzimas involucradas directamente en la fijación fotosintética de CO<sub>2</sub>.

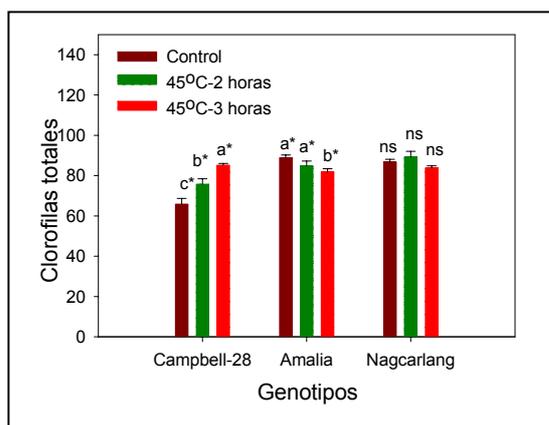
En el genotipo Nagcarlang, la estabilidad de las reacciones fotoquímicas en condiciones de estrés y el mantenimiento de niveles adecuados de asimilación de CO<sub>2</sub>, indican el establecimiento de mecanismos eficientes, que le confieren cierta tolerancia al aparato fotosintético. Estos resultados aportan información novedosa relacionada con la fisiología del aparato fotosintético de este genotipo, el cual es considerado por la literatura internacional como un genotipo termotolerante (Stevens, 1979; Villareal y Lai,

1979; Bar-Tsur *et al.*,1985; Trabelsi *et al.*, 1986 y Rich, 1986, Tomato Genetic Cooperative Report, 1994).

#### 4.1.4 Contenido de pigmentos fotosintéticos foliares

El contenido de clorofilas totales mostró modificaciones diferenciadas dependiendo de la condición de temperatura y el genotipo (Figura 2).

Con el aumento de la temperatura y del tiempo de exposición, se detectó un incremento significativo en el contenido de clorofilas totales en el genotipo Campbell-28, mientras que en el genotipo Amalia, la condición de 45°C-3 horas provocó reducciones significativas. En el genotipo silvestre Nagcarlang, ninguna de las condiciones térmicas modificó el contenido de clorofilas totales.

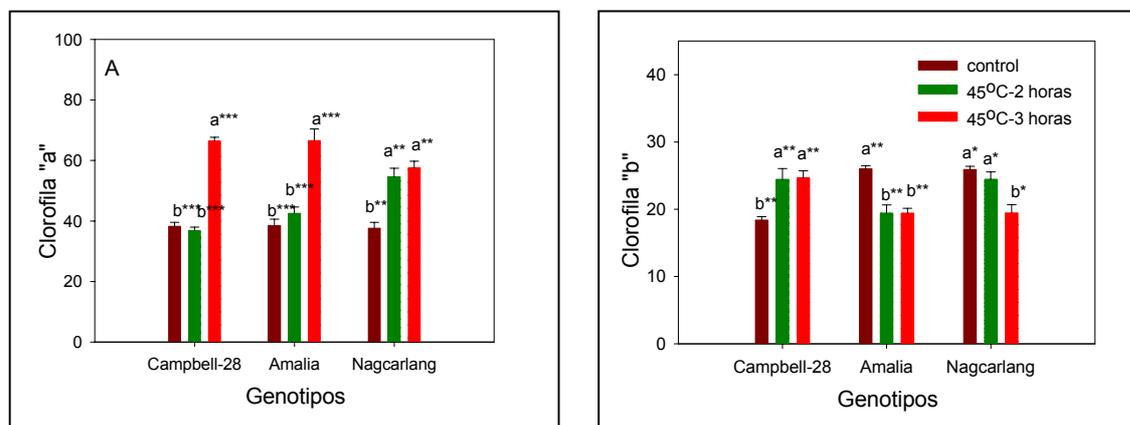


**Figura 2.** Contenido de clorofilas totales foliares ( $\text{mg g}^{-1}\text{MF}$ ); de plantas de tres genotipos de tomate expuestas a distintos tratamientos de temperatura ( $25^{\circ}\text{C}$  y  $45^{\circ}\text{C}$ , durante 2 y 3 horas). Las barras verticales representan el error estándar y letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. (no significativo (ns) \*  $p < 0,05$ ).

El contenido de clorofila **a** y **b**, varió significativamente según el tratamiento de exposición a la alta temperatura en los genotipos estudiados. En todos los genotipos se detectó un incremento en el contenido de clorofila **a** en las plantas estresadas a  $45^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas. Sin embargo, estos incrementos no se presentaron en las dos primeras horas de calor, excepto en el genotipo Nagcarlang (Figura 3A).

En plantas de limón *Eureka* sometidas a dos tratamientos de temperaturas ( $29/21^{\circ}\text{C}$  y  $42/32^{\circ}\text{C}$  día /noche) y dos concentraciones de  $\text{CO}_2$  en el ambiente ( $350\text{-}380$  y  $680 \mu\text{mol}^{-1}$ ), Martín *et al.* (1995) señalaron que las plantas sometidas a las altas

temperaturas incrementaban el contenido de clorofila **a** foliar en comparación con las plantas que permanecían en condiciones de temperaturas moderadas.



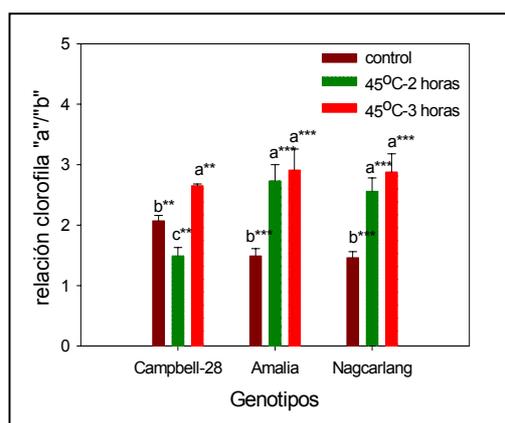
**Figura 3.** Contenido de clorofila **a** (A) y clorofila **b** (B) ( $\text{mg g}^{-1}\text{MF}$ ); de plantas de tres genotipos de tomate expuestas a distintos tratamientos de temperatura ( $25^{\circ}\text{C}$  y  $45^{\circ}\text{C}$ , durante 2 y 3 horas). Las barras verticales representan el error estándar y letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. (no significativo (ns), \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Por su parte, el contenido de clorofila **b**, no mostró un comportamiento similar ante los tiempos de exposición a la alta temperatura en los genotipos estudiados. En el genotipo Campbell-28, para ambas condiciones de estrés, se detectaron incrementos significativos en el contenido de clorofila **b** (Figura 3B), lo que sugiere un reforzamiento en el complejo captador de luz del FS<sub>II</sub>, al considerar que en el FS<sub>II</sub> la luz es absorbida más fuertemente por la clorofila **b** (Melis, 1991). Este reforzamiento en el FS<sub>II</sub> no parece justificar una respuesta adaptativa en este genotipo, por ser el FS<sub>II</sub> un sitio vulnerable al incremento de la temperatura, como lo demuestran las variables de fluorescencia de clorofila **a** analizadas anteriormente.

Una situación contraria se encontró en los genotipos Amalia y Nagcarlang, donde el incremento de la temperatura provocó reducciones significativas en el contenido de clorofila **b**, lo que hace suponer que estas plantas reducen la capacidad de captación de luz en el FS<sub>II</sub> en condiciones desfavorables para evitar la fotoinhibición. Este mecanismo operó eficientemente en Nagcarlang, donde las variables de fluorescencia indicaron una estabilidad térmica en la funcionalidad del FS<sub>II</sub>.

La relación clorofila **a/b** se redujo significativamente en el genotipo Campbell-28 en las plantas que recibieron la temperatura de 45°C durante 2 horas, la que dependió del incremento significativo en los niveles de clorofila **b**, fundamentalmente. Esta relación se incrementó significativamente en las plantas estresadas durante 3 horas y estuvo determinada por los incrementos significativos en el contenido de clorofila **a** (Figura 4).

En los genotipos Amalia y Nagcarlang la relación clorofila **a/b** se incrementó en ambas condiciones de estrés impuestas, con la particularidad que no fueron las mismas variaciones en el contenido de clorofila **a** y clorofila **b** las que determinaron este comportamiento similar (Figura 4). Sin embargo, es evidente que en ambos genotipos, los cuales mostraron una moderada y eficiente termotolerancia en las funciones fotosintética, el contenido de clorofila **b** se redujo con el incremento de la temperatura, contrariamente a lo encontrado en el genotipo susceptible, Campbell-28.



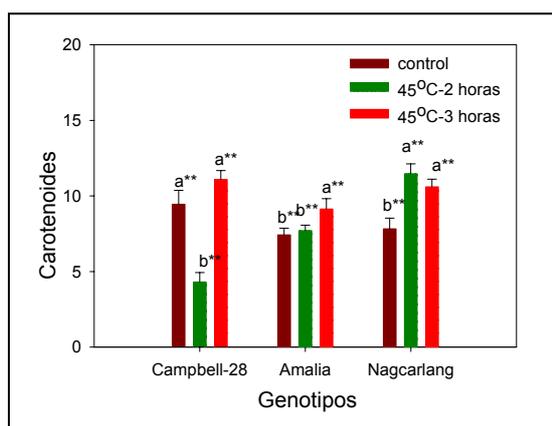
**Figura 4.** Relación clorofila **a/b**, de plantas de tres genotipos de tomate expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25°C y 45°C, durante 2 y 3 horas). Las barras verticales representan el error estándar y letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

El incremento de la relación clorofila **a/b** con la temperatura sugiere que ésta pudiera ser usada como un indicador de tolerancia de las plantas bajo condiciones de estrés de calor. Un aumento en la relación clorofila **a/b** está siempre asociado con cambios en la composición de pigmentos del aparato fotosintético similares a los que suceden en los cloroplastos de plantas crecidas en condiciones de alta intensidad de luz (plantas de sol), los cuales poseen menor cantidad de proteína-clorofilas captadoras de luz (LHCPs). La disminución en la absorción de luz a través de la sección de los cloroplastos por un decrecimiento en la cantidad de LHCPs es un mecanismo de

protección esencial en cloroplastos, hojas y plantas, el cual le permite sus supervivencias en condiciones desfavorables (Lichtenthaler *et al.*, 2000). En el experimento las plantas de los distintos genotipos crecieron en condiciones de luz media, sin embargo, los genotipos Amalia y Nagcarlang respondieron al calor con un incremento en la relación clorofila *a/b*, lo que supone un decrecimiento en la cantidad de LHCPs, lo que indica la acción de un mecanismo de protección para evitar la fotooxidación y la fotoinhibición (Lichtenthaler y Burkart, 1999)

De forma general, se puede plantear que el incremento de la temperatura permitió una respuesta adaptativa en los pigmentos del aparato fotosintético semejante a la encontrada en las plantas crecidas al sol, en los genotipos Amalia y Nagcarlang, pero no en Campbell-28.

El contenido de carotenoides, de igual manera, presentó modificaciones diferenciadas en los genotipos estudiados (Figura 5).



**Figura 5.** Contenido de carotenoides ( $\text{mg g}^{-1}\text{MF}$ ), de plantas de tres genotipos de tomate expuestas a distintos tratamientos de temperatura ( $25^{\circ}\text{C}$  y  $45^{\circ}\text{C}$ , durante 2 y 3 horas). Las barras verticales representan el error estándar y letras distintas muestran diferencias significativas entre los tratamientos. (no significativo (ns),  $**p < 0,01$ ).

Una reducción significativa de este pigmento se encontró en las primeras horas de impuesto el tratamiento de calor en el genotipo Campbell-28, condición que provocó las mayores afectaciones en el proceso de asimilación de  $\text{CO}_2$  y en las reacciones fotoquímicas de  $\text{FS}_{\text{II}}$ . Sin embargo, a las 3 horas de implantado el estrés los niveles de carotenoides en las plantas tratadas y controles fueron similares (Figura 5), indicando un posible reajuste fisiológico y bioquímico en estas plantas, donde igualmente las reacciones fotoquímicas mostraron menores afectaciones.

Por su parte, en los genotipos Amalia y Nagcarlang, el contenido de carotenoides se incrementó con la temperatura, siendo evidente en Nagcarlang desde las primeras horas de implantado el estrés.

Teniendo en cuenta las variaciones diferenciadas en el contenido de pigmentos fotosintéticos se puede sugerir una función dual de los carotenoides dependiendo del genotipo y su respuesta al estrés. En el genotipo Campbell-28 las variaciones detectadas en el contenido de carotenoides no permiten relacionarlo con sus dos funciones fundamentales: pigmentos accesorios captador de luz y compuesto protector del aparato fotosintético. Por su parte, en el genotipo Amalia, el incremento en el contenido de carotenoides quizás compense la pérdida de clorofilas totales, jugando un papel como pigmento accesorio captador de luz (Owens, 1994; Stefanov *et al.*, 1996). Sin embargo, en el genotipo Nagcarlang, probablemente el incremento en el contenido de carotenoides esté involucrado en la protección del aparato fotosintético (Foyer y Harbinson, 1994; Phillips *et al.*, 1995; Asada *et al.*, 1998; Loggini *et al.*, 1999; Ruban y Horton, 1999); al no encontrarse modificaciones en el contenido de clorofilas totales, lo que indica la ausencia de fotooxidación de los pigmentos.

Trabajos previos señalan el posible papel de los carotenoides en la termotolerancia del FS<sub>II</sub> y otros elementos de la cadena transportadora de electrones en los tilacoides (Havaux y Tardy, 1996; Havaux *et al.*, 1996).

#### **4.1.5 Estimación de la funcionalidad de las membranas celulares**

El método conductimétrico empleado para detectar los posibles daños al nivel de las membranas celulares, indicó que las altas temperaturas ejercieron un efecto diferenciado en su funcionalidad (Tabla 3).

En los genotipos Campbell-28 y Amalia se detectaron incrementos significativos en el eflujo de electrolitos en las plantas tratadas con calor, condición que provocó las mayores afectaciones en las reacciones fotoquímicas de los cloroplastos. La membrana de los tilacoides, en los cloroplastos, es el sitio donde se llevan a cabo las reacciones involucradas en la captación de luz y el transporte de electrones (Vijayan y Browse, 2002), alteraciones en su funcionalidad modifican algunos elementos claves en el

proceso de fotosíntesis. En el genotipo Nagcarlang, la integridad de las membranas no se vio afectada por las distintas condiciones de estrés (Tabla 3).

**Tabla 3.** Eflujo de electrolitos por las membranas (%) de plantas de tres genotipos de tomate expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25°C y 45°C, durante 2 y 3 horas). Los valores representan la media de tres repeticiones  $\pm$  el error estándar. Letras distintas muestran diferencias significativas entre los tratamientos. (no significativo (ns), \*\*\* $p < 0,001$ ).

Genotipos	Tratamientos	% de eflujo de electrolitos
<b>Campbell-28</b>	Control	26,7 $\pm$ 1,6 b
	45°C-2 h	45,2 $\pm$ 1,2 a
	45°C-3 h	46,4 $\pm$ 2,3 a
significación		***
<b>Amalia</b>	Control	16,1 $\pm$ 0,8 c
	45°C-2 h	45,1 $\pm$ 0,3 b
	45°C-3 h	52,9 $\pm$ 2,3 a
significación		***
<b>Nagcarlang</b>	Control	12,3 $\pm$ 1,1
	45°C-2 h	8,3 $\pm$ 0,4
	45°C-3 h	13,2 $\pm$ 1,4
significación		ns

Aunque los mecanismos involucrados en este proceso aún se desconocen, algunos autores plantean que se debe a alteraciones en la fluidez de las membranas relacionadas con cambios en la fase de transición de los lípidos; lo cual conduce en especies sensibles al calor a una disminución en la semipermeabilidad, y por lo tanto, a una pérdida de compartimentación de los iones y metabolitos y a una interrupción en las rutas de generación de energía asociados a las membranas (fotosíntesis y respiración), por pérdida de actividad enzimática (Tudela y Tadeo, 1993; Salisburi, 1994; Iglesias, 1994, Ristic *et al.*, 1996).

Alteraciones en la funcionalidad de las membranas se han detectado en condiciones de diversos estreses ambientales en diferentes especies de plantas, entre los que se pueden citar: estrés hídrico en tomate y caña de azúcar (Chengkun *et al.*, 1996; Díaz *et al.*, 1996); bajas temperaturas en arroz (López *et al.*, 1996), estrés salino en diferentes variedades de caña de azúcar (Schmidty y González, 1998) y estrés de calor en tomate (Florido, 1999).

A modo de resumen breve de este experimento, se puede plantear que tanto los genotipos Amalia como Nagcarlang mostraron una serie de respuestas similares ante el estrés de calor. En ambos casos se observaron modificaciones similares en la actividad fotosintética durante las primeras horas de estrés térmico, en el comportamiento estomático, y también en el complejo captador de luz determinado por el contenido de clorofila *a* y *b* y carotenoides. Sin embargo, el comportamiento del genotipo Campbell-28 se alejó de este tipo de respuesta, mostrándose como un genotipo mucho más sensible al estrés por alta temperatura. Por tales razones, en los experimentos posteriores solamente se han considerado los genotipos Amalia y Nagcarlang para profundizar en los componentes de las reacciones fotoquímicas y del proceso de asimilación de CO<sub>2</sub> involucrados en la termotolerancia. Para ello se estudiaron, además del efecto de un choque térmico de 45°C durante tres horas, el efecto de un tratamiento de temperatura moderadamente elevada aplicada en condiciones de oscuridad durante un período prolongado de tiempo, y los efectos que se generan cuando se produce un incremento rápido en la temperatura foliar de ambos genotipos.

## **4.2 Efecto de la aplicación de una temperatura elevada en la oscuridad y un choque de calor en condiciones luminosas, sobre la actividad fotosintética y el metabolismo oxidativo, en dos genotipos de tomate.**

### **4.2.1 Medida del estado hídrico de la planta**

En la Tabla 4 se muestra el efecto que tuvieron los distintos tratamientos en los valores del potencial hídrico foliar y potencial de presión, en los genotipos Amalia y Nagcarlang.

En el genotipo Amalia se encontró, en el momento de realizar los muestreos, que los tratamientos aumentaron de forma significativa los valores del  $\Psi_h$  (Tabla 4), los cuales no tuvieron un efecto en los valores del  $\Psi_p$ . En el genotipo Nagcarlang no se detectaron alteraciones en los valores de potenciales en el momento de la evaluación (Tabla 4).

Al igual que en el experimento anterior, los tratamientos térmicos empleados no provocaron condiciones de deshidratación en las plantas, por lo que las modificaciones que se observaron en las variables fisiológicas y bioquímicas sólo se deben a éstos.

**Tabla 4.** Potencial hídrico foliar,  $\Psi_h$  (MPa) y de presión,  $\Psi_p$  (MPa), de hojas de plantas de dos genotipos de tomate expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25°C, Control; 35°C tres noches, Moderada; 45°C tres horas en luz, Choque; 35°C tres noches+45°C tres horas, Moderada+Choque). Los valores representan la media de cuatro repeticiones  $\pm$  el error estándar y letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. (no significativo (ns), \* $p < 0,05$ ).

Genotipos	Tratamientos	$\Psi_h$	$\Psi_p$
Amalia	Control	-0,43 $\pm$ 0,0 d	0,47 $\pm$ 0,1
	Moderada	-0,38 $\pm$ 0,0 c	0,77 $\pm$ 0,1
	Choque	-0,33 $\pm$ 0,0 b	0,68 $\pm$ 0,0
	Moderada+Choque	-0,29 $\pm$ 0,0 a	0,61 $\pm$ 0,0
significación		*	ns
Nagcarlang	Control	-0,47 $\pm$ 0,0	0,40 $\pm$ 0,0
	Moderada	-0,37 $\pm$ 0,0	0,69 $\pm$ 0,0
	Choque	-0,42 $\pm$ 0,0	0,48 $\pm$ 0,1
	Moderada+Choque	-0,34 $\pm$ 0,1	0,50 $\pm$ 0,0
significación		ns	ns

#### 4.2.2 Temperatura foliar y del suelo

La tabla 5 muestra la temperatura foliar y del suelo alcanzada durante el período de aplicación de los diferentes tratamientos de calor.

La temperatura foliar detectada en las plantas que se sometieron a 35°C en la oscuridad durante tres días (Moderada) fue similar en ambos genotipos. Sin embargo, el tratamiento Choque (45°C durante 3 horas, en presencia de luz) sí modificó la temperatura foliar de las plantas de forma diferenciada en cada genotipo, los que presentaron valores de 41 y 38°C para Amalia y Nagcarlang, respectivamente.

Por su parte, las plantas que recibieron ambos tratamientos de temperatura (Moderada+Choque) alcanzaron una temperatura foliar de 39°C en el genotipo Amalia, y de 42°C en el genotipo Nagcarlang. Cabe destacar que las plantas del genotipo Amalia sometidas al tratamiento nocturno de calor y posteriormente el de estrés (Moderada+Choque) presentaron temperaturas algo inferiores a las que sólo recibieron el tratamiento de estrés (Choque); sin embargo, en el genotipo Nagcarlang se presentó

la situación inversa. Estos valores diferenciados de temperatura foliar expresan la condición térmica real a la que llegaron las plantas de cada tratamiento.

**Tabla 5.** Temperatura foliar y del suelo detectadas en las distintas condiciones de temperatura (25°C, Control; 35°C tres noches, Moderada; 45°C tres horas en luz, Choque; 35°C tres noches+45°C tres horas, Moderada+Choque), en dos genotipos de tomate. Los valores representan la media de 3 repeticiones  $\pm$  sus variaciones.

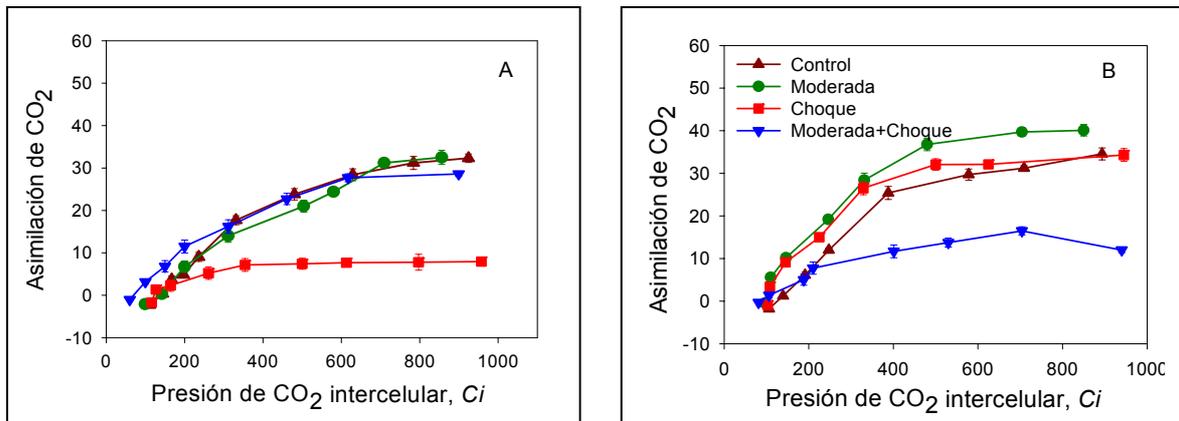
Genotipos	Tratamientos	Temperatura Foliar (°C)	Temperatura del suelo (°C)
Amalia	Control	23 $\pm$ 1,0	24 $\pm$ 1,0
	Moderada	30 $\pm$ 1,0	34 $\pm$ 0,5
	Choque	41 $\pm$ 1,0	43 $\pm$ 0,5
	Moderada+Choque	39 $\pm$ 1,0	44 $\pm$ 0,5
Nagcarlang	Control	23 $\pm$ 1,0	24 $\pm$ 1,0
	Moderada	31 $\pm$ 1,0	34 $\pm$ 0,5
	Choque	38 $\pm$ 1,0	43 $\pm$ 0,5
	Moderada+Choque	42 $\pm$ 1,0	44 $\pm$ 0,5

Por su parte, la temperatura del suelo encontrada a nivel del sistema radicular no varió de la temperatura existente en la cámara. Esto demuestra las propiedades conductoras de calor del sustrato empleado (Tabla 5).

#### **4.2.3 Variables del intercambio gaseoso de las plantas. Análisis de las curvas de asimilación de CO<sub>2</sub> a diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> (Curvas A/Ci)**

En las Figuras 6 A y B se muestra el efecto de los distintos tratamientos de calor en la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> para el rango de concentración de CO<sub>2</sub> ensayado (curvas A/Ci), en los genotipos Amalia y Nagcarlang, respectivamente.

En el genotipo Amalia se encontró que las plantas que se expusieron al tratamiento de temperatura de 35°C (Moderada), independientemente de recibir o no el tratamiento Choque posterior, mostraron valores de asimilación en el rango de concentración de CO<sub>2</sub> evaluado, similares a las plantas control. Se observó que los valores de saturación del proceso se alcanzaron a concentraciones internas de CO<sub>2</sub> cercanas a 700  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , en los tratamientos Control, Moderada y Moderada+Choque (Figura 6A).



**Figura 6.** Curvas de asimilación de  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a distintas presiones de  $\text{CO}_2$  intercelular ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) (curvas A/Ci), de plantas de dos genotipos de tomate, Amalia (A) y Nagcarlang (B), expuestas a distintos tratamientos de temperatura ( $25^\circ\text{C}$ , Control;  $35^\circ\text{C}$  tres noches, Moderada;  $45^\circ\text{C}$  tres horas en luz, Choque;  $35^\circ\text{C}$  tres noches+ $45^\circ\text{C}$  tres horas, Moderada+Choque). ( $Q = 1\ 800\ \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura foliar  $25^\circ\text{C}$  y flujo de gases de  $400\ \mu\text{mol s}^{-1}$ ).

Es de notar, que en el genotipo Amalia las plantas que recibieron la temperatura de  $35^\circ\text{C}$  en la oscuridad durante tres días consecutivos (Moderada) incrementaron la estabilidad térmica de su maquinaria fotosintética, presumiblemente logrando un corrimiento en la temperatura óptima del proceso, lo cual incrementó la tolerancia de las plantas para soportar exposiciones posteriores a temperatura de  $45^\circ\text{C}$  (Choque). Trabajos previos demuestran que cuando los organismos fotosintéticos son expuestos al calor, su maquinaria fotosintética es irreversiblemente inactivada, sin embargo, cuando éstos son aclimatados, por medio de la aplicación de temperaturas moderadamente elevadas, su maquinaria fotosintética exhibe un incremento en su estabilidad térmica (Berry y Björkman, 1980). Este fenómeno ha sido observado en diferentes organismos fotosintéticos, incluyendo las plantas superiores (Raison *et al.* 1982, Nishiyama *et al.*, 1993, Tanaka *et al.* 2000; Yamasaki *et al.*, 2002).

El presente experimento demuestra por primera vez, que el genotipo Amalia tiene un potencial de aclimatación térmico elevado en sus funciones fotosintéticas. Esto pudiera justificar los buenos rendimientos agrícolas obtenidos en este genotipo en condiciones de campo en época no óptima de siembra, si se parte del hecho que las condiciones de altas temperaturas en el campo ocurren de forma gradual, lo cual favorece la aclimatación de la planta en general, particularmente del proceso de fotosíntesis, para condiciones posteriores de temperaturas severas.

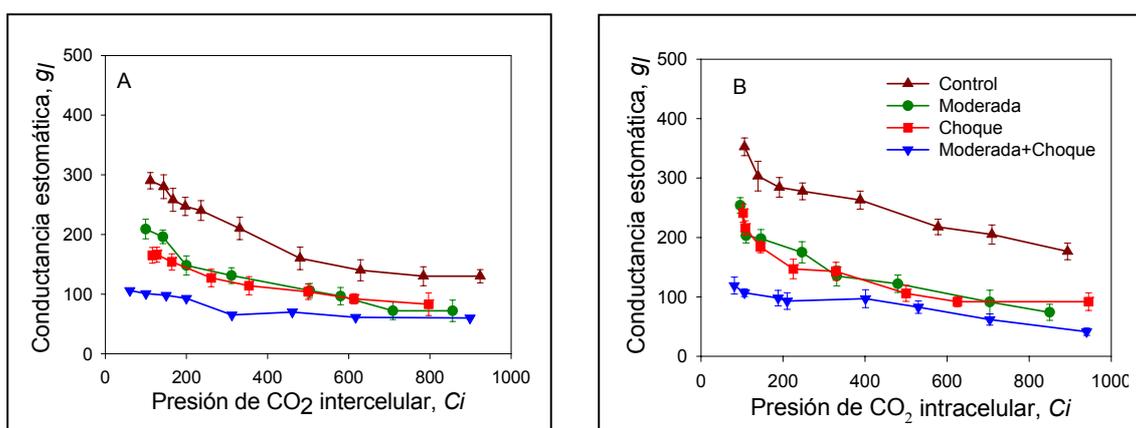
Se pudo confirmar en el genotipo Amalia, que las plantas que recibieron directamente el choque térmico de 45°C durante 3 horas mostraron una reducción severa en la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> (A) en todo el rango de concentración de CO<sub>2</sub> evaluado. Los valores de saturación del proceso de fotosíntesis se alcanzaron a concentraciones internas de CO<sub>2</sub> bajas, cercanas a la presente en la atmósfera (354 μmol mol<sup>-1</sup>) (Figura 6A).

Por el contrario, en el genotipo silvestre Nagcarlang, se observó que los tratamientos Moderada y Choque aplicados de forma independiente, incrementaron la tasa de asimilación neta a concentraciones bajas de CO<sub>2</sub> (100 a 400 μmol mol<sup>-1</sup>), lo cual refleja un incremento en la eficiencia de carboxilación de la enzima. Esta situación favorable en la tasa de asimilación fotosintética se mantuvo a concentraciones de CO<sub>2</sub> saturantes en las plantas que recibieron calor nocturno, lo que indica la ausencia de procesos inhibitorios en la regeneración de la RuBP. Para estas condiciones de temperaturas el valor de saturación del proceso fue alcanzado a concentraciones de CO<sub>2</sub> cercanas a los 500 μmol mol<sup>-1</sup>. Sin embargo, se comprobó que la termotolerancia de las funciones fotosintéticas no se expresa cuando ambos tratamientos de calor son impuestos conjuntamente, observándose una reducción en la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> en el rango de concentración de CO<sub>2</sub> ensayado. Un desplazamiento en el valor de saturación del proceso a concentraciones de CO<sub>2</sub> cercanas a 400 μmol mol<sup>-1</sup> se detectó en estas plantas (Figura 6B).

A partir de estos resultados se puede plantear que diferentes condiciones de temperatura no sólo modifican, de forma diferenciada, la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>, en ambos genotipos, sino que provocan un desplazamiento en el umbral de saturación del proceso. Igualmente, se observó que el potencial de aclimatación de la fotosíntesis a la temperatura varía con la especie de planta y el ecotipo.

La limitación impuesta por los estomas fue estimada a partir de los valores de conductancia estomática (*g*), los que se redujeron de forma similar con el incremento de la temperatura en los genotipos Amalia y Nagcarlang, respuesta característica de plantas C<sub>3</sub> (Berry y Bjorkman, 1980). Del mismo modo, se observó una disminución en la *g* con el incremento de la concentración de CO<sub>2</sub> en ambos genotipos (Figuras 7A y B).

Es de señalar, en ambos genotipos, que las plantas que recibieron ambos tratamientos de temperatura (Moderada+Choque) mostraron los menores valores de conductancia estomática y su variación en el rango de concentración interna de CO<sub>2</sub> fue mucho menor que la detectada en los restantes tratamientos. Estos resultados permiten sugerir que bajo estas condiciones de temperatura la planta responde con un cierre estomático severo, que limita la respuesta de los mismos a las variaciones intercelulares de CO<sub>2</sub>.



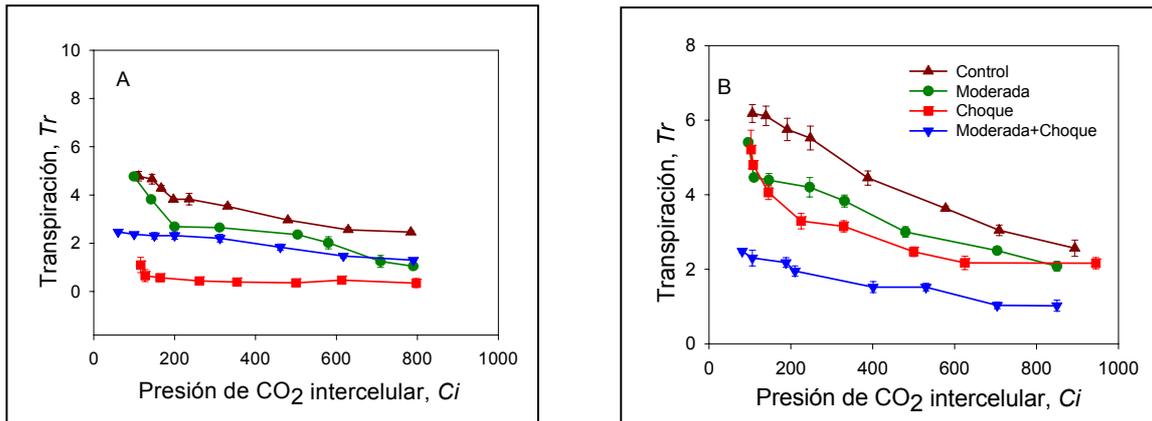
**Figura 7:** Curvas de conductancia estomática ( $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) a distintas presiones de CO<sub>2</sub> intercelular ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), de plantas de dos genotipos de tomate, Amalia (A) y Nagcarlang (B), expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25°C, Control; 35°C tres noches, Moderada; 45°C tres horas en luz, Choque; 35°C tres noches+45°C tres horas, Moderada+Choque). ( $Q = 1\ 800\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , temperatura foliar 25°C y flujo de gases de  $400\ \mu\text{mol s}^{-1}$ ).

Las variaciones en los valores de conductancia estomática tienen también efecto sobre las tasas de transpiración ( $Tr$ ), que como se sabe está a su vez muy relacionada con los valores de temperatura foliar. En el genotipo Amalia, los valores de  $Tr$  se redujeron con el incremento de la temperatura, notándose los menores valores en las plantas que recibieron únicamente el tratamiento de Choque, donde la transpiración encontrada fue mínima (Figura 8A). En este tratamiento fue donde se detectaron los mayores valores de temperatura foliar (41°C) (Tabla 5).

Una respuesta similar se encontró en Nagcarlang, donde los distintos tratamientos de temperatura redujeron la tasa de transpiración foliar, pero, a diferencia de Amalia, las plantas que recibieron ambos tratamientos de temperatura (Moderada+Choque) fueron las que mostraron la menor tasa de transpiración en el rango de concentración

de CO<sub>2</sub> evaluado (Figura 8B) y donde se obtuvieron los mayores valores de temperatura foliar (Tabla 5).

La reducción detectada en la transpiración ante el incremento de la temperatura, en ambos genotipos, sugiere la activación de mecanismos relacionados con la conservación de agua bajo condiciones favorables de evapotranspiración, lo cual fue evidente a través de los potenciales hídrico y de turgencia.



**Figura 8.** Curvas de transpiración ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a distintas presiones de CO<sub>2</sub> intercelular ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) de plantas de dos genotipos de tomate, Amalia (A) y Nagcarlang (B), expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25°C, Control; 35°C tres noches, Moderada; 45°C tres horas en luz, Choque; 35°C tres noches+45°C tres horas, Moderada+Choque). ( $Q = 1\ 800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura foliar 25°C y flujo de gases de  $400 \mu\text{mol s}^{-1}$ ).

A partir del modelo bioquímico de asimilación de CO<sub>2</sub> en hojas de especies C<sub>3</sub> propuesto por Farquhar *et al.* (1980), se pudo relacionar las medidas de intercambio gaseoso (curvas  $A/C_i$ ), descritas anteriormente, con las propiedades bioquímicas de la hoja. Este modelo permitió hacer una distinción clara entre las limitaciones atribuibles a la enzima Rubisco y aquellas atribuibles a los factores que limitan la tasa de regeneración de la ribulosa-1,5-bisfosfato, RuBP, (transporte de electrones) en el proceso de fotosíntesis.

El ajuste de las ecuaciones  $A_c$  y  $A_q$  mediante un análisis de regresión no lineal permitió estimar la velocidad máxima de carboxilación de la enzima ( $V_{cmax}$ ) y la tasa máxima de transporte electrónico ( $J_{max}$ ) en los distintos tratamientos de ambos genotipos (Tabla 6). Es de señalar, que los valores de  $V_{cmax}$  y  $J_{max}$  obtenidos en las plantas control de ambos genotipos, se encuentran en el rango señalado por Wullschleger (1993), quien analizó las curvas  $A/C_i$  en 109 especies de plantas C<sub>3</sub>, en las que incluyó al *Lycopersicon esculentum*.

Al considerar las limitaciones impuestas por la enzima Rubisco en la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> se encontró que la velocidad máxima de carboxilación de la enzima (*V<sub>cmax</sub>*) se redujo significativamente (más del 50%) en las plantas que recibieron los tratamientos Choque y Moderada+Choque en los genotipos Amalia y Nagcarlang, respectivamente (Tabla 6). Igualmente, una reducción en la tasa de carboxilación de la enzima (*A<sub>c</sub>*), dependiente de la cantidad, estado de activación y cinética de la enzima Rubisco se detectó en el rango de concentración de CO<sub>2</sub> evaluado (Figura 9). Las reducciones encontradas en los valores de *V<sub>cmax</sub>* y *A<sub>c</sub>* sugieren una disminución en la afinidad de la enzima por el CO<sub>2</sub>; ya sea por una disminución en la disponibilidad CO<sub>2</sub>, dependiente de la apertura estomática o de los cambios diferenciales en la solubilidad del CO<sub>2</sub> y el O<sub>2</sub> con la temperatura, o por cambios específicos en las propiedades cinéticas de la enzima Rubisco (Crafts-Brandner y Salvucci, 2000).

**Tabla 6.** Valores de *V<sub>cmax</sub>* y *J<sub>max</sub>* obtenidos a partir de las curvas *A/C<sub>i</sub>*, de plantas de dos genotipos de tomate, Amalia y Nagcarlang, expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25°C, Control; 35°C tres noches, Moderada; 45°C tres horas en luz, Choque; 35°C tres noches+45°C tres horas, Moderada+Choque). Los valores representan la media de dos repeticiones ± el error estándar del parámetro.

Genotipos	Tratamientos	<i>V<sub>cmax</sub></i> (μmolm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	<i>J<sub>max</sub></i> (μEqm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
Amalia	Control	92,02±6,4	190,78±9,1
	Moderada	88,81±4,5	178,00±9,9
	Choque	42,60±7,4	59,92±5,9
	Moderada+Choque	81,58±6,2	172,10±6,8
Nagcarlang	Control	100,64±6,7	195,23±5,3
	Moderada	100,80±4,8	210,20±8,3
	Choque	102,42±6,3	187,9±9,3
	Moderada+Choque	48,43±5,8	90,90±5,7

Teniendo en cuenta los niveles de CO<sub>2</sub> intercelulares (*C<sub>i</sub>*) obtenidos en los distintos tratamientos, en el rango de concentración ensayado, se puede descartar el efecto inhibitorio del cierre de los estomas en la tasa de carboxilación de la enzima, en ambos genotipos (Figura 7).

Si bien este modelo permite distinguir las limitaciones que imponen la enzima Rubisco y el transporte electrónico al proceso de fotosíntesis, tiene el inconveniente de no incluir los cambios en el estado de activación de la enzima Rubisco como un factor que influye en la tasa fotosintética y que es vulnerable a los cambios ambientales (Crafts-Brandner y Salvucci, 2000; Salvucci y Crafts-Brandner, 2004).

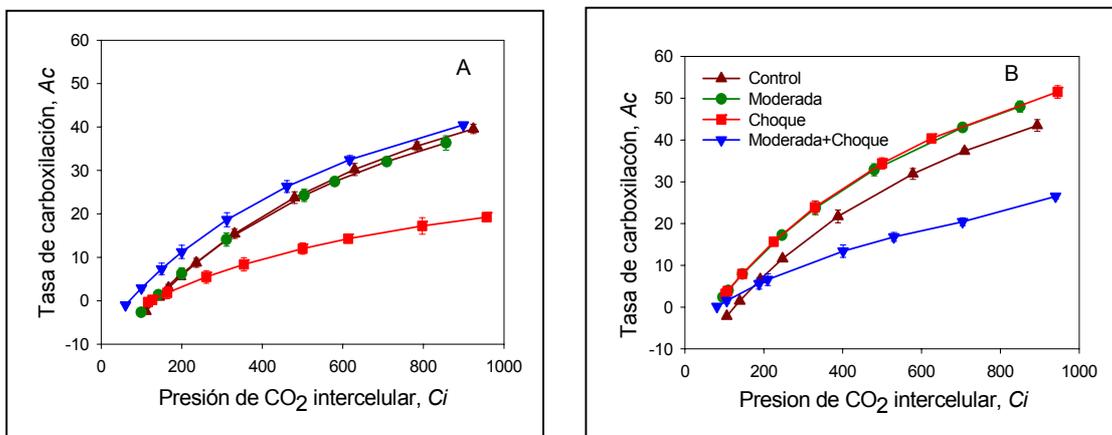
En el experimento, aun cuando no se determinó la actividad de la enzima Rubisco ni el estado de activación de la misma, se propone a la enzima Rubisco activasa como el factor responsable de la disminución en la tasa de carboxilación de la enzima Rubisco en el genotipo Amalia. Evidencias anteriores señalan que la enzima Rubisco activasa determina la cantidad de enzima Rubisco catalíticamente activa y competente, que garantiza el proceso de carboxilación en la hoja, pero la misma es inhibida cuando se incrementa la temperatura de la hoja (Vining *et al.*, 1997; Crafts-Brandner *et al.*, 1997; Feller *et al.*, 1998; Salvucci y Crafts-Brandner, 2004).

Por su parte, la termotolerancia del genotipo Nagcarlang se vio reducida cuando las plantas se sometieron de forma sucesiva a condiciones de temperaturas de 35°C en condiciones de oscuridad y de 45°C en condiciones de luz. Éstas condiciones no fueron dañinas cuando se aplicaron de forma independiente. Los resultados permiten sugerir que la imposición de la temperatura moderadamente elevada en condiciones de oscuridad limitó la acumulación de metabolitos relacionados con la tolerancia, como pudieron ser compuestos orgánicos antiestrés (Bohnert y Sheveleva, 1998; Gill *et al.*, 2001) o proteínas de choque térmico (HS) inducidas por la luz en los cloroplastos (Otto *et al.*, 1992; Kruse *et al.*, 1993; Nover y Starf, 1997). Un desbalance en los niveles antioxidantes de las plantas tiene lugar bajo condiciones de oscuridad (Alscher *et al.*, 1997). Estos metabolitos probablemente fueron inducidos en las plantas que recibieron solamente el tratamiento, Moderada, donde las condiciones de recuperación impuestas fueron las óptimas, en presencia de luz. Una termotolerancia de las funciones fotosintética se detectó en las plantas de éste tratamiento (Figura 6). Sin embargo, el período de recuperación de las plantas que recibieron ambos tratamientos de temperatura, fue interrumpido por el tratamiento Choque, donde la temperatura alcanzó valores de 45°C, inhibitorias para cualquier proceso de síntesis. Tal situación inhibió la inducción de mecanismos relacionados con la termotolerancia del aparato fotosintético.

Una combinación de alta temperatura y condiciones de oscuridad provocó daños drásticos en la funcionalidad del aparato fotosintético y una disminución en los niveles de proteínas de choque térmico en los cloroplastos, en plantas de cebadas (Kalitaho *et al.*, 2003).

La aclimatación y la termotolerancia del proceso de asimilación de CO<sub>2</sub> detectadas en los genotipos Amalia y Nagcarlang, respectivamente se corresponden con una estabilidad térmica en la velocidad máxima y tasa de carboxilación de la enzima (Tabla 6 y Figura 9). Estos resultados indican que el estado de carboxilación de la enzima constituye un elemento clave en la termotolerancia, porque reduce al máximo procesos inhibitorios de la fotosíntesis como la fotorrespiración; que siempre está presente en plantas del tipo C<sub>3</sub>.

Sin embargo, en ambos genotipos los mecanismos involucrados en la termotolerancia no parecen ser idénticos. En el genotipo Amalia, el incremento gradual de la temperatura (35°C durante tres días) previo al choque térmico (45°C-3 horas) favoreció la estabilidad térmica de la enzima Rubisco, presumiblemente de la enzima Rubisco activasa; la cual puede aclimatarse durante un período corto de tiempo, siempre y cuando la temperatura de la hoja sea incrementada gradualmente (Law y Crafts-Brandner, 1999). Sin embargo, en el genotipo Nagcarlang, la termotolerancia se manifiesta cuando las plantas son expuestas directamente al choque térmico, lo que sugiere la presencia de una enzima Rubisco mucho más estable al calor en el genotipo silvestre que en el mejorado genéticamente (Amalia).



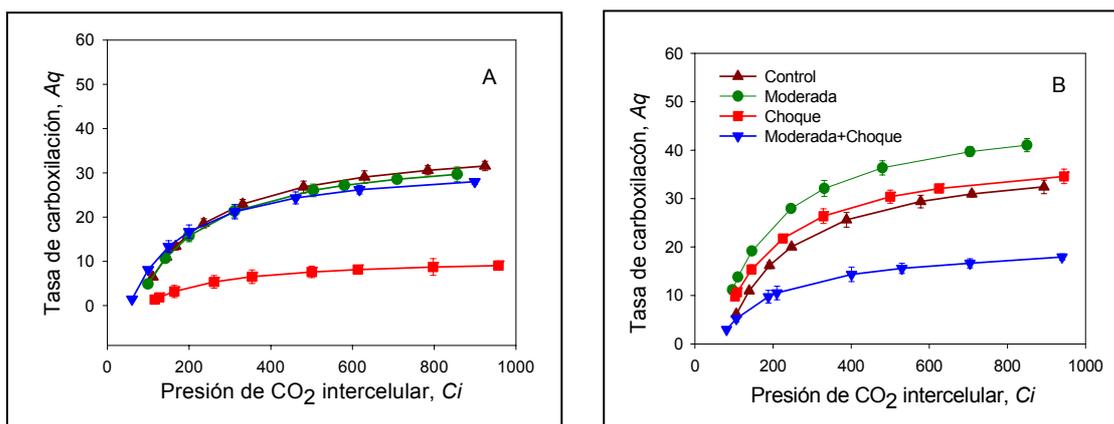
**Figura 9.** Curvas representativas de la tasa de carboxilación de la enzima Rubisco ( $A_c$ ) ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), limitada por las propiedades cinéticas de la enzima, a distintas presiones de  $\text{CO}_2$  intercelular; de plantas de dos genotipos de tomate, Amalia (A) y Nagcarlang (B) expuestas a distintos tratamientos de temperatura ( $25^\circ\text{C}$ , Control;  $35^\circ\text{C}$  tres noches, Moderada;  $45^\circ\text{C}$  tres horas en luz, Choque;  $35^\circ\text{C}$  tres noches +  $45^\circ\text{C}$  tres horas, Moderada+Choque). ( $Q = 1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y temperatura foliar  $25^\circ\text{C}$ ).

Es de destacar, en ambos genotipos, que el tratamiento, Moderada, no resultó inhibitoria en la actividad de la enzima Rubisco, lo que se hizo evidente a través de los valores de  $V_{cmax}$  y de  $A_c$ .

Al analizar las limitaciones impuestas por el transporte electrónico en el proceso de fotosíntesis se tuvo en cuenta los valores de  $J_{max}$  (indicador de la eficiencia en la tasa de transporte de electrones originado en el proceso fotosintético), los cuales se redujeron severamente en aquellos tratamientos donde la temperatura limitó la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$ , en ambos genotipos (Tabla 6).

En el genotipo Amalia las afectaciones notadas en los valores de  $J_{max}$  (70%) superaron las detectadas en los valores de  $V_{cmax}$  (54%); indicando que el sitio de mayor vulnerabilidad al incremento de la temperatura es la cadena transportadora de electrones. Por su parte, en el genotipo Nagcarlang, ambos procesos (velocidad máxima de carboxilación y tasa de transporte electrónico) co-limitaron con igual intensidad la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$ . En ambos genotipos la reducción en la eficiencia del transporte electrónico ( $J_{max}$ ) limita la formación ATP y  $\text{NADP H}^+$  a lo largo de la cadena transportadora de electrones, necesarios para mantener la funcionalidad del aparato fotosintético (Pastenes y Horton, 1996).

En correspondencia con las afectaciones notadas en el transporte electrónico se encontró que tanto el tratamiento Choque como el Moderada+Choque redujeron la tasa de carboxilación de la enzima Rubisco limitada por la regeneración del sustrato ( $A_p$ ), en los genotipos Amalia y Nagcarlang, respectivamente (Figura 10). En este caso la limitada transferencia de electrones reduce la formación de ATP y NADP H<sup>+</sup> a lo largo de la cadena transportadora, metabolitos indispensables para la regeneración de RuBP, sustrato esencial de la enzima Rubisco. Igualmente, no se debe descartar que una deficiencia de ATP y una acumulación de ADP en los cloroplastos limita la actividad de la enzima Rubisco activasa, y por tanto el estado de activación de la enzima Rubisco y su tasa de carboxilación. Estudios anteriores señalan que la regeneración de la RuBP (dependiente del transporte de electrones) es un factor importante que afecta la fotosíntesis dependiente de la temperatura a concentración de CO<sub>2</sub> atmosférica (Hikosaka *et al.*, 1999; Brunce, 2000).



**Figura 10.** Curvas representativas de la tasa de carboxilación de la enzima Rubisco ( $A_q$ ) ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), limitada por la regeneración de la RuBP a distintas presiones de  $\text{CO}_2$  intercelular; de plantas de dos genotipos de tomate, Amalia (A) y Nagcarlang (B) expuestas a distintos tratamientos de temperatura ( $25^\circ\text{C}$ , Control;  $35^\circ\text{C}$  tres noches, Moderada;  $45^\circ\text{C}$  tres horas en luz, Choque;  $35^\circ\text{C}$  tres noches+ $45^\circ\text{C}$  tres horas, Moderada+Choque). ( $Q = 1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y temperatura foliar  $25^\circ\text{C}$ ).

La aclimatación y tolerancia del proceso de asimilación de  $\text{CO}_2$  en los genotipos Amalia y Nagcarlang, respectivamente, estuvo igualmente relacionado con una estabilidad en el transporte electrones fotosintético (Tabla 6).

De forma general, se puede plantear que tanto las propiedades de la enzima como los componentes involucrados en el transporte de electrones son sitios vulnerables al incremento de la temperatura y ambos co-limitaron la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  en los genotipos estudiados. Sin embargo, resulta novedoso destacar que en el genotipo

Amalia el sitio de mayor vulnerabilidad al incremento de la temperatura fueron los componentes involucrados en las reacciones de transporte de electrones (69%), mientras que la velocidad de carboxilación presentó reducciones del 54%. Del mismo modo, se comprobó por primera vez para este genotipo que la imposición del estrés de forma gradual amplía el rango de tolerancia de ambos parámetros ( $V_{cmax}$  y  $J_{max}$ ) e incrementa la tolerancia de la fotosíntesis neta.

Por el contrario, en el genotipo Nagcarlang, el cual ha sido identificado como termotolerante, se obtienen evidencias, antes no señaladas, de que la aplicación de una condición de temperatura moderada en la oscuridad (35°C) y luego una exposición a temperaturas elevadas (45°C), provocan afectaciones similares en los valores de  $V_{cmax}$  y  $J_{max}$ .

Teniendo en cuenta los resultados se puede decir, que una misma condición de estrés no afecta, necesariamente, de igual manera la maquinaria fotosintética, quedando demostrado que los mecanismos de tolerancia del aparato fotosintético varía con la especie de planta.

#### **4.2.4 Variables de la fluorescencia de la clorofila a en las plantas**

Se comprobó que los niveles de fluorescencia inicial ( $F_o$ ) se incrementaron sólo por la condición de estrés 45°C-3 horas, sin previa aclimatación nocturna, en el genotipo Amalia (Tabla 7). Resultados similares se obtuvieron en el epígrafe 4.1.3, donde la condición de estrés 45°C provocó incrementos en los valores de  $F_o$  desde las primeras horas (2 horas) de impuesto el calor. Este incremento en los valores de  $F_o$  detectado indica que la temperatura de 45°C afecta la capacidad de captación de energía del FS<sub>II</sub>, limitando los procesos de migración de energía en los pigmentos antenas y/o en los centros de reacción del FS<sub>II</sub> (Armond *et al.*, 1980; Bukhov *et al.*, 1990; Cao y Govindjee, 1990; Havaux, 1993; Goltsev *et al.*, 1994; Rintamaki *et al.*, 1994).

En el mismo genotipo, ninguno de los tratamientos modificaron los valores de fluorescencia cuando los aceptores primarios de electrones del FS<sub>II</sub> estuvieron completamente reducidos ( $F_m$ ), mientras que el tratamiento Choque si redujo los valores de fluorescencia variable ( $F_v$ ) y la eficiencia del FS<sub>II</sub> ( $F_v/F_m$ ) (Tabla 7). Las

modificaciones notadas en la eficiencia del FS<sub>II</sub> se debieron fundamentalmente a modificaciones en la capacidad de captación de luz, reflejada a través del incremento en los valores de *F<sub>o</sub>*.

**Tabla 7.** Fluorescencia inicial (*F<sub>o</sub>*), fluorescencia máxima (*F<sub>m</sub>*), fluorescencia variable (*F<sub>v</sub>*) y eficiencia fotoquímica del FS<sub>II</sub> (*F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>*) de plantas de dos genotipos de tomate, Amalia y Nagcarlang, expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25°C, Control; 35°C tres noches, Moderada; 45°C tres horas en luz, Choque; 35°C tres noches+45°C tres horas, Moderada+Choque). Los valores representan la media de cuatro repeticiones ± el error estándar y letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. (no significativo (ns), \* *p*<0,05).

Genotipos	Tratamientos	<i>F<sub>o</sub></i>	<i>F<sub>m</sub></i>	<i>F<sub>v</sub></i>	<i>F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub></i>
Amalia	Control	384,5±3,7 b	1994,8±11,4	1616,0±16,1 a	0,81±0,0 a
	Moderada	371,7±0,4 b	1975,4±10,5	1603,5±5,2 a	0,81±0,0 a
	Choque	899,0±8,5 a	1916,0±9,1	1017,0±8,4 b	0,53±0,0 b
	Moderada+ Choque	398,0±3,7 b	2075,0±14,9	1676,8±24,1 a	0,81±0,0 a
significación		*	ns	*	*
Nagcarlang	Control	362,9±4,2	1936,1±6,8	1577,55±3,5	0,81±0,0
	Moderada	368,0±4,0	1921,3±5,6	1553,2±4,5	0,81±0,0
	Choque	366,7±2,8	1927,0±4,2	1560,0±5,8	0,80±0,0
	Moderada+Choque	382,2±4,3	2022,3±14,5	1550,05±10,8	0,81±0,0
significación		ns	ns	ns	ns

Cabe señalar que las afectaciones provocadas por el tratamiento Choque en la eficiencia del FS<sub>II</sub> se minimizaron al someter las plantas a un tratamiento de temperatura moderadamente elevada en la oscuridad (Moderada), demostrándose la capacidad de aclimatación del FS<sub>II</sub> (Havaux, 1993a). Evidencias anteriores señalan que la aclimatación del proceso de fotosíntesis depende fuertemente de la respuesta del FS<sub>II</sub> a los cambios en la temperatura ambiental (Yamasaki *et al.*, 2002).

Por otra parte, en el genotipo Nagcarlang, ninguna de las condiciones de temperaturas establecidas modificaron las distintas variables de fluorescencia de clorofila *a* evaluadas, ni en condiciones donde la funcionalidad del aparato fotosintético, estimada a partir de los valores de asimilación, se vio reducida por el tratamiento de

temperatura. Estos resultados indican que el genotipo silvestre Nagcarlang dispone de una maquinaria fotosintética provista de FS<sub>II</sub> con una capacidad de respuesta plástica que le permite adaptarse a un amplio rango de temperatura.

Los resultados descritos hasta el momento han permitido valorar los eventos fotoquímicos iniciales del FS<sub>II</sub>. Sin embargo, el análisis de los “quenching” fotoquímico (*qP*) y no-fotoquímico (*qN*) pudiera ayudar a entender y detectar modificaciones en el aparato fotosintético que no se detectaron a través de las variables de fluorescencia analizadas hasta el momento (Tabla 8).

**Tabla 8.** “Quenching” fotoquímico (*qP*) y no fotoquímico (*qN*) de plantas de dos genotipos de tomate, Amalia y Nagcarlang, expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25°C, Control; 35°C tres noches, Moderada; 45°C tres horas en luz, Choque; 35°C tres noches+45°C tres horas, Moderada+Choque). Los valores representan la media de cuatro repeticiones ± el error estándar y letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. (no significativo (ns), \*\**p*<0,01).

Genotipos	Tratamientos	<i>qP</i>	<i>qN</i>
Amalia	Control	0,34±0,0	0,84±0,00
	Moderada	0,30±0,0	0,86±0,0
	Choque	0,30±0,0	0,87±0,0
	Moderada+Choque	0,31±0,0	0,89±0,0
significación		ns	ns
Nagcarlang	Control	0,34±0,0 a	0,82±0,0 b
	Moderada	0,31±0,0 a	0,86±0,0 a
	Choque	0,34±0,0 a	0,86±0,0 a
	Moderada+Choque	0,22±0,0 b	0,86±0,0 a
significación		**	**

En el genotipo Amalia, ninguna de las condiciones de temperatura en estudio provocaron variaciones significativas en la producción de *qP* y *qN* (Tabla 8). Trabajos anteriores señalan una estabilidad en los valores de *qP* y *qN* en plantas de frijol sometidas a un rango de temperatura de 20 a 35°C en condiciones de intensidad luminosa de 200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Pastenes y Horton, 1996).

Por su parte, en el genotipo Nagcarlang se observó una disminución significativa en los valores de *qP* en las plantas que recibieron conjuntamente ambos tratamientos de

temperatura, mientras que los valores de  $qN$  se incrementaron significativamente para todas las condiciones de temperatura ensayadas (Tabla 8). Evidencias anteriores señalan que el incremento de la temperatura en condiciones de oscuridad provoca una reducción severa en la funcionalidad del aparato fotosintético en plantas de cebadas, donde se observó una reducción significativa en la producción de  $qP$  en hojas de 8 y 11 días de edad (Kalituho et al., 2003).

Esta reducción en los valores de  $qP$  indica que bajo esta condición de temperatura la proporción de  $FS_{II}$  “abierto” se reduce ya sea por afectaciones generadas en el centro de reacción y su limitada transferencia de electrones a la cadena o por afectaciones en la cadena transportadora de electrones lejana al  $FS_{II}$ , por una disminución en la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo del carbono.

Teniendo en cuenta los resultados queda claro que la reducción detectada en el  $qP$  no se debe a daños directos en el  $FS_{II}$  (estabilidad en  $Fo$ ,  $Fm$  y  $Fv/Fm$ ) y sí a una disminución en el transporte de electrones por una reducción en la velocidad de carboxilación de la enzima Rubisco (reducción  $V_{cmax}$ ). Esto provoca una saturación del proceso de fotosíntesis y una acumulación de centro de reacción del  $FS_{II}$  en su forma cerrada. Es bien conocido que la producción de  $qP$  en las plantas está relacionado con la continua reoxidación del aceptor primario de electrones  $Q_A^-$  inducido por la redistribución de la energía de excitación en el  $FS_I$  en sincronía con el flujo completo de electrones y el desprendimiento de oxígeno (Lichtenthaler et al., 1988).

Por su parte, el incremento en el  $qN$  está relacionado con la activación de los procesos de disipación de energía por vía no radioactiva ( $qE$ ); al mismo tiempo, no se descarta una disminución en los procesos de distribución de energía entre el fotosistema I y II ( $qT$ ), al tratarse de plantas crecidas en condiciones de baja intensidad de luz. Tanto el  $qE$  como el  $qT$  son distinguidos difícilmente a partir de la cinética de relajación, ya que el  $qT$ , generalmente, tiene una pequeña contribución al “quenching” no fotoquímico; pero éste sí está presente en plantas crecidas en condiciones de bajas intensidad de luz (Walters y Horton, 1991).

De forma general las evidencias indican que dos regiones del aparato fotosintético son responsables de los cambios adaptativos al incremento de la temperatura en los

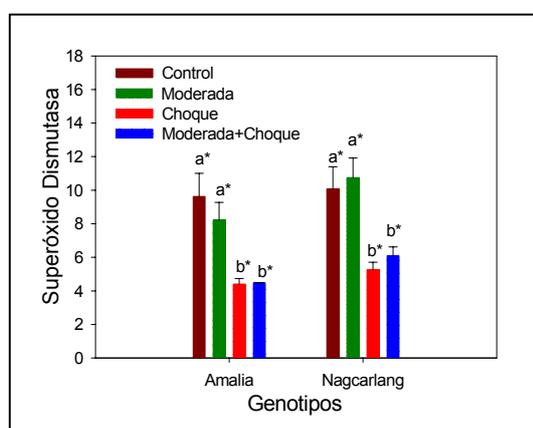
genotipos estudiados. En el caso del genotipo Amalia, parecen ser las reacciones involucradas en las reacciones fotoquímicas y transferencia de electrones las que definen la aclimatación de las funciones fotosintéticas a la temperatura. Por el contrario, en el genotipo silvestre Nagcarlang la termotolerancia de la enzima Rubisco, presumiblemente de la enzima Rubisco activasa, parece ser el sitio que permite los cambios adaptativos al incremento de la temperatura.

#### 4.2.5 Actividad antioxidante enzimática

##### 4.2.5.1 Actividad de la enzima Superóxido Dismutasa

La actividad específica de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) se vio afectada de forma similar ante las distintas condiciones de temperatura, en cada genotipo (Figura 11).

Se observó que el tratamiento Moderada no modificó los niveles de actividad específica total de la enzima. Sin embargo, el tratamiento Choque, en plantas con y sin previo tratamiento de temperatura moderada en la oscuridad, redujo en casi un 50% los valores de actividad específica total de la enzima SOD, en los genotipos estudiados (Figura 11).



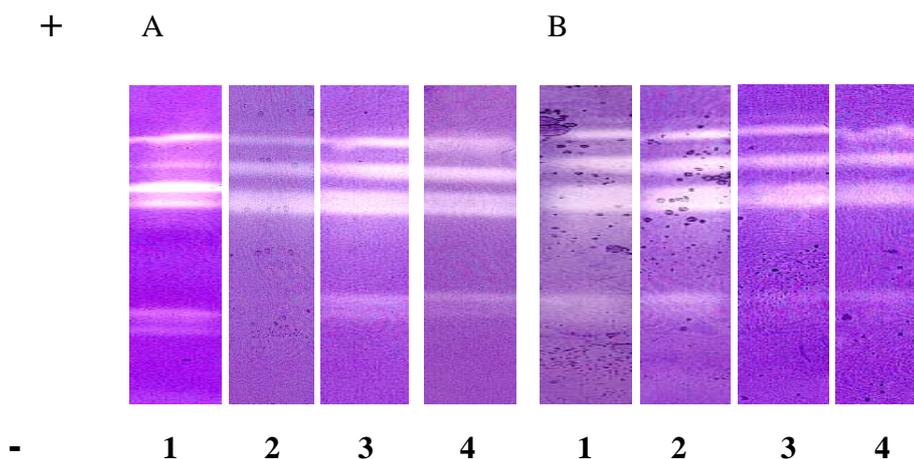
**Figura 11.** Actividad de la enzima Superóxido Dismutasa ( $U_{SOD} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$ ), de plantas de dos genotipos de tomate, Amalia y Nagcarlang, expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25°C, Control; 35°C tres noches, Moderada; 45°C tres horas en luz, Choque; 35°C tres noches+45°C tres horas, Moderada+Choque). Las barras verticales representan el error estándar y letras distintas muestran diferencias significativas entre los tratamientos. (\*  $p < 0,05$ ).

El comportamiento diferenciado en la actividad de la enzima ante condiciones de temperatura de 35 y 45°C demuestran la estabilidad de la enzima en condiciones de temperatura moderada, en este caso no superior a los 35°C, y la extrema

susceptibilidad de la misma a condiciones de temperatura severa (45°C). Del mismo modo, se comprobó que la exposición previa de las plantas a tratamientos de calor moderado no favorece eventos que incrementen la tolerancia de la enzima cuando las plantas son expuestas a temperaturas elevadas.

Evidencias anteriores señalan un decremento en los valores de actividad de la enzima SOD y un aumento en la concentración de oxidantes seguido del estrés de calor (Willekens *et al.*, 1995; Foyer, 1997; Polle, 1997). Estudios realizados en diferentes especies de tomate, creciendo en condiciones de altas temperaturas, señalan un decremento en la actividad SOD, en algunas de estas especies (Rainwater *et al.*, 1996).

Las corridas electroforéticas basadas en el punto isoeléctrico de las isoenzimas (isoelectroenfoque) revelaron la presencia de 6 isoformas activas de la enzima SOD en las plantas control de ambos genotipos (Figura 12 A y B).



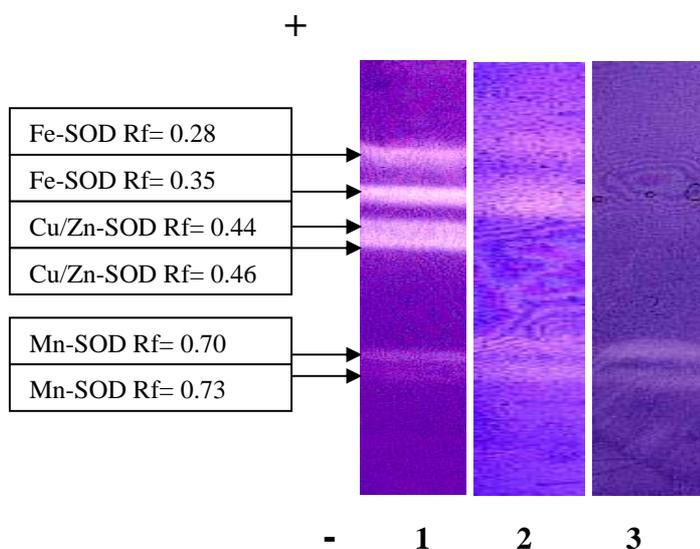
**Figura 12.** Electroforesis de isoenzimas activas de la enzima Superóxido Dismutasa (isoelectroenfoque) detectadas en el extracto crudo de hojas de plantas de dos genotipos de tomate, Amalia y Nagcarlang, expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25°C, Control; 35°C tres noches, Moderada; 45°C tres horas en luz, Choque; 35°C tres noches+45°C tres horas, Moderada+Choque). Gel de Bis/Acrilamida al 30%: Gel 1 Control, Gel 2 Moderada, Gel 3 Choque, Gel 4 Moderada+Choque.

Acorde a los resultados obtenidos con los inhibidores (KCN y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se pudo identificar que de las 6 bandas de actividad de la SOD observadas en el gel control, cuatro de ellas mostraron resistencia a la incubación con KCN (2 mM), indicando la presencia de isoenzimas Fe-SOD y Mn-SOD. La incubación de los geles en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM) permitió identificar que dos de las cuatro bandas de actividad, presentes en el gel incubado con KCN correspondían a isoenzimas Mn-SOD (Figura 13).

La distribución e identificación de las isoformas activas ubican hacia la porción más ácida del gel dos bandas de actividad de Fe-SOD a un Rf de 0,28 (banda 1) y Rf de 0,35 (banda 2); en una posición intermedia a un Rf de 0,44 (banda 3) y Rf de 0,46 (banda 4) se ubicaron dos Cu/Zn-SOD y dos isoformas Mn-SOD se localizaron hacia la porción más básica del gel a un Rf de 0,70 (banda 5) y Rf de 0,73 (banda 6) (Figura 13).

Los distintos tratamientos de temperatura no modificaron el patrón de isoenzimas presente en las plantas del tratamiento Control, observándose 6 bandas con actividad en cada gel.

A pesar de que los valores de actividad específica total de la enzima SOD tuvieron un comportamiento similar ante los distintos tratamientos de temperatura para cada genotipo, las actividades de sus isoenzimas no se modificaron de igual manera.



**Figura 13.** Electroforesis de isoenzimas activas de la enzima Superóxido Dismutasa (isoelectroenfoque) detectadas en el extracto crudo de plantas de tomate. Gel 1 sin inhibidores, Gel 2 incubado con KCN (2 mM), Gel 3 incubado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM).

La actividad de la isoenzima Fe-SOD tuvo un comportamiento peculiar en los genotipos estudiados. En el genotipo Amalia las plantas que recibieron el tratamiento Choque redujeron la actividad de la isoforma Fe-SOD más ácida (banda 1), mientras que se observó un incremento en la actividad de la isoforma menos ácida (banda 2).

Por su parte, las plantas que recibieron el tratamiento Moderada incrementaron ambas isoformas, a diferencia de las que recibieron ambos tratamientos (Moderada+Choque), que solamente incrementaron la actividad de la isoforma menos ácida (Tabla 9).

Por el contrario, en el genotipo Nagcarlang se encontró que ambas isoformas de la Fe-SOD se incrementaron en las plantas que recibieron los tratamientos Moderada y Choque de forma independiente, mientras que las que recibieron ambos tratamientos de calor redujeron la actividad de ambas isoformas.

Estudios previos señalan la presencia de la isoenzima Fe-SOD en cloroplastos de hojas de tomate; junto con la más ácida de las isoformas Cu/Zn-SOD (banda 3) (Kwiatowski y Kaniuga, 1984; Perl-Treves y Galum, 1991). Por homología a los resultados previos y teniendo en cuenta el pI de cada isoenzima se considerará en el experimento que la isoforma Cu/Zn-SOD ubicada en la banda 3 es la cloroplástica, mientras que la ubicada en la banda 4 es la citosólica.

**Tabla 9.** Actividad de las distintas isoenzimas presentes en el extracto crudo, de plantas de dos genotipos de tomate, Amalia y Nagcarlang, expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25°C, Control; 35°C tres noches, Moderada; 45°C tres horas en luz, Choque; 35°C tres noches+45°C tres horas, Moderada+Choque).

Genotipos	Tratamientos	Fe-SOD (USOD mg <sup>-1</sup> proteína)			Cu/Zn-SOD (USOD mg <sup>-1</sup> proteína)			Mn-SOD (USOD mg <sup>-1</sup> proteína)		
		Banda 1	Banda 2	Total	Banda 3	Banda 4	Total	Banda 5	Banda 6	Total
Amalia	Control	1,15	1,08	2,23	3,28	1,68	4,96	0,61	0,32	0,93
	Moderada	1,83	2,36	4,19	1,31	3,37	4,68	-	-	-
	Choque	0,84	1,49	2,33	0,67	2,09	2,76	0,32	0,22	0,54
	Moderada+Choque	1,09	1,47	2,56	0,70	2,22	2,92	0,30	0,12	0,42
Nagcarlang	Control	1,43	2,28	3,71	1,66	2,61	4,27	1,53	1,21	2,74
	Moderada	1,47	2,72	4,63	2,24	2,05	4,29	1,65	0,63	2,28
	Choque	1,57	2,68	4,25	1,00	1,62	2,62	0,34	0,16	0,50
	Moderada+Choque	1,19	1,68	2,87	0,95	1,49	2,44	0,58	0,14	0,72

En el genotipo Amalia se observó que la actividad de la Cu/Zn-SOD cloroplástica (banda 3) mostró una reducción en los distintos tratamientos de temperatura ensayados, mientras que Cu/Zn-SOD citosólica (banda 4) se incrementó, lo que hace

suponer que esta isoforma es mucho más estable al calor que la ubicada en los cloroplastos.

Por su parte, en el genotipo Nagcarlang ambas isoformas de la Cu/Zn-SOD resultaron sensibles a la exposición a 45°C. Sin embargo, resulta interesante destacar que el porcentaje de reducción de la isoforma cloroplástica fue menor al detectado en el genotipo Amalia. (Tabla 9). Los resultados coinciden con evidencias anteriores que señalan la actividad Cu/Zn-SOD cloroplástica es reducida con el incremento de la temperatura en plantas de guisante (Burke y Oliver, 1992).

Intentando relacionar la actividad de las isoenzimas Fe-SOD y Cu/Zn-SOD, ubicadas en los cloroplastos, con la termotolerancia de las funciones fotosintéticas de los genotipos estudiados, se puede decir que el incremento de la actividad de ambas isoformas Fe-SOD parece conferirle protección a los cloroplastos; en situaciones donde la actividad de la Cu/Zn-SOD se deprime severamente. Resulta interesante destacar que en el genotipo silvestre Nagcarlang la actividad de la isoenzima Cu/Zn-SOD cloroplástica parece contribuir a la protección de las funciones fotosintéticas. Por el contrario, se detectó que los tratamientos de calor que disminuyeron la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>, en ambos genotipos, provocaron una severa reducción en la actividad de la isoforma Fe-SOD más ácida (banda 1) al igual que de la isoforma Cu/Zn-SOD cloroplástica.

Por analogía a lo encontrado en estudios anteriores se asumió que la isoforma Mn-SOD menos básica (banda 5) corresponde a la isoforma mitocondrial (Perl-Treves y Galum, 1991; Hernández *et al.*, 1999; Jiménez *et al.*, 2003); mientras que la ubicada hacia la posición más básica (banda 6) corresponde a la peroxisomal (Mittova *et al.*, 2000; Del Rio *et al.*, 2003).

En el genotipo Amalia se encontró que la actividad de las isoformas Mn-SOD mitocondrial y peroxisomal se redujo con la temperatura. Las mayores afectaciones se encontraron en las plantas que solamente recibieron el tratamiento de calor moderado en la oscuridad (Moderada). Por su parte, el genotipo silvestre Nagcarlang, igualmente redujo la actividad de esta isoenzima, excepto la isoforma menos básica (banda 5) que mostró tolerancia a condiciones moderadas de temperatura (Moderada).

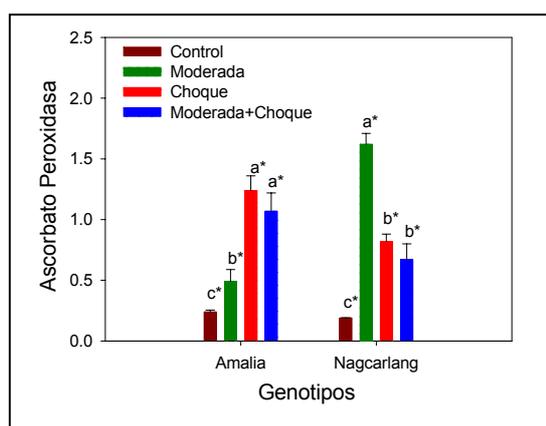
Teniendo en cuenta las variaciones encontradas en la actividad de las distintas isoformas Mn-SOD en ambos genotipos, se puede decir que tanto las mitocondrias

como los peroxisomas se encontraban desprovistos de un sistema de defensa antioxidante, relacionado con la eliminación del radical libre  $O_2^-$ , que redujera los daños oxidativos. Este fenómeno pudo ser menos severo en las plantas que recibieron temperaturas de 35°C en Nagcarlang, donde parece existir una isoforma más estable al incremento moderado de la temperatura.

De forma general, se encontró que las variaciones detectadas en la actividad específica SOD no justifican la termotolerancia del aparato fotosintético. Sin embargo, las modificaciones detectadas en las isoformas de la Fe-SOD parecen relacionarse con la protección de los cloroplastos bajo determinadas condiciones de temperatura, en ambos genotipos. Igualmente, parece ser esta isoenzima la responsable de la actividad antioxidante en los cloroplastos cuando las altas temperaturas reducen la actividad de Cu/Zn-SOD.

#### 4.2.5.2 Actividad de la enzima Ascorbato Peroxidasa

Cuando se examinó la enzima Ascorbato Peroxidasa (APX) se encontró un incremento en su actividad con la temperatura, en ambos genotipos (Figura 14), patrón que coincide con observaciones previas en otros cultivos (Mittova *et al.*, 2000; Panchuck *et al.*, 2002, del Río *et al.*, 2003; Mateos *et al.*, 2003).



**Figura 14.** Actividad de la enzima Ascorbato Peroxidasa ( $nmoles\ min^{-1}\ mg^{-1}\ proteína$ ) de plantas de dos genotipos de tomate, Amalia y Nagcarlang, expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25°C, Control; 35°C tres noches, Moderada; 45°C tres horas en luz, Choque; 35°C tres noches+45°C tres horas, Moderada+Choque). Las barras verticales representan el error estándar y letras distintas muestran diferencias significativas entre los tratamientos. (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

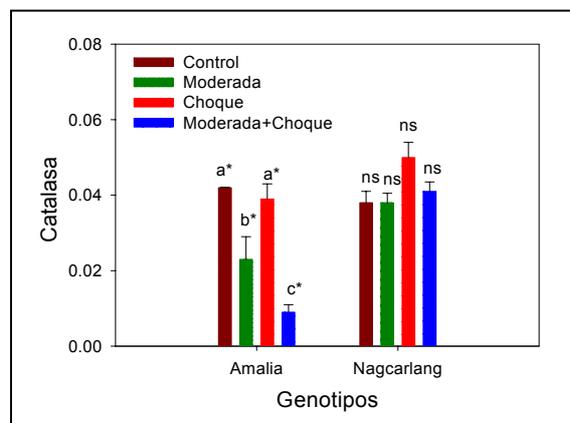
Se debe de señalar que en el genotipo Amalia los mayores incrementos de actividad se obtuvieron en las plantas que recibieron de algún modo el tratamiento Choque, mientras que en Nagcarlang se detectó en las plantas expuestas al tratamiento Moderada (Figura 14). Esta respuesta diferencial en los niveles de actividad de la enzima APX hace suponer que en el genotipo Amalia, mejorado genéticamente, existe una enzima APX con mayor estabilidad térmica.

De forma general, es evidente que ante el incremento de la temperatura, en ambos genotipos, se disparó un sistema de defensa antioxidante eficiente para eliminar la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la célula, el cual es potencialmente tóxico. No se pudo relacionar el incremento de la actividad de la enzima APX con la termotolerancia o susceptibilidad al calor del aparato fotosintético, en ambos genotipos .

#### 4.2.5.3 Actividad de la enzima Catalasa

La actividad de la enzima Catalasa (CAT) encontrada en ambos genotipos en condiciones diferentes de temperatura se muestra en la Figura 15.

En el genotipo Amalia, la actividad de la enzima CAT se redujo en aquellas plantas que recibieron tratamientos de temperatura en la oscuridad (Moderada y Moderada+Choque), mientras que las plantas que se expusieron al tratamiento de Choque mostraron valores similares de actividad a las plantas control. Los resultados sugieren que la pérdida de actividad de la enzima CAT no se debió al incremento de la temperatura, sino al modo de imponer los tratamientos de calor (donde se incluye un período de oscuridad y posteriormente uno de luz) el cual pudo inducir la fotoinhibición de la enzima (Schafer y Feierabend, 2000) y una inhibición de su síntesis en la oscuridad (Dat *et al.*, 1998). Evidencias anteriores señalan que la actividad Catalasa puede ser fotoinhibida en algunas condiciones de luz (Feierabend y Engel, 1986; Polle, 1997; Foyer *et al.*, 1997; Dat *et al.*, 1998).



**Figura 15.** Actividad de la enzima Catalasa ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$ ) de plantas de dos genotipos de tomate, Amalia y Nagcarlang, expuestas a distintos tratamientos de temperatura ( $25^{\circ}\text{C}$ , Control;  $35^{\circ}\text{C}$  tres noches, Moderada;  $45^{\circ}\text{C}$  tres horas en luz, Choque;  $35^{\circ}\text{C}$  tres noches+ $45^{\circ}\text{C}$  tres horas, Moderada+Choque). Las barras verticales representan el error estándar y letras distintas muestran diferencias significativas entre los tratamientos. (no significativo (ns),  $*p < 0,05$ ).

En el genotipo Nagcarlang, ninguno de los tratamientos de calor ensayados provocaron modificaciones en la actividad de la enzima, lo que pudiera indicar la presencia de una enzima con mayor estabilidad al calor en este genotipo. Los niveles de actividad de la enzima CAT encontrados en las plantas expuestas al tratamiento Choque en los genotipos Amalia y Nagcarlang suponen un predominio de las isoenzimas más estables al calor (Anderson, 2002).

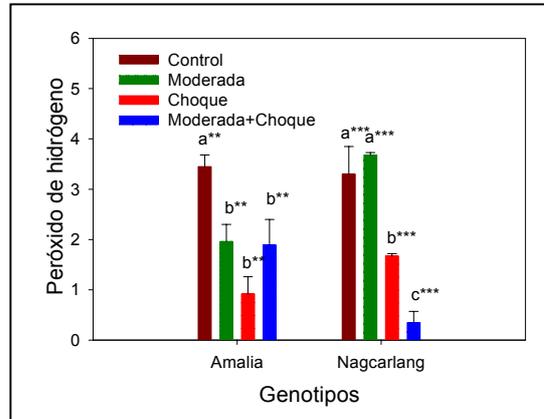
De forma general, la actividad de la enzima CAT no fue inducida por el incremento de la temperatura, por el contrario una disminución de la misma fue detectada en las plantas que recibieron condiciones de calor en la oscuridad, en el genotipo Amalia. En condiciones donde la actividad CAT fue reducida, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue eliminado de las plantas por la enzima APX.

#### **4.2.6 Estado oxidativo de las plantas**

##### **4.2.6.1 Contenido de peróxido de hidrógeno foliar**

El contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foliar se redujo con el incremento de la temperatura en el genotipo Amalia. Sin embargo, en el genotipo Nagcarlang esto solamente se observó en aquellas plantas que recibieron en algún momento el tratamiento de Choque. Las

plantas expuestas al tratamiento Moderada (35°C) mostraron valores similares a las plantas control (Figura 16).



**Figura 16.** Contenido de peróxido de hidrógeno ( $\text{nmol mL}^{-1}$ ) de plantas de dos genotipos de tomate, Amalia y Nagcarlang, expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25°C, Control; 35°C tres noches, Moderada; 45°C tres horas en luz, Choque; 35°C tres noches+45°C tres horas, Moderada+Choque). Las barras verticales representan el error estándar y letras distintas muestran diferencias significativas entre los tratamientos. (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

Teniendo en cuenta las enzimas encargadas de mantener los niveles no tóxicos de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la célula, se puede sugerir que en el genotipo Amalia los valores tan bajos de esta especie reactiva de oxígeno, encontrados en las plantas que recibieron el tratamiento Choque, se debieron a la acción combinada y eficiente de los sistemas enzimáticos encargados su eliminación (APX y CAT) (Figuras 14 y 15), mientras que en los restantes tratamientos parece ser solamente la enzima APX la encargada de reducir los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el tejido (Figura 14).

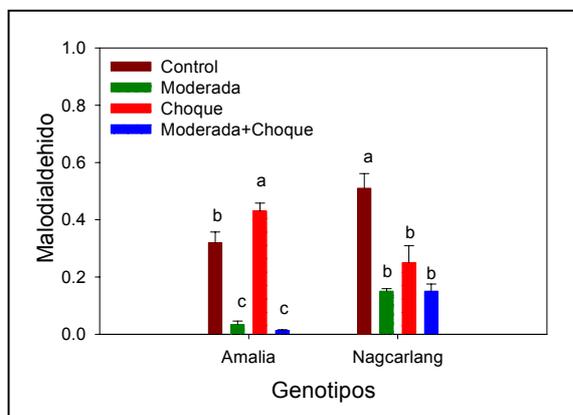
Por otra parte, en el genotipo Nagcarlang mientras que la actividad CAT mantiene su actividad ante el incremento de la temperatura y contribuye a la eliminación de las posibles especies reactivas de oxígeno que se forman bajo estas condiciones, es la actividad de la enzima APX la que garantiza, en mayor medida, un estado oxidativo no tóxico en las plantas (Figura 14 y 15). Es de señalar, que las plantas expuestas al tratamiento Moderada, aun cuando presentaron un incremento significativo en la actividad de la enzima APX, y niveles de actividad de la enzima SOD similares a las plantas control, el contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue similar al detectado en las plantas control, lo que supone que bajo estas condiciones de calor la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se incrementa, no sólo por la acción de la enzima SOD. Es bien conocido, que la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$

en las plantas está dada por dos procesos fundamentales, la fotosíntesis (reacción de Mehler) y la fotorrespiración (glicolato oxidasa) (Veljovic-Jovanovic *et al.*, 2002). Sin embargo, existen otras enzimas en las hojas que son capaces de producir cantidades significativas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incluyendo peroxidas, NADPH oxidasa y oxalato oxidasa (Sagi y Fluhr, 2001).

Se ha reconocido que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como otras especies activas de oxígeno, pueden atacar y dañar diferentes macromoléculas en la célula viviente (Foyer *et al.*, 1994; Smirnoff, 1993). Sin embargo, no se debe de descartar el efecto dual que tiene el peróxido de hidrógeno al actuar como señalizador del estrés en la célula (Neil *et al.*, 1999; Noctor *et al.*, 2000).

#### 4.2.6.2 Contenido de malondialdehído en las plantas

La acción de las especies reactivas de oxígeno en las membranas celulares se estimó a partir de los niveles de malondialdehído (MDA) detectados en el extracto crudo foliar, en ambos genotipos (Figura 17).



**Figura 17.** Contenido de malondialdehído (nmol mg<sup>-1</sup> proteína), de plantas de dos genotipos de tomate, Amalia y Nagcarlang, expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25°C, Control; 35°C tres noches, Moderada; 45°C tres horas en luz, Choque; 35°C tres noches+45°C tres horas, Moderada+Choque). Las barras verticales representan el error estándar y letras distintas muestran diferencias significativas entre los tratamientos. (\*\*p<0,01).

En el genotipo Amalia, solamente la condición de temperatura de Choque provocó un incremento en los niveles de MDA en el tejido foliar, mientras que las plantas que de algún modo recibieron el tratamiento Moderada (Moderada y Moderada+Choque)

presentaron niveles de MDA menores a los detectados en las plantas control (Figura 17).

El incremento en el contenido de MDA, detectado en las plantas que recibieron el tratamiento Choque, en el genotipo Amalia, estuvo acompañado de un incremento en la pérdida de electrolitos por la membrana (Tabla 3). Las modificaciones encontradas en las funciones fotoquímicas de FS<sub>II</sub> y la baja actividad de la enzima SOD bajo estas condiciones pudieron favorecer la formación y acumulación de especies reactivas de oxígeno, como el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, en la vecindad del FS<sub>I</sub>; el cual tiene la capacidad de interactuar directamente con los lípidos de membranas e incrementar los niveles de peroxidación lipídica. Estudios anteriores han relacionado el incremento en el contenido de MDA con la oxidación del ácido linoleico y del linolénico, componentes de los galactolípidos y fosfolípidos que componen los centros de reacción de los fotosistemas, en la membrana de los cloroplastos (Kurganova *et al.*, 1997).

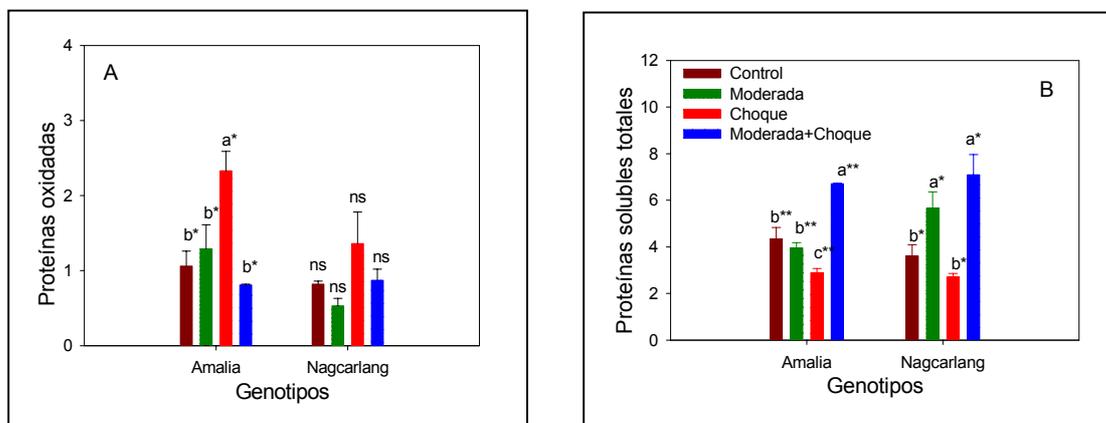
Por su parte, en el genotipo silvestre Nagcarlang todas las plantas expuestas a los distintos tratamientos de temperatura presentaron niveles de MDA inferiores a los detectados en las plantas control, lo cual se correspondió con la tolerancia de las funciones fotoquímicas.

Es de notar que los niveles de MDA detectados en las plantas control, en ambos genotipos, son resultado de la generación de especies reactivas de oxígeno en los procesos fisiológicos normales, los cuales producen pequeñas cantidades, pero cuantificables, de estas especies oxidadas.

#### 4.2.6.3 Contenido de proteínas solubles: totales y modificadas oxidativamente

El contenido de proteínas modificadas oxidativamente en la célula solamente se incrementó en las plantas que recibieron directamente el tratamiento Choque en el genotipo Amalia, mientras que los restantes tratamientos de calor lograron mantener valores similares a los encontrados en las plantas control (Figura 18A). Se ha encontrado un incremento en el contenido de proteínas oxidadas en plantas de maíz después del estrés oxidativo inducido por enfriamiento (Prasad, 1996; Kingston-Smith y Foyer, 2000), en nódulos en senescencia de guisante y frijol (Matamoros *et al.*, 1999)

y en plantas de guisante, después del estrés oxidativo inducido por cadmio (Romero-Puerta *et al.*, 2002).



**Figura 18.** Contenido de proteínas modificadas oxidativamente ( $\text{nmol mg}^{-1}$  proteína) (A) y proteínas solubles totales ( $\text{mg mL}^{-1}$ ), de plantas de dos genotipos de tomate, Amalia y Nagcarlang, expuestas a distintos tratamientos de temperatura ( $25^{\circ}\text{C}$ , Control;  $35^{\circ}\text{C}$  tres noches, Moderada;  $45^{\circ}\text{C}$  tres horas en luz, Choque;  $35^{\circ}\text{C}$  tres noches +  $45^{\circ}\text{C}$  tres horas, Moderada+Choque). Las barras verticales representan el error estándar y letras distintas muestran diferencias significativas entre los tratamientos. (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

En el genotipo Nagcarlang ninguno de los tratamientos de calor impuestos modificaron significativamente el contenido de proteínas oxidadas en el tejido foliar.

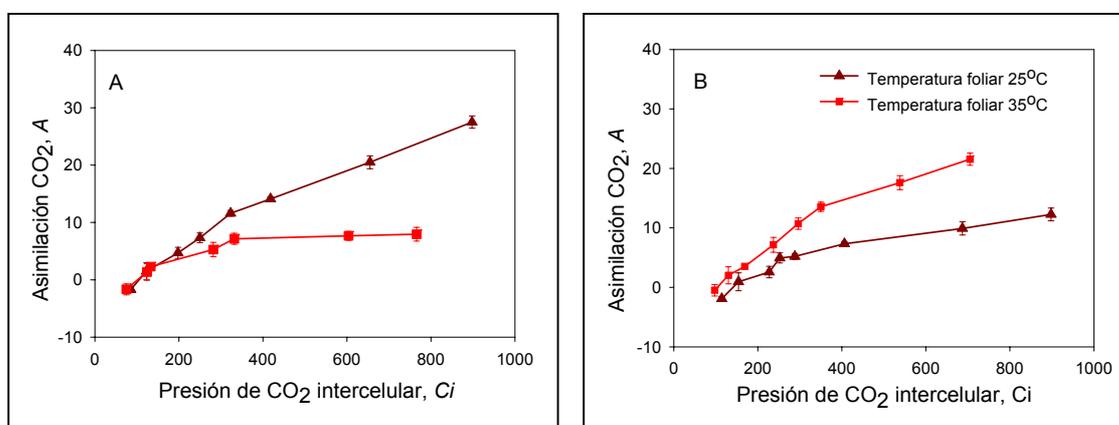
Por su parte, el contenido de proteínas solubles totales presentes en el extracto se redujo significativamente en las plantas expuestas al tratamiento Choque, en el genotipo Amalia; mientras que se detectó un incremento de éstas en las plantas que recibieron ambas condiciones de calor (Moderada+Choque) (Figura 18B). En el genotipo Nagcarlang se observó un incremento en el contenido de proteínas totales en las plantas que recibieron en algún momento la temperatura de  $35^{\circ}\text{C}$  (Moderada y Moderada+Choque).

De forma general, se encontró una relación inversa entre el contenido de proteínas modificadas oxidativamente y el contenido de proteínas solubles totales, lo que indica que las proteínas oxidadas las cuales pierden su funcionalidad, parecen ser sitio preferencial de las proteasas. Trabajos previos señalan que la degradación de proteínas constituye un índice de estrés oxidativo en la planta cuando son expuestas a distintas condiciones adversas de crecimiento (Pacifci y Davies, 1990).

### 4.3 Efecto del período breve de exposición a diferentes temperaturas foliares en la funcionalidad del aparato fotosintético, en dos genotipos de tomate.

#### 4.3.1 Variables del intercambio gaseoso de las plantas. Análisis de las curvas de asimilación de CO<sub>2</sub> a diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> (Curvas A/Ci)

En la Figuras 19A y B se muestra el efecto de diferentes condiciones de temperatura foliar en las variables del intercambio gaseoso en el rango de concentración de CO<sub>2</sub> evaluado (curvas A/Ci), en los genotipos Amalia y Nagcarlang.



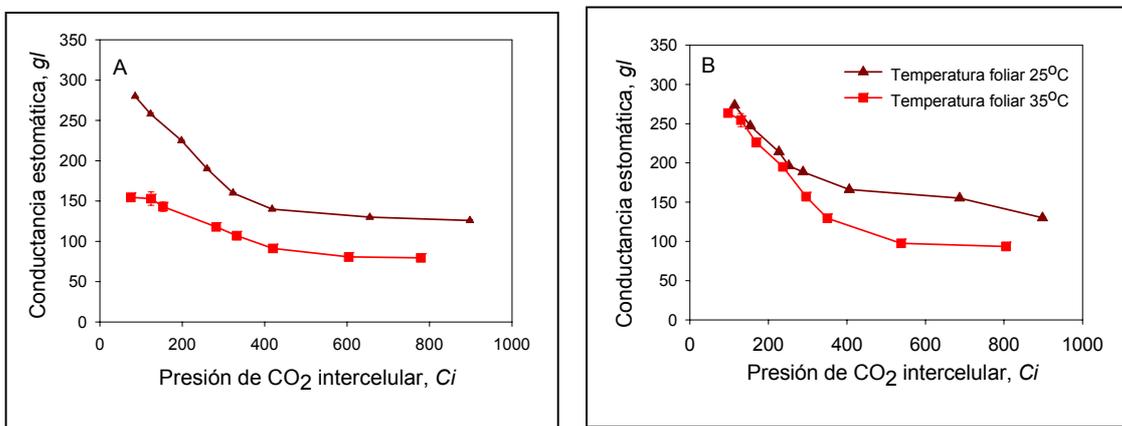
**Figura 19.** Curvas de asimilación de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a distintas presiones de CO<sub>2</sub> intercelular ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), de hojas de dos genotipos de tomate, Amalia (A) y Nagcarlang (B), expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25 y 35°C). ( $Q = 1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y flujo de gases de  $400 \mu\text{mol s}^{-1}$ ).

En el genotipo Amalia la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> detectada a concentraciones bajas de CO<sub>2</sub>, y la que a menudo es referida a la eficiencia de carboxilación, no se diferenció entre las hojas control y las tratadas. Sin embargo, a medida que se incrementó la concentración interna de CO<sub>2</sub>, la fotosíntesis neta se redujo severamente en las hojas que recibieron la temperatura de 35°C, notándose una marcada diferencia a partir de concentraciones internas de CO<sub>2</sub> de 300  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  (Figura 19A). Teniendo en cuenta el efecto diferencial de la temperatura en los distintos componentes del aparato fotosintético, se puede decir que la dependencia de los procesos que limitan la fotosíntesis con el incremento de la temperatura, no es necesariamente la misma (Labate y Leegood, 1988 y Sage *et al.*, 1990).

Por su parte, en el genotipo Nagcarlang, la condición de temperatura de 35°C incrementó los valores de esta variable en el rango de concentración de CO<sub>2</sub> evaluado, notándose las mayores diferencias entre el control y las tratadas a concentraciones de CO<sub>2</sub> elevadas (Figura 19B).

Se debe de tener en cuenta que la forma de aplicar el estrés modula la respuesta de las plantas, lo que pudiera justificar, en este caso, la reducción en los valores *A* detectada a 35°C, en Amalia, donde la temperatura fue aplicada localmente en el tejido foliar. Es de señalar, que en los epígrafes 4.1.2 y 4.2.3 se aplicaron temperaturas de 45°C durante 2 horas y 35°C durante cuatro horas tres días, respectivamente; a las plantas y no se detectaron variaciones en esta variable.

Las limitaciones impuestas por los estomas al intercambio gaseoso se estimaron a partir de los valores de conductancia estomática (*g*). En el genotipo Amalia un cierre estomático caracterizó la respuesta de este genotipo al incremento de la temperatura (Figura 20). Esta respuesta estomática en condiciones de estrés foliar breve (minutos), fue similar a la detectada cuando el estrés se le aplicó a la planta por un período mayor (3 horas), quedando demostrado que el genotipo Amalia responde al incremento de la temperatura con un cierre estomático, respuesta típica de una planta C<sub>3</sub>.



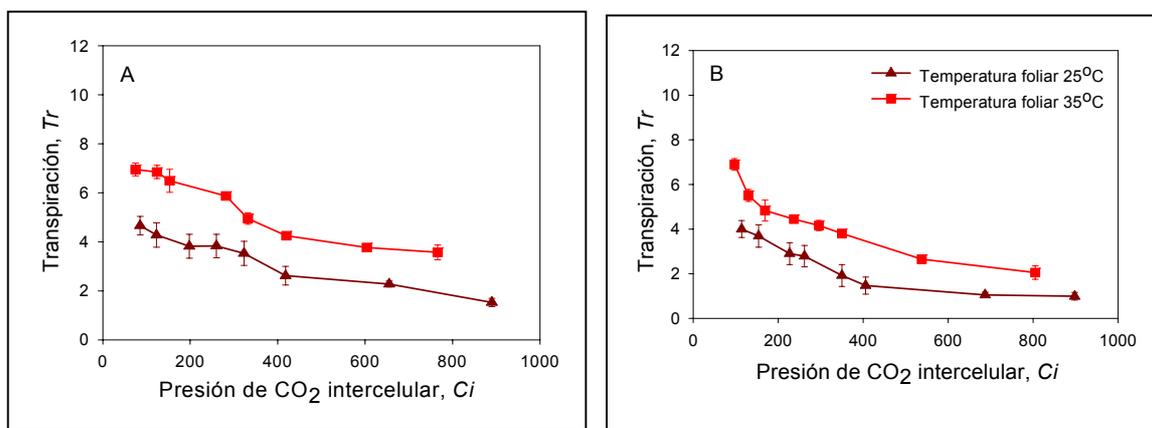
**Figura 20.** Curvas de conductancia estomática ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a distintas presiones de CO<sub>2</sub> intercelular ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), de hojas de dos genotipos de tomate, Amalia (A) y Nagcarlang (B), expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25 y 35°C). ( $Q = 1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y flujo de gases de  $400 \mu\text{mol s}^{-1}$ ).

Por el contrario, en el genotipo Nagcarlang la respuesta estomática detectada en las hojas tratadas no tuvo un comportamiento similar en el rango de concentración de CO<sub>2</sub> evaluado. Se observó que cuando los niveles de CO<sub>2</sub> intercelular se mantuvieron por

debajo de  $200 \mu\text{mol mol}^{-1}$  los estomas no respondieron al incremento de la temperatura, sin embargo por encima de éstos niveles un cierre estomático caracterizó la respuesta de éste genotipo. La respuesta diferencial encontrada en el genotipo Nagcarlang permite sugerir que para ciertas condiciones de temperatura, aun cuando supere el óptimo de la especie, si la atmósfera esta empobrecida de  $\text{CO}_2$  los estomas se mantienen abiertos para garantizar la difusión del  $\text{CO}_2$  a los espacios intercelulares. Bajo estas condiciones se puede decir que en el genotipo Nagcarlang, se activaron una serie de mecanismos relacionados con los estomas que favorecieron la eficiencia de carboxilación de la enzima (obtenida en la primera porción de curva  $A/C_i$ ), minimizando el proceso de fotorrespiración.

Es de señalar, en ambos genotipos, que el cierre estomático no limitó la difusión  $\text{CO}_2$  a los espacios intercelulares, obteniéndose valores similares de  $C_i$  en las hojas control y tratadas en el rango de concentración ensayado (Figura 20). De ahí, que no se considere la contribución del componente estomático en los valores de asimilación neta.

Por su parte, la tasa de transpiración ( $Tr$ ) de las hojas se incrementó en las distintas condiciones de estrés térmico, en ambos genotipos (Figura 21).



**Figura 21.** Curvas de transpiración ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a distintas presiones de  $\text{CO}_2$  intercelular ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) de hojas de dos genotipos de tomate, Amalia (A) y Nagcarlang (B), expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25 y  $35^\circ\text{C}$ ). ( $Q = 1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y flujo de gases de  $400 \mu\text{mol s}^{-1}$ ).

No se encontró una relación directa entre la transpiración y la conductancia estomática. Es de notar, que las hojas que recibieron el tratamiento de temperatura lograron un incremento en la  $Tr$  cuando los valores de  $g_l$  se redujeron. Esta respuesta puede ser explicada si se tiene en cuenta que la transpiración no solo depende de la apertura estomática, sino también de la diferencia de presión de vapor de agua entre la

hoja y el aire (Azcón-Bieto y Talón, 2000). Bajo las condiciones de temperatura ensayadas se puede sugerir que en las hojas expuestas a temperatura del aire de 35°C la diferencia de presión de vapor entre la hoja y la capa límite se incrementó, favoreciendo la transpiración, aún cuando los estomas redujeron su apertura.

Trabajos previos han relacionado, en muchas especies, la resistencia al calor con la forma de evitar el estrés, al cual se une el hábitat específico y la arquitectura de hoja (pelos, textura y talla), teniendo un papel decisivo para evitarlo las adaptaciones funcionales, principalmente, la transpiración (Shabala, 1996). Se ha señalado que por la transpiración, la temperatura de la hoja puede ser reducida en 5°C, y del 20 al 30% de la energía de calor absorbida puede ser disipada (Zhuchenko, 1988). Investigaciones, llevadas a cabo con plantas de tomate con diferentes susceptibilidades al calor, han encontrado una tendencia a la disminución en la transpiración con un sacrificio en la fotosíntesis neta, en plantas termosensibles; por el contrario, han asociado la transpiración activa con la tolerancia al calor (Jun *et al.*, 1990).

Si bien evidencias anteriores señalan que el incremento de la transpiración disipa parte de la energía absorbida y reduce la temperatura foliar, como se ha comprobado en el epígrafe 4.2.3, e incrementa la tolerancia al calor, la forma de imponer el estrés en este experimento limitó estas adaptaciones funcionales, las cuales no pudieron ejercer su función al mantener de manera constante la temperatura de la hoja a 35°C.

A partir de los resultados de las curvas de asimilación de CO<sub>2</sub> a diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> (curvas *A/Ci*), en ambos genotipos, se pudo distinguir la contribución del componente mesofílico al intercambio gaseoso.

Al considerar las limitaciones impuestas por la enzima Rubisco en la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>, se encontró, que el incremento de la temperatura foliar redujo en un 16% los valores de velocidad máxima de carboxilación de la enzima (*V<sub>cmax</sub>*), en el genotipo Amalia (Tabla 10). En correspondencia a las afectaciones observadas en la *V<sub>cmax</sub>*, se encontró una reducción en la tasa de carboxilación dependiente de las propiedades de la enzima Rubisco (*A<sub>c</sub>*), la cual se hizo más evidente a concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub> (Figura 22).

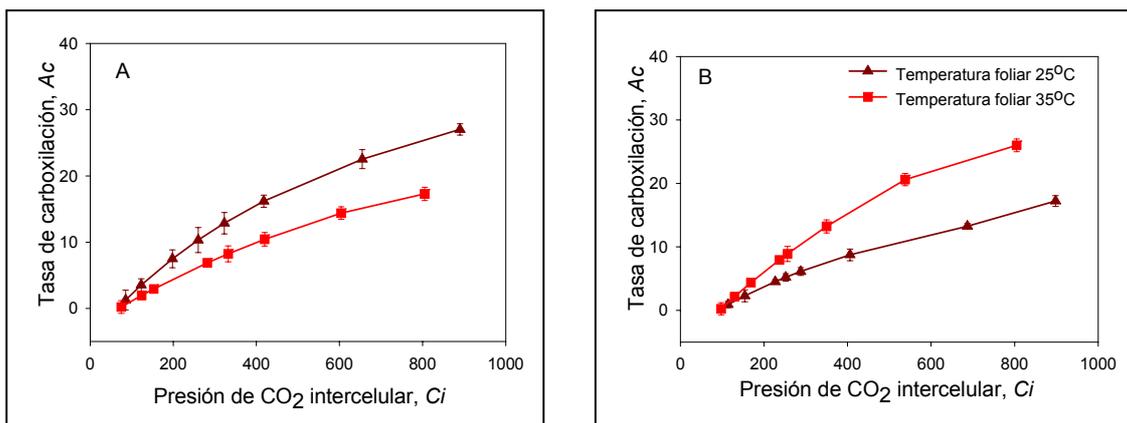
Por el contrario, en el genotipo Nagcarlang, la elevación de la temperatura en 10°C incrementó 1,6 veces la velocidad máxima de carboxilación de la enzimas, lo que hace suponer, que el óptimo de actividad de la enzima Rubisco, presente en el genotipo

silvestre, es superior a los 25°C. Estudios previos realizados en arroz señalan que la actividad de la enzima Rubisco manifiesta una estabilidad a la temperatura en los cultivares tolerantes comparado con los susceptibles, debido fundamentalmente a la degradación diferencial de la enzima por proteasas, acoplada con una pérdida de habilidad para la síntesis de la enzima en los cultivares sensibles (Bose *et al.*, 1999).

**Tabla 10.** Valores de  $V_{cmax}$  y  $J_{max}$  obtenidos a partir de las curvas  $A/C_i$ , de hojas de dos genotipos de tomate, expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25 y 35°C). Los valores representan la media de dos repeticiones  $\pm$  el error estándar del parámetro.

Genotipos	Temperatura foliar (°C)	$V_{cmax}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	$J_{max}$ ( $\mu\text{Eq m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
Amalia	25	55,55 $\pm$ 5,4	110,16 $\pm$ 5,8
	35	46,99 $\pm$ 5,7	53,34 $\pm$ 3,6
Nagcarlang	25	53,90 $\pm$ 5,6	102,36 $\pm$ 6,5
	35	88,50 $\pm$ 4,8	114,06 $\pm$ 3,8

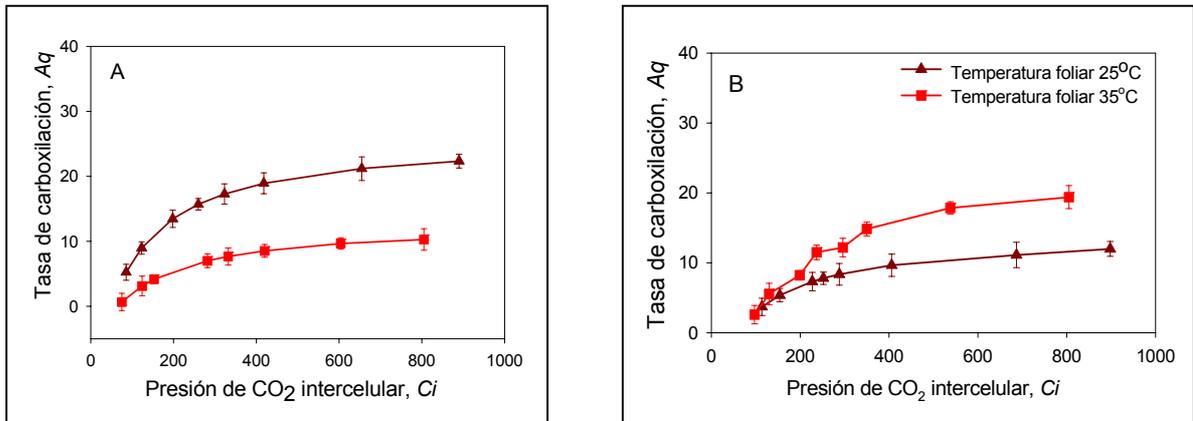
Igualmente, la tasa de carboxilación dependiente de las propiedades de la enzima ( $A_c$ ), se incrementó en las hojas expuestas a 35°C, en el genotipo Nagcarlang (Figura 22). Este incremento en la capacidad de carboxilación de la enzima reduce su función oxigenasa, lo cual constituye un gran valor adaptativo al calor en plantas  $C_3$ , donde el proceso de fotorrespiración está presente y constituye una de las mayores limitantes a la fotosíntesis.



**Figura 22.** Curvas representativas de la tasa de carboxilación de la enzima Rubisco ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), limitada por las propiedades cinéticas de la enzima, a distintas presiones de  $CO_2$  intercelular de hojas de dos genotipos de tomate, Amalia (A) y Nagcarlang (B), expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25 y 35°C). ( $Q = 1800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y flujo de gases de  $400 \mu\text{mol s}^{-1}$ ).

Cuando se consideró la influencia del calor en la eficiencia del transporte de electrones ( $J_{max}$ ), se encontró que, en el genotipo Amalia, éste parece ser el sitio de mayor vulnerabilidad al incremento de la temperatura (reducción del 50%) (Tabla 10). Esta reducción en los valores de  $J_{max}$  definió una reducción severa en la tasa de carboxilación de la enzima, dependiente de la regeneración del sustrato ( $Aq$ ), la cual se hizo más evidente a concentraciones elevadas de  $CO_2$ . Por su parte, en el genotipo Nagcarlang, un aumento en la temperatura provocó un pequeño incremento en los valores de  $J_{max}$ , lo cual favoreció la capacidad de carboxilación de la enzima dependiente de la regeneración del sustrato (Figura 22).

Teniendo en cuenta las variaciones diferenciadas en los valores de  $V_{cmax}$  y  $J_{max}$ , en los genotipos estudiados, se puede decir que en genotipo Amalia la pequeña reducción (16%) en la velocidad máxima de carboxilación de la enzima Rubisco no se debió a afectaciones directas en la enzima, sino a la severa reducción en la eficiencia de transporte de electrones, lo cual define la cantidad de ATP indispensable para la activación de la enzima Rubisco. Estudios previos señalan que, de todas las funciones de la célula, la actividad fotosintética de los cloroplastos resulta ser la más sensible al calor, considerándose el sitio primario de daño los componentes del aparato fotosintético localizado en las membranas de los tilacoides (Havaux, 1993; Stefanov *et al.*, 1996; Giardi *et al.*, 1997 y Heckathorn *et al.*, 1997) donde se realizan las reacciones fotoquímicas. Igualmente, se señala que la temperatura afecta la tasa de regeneración de la RuBP, limitada por el transporte de electrones, en mayor medida que la capacidad de la enzima (Farquhar y von Caemmerer, 1982; Sharkey, 1985)



**Figura 23.** Curvas representativas de la tasa de carboxilación de la enzima Rubisco ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), limitada por la regeneración de la RuBP a distintas presiones de  $\text{CO}_2$  intercelular de hojas de dos genotipos de tomate, Amalia (A) y Nagcarlang (B), expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25 y 35°C). ( $Q = 1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y flujo de gases de  $400 \mu\text{mol s}^{-1}$ ).

Por el contrario, en el genotipo Nagcarlang, el incremento en la velocidad máxima de carboxilación, parece ser el evento que define la pequeña estimulación en la eficiencia de transporte de electrones, para garantizar la presencia de intermediarios como el ATP y  $\text{NADP H}^+$  necesarios para la carboxilación y la regeneración del sustrato.

De forma general, se puede plantear que la reducida tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  detectada en Amalia, se debió a la extrema vulnerabilidad del transporte de electrones. Sin embargo, en el genotipo Nagcarlang, parece ser la actividad de la enzima lo que define el incremento en la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  en condiciones de alta temperatura.

#### 4.3.2 Variables de la fluorescencia de clorofila a en las plantas

En la Tabla 11 se muestra el efecto de las distintas condiciones de tratamiento térmico aplicado al nivel foliar en las variables de fluorescencia ( $F_o$ ,  $F_m$ ,  $F_v$ ,  $F_v/F_m$ ), en ambos genotipos.

**Tabla 11.** Fluorescencia de clorofila *a* de hojas de dos genotipos de tomate expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25 y 35°C). Los valores representan la media de los tratamientos  $\pm$  el error estándar. Letras distintas muestran diferencias significativas entre los tratamientos. (no significativo (ns) \*\* $p < 0,01$ ).

Genotipo	Tratamientos	<i>F<sub>o</sub></i>	<i>F<sub>m</sub></i>	<i>F<sub>v</sub></i>	<i>F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub></i>
Amalia	25°C	130,20 $\pm$ 3,2	661,00 $\pm$ 2,2 a	530,00 $\pm$ 2,4 a	0,80 $\pm$ 0,0
	35°C	113,00 $\pm$ 2,0	546,40 $\pm$ 4,4 b	432,00 $\pm$ 3,8 b	0,79 $\pm$ 0,0
significación		ns	**	**	ns
Nagcarlang	25°C	126,80 $\pm$ 2,6	667,00 $\pm$ 2,00	540,00 $\pm$ 2,3	0,81 $\pm$ 0,0
	35°C	114,10 $\pm$ 3,9	642,70 $\pm$ 7,5	528,00 $\pm$ 5,9	0,81 $\pm$ 0,0
significación		ns	ns	ns	ns

Los valores de *F<sub>o</sub>*, indicador de los eventos relacionados con la captación y migración de energía al nivel de antena y del FS<sub>II</sub>, no fueron modificados por el incremento de la temperatura foliar, en ambos genotipos. Por el contrario, los valores de *F<sub>m</sub>*, indicador del estado reducido de los aceptores de electrones del FS<sub>II</sub>, disminuyeron por el incremento de la temperatura, en el genotipo Amalia, siendo esta variable la que definió una reducción en los valores de *F<sub>v</sub>*, variable que refleja el estado oxidativo de los aceptores primarios de electrones (Tabla 11). Es de notar, que las modificaciones detectadas en los valores de *F<sub>m</sub>* no ejercieron efecto alguno en la eficiencia fotoquímica del FS<sub>II</sub> (*F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>*), indicando la ausencia del fenómeno de fotoinhibición (Tabla 11).

Por el contrario en el genotipo Nagcarlang se corrobora la estabilidad de las reacciones fotoquímicas ante el incremento de la temperatura.

El análisis de las variables “quenching” fotoquímico y no fotoquímico permite estimar modificaciones en el aparato fotosintético que no son detectadas por las variables de fluorescencia analizadas, y sin embargo brinda información útil sobre el funcionamiento del aparato fotosintético.

De forma general, se encontró que la condición de temperatura impuesta no modificó las variables *qP* y *qN*, en los genotipos estudiados (Tabla 12), lo que indica el establecimiento de mecanismos eficientes, para reducir por vía fotoquímica (*qP*) la

emisión de fluorescencia de clorofila, y una disipación de energía en forma de calor ( $qN$ ) similar a la presente en condiciones normales de crecimiento.

**Tabla 12.** “Quenching” fotoquímico ( $qP$ ), no-fotoquímico ( $qN$ ), de hojas de dos genotipos de tomate, expuestas a distintos tratamientos de temperatura (25 y 35°C). Los valores representan la media de los tratamientos  $\pm$  el error estándar. Letras distintas muestran diferencias significativas entre los tratamientos. (no significativo (ns)  $**p < 0,01$ ).

Genotipos	Tratamientos	$qP$	$qN$
<b>Amalia</b>	25°C	0,18 $\pm$ 0,0	0,81 $\pm$ 0,0
	35°C	0,19 $\pm$ 0,0	0,81 $\pm$ 0,0
significación		ns	ns
<b>Nagcarlang</b>	25°C	0,17 $\pm$ 0,0	0,82 $\pm$ 0,0
	35°C	0,17 $\pm$ 0,0	0,82 $\pm$ 0,0
significación		ns	ns

Es de notar, que aun cuando el análisis de las curvas  $A/Ci$  reflejó que, en el genotipo Amalia, el sitio vulnerable al incremento de la temperatura fue la cadena transportadora de electrones, el análisis de las distintas variables que describen los eventos fotoquímicos primarios no reflejó modificaciones que limiten la eficiencia fotoquímica del  $FS_{II}$  ( $Fv/Fm$ ). A partir de estos resultados, se puede sugerir que este hecho está relacionado con el efecto de la alta temperatura en los componentes de la cadena transportadora de electrones alejada del  $FS_{II}$ , los cuales son los responsables de la reducción en la eficiencia de transporte de electrones ( $Jmax$ ) en el sistema, y de la acumulación de las formas reducidas de los aceptores primarios de electrones ( $Q_A^-$  y  $Q_B^-$ ), lo que se tradujo en una reducción en los valores de  $Fm$ .

De forma general, se puede plantear que se corrobora la susceptibilidad del aparato fotosintético en el genotipo Amalia cuando el incremento de la temperatura se ejerce de manera rápida (choque), resultado que corrobora los obtenidos en los experimentos anteriores. Sin embargo, la manera de aplicar el estrés ejerce en mayor o menor medida su efecto en los distintos componentes del aparato fotosintético, quedando demostrado que el sitio vulnerable al incremento de la temperatura por período breve es la cadena transportadora de electrones. Al mismo tiempo se confirma la tolerancia de

las funciones fotosintéticas en el genotipo Nagcarlang y se plantea por primera vez que la tolerancia reportada por los genetistas está relacionada, al menos, con la tolerancia del proceso de fotosíntesis. De igual manera, queda demostrado para ambos genotipos que, independientemente de la forma de aplicar el estrés, los estomas se cierran ante el incremento de la temperatura.

## 5- DISCUSIÓN GENERAL

La fotosíntesis es uno de los procesos fisiológicos de mayor susceptibilidad a las altas temperaturas, ésta puede ser completamente inhibida antes que otros síntomas sean detectados en las plantas (Berry y Björkman, 1980). Los cambios en la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> reflejan alteraciones en el componente estomático y/o la capacidad mesofílica del aparato fotosintético, donde el componente estomático depende de la resistencia que imponen los estomas al intercambio gaseoso, mientras que la capacidad mesofílica depende de la actividad de la enzima Rubisco y la capacidad de transporte electrónico para generar la RuBP (von Caemmerer y Farquhar, 1981).

El incremento de la temperatura y la forma de aplicar el estrés tuvo un efecto diferenciado en la fisiología del aparato fotosintético en los genotipos estudiados. En el genotipo Campbell-28, se demostró que las funciones fotosintéticas fueron extremadamente sensibles al incremento de la temperatura. Esto se comprobó a partir de los valores de asimilación de CO<sub>2</sub> y las variables de fluorescencia de clorofila evaluadas. Sin embargo, las modificaciones detectadas en los componentes estomático y fotoquímico en este genotipo no parecen justificar los valores reducidos de *A* ante el incremento de la temperatura, lo que hace suponer que el calor provocó modificaciones en eventos claves involucrados en la fijación de CO<sub>2</sub> (Makino *et al.*, 1994; Heckathorn *et al.*, 1997; Xiong *et al.*, 1999; Law y Crafts-Brandner, 1999; Xiong *et al.*, 2000).

Por el contrario, en el genotipo Amalia se demuestra por primera vez que la fisiología del aparato fotosintético muestra una moderada tolerancia para ciertas condiciones de alta temperatura. Se comprueba que condiciones de 45°C durante 2 horas y condiciones de 35°C impuestas cuatro horas diarias durante tres días en la oscuridad no afectan la capacidad fotosintética de las plantas. Sin embargo, exposiciones a 45°C superiores a 2 horas reducen la capacidad de asimilación fotosintética de las plantas, pero tal efecto puede ser reducido cuando las plantas se exponen previamente a una temperatura moderada (35°C en la oscuridad), comprobándose un incremento en el rango de tolerancia.

Es de notar, que la tolerancia y la capacidad de aclimatación de las funciones fotosintéticas, en este genotipo, estuvieron relacionadas con la tolerancia de la velocidad máxima de carboxilación de la enzima Rubisco (*V<sub>cmax</sub>*) y la eficiencia del

transporte de electrones ( $J_{max}$ ), parámetros que definieron la tasa de carboxilación dependiente de las propiedades de la enzima ( $A_c$ ) y la dependiente de la regeneración del sustrato ( $A_q$ ), respectivamente.

En el genotipo silvestre Nagcarlang, ampliamente referido en la literatura como termotolerante (Stevens, 1979; Villareal y Lai, 1979; Bar-Tsur *et al.*, 1985; Trabelsi *et al.*, 1986 y Rich, 1986, Tomato Genetic Cooperative Report, 1994), se comprobó por primera vez que la tolerancia de las funciones fotosintéticas parece justificar su termotolerancia. Igualmente, un aspecto novedoso en esta investigación resulta el hecho de que ciertas formas de imponer el calor pueden incrementar la sensibilidad, al menos del proceso de asimilación de  $CO_2$ , en este genotipo. Se comprobó que exposiciones prolongadas a temperaturas moderadas en la oscuridad (Moderada) y posteriormente una temperatura de  $45^\circ C$  (Choque) reducen significativamente la tasa de asimilación fotosintética ( $A$ ), disminuyendo la eficiencia de carboxilación de la enzima Rubisco, limitada tanto por las propiedades cinéticas y estado de activación de la enzima como por la disponibilidad del sustrato (definido por la tasa de transporte electrónico).

Esta inhibición encontrada en la capacidad de carboxilación de la enzima Rubisco supone afectaciones directas en la misma o en las enzimas relacionadas con su activación. Uno de los posibles candidatos a ser dañados por el incremento de la temperatura es la enzima Rubisco activasa (Vining *et al.*, 1997; Feller *et al.*, 1998; Crafts-Brandner *et al.*, 1997).

La conductancia estomática ( $g_l$ ) detectada en los genotipos Amalia y Nagcarlang no justifica las reducciones en los valores de asimilación de  $CO_2$  ( $A$ ), en ninguno de los tratamientos de temperatura. En la totalidad de los tratamientos no se encontró una relación clara entre  $g_l$  y  $A$ , demostrándose que el efecto de las altas temperaturas en los valores de  $A$  no fue por afectaciones en el componente estomático, sino por daños en la capacidad mesofílica, lo cual redujo la capacidad fotosintética.

Hasta el momento se ha señalado el efecto de la  $g_l$  en los valores de  $A$  al asumir que valores reducidos de conductancia limitan la difusión del  $CO_2$  y, por tanto, la actividad carboxilasa de la enzima. Sin embargo, no se debe descartar su efecto en los valores de  $Tr$ , la que está muy relacionada con los valores de temperatura presente

en la hoja. Se comprobó que las plantas, de ambos genotipos, que redujeron en menor medida los valores de  $T_r$  con el incremento de la temperatura presentaron una temperatura foliar menor que aquellas donde los niveles de  $T_r$  se redujeron. Es conocido, que a través de la transpiración, la temperatura foliar puede ser reducida en 5°C y que del 20 al 30% de la energía absorbida en forma de calor puede ser disipada (Zhuchenko, 1988). Teniendo en cuenta el efecto de la temperatura en la estructura y funcionalidad de las enzimas, así como en la estabilidad de las membranas celulares, se puede sugerir que el incremento en la temperatura foliar, la que depende de la tasa de  $T_r$ , pudo exponer a las distintas enzimas involucradas en la fijación fotosintética de CO<sub>2</sub> y ciertas membranas termosensibles a temperaturas superiores a las tolerantes.

El efecto del calor en el aparato fotosintético fue también evidente a través del análisis de fluorescencia de clorofila, la que es originada por la clorofila **a** del FS<sub>II</sub> y refleja los procesos de captación de luz y las reacciones fotoquímicas primarias del FS<sub>II</sub> (Georgieva y Yordanov, 1993). Una información novedosa en este sentido resultó demostrar que, en el genotipo Amalia, la condición de calor que resultó estresante (45°C- 3 horas) redujo la funcionalidad del FS<sub>II</sub>, con un efecto severo en las reacciones involucradas en la captación y migración de energía en el centro de reacción del FS<sub>II</sub> (incremento de  $F_o$ ). Del mismo modo, se comprobó que la aclimatación de la maquinaria fotosintética estuvo relacionada con la aclimatación de este fotosistema (Havaux, 1993).

Por el contrario, en el genotipo Nagcarlang las afectaciones notadas en las reacciones fotoquímicas (reducción  $qP$ ) en las plantas que recibieron ambos tratamientos de calor (35 y 45°C) no se debieron a afectaciones directas en el centro de reacción del FS<sub>II</sub> (estabilidad en las variables  $F_o$ ,  $F_m$  y  $F_v/F_m$ ), sino a afectaciones en los componentes de la cadena transportadora de electrones alejados del FS<sub>II</sub>, presumiblemente por una reducción en la velocidad máxima de carboxilación de la enzima Rubisco.

El desbalance detectado en las reacciones fotoquímicas y la cadena transportadora de electrones en algunos tratamientos de calor, en los genotipos Amalia y Nagcarlang, pudo generar la producción de especies reactivas de oxígeno en los cloroplastos. De ahí, que resultó interesante conocer si la actividad antioxidante enzimática presente en

estas plantas y el estado oxidativo de las mismas estuvieron relacionados con la termotolerancia. Es bien conocido que bajo condiciones fisiológicas normales, el transporte de electrones se dirige directamente hacia la reducción secuencial de aceptores de electrones que operan, en completa concordancia, entre el FS<sub>II</sub> y FS<sub>I</sub>. Sin embargo, condiciones de altas temperaturas provocan un estado de “hipertermia” en la cadena transportadora de electrones, lo cual incrementa la transferencia de electrones al oxígeno (Doke *et al.*, 1994; Foyer, 1997; Dat *et al.*, 1998; Asada, 1999). La operación de un sistema altamente específico y complicado, que incluyen antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, mantienen los niveles adecuados de radicales de oxígeno en la célula (Keniya *et al.*, 1993).

De forma general, se encontró que las variaciones detectadas en la actividad específica SOD no justifican la termotolerancia del aparato fotosintético. Sin embargo, las modificaciones detectadas en las isoformas de la Fe-SOD parecen relacionarse con la protección de los cloroplastos bajo determinadas condiciones de temperatura, en ambos genotipos.

Por el contrario, la actividad APX se incrementó en todos los tratamientos de calor, independientemente de la tolerancia manifestada en las funciones fotosintéticas. Esta actividad se relacionó con una reducción significativa en los niveles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las plantas tratadas de ambos genotipos. Es de notar, que las plantas tratadas (45°C-3 horas Amalia, 35 y 45°C Nagcarlang) que presentaron los niveles más bajos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, manifestaron las mayores afectaciones en sus funciones fotosintéticas. Esta relación permite suponer algún efecto inhibitorio en la respuesta al estrés cuando los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son extremadamente reducidos en las células, si se tiene en cuenta que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también actúa como un mensajero secundario en la señalización inducida por algunos estreses abióticos y bióticos (Noctor y Foyer, 1998, López-Delgado *et al.*, 1998; Neill *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 1999; Noctor *et al.*, 2000). La actividad CAT no experimentó variaciones con el calor en los genotipos estudiados.

Sin embargo, sí se pudo constatar una relación entre la susceptibilidad de las reacciones fotoquímicas y el estado oxidativo de la planta. En el genotipo Amalia, las plantas que recibieron la temperatura de 45°C durante 3 horas experimentaron incrementos en los contenidos de MDA y carbonil proteína cuando sus reacciones

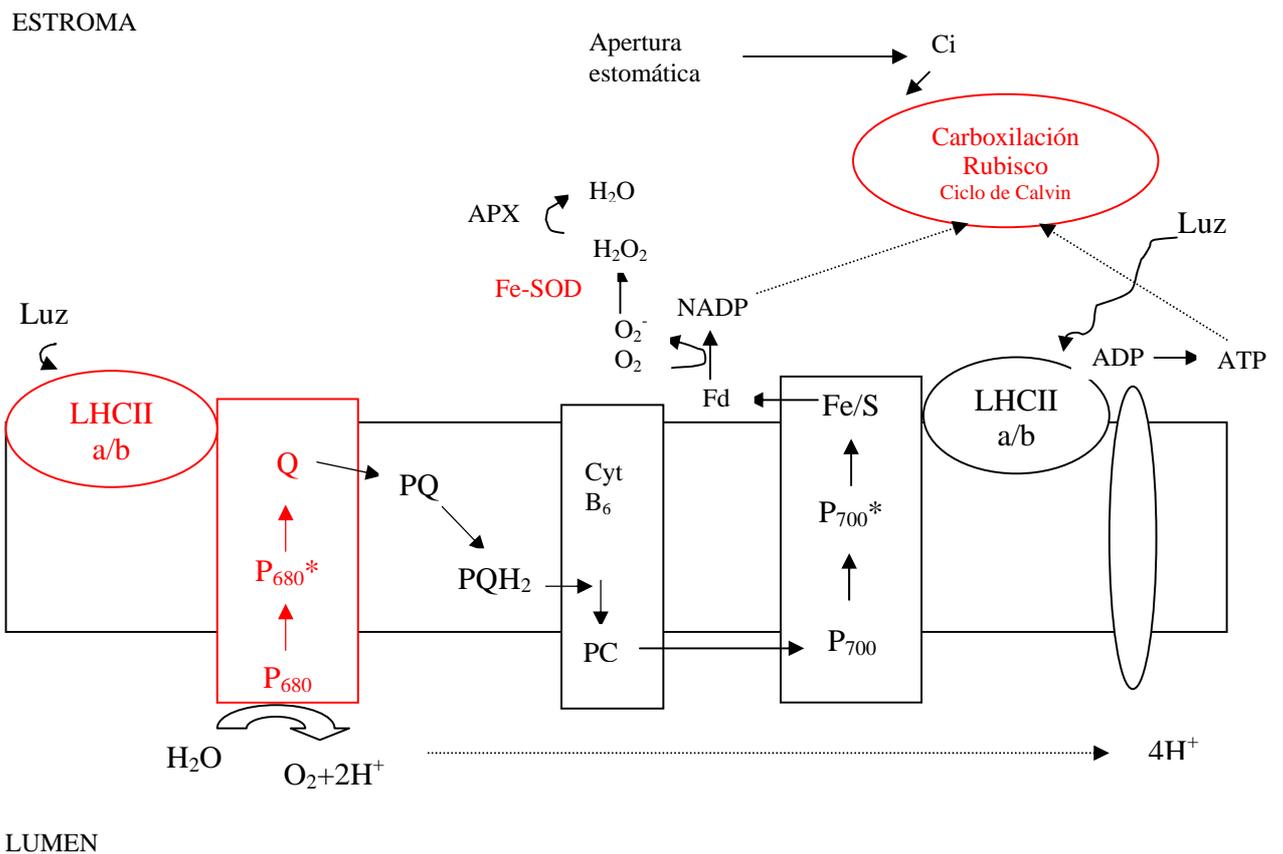
fotoquímicas habían sido significativamente afectadas. A partir de estos resultados se puede sugerir, que sumado a las modificaciones fotoquímicas del FS<sub>II</sub>, la baja actividad SOD favoreció la formación de especies reactivas de oxígeno, como el radical superóxido, en la vecindad cercana al FS<sub>I</sub>, las cuales interactúan directamente con los lípidos de membranas y proteínas provocando modificaciones oxidativas de las mismas. En el caso de las proteínas, el incremento detectado en los niveles de MDA en estas plantas, pudo favorecer la oxidación de las proteínas por la interacción del MDA con los grupos amino libres de proteínas (Romero-Puerta *et al.*, 2002).

Hasta el momento se ha discutido el efecto de diferentes condiciones de temperatura del aire en la fisiología del aparato fotosintético de la planta, donde la planta responde como un todo y se ha demostrado que la tolerancia del aparato fotosintético detectada en estas condiciones de temperatura es el resultado de varios mecanismos de respuesta. Sin embargo, la respuesta local de la hoja, sin el concurso de la planta como un todo, ayuda a comprender qué componentes del aparato fotosintético constituyen el sitio primario de vulnerabilidad al incremento de la temperatura y dónde se localiza la termotolerancia. De ahí que se considerara la influencia de dos condiciones de temperatura a la hoja, aplicada por período breve, en el intercambio gaseoso y las reacciones fotoquímicas del FS<sub>II</sub>, en los genotipos Amalia y Nagcarlang.

Los resultados obtenidos corroboran la susceptibilidad del proceso de asimilación de CO<sub>2</sub> en el genotipo Amalia cuando el incremento de la temperatura se realiza de forma rápida (Choque). Se debe señalar que, cuando la temperatura es superior a 35°C y es aplicada de forma prolongada (45°C-3horas), tanto las reacciones fotoquímicas como las oscuras co-limitan el proceso de asimilación de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, la imposición breve de una temperatura moderadamente elevada ejerce un mayor efecto en la cadena transportadora de electrones, disminuyendo la eficiencia de transporte electrónico y por tanto el proceso de asimilación de CO<sub>2</sub>. Las variables de fluorescencia de clorofila señalan que los eventos fotoquímicos primarios ( $F_v/F_m$ ) no son vulnerables al incremento de la temperatura foliar de forma breve, sino los elementos de la cadena transportadora de electrones alejada del FS<sub>II</sub>, quienes son los responsables de la reducción en la eficiencia de transporte de electrones ( $J_{max}$ ) en el sistema y la

acumulación de las formas reducidas de los aceptores primarios de electrones ( $Q_A^-$  y  $Q_B^-$ ), los que fueron detectados por una reducción en los valores de *Fm*. Igualmente, se confirma la tolerancia de las funciones fotosintéticas en el genotipo Nagcarlang y se plantea por primera vez que la tolerancia está relacionada, al menos, con la tolerancia del proceso de fotosíntesis. Por su parte, queda demostrado que independientemente de la forma de aplicar el calor, un incremento de la temperatura por encima del óptimo provoca un cierre no total de los estomas, en ambos genotipos.

Teniendo en cuenta los resultados de la experimentación, y luego de detectar los sitios involucrados en la tolerancia y aclimatación, se propone en este trabajo un modelo biológico que permite identificar a que nivel del aparato fotosintético se establece la tolerancia al calor en los genotipos de tomate estudiados (Figura 24).



**Figura 24.** Modelo biológico de termotolerancia del aparato fotosintético en el cultivo del tomate. Se describen los distintos componentes del aparato fotosintético (componente estomático y mesofílico) y el sistema de defensa antioxidante presente en los cloroplastos (*SOD* y *APX*). Los componentes involucrados en la termotolerancia son marcados en rojo.

De forma general, se encontró que la estabilidad térmica de las reacciones fotoquímicas, principalmente los eventos involucrados en la captación de luz donde el contenido de pigmentos juegan un papel importante, y la tasa de carboxilación de la enzima Rubisco, dependiente del estado de activación y la regeneración del sustrato, constituyen elementos claves en la tolerancia al calor, en los genotipos Amalia y Nagcarlang. Ambos componentes fueron diferencialmente modificados por las condiciones de estrés impuestas y la forma de aplicar el estrés, sin embargo su estabilidad térmica y aclimatación definieron la termotolerancia del aparato fotosintético. Unido al funcionamiento del aparato fotosintético la actividad de la isoenzima Fe-SOD demostró estar involucrada en la protección de los cloroplastos en condiciones de temperatura supraóptima, donde la actividad de la isoenzima Cu/Zn-SOD es inhibida.

De forma general, los resultados permiten concluir que el genotipo Amalia presenta mecanismos de respuesta a las altas temperaturas asociados al aparato fotosintético, que lo ubican como un genotipo medianamente termotolerante, con gran capacidad de aclimatación. Mientras que Nagcarlang presenta una termotolerancia bien establecida para un amplio rango de temperatura, sin embargo esta tolerancia puede ser disminuida por algunas condiciones de calor impuestas en la oscuridad de forma prolongada.

## 6- CONCLUSIONES

1. La funcionalidad del aparato fotosintético, bajo condiciones de estrés de calor, dependió de la forma de aplicación de éste y los genotipos en cuestión.
2. Las afectaciones en la asimilación de CO<sub>2</sub> bajo condiciones de estrés de calor no se relacionaron con el componente estomático sino con modificaciones en el componente mesofílico.
3. La termotolerancia del aparato fotosintético está relacionada con una estabilidad en el Fotosistema II y en la actividad de carboxilación de la enzima Ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa/oxigenasa.
4. El proceso de aclimatación por temperaturas moderadamente elevadas en la oscuridad depende de la capacidad de aclimatación del Fotosistema II.
5. No hubo una relación entre los diferentes sistemas antioxidantes enzimáticos y la termotolerancia del aparato fotosintético, aunque las modificaciones detectadas en las isoformas de la Fe-SOD indican la protección de los cloroplastos ante el estrés de calor.
6. La fluorescencia de clorofila constituye un indicador práctico sensible de la influencia de los tratamientos de calor en la funcionalidad del aparato fotosintético.
7. Se propone un modelo biológico que permite identificar a que nivel del aparato fotosintético se establece la tolerancia al calor en los genotipos de tomate estudiados.

## 7- RECOMENDACIONES

- Estudiar los aspectos relacionados con la estabilidad térmica de la enzima Rubisco, así como su activación en las condiciones de temperaturas ensayadas.
- Estudiar la funcionalidad del complejo que evoluciona oxígeno en los distintos tratamientos y su relación con la tolerancia o la susceptibilidad del proceso de asimilación de CO<sub>2</sub>.
- Evaluar el efecto de la condición de temperatura moderadamente elevada, en presencia de luz, en la aclimatación de las funciones fotosintéticas, en los genotipos estudiados.
- Utilizar la técnica de fluorescencia de clorofila *a* en los programas de mejoramiento genético, como un método fácil, rápido y no destructivo que brinda información relacionada con la termotolerancia del aparato fotosintético.
- Utilizar la información fisiológica y bioquímica relacionada con la termotolerancia en los programas de mejoramiento genético en el cultivo del tomate, para la obtención de nuevas variedades tolerante al calor.
- Utilizar los resultados de este trabajo en los programas de estudio de pre y postgrado en estudiantes de agronomía y biología.

## 8- BIBLIOGRAFÍA

- Abadía, J. **1992**. Leaf responses to Fe deficiency: A review. *J. Plant Nutr.*, 15:1699-1713.
- Abdul-Baki, A.A. **1991**. Tolerance of tomato cultivars and selected germoplasm to heat stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 116:1113-1116.
- 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.
- Aebi, H. **1984**. Catalase *in vitro*. *Method in Enzymology*, 105:121-126.
- Allen, J.F.; Bennett, J.; Steinback, K.E.; Arntzen, C.J. **1981**. Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature*, 291:25-29.
- Aloni, B.; Pashkar, T.; Karni, L. **1991**. Partitioning of [<sup>14</sup> C]-sucrose and acid invertase activity in reproductive organs of pepper plants in relation to abscission under heat stress. *Ann. Bot.*, 67:371-377.
- Alscher, R.G.; Donahue, H.L.; Cramer, C.L. **1997**. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiol. Plant*, 100: 224-233.
- Álvarez, Martha; Armas de G.; Martínez B. **1997**. Amalia y Mariela, dos variedades de tomate para consumo fresco. *Cultivos Tropicales*, 18:83.
- Anderson, J.A. **2002**. Catalase activity, hydrogen peroxide content and thermotolerance of pepper leaves. *Scientia Horticulturae*. 95: 277-284
- Anderson, J.M.; Melis, A. **1983**. Heterogeneity of photosystem II in spinach thylakoids. In: *The oxygen evolving system of photosynthesis*, (eds.), Academic Press Japan, Inc, p.273-280.
- Andrews, T.J.; Hudson G.S.; Mate C.J.; von Caemmerer S.; Evans, J.; Avridsson, Y.B.C. **1995**. Rubisco, consequences of altering its expression and activation in transgenic plants. *J. Exp. Bot.*, 46, 1293-1300.
- Armond, P.A.; Björkman, O.; Staehelin, L.A. **1980**. Dissociation of supramolecular complexes in chloroplast membranes. A manifestation of heat damage to the photosynthetic apparatus. *Biochim Biophys Acta* 601, pp 433-442.

- Arnon, D.I. **1949**. Cooper enzyme in isolated chloroplasts. Polyphenoloxylase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol 24: 1-15
- Asada, K. **1994**. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. See Ref. 49<sup>a</sup>, 77-104.
- Asada, K. **1999**. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of Active Oxygen and Dissipation of Excess Photons. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 50:601-39.
- Asada, K.; Endo, T.; Mano, J.; Miyake C. **1998**. Molecular mechanism for relaxation of and protection from light stress. Stress Responses of photosynthetic Organisms. Elsevier Science B.V. 37-52.
- Azcón-Bieto, J.; Talón, M. **2000**. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Eds: Universitarias de Barcelona, pp 522.
- Babcock, G.T. **1987**. The photosynthetic oxygen evolving process. In: New Comprehensive Biochemistry, Photosynthesis, J. Amesz (eds.), ELSEVIER, Amsterdam, p.125-158.
- Badger, M.R.; Schreiber, U. **1993**. Effect of inorganic carbon accumulation on photosynthetic Oxygen reduction and cyclic electron flow in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. Photosynth. Res., 37:177-91.
- Bakker, J.C. **1990**. Effects of day and night humidity on yield and fruit quality of glasshouse tomatoes (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Jour. Hort. Sci., 65(3), 323-331.
- Barber, J. **1982**. Influence of surface charges on thylakoid structure and function. Ann. Rev. Plant Physiol., 33:261-295.
- Barker, D.H.; Logan, B.A.; Adams, W.W.III and Demmig-Adams, B. **1998**. Photochemistry and xanthophyll cycle-dependent energy dissipation in differently oriented cladodes of *Opuntia stricta* during the winter. Australian Journal of Plant Physiology, 25:95-104.
- Bar-Tsur, A.; Rudich, T.; Bravdo, B. **1985**. High temperature effects on CO<sub>2</sub> exchange in heat tolerant and sensitive tomatoes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. (Alejandria), 110(4):582-585.
- Basra A.S. et al. **1992**. Proline and polyamine accumulation in relation to heat tolerance in tomato. En: Kuo, C.G. (Eds). Adaptation of food crops to temperature

and water stress. Proceeding of an International Symposium. Taiwan, 13-18 August. 493-495.

- Bassi, R.; Hoyer-Hansen, G.; Barbato, R.; Giacometti, G.M.; Simpson, D.J. **1987**. Chlorophyll-proteins of the photosystem II antenna system. *J. Biol. Chem.*, 262:13333-13341.
- Bassi, R.; Pineau, B.; Dainese, P.; Marquard, J. **1993**. Carotenoid-binding proteins of photosystem II. *Eur. J. Biochem.*, 212:297-303.
- Bassi, R.; Rigoni, F.; Barbato, R. & Giacometti, G.M. **1988**. Light-harvesting chlorophyll a/b proteins (LHCII) populations in phosphorylated membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 936:29-38.
- Beck, B.L.; Tabatabai, L.B.; Mayfield, J.E. **1990**. A protein isolated from *Brucella abortus* is a Cu,Zn superoxide dismutase. *Biochemistry*, 29:372-376.
- Bennett, J. **1983**. Regulation of photosynthesis by reversible phosphorylation of the light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Biochem. J.*, 212:1-13.
- Berry, J.; Björkman, O. **1980**. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 31: 491-543
- Bilger, W.; Björkman, O. **1990**. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynthesis RESEARCH*, 25:173-185.
- Björkman, O.; Demmig, B. **1987**. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence at 77k among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170:489-504.
- Bohnert, H.J.; Sheveleva, E. **1998**. Plant stress adaptation making metabolism move. *Curr. Opin. Plant Biol.*; 1: 267-274.
- Bose, A.; Ghosh, B. **1995**. Responses of photosynthetic apparatus in rice cultivars under heat stress. *Photosynthetica*, 31, pp. 625-630.
- Bose, A.; Tiwari, B.S.; Chattopadhyay, M.K.; Gupta, S.; Ghosh, B. **1999**. Thermal stress induces differential degradation of Rubisco in heat-sensitive and heat-tolerance rice. *Physiologia Plantarum*, 105, pp.89-94.

- Bradford, M. M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- Bridges, S.M.; Salin, M.L. **1981**. Distribution of iron-containing superoxide dismutase in vascular plants. *Plant Physiol.*, 68:275-278.
- Brunce J.A. **2000**. Acclimation of photosynthesis to temperature in eight cool and warm climate herbaceous C3 species: temperature dependence of parameters of a biochemical photosynthesis model. *Photosynth Res* 63:59-67.
- Buege, J.A.; Aust, S.D. **1972**. *Methods Enzymology*, 52: 302-310.
- Bukhov, N.G.; Sabat, S.; Mohanty, P. **1990**. Analysis of chlorophyll a fluorescence changes in weak light in heat treated *Amaranthus* chloroplast. *Photosynth Res*, 23, pp 81-87.
- Burke, J.J.; Oliver, M.J. **1992**. Differential temperature sensitivity of pea superoxide dismutases. *Plant Physiol*, 100:1595-1598.
- Cao, J.; Govindjee. **1990**. Chlorophyll a fluorescence transients an indicator of active and inactive photosystem II in thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1015, pp 180-188.
- Chengkun, H.; Suzhi, G.; Jiasen, L. **1996**. Effects of drought stress on activated oxygen metabolism in tomato. *J. 25:307-311*.
- Chitnis, P.R.; Thornber, J.P **1988**. The major light-harvesting complex of photosystem II. Aspects of its molecular and cell biology. *Photosyn. Res.*, 16:41-43.
- Chua, N.; Blomberg, F. **1979**. Immunochemical studies of thylakoid membrane polypeptides from spinach and *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.*, 10:215-223.
- Chylla, R.A.; Whitmarsh, J. **1989**. Inactive photosystem II complexes in leaves. *90:765-772*.
- Crafts-Brandner S.J.; Salvucci M.E. **2000**. Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature. *Proc Natl Acad Sci*, 97(24):13430-13435.

- Crafts-Brandner, S.J.; van de Loo, F.J.; Salvucci, M.E. **1997**. The forms of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase differ in sensitivity to elevated temperature. *Plant Physiol.*, 114:439-444.
- Crapo, J.D.; McCord, J.M.; Fridovich, I. **1978**. Preparation and assay of superoxide dismutase. *Method Enzymol.*, 53:382-393.
- Cuartero J.; Fernández-Muñoz, R.F.; González-Fernández, J.J. **1995**. Estrés abióticos. En: F, Nuez (Eds). *El cultivo del tomate*. Ediciones Muni-Prensa. Madrid, Barcelona y México. 351-384.
- Cuba, MINAGRI. **1984**. Instructivo técnico para el cultivo del tomate. Folleto.
- Dat, J.F.; López-Delgado, H.; Foyer, C.H.; Scott, I.M. **1998**. Parallel changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mutant seedlings. *Plant Physiol.*, 116:1351-1357.
- De Las Rivas, J.; Telfer, A.; Barber, J. **1993**. Two couple β-carotene molecules protect P680 from photodamage in isolated photosystem II reaction centers. *Biochem. Biophys. Acta*, 1142:155-164.
- Debus, R.J. **1992**. The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochem. Biophys. Acta*, 1102:269-352.
- Debus, R.J. **1992**. The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta*, 1102:269-352.
- Debus, R.J.; Barry, B.A.; Babcock, G.T.; MacIntosh.; L. **1988**. Site-directed mutagenesis identifies a tyrosine radical involved in the photosynthesis oxygen-environment system. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, 85:427-430.
- Del Río, L. A.; Sevilla, F.; Gómez, M.; Yáñez, J.; López, J. **1978**. Superoxide dismutase: an enzyme system for the study of micronutrient interactions in plants. *Planta*, 140:221-225.
- Del Río, L.A.; Sandalio, L.M.; Altomare, D.A.; Tilinskas, B.A. **2003**. Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expresión during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 54: 923-933.
- Demmig-Adams, A.; Adams, W.W.III. **1996**. Xanthophyll cycle and light stress in nature; uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta*, 198:460-470.

- Demmig-Adams, B.; Adams, W.W.III. **1992**. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43:599-626.
- Di Paolo, M.L.; Peruffo, A.; Bassi, R. **1990**. Immunological studies on chlorophyll-a/b proteins and their distribution in thylakoid membrane domains. *Planta*, 181:275-286.
- Díaz, P.; Rodríguez, M.; Cornide, M.T.; Coto, O.; Ruiz, A.; Niubo, E.; Mitchel, E.; Maribona, R.H.; Barquie, O.; Leonard, H.; Sánchez, C. **1996**. Indicadores fisiológicos y bioquímicos para la evaluación de la osmotolerancia en caña de azúcar. En: Resúmenes X. Seminario Científico. INCA. Cultivos Tropicales. 17:125.
- Dinar, M.; Rudich, J. **1985**. Effect of heat stress on assimilation partitioning in tomato. *Ann. Bot.*, 56:239-248.
- Doke, N.; Miura, Y.; Leandro, M.S.; Kawakita, K. **1994**. Involvement of superoxide in signal transduction responses to attack by pathogens, physical and chemical shocks, and UV irradiation. In C.H. Foyer, P.M. Mullineaux, eds, *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, 177-197.
- Dunahay, T.G.; Schuster, G.; Staehelin, L.A. **1987**. Phosphorylation of spinach chlorophyll-protein complexes: CP II, but not CP29, CP 27, or CP24, is phosphorylated in vitro. *FEBS Lett.*, 215:25-30.
- Duncan, D.B. **1951**. A significance test for differences between ranked treatment in Analysis of Variance. *Virginia J. Sci.* 2:171-189
- Eckardt, N.A.; Snyder, G.W.; Portis, A. R. Jr.; Ogren, W.L. **1997**. Growth and photosynthesis under high and low irradiance of *Arabidopsis thaliana* antisense mutants with reduced ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase content. *Plant Physiol.*, 113:575-586.
- Ehleringer, J.R. y Monson, R.K. **1993**. Evolutionary and ecological aspects of photosynthetic pathway variation. *Annu. Rev. Ecol. Sist.*, 24:411-439.
- Enemy, I.M.; Kitamura, T.; Tato, Y.; Isokawa, H.; Ohta, S.; Katoh. **1994**. Is primary cause of thermal inactivation of oxygen evolution in spinach PSII

- membranes release of the 33kDa protein or of Mn ? Biochim. Biophys. Acta, 186:52-58.
- Epel, B.L.; Neuman, J. **1973**. The mechanism of the oxidation of ascorbate and Mn<sup>2+</sup> by chloroplast, the role of the radical superoxide. Biochem. Biophys. Acta, 325:520-529.
  - Farquhar, G.D. **1979**. Models describing the kinetics of ribulose biphosphate carboxilase-oxygenase. Arch. Biochem. Biophys. 193:456-468.
  - Farquhar, G.D.; von Caemmerer, S. **1982**. Modeling of photosynthetic response to environmental conditions. In OL Lange, PS Nobel, CB Osmond, H Ziegler, eds, Physiological Plant Ecology II. Water Relation and Carbon Assimilation, Vol 12B. pringer-Verlag, Berlin, 12 B:550-587.
  - Farquhar, G.D.; von Caemmerer; Berry J.A. **1980**. A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. Planta, 149:78-90.
  - Feierabend, J.; Engel, S. **1986**. Photoinactivation of catalase in vitro and in leaves. Arch Biochem. Biophys, 251:567-576.
  - Feller U.; Crafts-Brandner S.J.; Salvucci M.E. **1998**. Moderately high temperatures inhibit ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (Rubisco) activase-mediated activation of Ribulose. Plant Physiol., 116:539-546.
  - Feller U.; Crafts-Brandner, S.J.; Salvucci, M.E. **1998**. Moderately high temperatures inhibit ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (Rubisco) activase-mediated activation of Ribulose. Plant Physiol., 116:539-546.
  - Fitter, A..H.; Hay, R.K.M. **1989**. Environmental physiology of plants. Temperature Academic Press, New York, 187-224.
  - Florido, M. **1999**. Caracterización de variedades y especies silvestres de tomate atendiendo a sus características morfo-bioquímicas y tolerancia al calor. Tesis de Maestría en Biología Vegetal. Universidad de la Habana. Cuba, p:30-31.
  - Florido, M.; Iglesias, L.; Varela, M.; Ponce, M. **1996**. Respuesta al estrés de calor de un grupo de variedades de soya (*Glycine max L.*). Cultivos Tropicales, 17(1):92-96.
  - Foyer, C.H. **1997**. Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. En: J Scandalios, ed, The Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 587-621

- Foyer, C.H.; Harbinson, J. **1994**. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In CH Foyer, PM Mullineaux, eds, Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense System in Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-42.
- Fracheboud, Y. **2000**. Using Chlorophyll Fluorescence to Study Photosynthesis. Fluorescence to Study Photosynthesis. htm, 1-15.
- Frew, H. **1983**. Hydrogen peroxide determination. Anal Chim. Acta, 155:130-150.
- Gene Tools. **1998**. Análisis de genes unidimensional desarrollado por SYNGENE (Beacon House, Nuffeeler Road, Cambridge, U.K. ).
- Gent, M.P. **1990**. Carbohydrate level and growth of tomato plant. I. The effects of carbon dioxide enrichment and diurnally fluctuating temperatures. Plant Physiol., 79:694-699.
- Georgieva, K. **1999**. Some mechanisms of damage and Acclimation of the photosynthetic apparatus due to high temperature. Bulg. J. Plant Physiol., 25:89-99.
- Georgieva, K.; Tsonev, T.; Velikova, V.; Yordanov, I. **2000**. Photosynthetic activity during high temperature treatment of pea plants. J. Plant Physiol., 157:169-176.
- Georgieva, K.; Yordanov, I. **1993**. Temperature dependence of chlorophyll fluorescence parameters of pea seedling. J. Plant Physiol., 142:151-155.
- Ghanotakis, D.F.; de Paula, J.C.; Demetriou, D.M.; Bowly, N.R.; Petersen, J.; Babcock, G.; Yocum, C.F. **1989**. Isolation and characterization of the 47-kDa and the D1-D2-cytochrome b559 complex. Biochem. Biophys. Acta, 947:45-53.
- Ghanotakis, D.F.; Yocum, C.F. **1990**. Photosystem II and the oxygen-evolving complex. Ann.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 41:255-276.
- Ghanotakis, D.F.; Topper, J.N.; Babcock, G. **1984**. Water-soluble 17-and 23-kDa polypeptides restore oxygen evolution activity by creating a high-affinity binding site for Ca<sup>2+</sup> on the oxidizing side of photosystem II. FEBS Lett. 170:169-173.
- Giardi, M.T.; Masojidek, J.; Godde, D. **1997**. Effects of abiotic stresses on the turnover of the D-1 reaction center II protein. Physiol. Plant, 101:635-642.
- Gill, P. K., A. D. Sharma, P. Singh, S. S. Bhullar, **2001**. Effect of various abiotic stresses on the growth, soluble sugars and water relation of Sorghum seedlings growth in light and darkness. Bulg. J. Plant Physiol., 27, 72–84.

- Goltsev, V.; Yordanov, I.; Tsonev, T. **1994**. Evaluation of relative contribution of initial and variable chlorophyll fluorescence measured at different temperatures. *Photosynthetica*, 30:629-643.
- Gómez, J.M.; Jiménez, A.; Olmos E.; Sevilla F. **2004**. Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. *Journal of Experimental Botany* 55: 119-130
- Gómez, O.; Casanova, A.; Laterrot, H.; Anais, G. **2000**. Mejora genética del cultivo del tomate para la producción en el Caribe. La Habana. Cuba. 159p.
- Gómez, O.; Casanova, A.; Martínez, L.; Hernández, J.C.; Georgina de Armas; Santos, R.; Hernández, A. **1997**. Memorias 25 Aniversarios . Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova, La Habana. Cuba, pp. 11-19.
- Gong M.; Vanderluit, M.R.; Knight, M.R.; Trewavas, A.J. **1998**. Heat-shock-induced changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. *Plant. Physiol.*, 116:429-437.
- González, J.; Pastenes, C.; Horton, P. **2001**. Efecto de la temperatura, el estrés hídrico y luminoso sobre la heterogeneidad del fotosistema II en cuatro variedades de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.). *Rev. Chil. de Hist. Nat.*, 74(4):779-791.
- Gounaris, K.; Chapman, D.J.; Booth, P.; Crystall, B.; Giorgi, L.B.; Klug, D.R.; Porter, G.; Barber, J. **1990**. Comparison of the D1/D2/cytochrome b559 reaction center complex of photosystem two isolated by two different methods. *FEBS Lett.*, 265:88-92.
- Gucci, R.; Xiloyannis, C.; Flore, J.A. **1991**. Gas exchange parameters water relations and carbohydrate partitioning in leaves of field-grown *Prunus domestica* following fruit removal. *Physiol. Plant.*, 83:497-505.
- Hale, M.G.; Orcutt, D. M. **1987**. The physiology of plant under stress. John Wiley and Sons, New York, 1-4.
- Halliwell, B. **1989**. Tell me about free radicals, doctor: A review. *J. R. Soc. Med.*, 82:747-752.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. **1986**. Oxygen free radicals and iron in reaction to biology and medicine: Some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 246:501-514.

- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. **1985**. Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford, England.
- Harley, P.C.; Sharkey, T.D. **1991**. An improved model of C<sub>3</sub> photosynthesis at high CO<sub>2</sub>: Reversed O<sub>2</sub> sensitivity explained by lack of glycerate re-entry into the chloroplast. *Photosynthesis Research*, 27:169-178.
- Harley, P.C.; Thomas, R.B.; Reynolds, J.F.; Strain, B.R. **1992**. Modelling photosynthesis of cotton grown in elevated CO<sub>2</sub>. *Plant, Cell and Environment*, 15:271-281.
- Harrison, M.A.; Allen, J. **1993**. Differential phosphorylation of individual LHC-II polypeptides during short-term acclimation to light regime in the green alga *Dunaliella salina*. *Biochem. Biophys. Acta*, 1141:37-44.
- Havaux M.; Tardy, F. **1996**. Temperature-dependent adjustment of the thermal stability of photosystem II in vivo: possible involvement of xanthophylls content. *Plant Cell Environ* 19: 1359-1368
- Havaux, M. **1993**. Characterization of thermal damage to the photosynthetic electron transport system in potato leaves. *Plant Sci.*, 94:19-33.
- Havaux, M. **1993a**. Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperature. *Plant Cell Environ.*, 16:461-467.
- Havaux, M. **1998**. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plant Sci*, 3:147-151.
- Havaux, M.; Tardy F.; Raynel J.; Chanu D; Parot P. **1996**. Thylakoid membrane stability to heat stress by flash spectroscopic measurements of the electrochromic shift in intact potato leaves: Influence of xanthophyll content. *Plant Cell Environ*; 19:1359-68.
- Heckathorn, S. A.; Coleman, J.S.; Hallberg, R.I. **1997**. Recovery of net CO<sub>2</sub> assimilation after heat stress is correlated with recovery of oxygen-evolving-complex proteins in *Zea Mays* L. *Photosynthetica*, 34:13-20.
- Heckathorn, S. A.M.; Downs, C. A.; Coleman, J.S. **1998**. The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protect photosystem II electron transport during heat stress. *Plant Physiol.*, 116:439-444.

- Henrysson, T.; Schröder, W.; Spangfort, M.; Akerlund, H. **1989**. Isolation and characterization of the chlorophyll a/b protein CP29 from spinach. *Biochem. Biophys. Acta*, 977:301-308.
- Hernández, J.A.; Campillo, A.; Jiménez, A.; Alarcón, J.J.; Sevilla, F. **1999**. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytologist* 141: 241-251.
- Hikosaka, K.; Murakami, A.; Hirose T. **1999**. Balancing carboxylation and regeneration of ribulose-1,5-bisphosphate in leaf photosynthesis: temperature acclimation of an evergreen tree, *Quercus myrsinaefolia*. *Plant Cell Environ*, 22: 841-849.
- Hoagland, D.R.; Arnon, D.I. **1950**. The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn (Circ. No 347)*.
- Hodgson, E.K.; Fridovich, I. **1975**. The interaction of bovine erythrocyte superoxide desmutase with hydrogen peroxide: Inactivation of the enzyme. *Biochemistry*, 14:5294-5303.
- Horton, P.; Ruban, A.V.; Walters, R.G. **1996**. Regulation of light harvesting in green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47:655-684.
- Hossain, M.A.; Asada, K. **1984**. Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: Its protection by ascorbate. *Plant Cell Physiol*, 25:1285-1295.
- Houghton, J.T.; Collander, B.A.; Ephraums, J.J. **1990**. *Climate Change - The IPCC Scientific Assessment*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 135.
- How-Yeon, L.; Wah Soon C.; Young-Nam H. **1999**. Photoinactivation of photosystem II in leaves of *Capsicum Annuum*. *Physiol Plant*, 105:377-84.
- Hsu, L.H.; Tzeng, C.M.; Pan, R.L. **1993**. Characterization of the phosphatase from spinach thylakoids. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 34:175-182.
- Iglesias, L. **1994**. Revisión sobre diversos aspectos relacionados con la tolerancia al estrés de calor en plantas. *Cultivos Tropicales*, 15:99-107.
- Ikeuchi, M.; Inoue, Y. **1988**. A new 4.8-kDa polypeptide intrinsic to the PSII reaction center, as revealed by modified SDS-Page with improved resolution of low-molecular-weight proteins. *Plant Cell Physiol.*, 29:1233-123.

- Janssen, L. H. J.; Van Hasselt, P. R. **1994**. Temperature effects on chlorophyll fluorescence induction in tomato. *J. Plant Physiol.*, 144:129-135.
- Jansson, S.; Pichersky, E.; Bassi, R.; Green, B.R.; Ikeuchi, M.; Melis, A.; Simpson, D.J.; Spangfort, M.; Staehelin, L.A.; Thornber, J.P. **1992**. A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll a/b-binding proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 10:242-253.
- Jiao, J.; Grodzinski, B. **1996**. The effect of leaf temperature and photorespiratory conditions on export of sugars during steady state photosynthesis in *Salvia splendens*. *Plant Physiol.*, 111:169-1773.
- Jiménez, A.; Lundquist, M.; Olmos E.; Gómez J.; Sevilla F. **2003**. Response to ripening of the antioxidant system in purified mitochondria, chloroplasts and chormoplasts from pepper fruits. *Free Radical Research* 37: 31-32.
- Johnson, G.N.; Young, A.J. Scholes, J.D.; Horton, P. **1993**. The dissipation of excess excitation energy in British plant species. *Plant Cell and Environment*, 16:673-679.
- Jun, H.; Imai, K.; Suzuki, Y. **1990**. Effect of day temperature on gas exchange characteristics in tomato ecotypes. *Scientia Horticulturae*, 42:321-327.
- Kalituho, L.N.; Pshybytko, N.L.; Kabashnikova, L.F.; Jahns, P. **2003**. Photosynthetic apparatus and high temperature. Role of light. *Bulg, J. Plant Physiol. Especial Issue*, 281-289.
- Kautsky, H.; Appel, W.; Amann, H. **1960**. Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation. *Biochem Z*, 332, 277-292.
- Kenematsu, S.; Asada, K. **1979**. Ferric and manganic superoxide dismutase in *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.*195:535-545.
- Kenematsu, S.; Asada, K. **1989**. Cu-Zn-superoside dismutase in rice: Ocurrance of an active, monomeric enzyme and two types of isoenzyme in leaf and non-photosynthetic tissues. *Plant Cell Physiol.*, 30:381-391.
- Keniya, M. V.; Lucas, A. I.; Gus'kov, E. N. **1993** The Role of Low-Molecular-Weight Antioxidant in Oxidative Stress. *Usp. Savrem. Biol.*, 113:456-470.
- Kingston-Smith, A.H.; Foyer, C.H. **2000**. Bundle sheath proteins are more sensitive to oxidative damage than those of the mesophyll in maize leaves

- exposed to paraquat or low temperatures. *Journal of Experimental Botany*, 51:123-130.
- Krause, G.H. **1994**. The role of oxygen in photoinhibition of photosynthesis. See Ref. 49a:43-76.
  - Kruse, E.; Liu, Z.; Kloppstech, K. **1993**. Expression of heat shock proteins during development of barley. *Plant Mol. Biol.*, 23, 111–122.
  - Kühlbrandt, W.; Wang, D.N. **1991**. Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography. *Nature*, 350:130-134.
  - Kurganova, L. N.; Vesselov A. P.; Goncharova T. A. y Sinitsyna Y. V. **1997**. Lipid peroxidation and antioxidant system of protection against heat shock in pea (*Pisum sativum* L.) chloroplast. *Russ. J. Plant Physiol.*, 44:630-635.
  - Kwiatowski. J.; Kaniuga, Z. **1984**. Evidence for iron-containing superoxide dismutase in leaves of *Lycopersicon esculentum* and *Phaseolus vulgaris*. *Acta Physiologiae Plantarum* 6(4): 197-202.
  - Labate, C.A.; Leegood, R.C. **1988**. Limitation of photosynthesis by change in temperature. Factors affecting the response of carbon-dioxide assimilation to temperature in barley leaves. *Planta*, 173:519-527.
  - Lafuente, M.T.; Belver, A.; Guye, M.G.; Salveit, M.E. **1991**. Effect of temperature conditioning on chilling injury of cucumber cotyledons – possible role of abscisic acid and heat-shock proteins. *Plant Physiol* 95: 443-449
  - Law, R.D.; Crafts-Brandner S.J. **1999**. Inhibition and Acclimation of Photosynthesis to Heat Stress Is Closely Correlated with Activation of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase /Oxygenase. *Plant Physiol.*, 120:173-181.
  - Law, R.D.; Crafts-Brandner, S.J. **1999**. Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiol.*, 120:173-181.
  - Leithold, B.; Muller, G.; Weber, W.E.; Westermann, T. **1997**. Investigations on heat tolerance of spring wheat varieties of different origin under growth chamber conditions. *J. Agron. Crop Sci.*, 179:115-122.
  - Leonardos, E. D.; Tsujita, M. J.; Grodzinski, B. **1996**. The effect of source or sink temperature on photosynthesis and <sup>14</sup>C partitioning in and export from a source leaf of *Alstroemeria*. *Physiol. Plant*, 97:563-575.

- Levine, R.L.; Willians, J.A.; Stadtman, E.R.; Shacter, E. **1994**. Carbonyll assays for determination of oxidatively modified proteins. *Method in Enzymology*, 233:346-363.
- Levitt J. **1980**. Responses of plants to environmental stress: Vol. I. Chilling, freezing, and high temperature I. Stress and strain therminology. Academic. Press. New York, p. 3-9.
- Li, Q.; Canvin, D.T. **1997**. Inorganic carbon accumulation stimulates linear electrón flow to artificial electrón acceptor of photosystem I in air-grown cells of the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. *Plant Physiol.*, 114:1273-81.
- Lichtenthaler, H.K. **1987**. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzymol.*, 148:350-382.
- Lichtenthaler, H.K.; Rinderk, U. **1988**. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *Critical Review in Analytical chemistry*, supplement 1, 19:529-585.
- Licthenthaler, H.K.; Banani, F.; Langsdorf, G.; Bushcmann, C. **2000**. Measurement of differences in red chlorophyll fluorescence and photosyntetic activity between sun and shade leaves by fluorescence imaging. *Photosynthetica*, 38(4):521-9.
- Licthenthaler, H.K.; Burkart, S. **1999**. Photosynthesis and high light stress. *Bulg J. Plant Physiol*, 25(3-4):3-16.
- Loggini, B.; Scartazza, Andrea; Brugnoli, E.; Navari-Izzo, Flavia. **1999**. Antioxidant Defense System, Pigment Composition and Photosynthetic Efficient in Two Wheat Cultivars Subjected to Drought. *Plant Physiol*, 119:1091-1099.
- Long, S.P.; Bernacchi, J. **2003**. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *J. Exp. Bot.*, 54:2393-401.
- López, E.; Florido, M.; Lara, M.; Iglesias, L. **1996**. Determinación de marcadores bioquímicos asociados con la tolerancia a bajas temperaturas en arroz (*Oryza sativa* L.). En: Resúmenes. X Seminario Científico. INCA. Cultivos Tropicales, 17:130.

- Lopez-Delgado, H.; Dat J.F.; Foyer, C.H.; Scott, I.A. **1998**. Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Exp Bot* 49:713-720.
- Mahan, J. R.; McMichael, B. L. y Wanjura, D. F. **1995**. Methods for reducing the adverse effects of temperature stress on plants: A Review. *Environ. and Exp. Bot.*, 35:251-258.
- Makino, A.; Nakano, H.; Mae, T. **1994**. Effects of growth temperature on the Responses of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase, Electron Transport Components, and Sucrose Synthesis Enzymes to Leaf Nitrogen in Rice, and their Relationships to Photosynthesis. *Plant Physiol.*, 105:1231-1238.
- Mariamma, M.; Muthukumar, B.; Valuthambi, K.; Gnanam, A. **1997**. Effects of High Temperature Stress on the Expression of Low Molecular Weight Heat Shock Proteins in Rice Leaves. *Plant Physiol*, 151:763-765.
- Martín, C. A.; Stutz, J. C.; Kimball, B. A.; Idso, S. B.; Akey, D. H. **1995**. Growth and topological changes of *Citrus limon* (L) Burn f. "Eureka" in response to high temperatures and elevated atmospheric carbon dioxide. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 120:1025-1031.
- Mateos, R.M.; León, A.M.; Sandalio, L.M.; Gómez, M.; del Río, L.A.; Paloma J.M. **2003**. Peroxisomes from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.): purification, characterization and antioxidant activity. *Journal of Plant Physiology* 160: 1507-1516.
- Mattamoros, M.A.; Baird, L.M.; Escuredo, P.R.; Dalton, D.A.; Minchin, F.R.; Iturbe-Ormaetxe, I.; Rubio, M.C.; Moran, J.F.; Gordon, A.J.; Becana, M. **1999**. Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, and structural alterations. *Plant Physiology*, 121:97-111.
- Mattew, P. R.; Elemer, E. E.; Thomas, G. O. **1990**. Photosynthesis at night temperature in tuber-bearing solanum species. *Plant Physiol*. 93:791-797, 1990.
- Maxwell, K.; Johnson, G.N. **2000**. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345):659-668.
- McCord, J.M.; Fridovich, I. **1969**. Superoxide dismutase: an enzymic function erythrocyprein (hemocuprein). *J Biol. Chem.*, 244:6049-6055.

- Mehler, A.H. **1951**. Studies on reactivities of illuminated chloroplasts I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. Arch Biochem. Biophys, 33:65-77.
- Melis, A. **1991**. Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. Biochimica et Biophysica Acta, 1058:87-106.
- Melis, A.; Homann, P.H. **1976**. Heterogeneity of the photochemical centers in system II of chloroplasts. Photochem. Photobiol., 23:343-350.
- Mir, N. A.; Salon, C.; Calvin, D. T. **1995**. Inorganic carbon-stimulation in air-grown cells of *Synechococcus* UTEX 625. Plant Physiol., 109:1295-300.
- Mittova, V.; Volokita, M.; Buy, M.; Tal, M. **2000**. Activities of SOD and the ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. Physiologia Plantarum 110: 42-51.
- Monk, L.S.; Fagerstedt, K.V.; Crawford, R.M. **1989**. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. Physiologia Plantarum, 76:456-459.
- Montané, M.H.; Dreyer, S.; Triantaphylidès, C. ; Kloppstech, K. **1997**. Early light-inducible proteins during long-term acclimatation of barley to photooxidative stress caused by light and cold: high level of accumulation by posttranscriptional regulation. Planta, 202:293-302.
- Morishige, D.T.; Anandan, S.; Jaing, J.T.; Thornber, J.P. **1990**. Amino-terminal sequence of the 21 kDa apoprotein of a minor light-harvesting pigment-protein complex of the Photosystem II antenna (LHCII/CP24). FEBS Lett., 264:239-242.
- Nagy, I.Z.S.; Floyd, R.A. **1984**. Hydroxyl free radical reactions with amino acids and proteins studied by electron spin resonance spectroscopy and spin-trapping. Biochem. Biophys. Acta, 790:238-250.
- Namba, O.; Satoh, K. **1987**. Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:109-112.
- Neill, S.; Desikan, R.; Clarke, A.; Hancock, J. **1999**. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signalling in plants cells. In M.F. Smallwood, C.M. Calvert, D.J. Bowles, eds, Plant Responses to environmental stress. Bios Scientific Publishers, Oxford, 59-64.

- Nishiyama, Y.; Kovács, E.; Lee, C.B.; Hayashi, H.; Watanabe, T.; Murata, N. **1993**. Photosynthetic adaptation to high temperature associated with thylakoid membranes of *Synechococcus* PCC 7002. *Plant Physiol*, 120: 301-308.
- Noctor, G.; Foyer, C.H. **1998**. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 49:249-279.
- Noctor, G.; Veljovic-Jovanovic, S.; Foyer, C.H. **2000**. Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. *Phil Trans R Soc Lond B*, 355:1465-1475.
- Nover, L.; Scharf, K-D. **1997**. Heat stress protein and transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci.*, 53, 80–103.
- Nuez, F.; Diez, M.J.; Pico, B.; Fernández de Córdova, P. **1996**. Catálogo de semillas de tomate. Banco de germoplasma de la Universidad Politécnica de Valencia. Instituto Nacional de Investigaciones y Tecnología Agraria y Alimentaría. Madrid, p117.
- Öquist, G.; Malmber, G. **1989**. Light and temperature dependent inhibition of photosynthesis in frost-hardened and un-hardened seedlings of Pine. *Photosynth Res*, 20:261-77.
- Osmond C.B. **1994**. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of sun and shade plants. In: Barker N.R. Bowyer J.R. eds. *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field*. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1-24.
- Otto, B., I. Ohad, K. Kloppstech, **1992**. Temperature treatments of dark-grown pea seedlings cause an accelerated greening in the light at different levels of gene expression. *Plant Mol. Biol.*, 18, 887–896.
- Owens, T.S. **1994**. Excitations energy transfer between chlorophylls and carotenoids: A proposed molecular mechanism for non-photochemical quenching. In: Backer NR, Bowyer JR (eds) *Photoinhibition of photosynthesis, from Molecular Mechanisms to the Field*. BIOS Scientific Publishers. Oxford, pp 95-109. ISBN 1-872748-03-1.
- Pacifici, R.E.; Davies, K.J.A. **1990**. Protein degradation as an index of oxidative stress. *Methods in Enzymology*, 186:485-502.

- Panchuk, I.I.; Volkov, R.A.; Schöffl, F. **2002**. Heat stress-and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129:838-853.
- Parker, M.W.; Schinina, M.E.; Bossa, F.; Bannister, J.V. **1984**. Chemical aspects of the structure, function and evolution of superoxide dismutase. *Inorg. Chim. Acta*, 91:307-317.
- Pastenes, C.; Horton, P. **1996**. Effect of high temperature on photosynthesis in beans. *Plant Physiol.*, 112:1245-1251.
- Perl-Treves, R.; Galum, E. **1991**. The tomato Cu,Zn superoxido dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Molecular Biology* 17: 745-760.
- Peter, G.F.; Thornber, J.P. **1991**. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J. Biol. Chem.*, 266:16745-16754.
- Peter, G.F.; 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.
- Phillips, L.G.; Cowan, A.K.; Rose, P.D.; Logie, M.R.R. **1995**. Operation of the Xanthophyll Cycle in Non-Stressed and Stressed Cells of *Dunaliella salina* Teod. in Response to Diurnal Changes in Incident Irradiation: A Correlation with Intracellular  $\beta$ -Carotene Content. *J. Plant Physiol.*, 146:547-553.
- Polle, A. **1997**. Defense against photooxidative damage in plants. En: J.G. Scandalios (ed). *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y, 785-813.
- Prasad, T.K. **1996**. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids and protease activities. *Plant, Cell and Environment*, 25:677-686.
- Puget, K.; Michelson, A.M. **1974**. Isolation of a new copper-containing superoxide dismutase bacteriocuprein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 58:830:838.

- Rainwater, D.T.; Gossett, D.R.; Millhollon, E.P.; Hanna, H.Y.; Banks, S.W.; Lucas, M.C. **1996**. The Relationship Between Yield and the Antioxidant Defense System in Tomatoes Grown Under Heat Stress. *Free Rad. Res.*, 25:421-435.
- Raison, J.K.; Roberts, J.K.M.; Berry, J.A. **1982**. Correlation between the thermal stability of chloroplast (thylakoid) membranes and the composition and fluidity of their polar lipids upon acclimation of the higher plant, *Nerium oleander*, to growth temperature. *Biochim Biophys Acta*, 688:218-228.
- Rank, D.R. **1991**. Time-temperature response of tomato callus during high- and low-temperature inactivation. *Planta*, 185:576-582.
- Rick, C.M. **1987**. Genetic resources in *Lycopersicon*. In: *Tomato Biotechnology*, edited by Nevis, D.J. y Jones, R.A., New York: Alan, R. Liss inc., 17-26.
- Rintamaki, E.; Salo, R.; Aro, E-A. **1994**. Rapid turnover of the D1 reaction-center protein of photosystem II as a protection mechanism against photoinhibition in a moss. *Ceratodon purpureus* (Hedw), *Brid Planta*, 193:520-529.
- Ristic Z.; Williams G.; Yang G.; Martin B.; Fullerton S. **1996**. Dehydration damage to cellular membranes, and heat-shock protein in maize hybrids from different climates. *J Plant Physiol* 149:424-32.
- Romero-Puertas, M.C.; Palma, J.M.; Gómez, M.; del Río, L.A.; Sandalio, L.M. **2002**. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell and Environment*, 25:677-686.
- Ruban, A. V.; Horton, P. **1999**. The xanthophyll cycle modulates the kinetics of nonphotochemical energy dissipation in isolated light-harvesting complex of intact chloroplast, and leave of Spinach. *Plant Physiol.*, 119:531-542.
- Sage, R.F.; Sharkey, T.D.; Pearcy, R.W. **1990**. The effect of leaf nitrogen and temperature on the CO<sub>2</sub> response of photosynthesis in the C3 dicot *Chenopodium album* L. *Aust J. Plant Physiol.*, 17:135-148.
- Sagi, M.; Fluhr, R. **2001**. Superoxide production by plant homologues of the gp91<sup>phox</sup> NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 126:1281-1290.
- Salisbury, F.B. **1994**. Fisiología en condiciones de estrés. En Salisbury, F.B.; Ross, C.W. (Eds). *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamericano S.A. de C.U., 639-667.

- Saltman, P. **1989**. Oxidative stress: A radical view. *Semin. Hematol.*, 26:249-256.
- Salvucci, M.E.; Crafts-Brandner S.J. **2004**. Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of Rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. *Plant Physiology*, 134:1460-1470.
- Sayed, O. H.; Earnshaw, M.J.; Emes, M.J. **1994**. Characterization of heat-induced stimulation of Photosystem-I-mediated electron transport. *Acta Bot. Neerl.*, 43:137-143.
- Sayre, R.T.; Andersson, B.; Bogorad, L. **1986**. The topography of membrane protein: The orientation of the 32-kd Qb-binding chloroplast thylakoid membrane protein. *Cell*, 47:601-608.
- Schaffer, L.; Feierabend, J. **2000**. Photoinactivation and protection of glycolate oxidase in vitro and in leaves. *Zitschrift fur Naturforschung C-A Journal. of Biosciences* 55 (5-6): 361-372
- Schmidty, A.; González, V. **1998**. Medición de conductividad eléctrica en discos de hojas y estudio morfológico de callos de cuatro variedades de caña de azúcar (*Saccharum spp*) bajo condiciones de estrés salino. En: Resúmenes II. Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. RedBio'98, 345.
- Scholander, P.F.; Hammel, H.T.; Bradstreet, E.D.; Hemengsen, E.A. **1965**. Sap pressure in vascular plants. *Science*, 148:339-346.
- Scott, I.M.; Dat, J.F.; Lopez-Delgado, H.; Foyer, C.H. **1999**. Salicylic acid and hydrogen peroxide in abiotic stress signaling in plants. *Plant Physiol*, 39:13-17.
- Seeman, J., Kobza, J., Moore, B. **1990**. Metabolism of 2- carbono phosphate and regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity. *Photosynth Res.*, 23:119-130.
- Sevilla, F.; Lopez-Gorge, J.; Del Rio, L.A. **1982**. Characterization of a manganese superoxide dismutase from the higher plant *Pisum sativum*. *Plant Physiol.*, 70:1321-1326.
- Shabala, S.N. **1996**. Leaf Temperature Kinetics Measure Plant Adaptation to Extreme High Temperatures. *Aust. J. Plant Physiol.*, 23:445-452.
- Sharkey, T.D. **1985**. Photosynthesis in intact leaves of C<sub>3</sub> plants: physics, physiology and rate limitations. *Bot Rev*, 51:53-105.

- Shuvalov, V.A.; Heber, U.; Shreiber, U. **1989**. Low temperature photochemistry and spectral properties of a photosystem 2 reaction center complex containing the proteins D1 and D2 and two hemes of cyt b559. *FEBS Lett.*, 258:27-31.
- Siefermann-Harms, D. **1985**. Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochem. Biophys. Acta*, 811:325-355.
- Simpson, D.J.; Andersson, B. **1986**. Extrinsic polypeptides of the chloroplast oxygen evolving complex constitute the tetrameric Essparticles of higher plant thylakoids. *Carlsberg. Res. Commun.*, 51:467-474.
- Smirnoff, N. **1993**. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.*, 125:27-58.
- Smith, E. **1937**. The influence of light and carbon dioxide on photosynthesis. *General Physiology*, 20:807-830.
- Sofrová, D.; Vácha, F.; Hladík, J. **1992**. The carotenid content of photosystem II antennae isolated from the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* (Nägeli). *Photosynthetica*, 26:79-86.
- Starck, Z.; Wazynska, Z.; Kucewicz. **1993**. Comparative effects of heat stress on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tomato plants with source-sink modulated by growth regulators. *Physiologia Plantarum*, 15:125-133.
- Stefanov, D.; Yordanov, I. y Tsonev, T. **1996**. Effect of thermal stress combined with different irradiance on some photosynthetic characteristics of barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. *Photosynthetica*, 32:171-180.
- Stevens, M.A. **1979**. Breeding tomatoes for processing./M.A. Stevens. En: *Proceeding of the International Symposium on Tropical Tomato (1:1978, oct. 23-27: Shanhua)-Shanhua:AVRDC*, 201-213.
- Stevens, M.A.; Rick, C.M. **1987**. Genetic and Breeding. En: J.G. Atherton, J. y Rudich (Eds): *Tomato Crop*. Chapman and may, London.
- Tanaka, Y.; Nishiyama Y.; Murata, N. **2000**. Acclimation of the Photosynthetic Machinery to High Temperature in *Chlamydomonas reinhardtii* Requires Synthesis de Novo of Proteins Encoded by the Nuclear and Chloroplast Genomes. *Plant Physiology*, 124:441-449.

- Thiele, A.; Krause, G.H. **1994**. Xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in photosystem II: relationship between zeaxanthin formation, energy-dependent fluorescence quenching and photoinhibition. *Journal of Plant Physiology*, 114:324-332.
- Thornber, J.P.; Morishige, D.T.; Anandan, S.; Peter, G.F. **1991**. Chlorophyll-carotenoid proteins of higher plant thylakoids. In: *Chlorophylls*, H. Scheer (eds.), CRC Press., Boca Raton, USA, p. 549-585.
- Tomato Genetic Cooperative Report. **1994**. Tomato Genetic Cooperative Report stock list, 44:34-44.
- Tudela D.; Tadeo F. R. **1993**. Respuesta y adaptación de las plantas al estrés. En: J. Azcon-Bieto y M. Talon (Eds). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Interamericana. Mc. Graw-Hill, p. 537-553.
- Turner, N.C. **1988**. Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrig. Sci.*, 9, 289-308.
- Vallon, O.; Tae, G.S.; Cramer, W.A.; Simpson, D.; Hoyer-Hanse, G.; Bogorad, L. **1989**. Visualization of antibody binding to the photosynthetic membrane: The transmembrane orientation of cytochrome b559. *Biochem. Biophys. Acta*, 975:132-141.
- Van Kooten, O.; Snel, F.H. **1990**. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* , 25:147-150.
- Veljovic-Jovanovic, S.; Noctor, G.; Foyer, C.H. **2001**. Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics and ascorbate. *Plant Physiol. Biochem.* 40:501-507
- Verwijst, T.; von Fircks, H.A. **1994**. Plant response to temperature stress is characterized by an asymmetric sigmoid function. *Env. Exp. Bot.*, 34:69-74.
- Vijayan, P.; Browse J. **2002**. Photoinhibition in mutants of *Arabidopsis* deficient in thylakoid unsaturation. *Plant Physiology*, 129:876-885.
- Villareal, R.L. **1982**. Un cultivo mundial: tomate./ R.L. Villareal. San José: II CA. 184p.
- Villareal, R.L.; Lai, S.H. **1979**. Development of heat tolerant tomato varieties in The Tropics./R.L. Villareal, S.H. Lai-En: proceeding of the international

- symposium on tropical tomato (1:1978 oct. 23-27: Shanhua) Shanhua: AVEDC, 188-200.
- Vining, E.C.; Crafts-Brandner, S.J. ; Day, T.A. **1997**. Photosynthetic acclimation of Antarctic hair grass (*Deschampsia antarctica*) to contrasting temperature regimes. Bull Ecol Soc Am, 78, pp 327.
  - Von Caemmerer, S.; Farquhar, G.D. **1981**. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. Planta, 153:376-387.
  - Walker, M.A.; McKersie, B.D. **1993**. Role of ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance in tomato. J. Plant Physiol., 141:234-239.
  - Walters, R.G.; Horton, P. **1991**. Resolution of components of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. Photosynthesis Research, 27:121-133.
  - Weis E. **1981**. The temperature sensitivity of dark-inactivation and light-activation of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in spinach chloroplasts. FEBS Lett 129: 197-200
  - Weis, E.; Berry, J.A. **1988**. Plants and high temperature stress In SP Long, FI Woodward eds, Symposia of the Society for Experimental Biology Number XLII. The Company of Biologist, Cambridge, UK, pp329-346.
  - Weisinger, R.A.; Fridovitch, I. **1973**. Superoxide dismutase: organelle specificity. J. Biol.Chem, 248, pp. 3582-3592.
  - Wheeler, T.R. **1997**. Dry matter partitioning in ground exposed to high temperature stress. Crop. Sci., 37:1507-1513.
  - Willekens, H.; Inzé, D.; Van Montagu, M y Van Camp, W. **1995**. Catalase in plants. Molecular Breeding, 1:207-228.
  - Wolf, S.; Marani, A.; Rudich, J. **1991**. Effect to temperature on carbohydrate metabolism in potato plants. J. Exp. Bot., 42:619-625.
  - Wong, S.F.; Halliwell, B.; Richmond, R.; Skowroneck, W.R. **1981**. The role of superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and by ascorbic acid. J. Inorg. Biochem, 14:127-134.

- Wullschleger, S.D. **1993**. Biochemical limitations to carbon assimilation in C<sub>3</sub> plants- A retrospective analysis of the A/Ci curves from 109 species. *Journal of Experimental Botany*, 44(262):907-920.
- Xiong, F.S.; Mueller, E.C.; Day, T.A. **2000**. Photosynthetic and respiratory acclimation and growth response of Antarctic vascular plants to contrasting temperature regimes. *American Journal of Botany*, 7(5):700-710.
- Xiong, F.S.; Ruhland, C.T.; Day, T.A. **1999**. Photosynthetic temperature response of the Antarctic vascular plants *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica*. *Physiologia Plantarum* 106:276-286.
- Yamasaki, T.; Yamakawa, T.; Yamane Y.; Koike, H.; Kazuhiko, S.; Katoh, S. **2002**. Temperature acclimation of Photosynthesis and related changes in photosystem II electron transport in winter wheat. *Plant Physiol*, 128:1087-1097.
- Zhuchenko, A.A. **1988**. Adaptive potential of cultivated plants. *Ecological and Genetic Bases*. Kishiner. Shtüntsa.