



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

**Escuela de Ciencias**

**PROFESOR PATROCINANTE**

**Dra. Miren Alberdi Lag**

**Instituto de Botánica**

**Facultad de Ciencias**

**EFEECTO DE LA SEQUÍA SOBRE LA EFICIENCIA FOTOQUÍMICA DEL PSII EN**

***N. dombeyi* (Mirb.) Oerst.**

Tesis de Grado presentada como  
parte de los requisitos para optar  
al Grado de Licenciado en  
Ciencias Biológicas.

**Erick Orlando Olivares Bravo**

VALDIVIA - CHILE

2005

## AGRADECIMIENTOS

*A mi Familia, mi mamá, mi papá y mis hermanos.*

*Quiero agradecer a todas las personas que hicieron agradable mi paso por esta hermosa Universidad.*

*A los profesores del Instituto de Botánica, Dra. Magali Rivero que me introdujo en el conocimiento de las plantas, Dra Magdalena Romero que me mostró por primera vez el mundo de la fisiología vegetal, al profesor Carlos Ramirez, quien me dio un primer barniz de conocimiento acerca de las especies nativas, y muy especialmente a la Dra. Miren Alberdi, quien me aceptó en su laboratorio y me guió en los diversos temas que componen esta tesis.*

*A la Dra Susan Hess, quien amablemente patrocinó y corrigió este trabajo*

*A Rubén, Pamela, Victor, Griselda, Nancy, Alejandra, Rafa, Viviana, Isabel, Mónica, Maricel, Carlos y Yessy.*

*A los muchachos del diario supervivir, callito, huguito, osito, cochi, pilpila, pedrito, marco, bellatriz.y gatoza, la bicicleta y a todos los coigiües que participaron de esta historia.*

*Este trabajo fue financiado por los proyectos de investigación: Fondecyt 1050640 y DID-UACH S-200402*

## INDICE

<b>1</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Déficit hídrico en plantas</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Efectos del déficit hídrico sobre la funcionalidad del aparato fotosintético: Fotosíntesis, eficiencia fotoquímica y pigmentos fotosintéticos</b>	<b>4</b>
<b>2.3</b>	<b>Antecedentes generales sobre la emisión de fluorescencia de la clorofila</b>	<b>7</b>
<b>2.4</b>	<b>Ciclo de las xantofilas y rol fotoprotector (disipador de energía lumínica)</b>	<b>11</b>
<b>2.5</b>	<b>Solutos compatibles y ajuste osmótico</b>	<b>13</b>
<b>2.6</b>	<b>Características generales de la especie en estudio</b>	<b>15</b>
<b>2.7</b>	<b>Hipótesis general</b>	<b>17</b>
<b>2.7.1</b>	<b>Hipótesis específicas</b>	<b>17</b>
<b>2.7.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODO</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Material vegetal y tratamientos de estrés hídrico.</b>	<b>18</b>
<b>3.1.1.</b>	<b>Origen del material vegetal.</b>	<b>18</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Inducción y selección de los niveles de estrés hídrico</b>	<b>18</b>
<b>3.1.2.1</b>	<b>Inducción de sequía a través de una cinética de desecamiento del suelo</b>	<b>19</b>
<b>3.1.2.2</b>	<b>Inducción de sequía a través de diferentes niveles de abastecimiento hídrico del suelo</b>	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Análisis fisiológicos</b>	<b>21</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Medición de fluorescencia de la clorofila</b>	<b>21</b>
<b>3.2.1.1</b>	<b>Generalidades</b>	<b>21</b>
<b>3.2.1.2</b>	<b>Parámetros de fluorescencia entregados por el fluorímetro modulado</b>	<b>21</b>
<b>3.2.1.3</b>	<b>Protocolos utilizados en la determinación de fluorescencia</b>	<b>23</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Análisis de los parámetros hídricos</b>	<b>25</b>
<b>3.2.2.1</b>	<b>Capacidad hídrica máxima (<math>CHM_s</math>)</b>	<b>25</b>
<b>3.2.2.2</b>	<b>Contenido relativo de agua en el suelo (<math>CRA_s</math>)</b>	<b>26</b>
<b>3.2.2.3</b>	<b>Potencial mátrico del suelo</b>	<b>26</b>
<b>3.2.2.2</b>	<b>Contenido relativo de agua en hojas (<math>CRA_f</math>)</b>	<b>27</b>

3.2.2.3	<i>Potencial Hídrico (<math>\Psi_h</math>)</i>	27
3.2.2.4	<i>Curvas presión-volumen</i>	27
3.2.2.5	<i>Potencial osmótico (<math>\Psi_p</math>)</i>	29
3.2.3	<i>Análisis bioquímicos</i>	30
3.2.3.1	<i>Determinación de clorofilas a,b y carotenoides totales</i>	30
3.2.3.2	<i>Determinación de carbohidratos solubles totales</i>	31
3.2.3.3	<i>Extracción y cuantificación de xantofilas</i>	31
3.2.3.4	<i>Extracción y cuantificación de prolina libre</i>	32
3.3	<i>Análisis estadísticos</i>	33
4	<b>RESULTADOS</b>	34
4.1	<i>Cinética de desecamiento</i>	34
4.1.2	<i>Variaciones de los parámetros hídricos del suelo y hojas</i>	34
4.1.3	<i>Parámetros de emisión de fluorescencia del PSII y determinación de los niveles de estrés</i>	35
4.1.4	<i>Pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores</i>	36
4.1.5	<i>Curvas de presión volumen y grado de ajuste osmótico</i>	38
4.2	<i>Niveles de abastecimiento hídrico en suelo</i>	40
4.2.1	<i>Estado hídrico de las hojas a los niveles de estrés seleccionados</i>	40
4.2.2	<i>Fracciones de luz absorbida en PSII a distintas densidades de flujo fotónico (DFE).</i>	41
4.2.3	<i>Comportamiento del aparato fotosintético en el paso desde la oscuridad a luz</i>	43
4.2.4	<i>Solutos compatibles</i>	45
5	<b>DISCUSIÓN</b>	46
6	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	52

## I.

**RESUMEN**

*Nothofagus dombeyi*, especie arbórea siempreverde, posee un amplio rango ecológico, además de poseer la capacidad de ser pionera en hábitats expuestos y desfavorables, debiendo soportar varios tipos de estrés, tales como sequía y alta intensidad lumínica. Se postula que esta capacidad se relacionaría con la habilidad de mantener la funcionalidad del aparato fotosintético gracias a una alta eficiencia fotoquímica del PSII (fotosistema II) ante un estrés hídrico y lumínico, además de ser capaz de ajustar osmóticamente su jugo celular ante eventos de sequía.

En plántulas de *N. dombeyi* de 2 años de edad sometidas a períodos de sequía se estudió la respuesta fotoquímica del PSII mediante la determinación de parámetros de emisión de fluorescencia a diferentes intensidades lumínicas y los cambios en pigmentos fotosintéticos, i.e. clorofilas, carotenos y ciclo de las xantofilas. El estado hídrico de la planta se estudió en base a determinaciones del  $CRA_f$  (contenido relativo de agua foliar) y del potencial hídrico ( $\Psi_h$ ) y de solutos ( $\Psi_\pi$ ), estableciéndose además curvas presión-volumen y concentración foliar de solutos compatibles. El CRA del suelo y su respectivo potencial mátrico, también fueron determinados.

Los resultados demuestran que bajo sequía la eficiencia fotoquímica máxima ( $F_v/F_m$ ) no sufrió cambios significativos, mientras que el rendimiento cuántico efectivo ( $\phi_{PSII}$ ) y el apagamiento fotoquímico ( $qP$ ) descendieron a la vez que ascendió la disipación no fotoquímica ( $qNP$ ).

Se observó que el pool de xantófilas fue mayor en plantas controles, mientras el estado de de-epoxidación (conversión de anteraxantina en zeaxantina) creció avanzada la sequía. Clorofilas totales aumentaron en plantas sometidas a sequía, sin variar las proporción entre clorofila a y b. Se apreció un mayor ajuste osmótico (0,26MPa) al mayor nivel de estrés, el que podría estar relacionado con el incremento de carbohidratos solubles totales (CTS). No hubo cambios importantes en  $CRA_f$  ni en  $\Psi_h$  de las hojas.

El efecto del déficit hídrico sobre la distribución de las fracciones de energía absorbidas por el PSII a diferentes DFF, indican leves cambios con respecto a los controles a DFF altos, mostrando un aumento de D (disipación térmica) en plantas en recuperación, lo que sugiere que plantas que han pasado por una período de sequía mejoran su resistencia a la fotoinhibición por altos DFF. Se concluye que *N. Dombeyi*, es capaz de tolerar eventos de sequía sin cambiar drásticamente la funcionalidad de su aparato fotosintético durante los primeros estados de su desarrollo, manteniendo la turgencia celular, mediante ajuste osmótico, lo que explicaría su rol de pionera.

## 1.1

**ABSTRACT**

The evergreen *Nothofagus dombeyi*, from the South Chilean forest, has a wide ecological range, being pioneer in exposed and harsh habitats. In these habitats this species should withstand various stresses, such as drought and high light intensities (high photon fluxes densities, DFF), specially during the summer. It is postulated, that this capacity may be related with the ability of this species to maintain the functionality of their photosynthetic apparatus throughout a high photochemical efficiency of the PSII (photosystem II) under water and light stress. Additionally, this species may have the capacity to show osmotic adjustment under drought events.

In 2 years old seedlings of *N. dombeyi* subjected to water stress, the photochemical efficiency of the PSII was studied by means of chlorophyll fluorescence and the determination of photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids of xanthophyll cycle). The water status of the plant was established in leaves by determinations of the relative water contents ( $CRA_f$ ), water potential ( $\Psi_h$ ) and osmotic potential ( $\Psi_\pi$ ), pressure-volume curves and compatible solutes. The relative water content of soil ( $CRA_s$ ) and its matrix potential ( $\Psi_s$ ) was also determined.

The results showed that the maximal photochemical efficiency ( $F_v/F_m$ ) did not change during drought, while the effective quantum yield ( $\phi_{PSII}$ ) and the photochemical quenching ( $qP$ ) decreased concomitant with an increase of the nonphotochemical quenching ( $qNP$ ).

Control plants have the greater xanthophyll cycle pool size. The conversion of violaxanthin to zeaxanthin is enhanced in response to drought. Chlorophyll content increased, while the chlorophyll *a/b* ratio did not show any change. The greatest degrees of osmotic adjustment (0.26 MPa) were found in the driest plants, which is may be associated with an accumulation of total soluble sugars (CST). There are not statistically significant differences in  $CRA_f$  or in  $\Psi_h$ .

The effect of drought in the partitioning of PSII absorbed light energy at different DFF shows slightly changes at high DFF, with respect to the controls. An enhanced thermal dissipation was found in recovery plants. That suggests a positive effect of a previous drought period in the capacity to withstand photoinhibition by high light intensities.

It can be concluded, that *N. dombeyi* is able to withstand drought events during the first development stages without drastically changes of its photosynthetic apparatus, with correspond well with its pioneer character. Additionally, it can maintain his turgor by osmotic adjustments.

## 2

**INTRODUCCIÓN****2.1 Déficit hídrico en plantas**

La disponibilidad de agua es considerada como uno de los factores fundamentales en la limitación de la supervivencia, crecimiento y distribución geográfica de las plantas (Sakai y Larcher, 1987; Lemcoff *et al.*, 1994; Ruiz-Lozano, 2003).

Una exhaustiva revisión sobre crecimiento de árboles y sequía demuestra que aproximadamente 70-80% de los cambios en crecimiento pueden ser explicados en base a déficit de agua (Zahner, 1968). Se ha observado que el déficit hídrico además de la disminución del crecimiento, se relaciona con otras manifestaciones fisiológicas y bioquímicas en la planta (Larcher, 2003), entre otras, alteración de la funcionalidad del aparato fotosintético y de la concentración de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores, aumento en la concentración de solutos compatibles (azúcares solubles, aminoácidos totales, prolina libre o glicina betaína), cambios en la concentración y conformación de lípidos y proteínas de membrana, disminución del contenido hídrico celular, manifestado en una disminución del contenido relativo de agua en las hojas ( $CRA_f$ ) y por ende de la turgencia celular y del descenso del potencial hídrico ( $\Psi_h$ ). El aumento de la concentración de iones y solutos provoca disminución del potencial osmótico o de solutos del jugo celular ( $\Psi_\pi$ ), y disminución de la transpiración, debido al cierre estomático producido por el déficit hídrico (Levitt, 1980; Larcher, 2003). El ajuste osmótico de las células, es un mecanismo que permite mantener el balance hídrico del vegetal.

## 2.2 *Efectos del déficit hídrico sobre la funcionalidad del aparato fotosintético: Fotosíntesis, eficiencia fotoquímica y pigmentos fotosintéticos*

Existen muchos reportes que dan cuenta del descenso de la fotosíntesis ante el déficit hídrico, debido a que el cierre estomático produce limitaciones en la incorporación de CO<sub>2</sub> (revisión Schultze, 1986; Yordanov *et al.*, 2003). Ya que la fotosíntesis consta de dos fases principales, la fase fotoquímica (captación de energía lumínica y transporte de electrones con generación del poder reductor del anhídrido carbónico), y el ciclo de Calvin, en que se reduce este compuesto, cualquier factor que altere el normal funcionamiento de alguna de estas fases es causal de descenso de la eficiencia fotosintética (Demmig-Adams y Adams, 1992).

Cuando la luz que es absorbida por los cloroplastos excede la utilización de ella en el proceso de reducción del CO<sub>2</sub>, se produce una inhibición de la fotosíntesis denominada fotoinhibición (Demmig *et al.*, 1987; Sommersalo y Krause, 1989; Long *et al.*, 1994). El exceso de absorción de energía lumínica puede también resultar en daño foto-oxidativo tanto del aparato fotosintético, como de otros componentes celulares (Krause, 1988; Demmig-Adams y Adams, 1992; Demmig-Adams y Adams, 1996). Estos investigadores señalan que la cantidad de energía lumínica necesaria para producir fotoinhibición desciende ante la presencia de algún otro tipo de estrés.

El fotosistema II (PSII), uno de los constituyentes del aparato fotosintético, es muy sensible a diferentes tipos de estrés, y también al estrés hídrico (Cornic *et al.*, 1992), habiéndose demostrado *in vivo* que este tipo de estrés daña el complejo responsable del desprendimiento de oxígeno de este fotosistema (Havaux, 1998; He *et al.*, 1995). Se ha reportado, que la inhibición del desprendimiento de oxígeno, y de la asimilación neta de CO<sub>2</sub> inducida por déficit hídrico puede recuperarse por altas concentraciones externas de CO<sub>2</sub>, lo que sugiere que los procesos bioquímicos no son responsables de la inhibición de la asimilación de CO<sub>2</sub>, y que los estomas tendrían un papel decisivo en presencia



de estrés hídrico, los que al disminuir su apertura para impedir la transpiración, acarrea una disminución del intercambio gaseoso entre el interior de la hoja y la atmósfera, impidiendo la renovación del CO<sub>2</sub> fijado durante la fotosíntesis (inhibición estomática) (Cornic, 2000).

Se han presentado evidencias que ante períodos simultáneos de alta luminosidad y estrés hídrico, la eficiencia fotoquímica del PSII en *Nerium oleander* se reduce a medida que el déficit hídrico decrece y que tarda entre 1 y 2 semanas en recuperarse, una vez que estos factores han desaparecido (Björkman y Powles, 1984). Este tipo de fotoinhibición ante el efecto combinado de sequía y alta luminosidad, refleja, según estos autores un alto grado de disipación energética vía no radiativa (como calor) probablemente mediado por zeaxantina (carotenoide), pigmento fotoprotector del ciclo de las xantofilas. El aumento de la disipación no radiativa en muchas plantas se asocia linealmente con el decrecimiento de la eficiencia fotoquímica del PSII, medida sobre la base del cociente fluorescencia variable, fluorescencia máxima, Fv/Fm (Demmig *et al.*, 1988). Más antecedentes sobre los parámetros de fluorescencia se entregan en 3.2.1.2, p21.

Por otra parte, el decrecimiento al mediodía de la eficiencia fotoquímica efectiva del PSII ( $\phi$  PSII) en condiciones de exposición a la luz de *Lavandula stoechas*, creciendo bajo condiciones de terreno en un ambiente mediterráneo, es completamente reversible al cabo de algunos minutos de adaptación a la sombra. Esto indica que la fotoinhibición, en este caso, se debería a procesos fotoprotectores y no a daño fotoinhibitorio. Además, en este mismo trabajo se demostró que el ciclo de las xantofilas era inducido por luz, independientemente del estado hídrico de la planta (Munné-Bosh y Alegre, 2000), ya que en esta especie la de-epoxidación de violaxantina es producida por alta intensidad lumínica y no por estrés hídrico (ver 2.4). Se encontró además, que durante el período seco de verano los contenidos de violaxantina decrecían desde prealba a mediodía concomitante con un incremento de zeaxantina + anteraxantina, manteniéndose constante la

concentración de otros pigmentos, como clorofilas,  $\beta$ -caroteno, luteína y neoxantina, los que descienden sólo después de mediodía. Es interesante señalar que este autor remarca la importancia de una alta intensidad lumínica en el funcionamiento del ciclo de las xantofilas y del déficit hídrico en el descenso de los otros pigmentos, tales como clorofila. Se debe tener presente que existen otros procesos disipadores de energía, además del ciclo de las xantofilas, que protegen el aparato fotosintético, como fotorespiración y el sistema “removedor” de especies reactivas de oxígeno que pueden contribuir a evitar el daño fotoinhibitorio en plantas estresadas hídricamente (Foyer *et al.*, 1994; Asada, 1999). Mayores antecedentes sobre el ciclo de las xantofilas se entregan en 2.4, p 11.

La pérdida de clorofila es una consecuencia negativa del estrés hídrico, que ha sido reportada para muchas plantas, aún cuando se le considere como una adaptación de las plantas sometidas a condiciones climáticas extremas, usualmente expuestas a exceso de excitación energética (Maslova y Popova, 1993; Kyparissis *et al.*, 1995). La pérdida de clorofila reduce la cantidad de luz interceptada por la hoja y al mismo tiempo disminuye la posibilidad de daños oxidativos (especies tóxicas reactivas de oxígeno) en la maquinaria fotosintética, debidos al oxígeno activado bajo luz intensa, por lo que su disminución podría ser favorable en estos casos. La eficiencia fotoquímica del PSII de hojas puede ser determinada *in vivo* por medio de la emisión de la fluorescencia de la clorofila *a*.

### 2.3 *Antecedentes generales sobre la emisión de fluorescencia de la clorofila*

Con el objeto de clarificar la interpretación de los resultados y la posterior discusión, y debido a que la técnica de emisión de fluorescencia ha sido muy poco aplicada en el estudio de la funcionalidad del aparato fotosintético en especies arbóreas nativas del bosque chileno, y a que en esta técnica están involucrados complejos procesos a nivel de las membranas tilacoidales de los cloroplastos, se hace necesario analizar los fundamentos de ella.

La energía lumínica absorbida por las moléculas de clorofila en la hoja, básicamente puede seguir tres caminos distintos: ser usada para llevar a cabo la fotosíntesis (fotoquímica), ser disipada como calor o puede ser reemitida como luz, fenómeno conocido como fluorescencia. Estos procesos son competitivos entre sí, de modo que cualquier aumento en la eficiencia de uno de ellos dará como resultado la disminución en el rendimiento de los otros dos. Por lo tanto, midiendo la producción de fluorescencia de la clorofila, se puede obtener información acerca de los cambios en la eficiencia fotoquímica y la disipación de calor (Maxwell y Johnson, 2000).

El análisis de la absorción de la energía lumínica por una molécula de clorofila, demuestra que este pigmento altera temporalmente su configuración electrónica (estado excitado) cuando absorbe un fotón. Este estado es inestable y de corta duración ( $<10^{-8}$  segundos), pues muchos procesos compiten para disipar la energía. Por lo tanto, *in vivo*, la clorofila presenta cambios en el rendimiento fluorescente durante la exposición a la luz (Kautsky y Hirsch, 1931). Estos cambios se deben a que la clorofila forma parte de complejos proteína-pigmento los cuales están embebidos en la membrana tilacoidal, y transmiten la excitación energética hacia los centros de reacción de los fotosistemas II (P680) y fotosistema I (P700) donde se produce la conversión energética por separación de cargas.

A temperatura ambiente la fluorescencia variable (Fv) se origina casi exclusivamente del PSII, por lo que los cambios en fluorescencia reflejan primariamente el estado del PSII (Krause y Weis, 1991). Esto no ocurre a temperaturas de  $-196^{\circ}\text{C}$  ( $77^{\circ}\text{K}$ ) donde se observa fluorescencia tanto del PSII ( $\lambda_{\text{max}} = 690 \text{ nm}$ ) como del PSI ( $\lambda_{\text{max}} = 730 \text{ nm}$ ) (Govindjee, 2002). Además, las variaciones en la distribución de la energía entre los dos fotosistemas también influyen en el rendimiento fluorescente. Como el PSI esencialmente no fluoresce, cualquier incremento en la transferencia de energía del PSII al PSI podría ser considerado como equivalente a la disipación no radiante (Björkman y Demmig, 1987). Esto permite utilizar la emisión de fluorescencia desde el PSII de hojas intactas como un método no destructivo para monitorear la fase primaria de la fotosíntesis y juzgar el estado fisiológico de las plantas (Krause y Weis, 1991). Mediante la emisión de fluorescencia se puede también llegar a establecer la distribución de la fracción de luz absorbida por el PSII que es disipada térmicamente, utilizada en el transporte de electrones o que es perdida en la oscuridad (Demmig-Adams *et al.*, 1996). El exceso de energía lumínica absorbida que no es consumida en los procesos de transporte de electrones ni disipada, por mecanismos fotoprotectores (por ejemplo, mecanismo de disipación térmica), determina la tasa de fotoinactivación del PSII (Kato *et al.*, 2003). Estos investigadores encontraron que en plantas de *Chenopodium album* crecidas bajo intensidades lumínicas altas ( $650 \mu \text{ moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y bien abastecidas de Nitrógeno (N) presentaron una menor fotoinactivación, dada por una alta capacidad fotosintética, que aquellas crecidas a una misma intensidad de luz pero mal abastecidas en N. Estas últimas compensaron una menor capacidad fotosintética con una gran habilidad de disipación térmica.

El estudio de la fluorescencia *in vivo* de la Clorofila *a* aporta información valiosa sobre el efecto que producen los diferentes tipos de estrés en la fotosíntesis. En los últimos años las técnicas de fluorescencia han sido aplicadas a estudios sobre la eficiencia fotoquímica o rendimiento cuántico

del PSII (Demmig y Björkman, 1987; Krause, 1988; Adams *et al.*, 1990; Horton *et al.*, 1994; Strasser, 1997; Agati *et al.*, 1996; Maxwell y Johnson, 2000; Rizza *et al.*, 2001). Estas técnicas se basan en registrar la emisión de fluorescencia de la Chl *a* en plantas adaptadas a la oscuridad y posteriormente iluminadas. Esta fluorescencia depende del estado de reducción de los aceptores primarios de electrones del PSII. La emisión de fluorescencia presenta una curva característica, denominada curva o efecto de Kautsky en honor a su descubridor (Kautsky y Hirsch, 1931), cuyos parámetros son utilizados en la interpretación del rendimiento cuántico del PSII (Krause y Weis, 1984; Krause, 1988; Maxwell y Johnson, 2000; Rizza *et al.*, 2001).

De acuerdo a estos investigadores, cuando una hoja es mantenida en la oscuridad, en que todos los componentes de la cadena transportadora de electrones se encuentran completamente oxidados, y es posteriormente irradiada con luz de medida, la fluorescencia aumenta rápidamente a un nivel inicial bajo ( $F_0$ ) o fluorescencia inicial (Fig. 1), característico de la apertura de los centros del PSII y la total oxidación del aceptor primario de electrones de este fotosistema, quinona A ( $Q_A$ ). Posteriormente, mediante la aplicación de un pulso de luz saturante, como se observa en la misma figura, la fluorescencia pasa por un nivel intermedio, a medida que la luz es absorbida y la separación de cargas tiene lugar, produciéndose un rápido cierre de los centros y la reducción de  $Q_A$ , aumentando la fluorescencia hasta un nivel máximo (fluorescencia máxima,  $F_m$ ). Esto indica que  $Q_A$  se encuentra totalmente reducida. Al mantener luego una fuente de luz no saturante, los procesos fotosintéticos se activan, funcionando la cadena transportadora de electrones y la energía es usada en la reducción del  $CO_2$ . Esto produce que la emisión de fluorescencia disminuya paulatinamente hasta llegar a un nivel de equilibrio ( $F_s$ ) cercano a  $F_0$  (Kautsky y Hirsch, 1931), el que está relacionado con el inicio de la reducción del  $CO_2$  en el ciclo de Calvin (Ireland *et al.*, 1984). Posteriormente y previa aplicación de un pulso de luz saturante se obtiene un segundo

máximo de fluorescencia ( $F_m'$ ) seguido de una caída de la curva hasta llegar a un nivel de  $F_o'$ . La disminución de la fluorescencia más allá de su valor máximo hasta llegar a  $F_s$  responde a la activación de los procesos, relacionados con la transformación de la energía en el PSII y la cadena transportadora de electrones, coeficiente de “quenching” fotoquímico (qP) y el coeficiente de “quenching” no fotoquímico (qNP). Este último representa los procesos que disipan la energía como calor o como energía de transferencia.

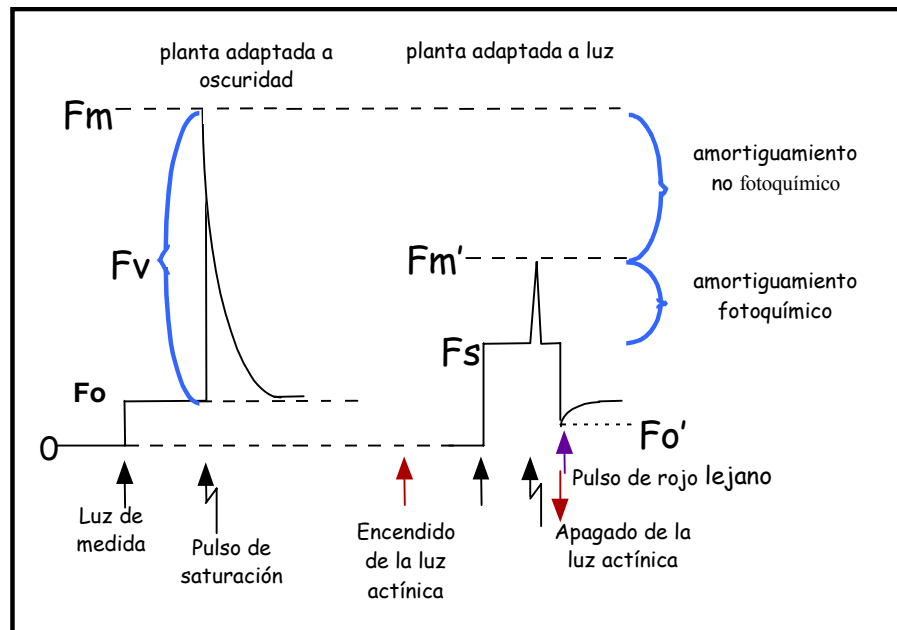


Fig. 1. Representación esquemática de los parámetros de fluorescencia medidos en hojas previamente oscurecidas y posteriormente iluminadas utilizando la técnica de fluorescencia modulada. Las flechas negras rectas indican el encendido de la luz de medida. Las flechas negras quebradas indican los pulsos de saturación. Con las flechas rojas se indica el encendido y apagado de la luz actínica. La figura fue extraída de Figueroa y Gómez, (2001).

#### 2.4 *Ciclo de las xantofilas y rol fotoprotector (disipador de energía lumínica)*

El ciclo de las xantófilas ocurre en las membranas tilacoidales (Fig.2) de todas las plantas superiores, además de helechos, musgos y diferentes grupos de algas, donde el mecanismo fotoprotector del ciclo o el estado de-epoxidado del ciclo, específicamente de la xantófila zeaxantina, facilita la disipación del exceso de energía de la clorofila *a* bajo condiciones naturales, respondiendo rápidamente a cambios en la luz absorbida durante los picos diarios de aumentos de densidad de flujo fotónico (DFF). También, el contenido de los componentes del ciclo exhiben una pronunciada aclimatación, aumentando la capacidad fotoprotectiva (Demmig-Adams y Adams, 1992). Existen muchas evidencias que apoyan la participación de los carotenoides en la mantención de una fotosíntesis adecuada ante condiciones de frío y alta intensidad lumínica, como ocurre en lugares ubicados en altura (Lutz, 1996). Especies de *Lycopersicum* provenientes de mayores altitud, sometidas a un tratamiento de enfriamiento respondieron más eficientemente con un ajuste de su pool de xantófilas, conducente a presentar niveles mayores de zeaxantina que las de menor altitud (Venema *et al.*, 1999). Hojas de varias especies tolerantes a la sombra presentan mayores cantidades de  $\alpha$ - caroteno respecto de hojas de especies de sol, lo que se asoció, por lo menos en algunas de las especies, con un incremento del pool de xantófilas (violaxantina + anteraxantina y zeaxantina), mientras que luteína y neoxanthina no variaron (Thayer y Björkman, 1990). Se ha reportado que en espinacas aclimatadas al frío disminuye la susceptibilidad a la fotoinhibición al ser sometidas a temperaturas de enfriamiento y alta intensidad lumínica (Krause, 1988; Somersalo y Krause, 1989).

Los antecedentes entregados demuestran que la sequía y alta intensidad lumínica actuando en forma independiente han sido investigadas en muchas plantas, demostrándose que la sequía predispone al descenso de la eficiencia fotoquímica del PSII. Sin embargo, a excepción del trabajo de Saavedra

(2004) en *Nothofagus nitida*, poco o nada se sabe sobre la respuesta de la eficiencia fotoquímica de especies arbóreas nativas ante un estrés hídrico y lumínico. Su conocimiento aportaría bases fisiológicas para aclarar aspectos ecofisiológicos tales como la diferente distribución ecológica de importantes especies forestales nativas de Chile. Sobre algunas de ellas, se ha estudiado la resistencia al frío, la acumulación de metabolitos crioprotectores, síntesis de proteínas específicas y la resistencia a la sequía (Alberdi *et al.*, 1985; Meza-Basso *et al.*, 1986; Weinberger *et al.*, 1973; Alberdi *et al.*, 1976).

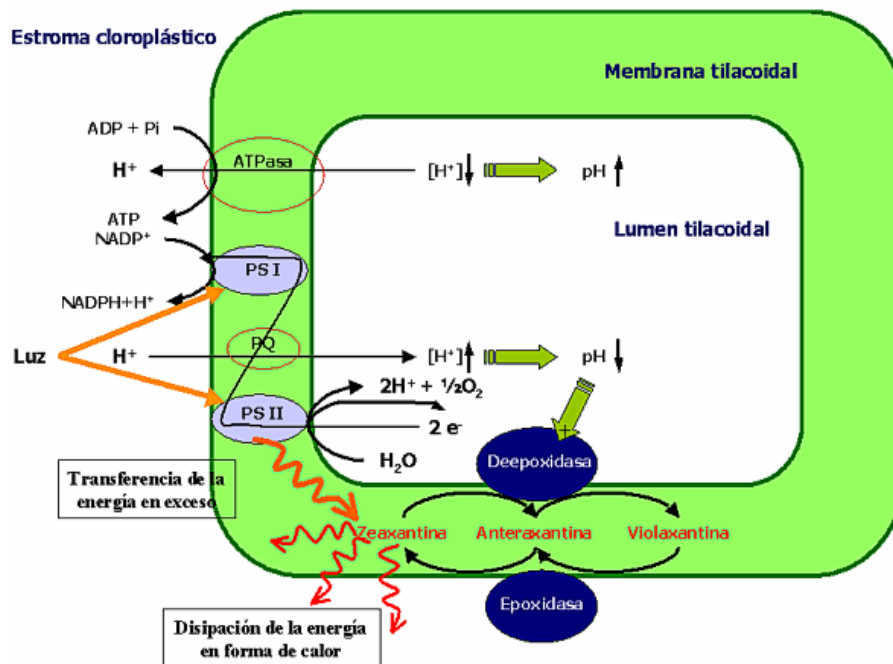


Fig. 2. Representación esquemática de las relaciones entre el transporte de electrones promovido por la luz, la acumulación de protones en el lumen cloroplástico, la síntesis de ATP y la activación de la enzima deepoxidasa de la violaxantina debido a la reducción del pH del lumen tilacoideal, acumulando zeaxantina. Tanto la salida de protones a través de la ATPasa de membrana como la disminución de la acumulación de protones por reducción de la intensidad lumínica promueven un incremento del pH intratilacoideal con la consecuente reducción en la actividad del enzima deepoxidasa, volviéndose a acumular violaxantina que no tiene capacidad disipadora. Figura extraída de Manrique, (2002).



## 2.5 *Solutos compatibles y ajuste osmótico*

Los solutos compatibles contribuirían a aminorar el daño que produce el incremento de solutos celulares, por efecto de pérdida de turgencia celular mediada por la sequía y permitirían en definitiva mantener la turgencia de la célula (Levitt, 1980; Sakai y Larcher, 1987). Los solutos compatibles corresponden a solutos orgánicos que acumulados, incluso en altas concentraciones, no inhiben las actividades enzimáticas, y protegen a las enzimas y membranas contra efectos deletéreos de la desestabilización de iones como  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Rathinasabapathi, 2000). El ajuste osmótico, es un mecanismo que poseen algunas plantas herbáceas y leñosas como respuesta al déficit hídrico. Puede ser definido como un incremento neto del contenido en solutos (carbohidratos, ácidos orgánicos, aminoácidos e iones inorgánicos como  $\text{K}^+$ ) que provoca un descenso del potencial osmótico, que es independiente de los cambios de volumen que resultan de la pérdida de agua (Taiz y Zeiger, 2002). En el ajuste osmótico el turgor o volumen celular no descienden. Este mecanismo permite a la planta continuar absorbiendo agua desde suelos más secos, puesto que su potencial hídrico se hace más negativo que el del suelo (Taiz y Zeiger, 2002; Edwards y Dixon, 1995).

En plántulas de varias especies de *Eucalyptus* se ha reportado ajuste osmótico asociado a déficit hídrico (Lemcoff *et al.*, 1994). Asimismo en la leñosa *Ziziphus mauritiana* (Lamk.) se observó ajuste osmótico junto a aumento en las concentraciones de azúcares y prolina (Clifford *et al.*, 1998) y en *Rubus spp* cultivado bajo déficit hídrico, se ha reportado una mantención del potencial de turgor en el momento de menor humedad del suelo, debido al descenso del potencial osmótico. Estos cambios se asociaron con un aumento de 218% de prolina foliar, con respecto de las plantas que se mantuvieron bajo riego constante, lo que sugiere que probablemente hubo ajuste osmótico (Parra *et al.*, 1999).

También en especies de interés agronómico como cereales se ha demostrado una acumulación de carbohidratos y aminoácidos en concomitancia con un déficit hídrico (Maldonado, 1992). La acumulación de glicina-betaína ha sido positivamente correlacionada con el incremento al estrés salino, sequía y frío en muchos cereales, sugiriéndose que puede actuar como osmoprotector (Yancey *et al.*, 1982; Grumet y Hanson, 1986), y como estabilizador de la integridad de las membranas (Zhao *et al.*, 1992). El incremento de azúcares, como por ejemplo sacarosa, ayudan a estabilizar las membranas biológicas ante el desecamiento, posiblemente por interacción con los grupos polares de la membrana, reemplazando los puentes de hidrógeno, normalmente proporcionados por el agua (Crowe *et al.*, 1993; Mullet y Whitsitt, 1996)

Maldonado (1992) en un estudio realizado en dos genotipos de *Avena sativa*, demostró que al inducir déficit hídrico con distintas concentraciones de polietilén glicol (PEG 6000) en la solución nutritiva, se produce una acumulación de prolina, además de la rápida aparición de proteínas de 37 kD y 42 kD, presumiblemente relacionadas con una respuesta al estrés hídrico.

En la presente tesis se estudia la respuesta fisiológica al déficit hídrico en la fagácea *Nothofagus dombeyi*, especie siempre verde que posee un rango ecológico amplio y que comparativamente con las otras especies de Fagáceas siempreverdes tiene un marcado carácter pionero en hábitat desfavorables (ver hipótesis y objetivos más abajo).

A continuación se entregan aspectos generales sobre la distribución geográfica y la amplitud ecológica especie en estudio y de las Fagáceas en general.

## 2.6 Características generales de la especie en estudio

Las especies del género *Nothofagus* tienen un papel muy importante en la fisonomía de los bosques templados de Chile, especialmente entre los 37-43° S, donde la vegetación nativa posee una marcada variabilidad.

Entre ellas existen representantes que poseen un amplio rango ecológico, como son la decidua *N. antarctica* (Ñirre) y la siempre verde *N. dombeyi* (Coigüe), respectivamente y un rango restringido como es el caso de la siempre verde *N. nitida* (Weinberger *et al.*, 1973; Alberdi, 1987). El Coigüe puede crecer óptimamente en las vertientes occidentales de los Andes, pero bajo condiciones de oceanidad climática puede desplazarse a hábitats esporádicamente secos y térmicamente desfavorables (cálidos y fríos). Es así, que esta especie puede crecer en los biotopos de otras Fagáceas, incluso en el límite del bosque andino de *N. pumilio* (alrededor de los 1000 m s.n.m.) y a menor altitud en los Ñadis junto a *N. antarctica*. Por otro lado, en los volcanes Llaima (38°42' S), Villarrica (39°23' S) y Osorno (41°06' S), el Coigüe es una especie pionera en los “Lahares”, sitios formados por escurrimientos o coladas de escoria volcánica, sometidos a intensa radiación durante el día y bajas temperaturas nocturnas (Weinberger, 1973; Mc Queen, 1976; Alberdi *et al.*, 1985; Alberdi, 1987; Alberdi, 1995; Veblen *et al.*, 1995). Estos lugares constituyen hábitat muy extremos y la única especie arbórea leñosa capaz de iniciar su colonización es *N. dombeyi*.

Con respecto a las demandas lumínicas, el Coigüe es una especie típicamente heliófita, intolerante a la sombra según la terminología ecológica-forestal (Donoso y Lara, 1998), El carácter heliófilo de *N. dombeyi*, la ubica entre las especies con más ventajas para ser utilizada con éxito en tratamientos de recuperación del bosque con especies tolerantes a la sombra, pues brinda el dosel superior y protector indispensable para la instalación de estas especies (Donoso y Lara, 1998). *N. dombeyi*, casi nunca crece junto a *N. nitida* probablemente por las diferencias en humedad edáfica y muchas

veces de saturación atmosférica de sus hábitats (Weinberger *et al.*, 1973). Si bien es cierto, que en su distribución mas septentrional *N. dombeyi* puede crecer bien en depresiones húmedas, en la Isla de Chiloé, en que se desarrollan grandes poblaciones de *N. nitida*, *N. dombeyi* cambia su biotopo a sitios con suelos mejor drenados, quedando los sitios más húmedos y planos habitados por *N. nitida*, especialmente en la región costera. La variabilidad genética de *N. dombeyi* es mayor que la de *N. nitida*, lo que concuerda con la hipótesis que especies de amplia distribución pueden mantener mayores niveles de variación genética que las de distribución restringida (Premoli, 1997).

*N. dombeyi* posee mayor tolerancia térmica y es capaz de tolerar mayores déficit de humedad atmosférica (mayor xerotermia de sus biotopos) que otras especies siempreverdes del bosque templado de Chile (Alberdi *et al.*, 1974; Mc. Queen, 1976). Weinberger *et al.* (1973) estableció que esta especie soportaba un déficit hídrico foliar de aproximadamente 75%, sin sufrir daños letales. Ninguna de las otras 53 especies siempre verdes que comprendía el estudio presentó el mismo nivel de soportar desecamiento. Poco o nada se conoce sobre los mecanismos fisiológicos y/o bioquímicos que puedan ser responsables de su alta capacidad de soportar el desecamiento foliar.

## 2.7 *Hipótesis general:*

En este proyecto se postula que la capacidad que posee *N. dombeyi* de ser pionera en hábitats desfavorables, se relacionaría con la habilidad de mantener la eficiencia fotoquímica del PSII ante un estrés hídrico y lumínico.

### 2.7.1 *Hipótesis específicas:*

- a) El fotosistema II (PSII) de *N. dombeyi* tolera eficientemente condiciones propicias para causar fotoinhibición como sequía y/o alta intensidad lumínica.
- b) *N. dombeyi* posee mecanismos protectores del aparato fotosintético (carotenoides del ciclo de las xantófilas) que disipan el exceso de radiación absorbida, frente a sequía y/o alta luminosidad.
- c) *N. dombeyi*, ante un evento de sequía, presenta ajuste osmótico y acumula solutos compatibles.

### 2.7.2 *Objetivos específicos:*

- a) Determinar el efecto del estrés hídrico y el incremento de luminosidad sobre la eficiencia fotoquímica del PSII, evidenciada por el estudio *in vivo* de los parámetros de fluorescencia de la clorofila *a*.
- b) Establecer la eficiencia fotosintética y su asociación con mecanismos fotoprotectores (carotenoides del ciclo de las xantófilas).
- c) Estimar la distribución de la energía absorbida por el PSII a diferentes intensidades lumínicas.

- d) Establecer si la especie presenta ajuste osmótico ante el déficit hídrico.
- e) Determinar la acumulación de solutos compatibles (carbohidratos totales y prolina).

### 3

## ***MATERIAL Y MÉTODO***

### ***3.1 Material vegetal y tratamientos de estrés hídrico.***

#### ***3.1.1. Origen del material vegetal.***

Plántulas de *N. dombeyi* de un año de edad, cultivados en viveros del Instituto de Silvicultura de la Universidad Austral de Chile desde semillas provenientes de Fundo San Pablo de Tregua, en Panguipulli (Provincia de Valdivia, Chile a 39°38'S, 72°09'W) fueron transplantadas a macetas de 10 cm de diámetro por 15 cm de alto en suelo de corteza de pino compostado. Antes de comenzar los tratamientos todas las macetas se regaron hasta saturar completamente el suelo.

#### ***3.1.2 Inducción y selección de los niveles de estrés hídrico***

Se desarrollaron dos experimentos independientes, en los que se utilizó dos diferentes formas de inducir sequía: por privación de riego (cinética de desecamiento), y por mantención de diferentes contenidos hídricos del suelo (niveles de abastecimiento hídrico), de modo de provocar diferentes niveles de estrés. Las plantas se mantuvieron en cultivo en cámaras de crecimiento reguladas del Instituto de Botánica de la Universidad Austral de Chile, durante los años 2003-2004, a las condiciones que se indican en cada experimento.

### ***3.1.2.1 Inducción de sequía a través de una cinética de desecamiento del suelo***

Se indujo la sequía por suspensión de riego en 24 individuos colocados en sus respectivas macetas, las que en la tarde anterior al inicio del experimento, fueron regadas a 100 % de capacidad de campo del sustrato y se transfirieron a cámaras de cultivo (Sigma Scientific) a 18°C día y 15°C noche, 70-80 % humedad relativa del aire, fotoperíodo de 14/10 h (día/noche) y a una la densidad de flujo fotónico (DFF), medido a la altura de las plantas, de aproximadamente  $150 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La luz fue proporcionada por lámparas de luz fría (Sylvania/GTE, Danvers MA, USA). Las plantas permanecieron bajo estas condiciones durante 52 días sin ser regadas. Tanto al inicio del experimento (control), como a intervalos de tiempo regular (2 veces por semana), se monitorizó, el estado hídrico del suelo y de la planta, por medio de la determinación de los contenidos relativos de agua ( $\text{CRA}_s$ , y  $\text{CRA}_f$ ) respectivamente, y el potencial mátrico del suelo ( $\Psi_m$ ). También se determinó la funcionalidad del aparato fotosintético en base a determinaciones “*in vivo*” de parámetros de fluorescencia de la clorofila *a* del PSII, tales como, la eficiencia fotosintética máxima o potencial ( $F_v/F_m$ ), la eficiencia fotosintética efectiva ( $\phi\text{PSII}$ ), el apagamiento fotoquímico ( $q_P$ ) y el no fotoquímico ( $q_{NP}$ ). El nivel de estrés se estableció en base al parámetro que mostró cambios más evidentes ante el estrés (ver Resultados). Más antecedentes sobre los parámetros de fluorescencia de la clorofila *a* del PSII en punto 2.1.

Tanto en las plantas del control (inicio del experimento), como para las de cada nivel de estrés se realizaron además de los análisis mencionados anteriormente, las curvas P-V, y determinó el contenido de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores del grupo de las xantofilas.

A este experimento nos referiremos más adelante como “cinética dedesecamiento”.

### ***3.1.2.2 Inducción de sequía a través de diferentes niveles de abastecimiento hídrico del suelo***

Se seleccionaron 40 plántulas homogéneas de 1 año de edad, cuyas macetas se colocaron sobre bandejas, y el conjunto se instaló en cámaras de ambiente controlado (80% H.R., 18°C, 80  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  y fotoperíodo de 12/12 h día/noche). Para mantener constante la humedad relativa del aire se instalaron ventiladores. Luego de 10 días de aclimatación a las condiciones mencionadas, las plantas se dividieron aleatoriamente en 4 grupos que correspondieron cada uno a un nivel de irrigación, el que fue estimado de acuerdo al  $\text{CRA}_s$  como sigue:

- A) Plantas bien abastecidas, control (7 días en 65%  $\text{CRA}_s$ ).
- B) Plantas semi abastecidas (7 días en 59%  $\text{CRA}_s$ ).
- C) Plantas mal abastecidas (7 días en 52%  $\text{CRA}_s$ ).
- D) Plantas en recuperación, 7 días en 52%  $\text{CRA}_s$  y luego otros 7 en 65 %  $\text{CRA}_s$ .

En cada nivel de estrés se determinó en hojas: el contenido relativo de agua ( $\text{CRA}_f$ ), potencial hídrico ( $\Psi_h$ ), potencial osmótico o de solutos ( $\Psi_\pi$ ), y por medio del estudio de fluorescencia de la clorofila *a* del PSII se midió la cinética de activación del aparato fotosintético a baja intensidad, y a alta intensidad lumínica, estimándose la utilización de la energía absorbida en tres niveles de intensidad lumínica ascendentes. Por otra parte, se determinaron los contenidos de prolina y carbohidratos solubles totales.

Este experimento será denominado “niveles de abastecimiento hídrico del suelo”



## **3.2 *Análisis fisiológicos***

### **3.2.1 *Medición de fluorescencia de la clorofila a***

#### **3.2.1.1 *Generalidades***

La emisión de fluorescencia por parte de la clorofila *a* del PSII fue medida utilizando un fluorímetro modulado (FMS1 Hansatech, Reino Unido). Los datos recogidos fueron traspasados a una planilla Excel mediante el software FMS versión 1.05.

Las mediciones se realizaron en hojas bien desarrolladas sin daño visible, a las cuales se les puso una pinza oscurecedora provista de una lámina deslizable. El diseño de esta pinza permite:

- 1) Oscurecer la hoja por 30 minutos antes de la medición para lograr que todos los componentes de la cadena transportadora de electrones se encuentren completamente oxidados y que los mecanismos disipadores de energía desciendan a un nivel basal.
- 2) Instalar junto al orificio de la pinza el extremo de la fibra óptica que transmite las señales luminosas desde el equipo haciendo incidir la luz sobre la hoja a un ángulo y distancia constante, además de transmitir desde la hoja hacia el equipo la luz que contiene la fluorescencia de la clorofila. Previo al envío de los pulsos de luz la lámina de la pinza debe abrirse, para permitir el libre paso de éstos.

#### **3.2.1.2 *Parámetros de fluorescencia entregados por el fluorímetro modulado.***

Una vez oscurecido el sector de hoja a medir e instalada la fibra óptica, tal como se indicó anteriormente, se envía el primer pulso de luz (luz de medida), que permaneció encendida durante toda la medición, se registró entonces la fluorescencia mínima ( $F_0$ ); a continuación se da un pulso de luz actínica saturante (aprox.  $8000 \mu\text{mols}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) que permitió registrar la fluorescencia máxima

( $F_m$ ); luego la hoja fue iluminada continuamente con luz actínica de intensidad regulable hasta alcanzar un estado de equilibrio ( $F_s$ ).

Para obtener la fluorescencia máxima durante iluminación ( $F_m'$ ), se aplicó nuevamente un pulso saturante, y finalmente, para determinar el mínimo nivel de fluorescencia durante iluminación ( $F_o'$ ) se apaga la luz actínica y se enciende una luz débil que emite en longitudes de rojo lejano.

Con estas mediciones se procede a calcular los parámetros de fluorescencia siguientes:

a) Fluorescencia variable:

$$F_v = (F_m - F_o)$$

b) Eficiencia fotoquímica máxima o potencial, indica la fracción de energía del total absorbida por los complejos antena que queda disponible luego de la disipación intrínseco a la antena:

$$F_v / F_m = (F_m - F_o) / F_m$$

c) Rendimiento cuántico efectivo del PSII (Genty *et al.*, 1989). Este parámetro mide la proporción de luz utilizada en transporte de electrones con respecto a la luz absorbida.

$$\phi_{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$$

d) Eficiencia fotoquímica efectiva o intrínseca del PSII bajo iluminación. Señala la eficiencia en la captura de excitación, por los centros abiertos del PSII:

$$F_v' / F_m' = (F_m' - F_o') / F_m'$$

e) Coeficiente de apagamiento fotoquímico o “quenching fotoquímico”. Indica la proporción de centros abiertos del PSII:

$$qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_o')$$

d) Coeficiente de apagamiento no fotoquímico o “quenching no fotoquímico. Señala la energía que es disipada como calor. Se calculó de acuerdo a Bilger y Björkman (1990):

$$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$$

### 2.1.2.1 Partición de la energía absorbida por el PSII:

Durante el experimento 2 se calculó además la partición de la energía absorbida según el modelo de Demming-Adams *et al.* (1996). En éste el total de energía absorbida por el fotosistema en un momento dado puede dividirse en cuatro partes, a saber:

a) Fracción disipada en oscuridad [L] (independiente de la fuente de luz)

$$L = 1 - F_v / F_m$$

b) Fracción disipada en luz [D]

$$D = F_v / F_m - F_v' / F_m'$$

c) Fracción utilizada en el transporte de electrones

$$P = (F_m - F_s) / F_m'$$

d) Fracción que no es disipada ni es aprovechada en el transporte de electrones y que corresponde al exceso de energía absorbida[E]

$$E = 1 - L - D - P$$

### 3.2.1.3 *Protocolos utilizados en la determinación de fluorescencia*

Para la determinación de los parámetros de fluorescencia, es necesario contar con una secuencia de instrucciones con respecto al tiempo e intensidad de las señales luminosas a que será expuesta la hoja (Protocolo). Estas instrucciones se guardan en el software FMS y al ejecutarlas desde el computador se aplican automáticamente. Debido a que para cada especie y tipo de experimento es necesario contar con un protocolo adecuado y a que esta técnica es poco conocida, para su mejor comprensión se incluyen detalles sobre la confección de los protocolos.

### Protocolo Experimento 1

Luego de registrar  $F_o$  y  $F_m$  (previo oscurecimiento de las hojas), se eligió la luz actínica mínima capaz de saturar el aparato fotosintético, la que fue de  $250 \mu\text{mol fotones s}^{-1}\text{m}^{-2}$  (datos no mostrados), y se determinó el tiempo que tarda el aparato fotosintético en llegar a un estado de equilibrio en la emisión de fluorescencia ( $F_s$ ) el que resultó ser de 3 minutos. Transcurrido este tiempo se aplicó el 2º pulso saturante de luz y el de la luz en rojo lejano.

### Protocolo experimento 2

Con el fin de estudiar el comportamiento del aparato fotosintético en el paso desde la oscuridad a una luz de intensidad similar a la de la cámara de cultivo y a intensidades lumínicas más altas, se diseñó el siguiente protocolo:

Luego del pulso saturante en la hoja adaptada a la oscuridad se encendió la luz actínica a una intensidad de  $80 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ , determinándose el tiempo en el que la fluorescencia alcanza equilibrio en 2 minutos (Fig. 3). Si bien el apagamiento de la fluorescencia es estable en este tiempo, aún permanece un desequilibrio entre el de la fracción de luz absorbida en la antena que es utilizada en el transporte de electrones ( $\phi\text{PSII}$ ) y aquella fracción que es disipada térmicamente (NPQ). Estos parámetros se midieron con pulsos saturantes cada minuto a partir del segundo y hasta el noveno minuto de exposición a luz donde se alcanzó el equilibrio. Una vez logrado esto se procedió a aplicar intensidades de luz ascendentes,  $360 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ , durante 16 minutos para alcanzar  $F_s$  luego otro pulso saturante exponiendo finalmente la hoja  $800 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  por otros 16 minutos con el correspondiente pulso saturante para medir  $F_o$  y  $F_m$ .

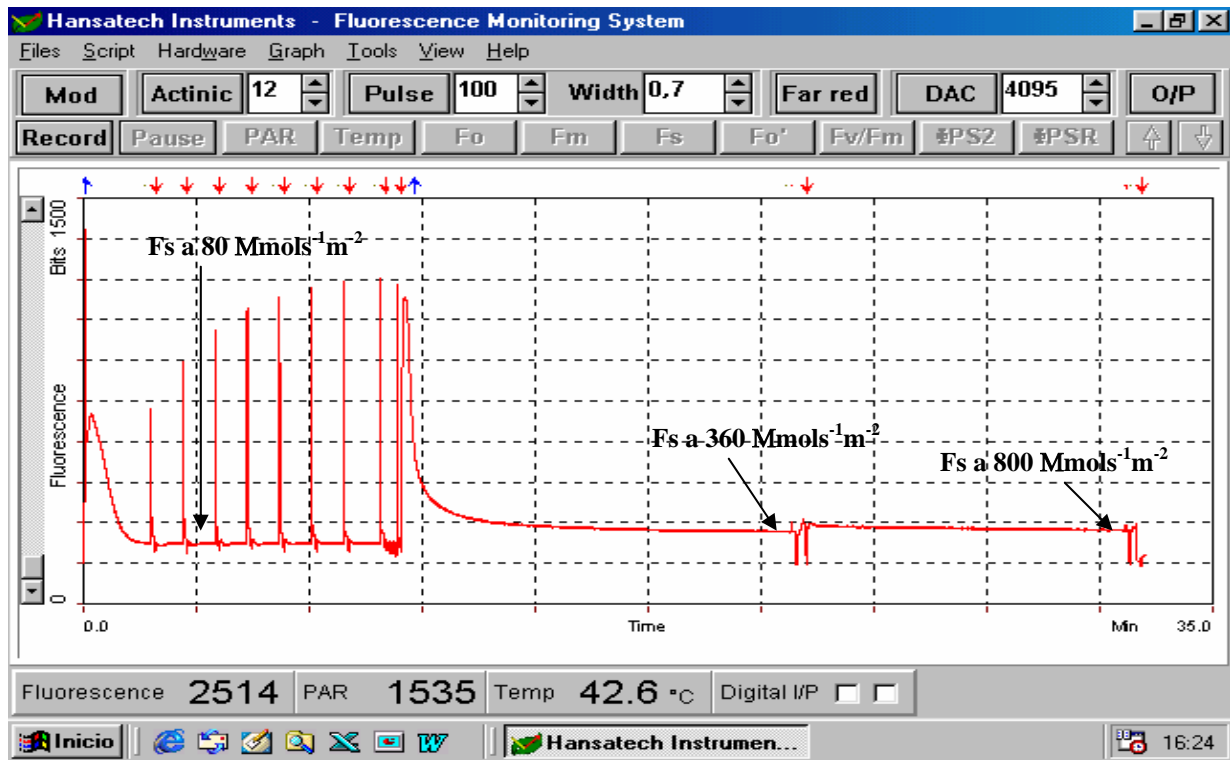


Fig 3. Emisión de fluorescencia través del tiempo observado en la grafica proporcionado por el software FMS1 Hansatech. La curva es típica para las hojas de *N. dombeyi* utilizadas en el estudio, se puede observar la secuencia de señales detalladas en protocolo del experimento dos y las respuestas en la emisión de fluorescencia por parte de la hoja. Las flechas indican el nivel de estabilización en la emisión de fluorescencia para los tres niveles de DFF utilizados en el protocolo.

### 3.2.2 Análisis de los parámetros hídricos

#### 3.2.2.1 Capacidad hídrica máxima ( $CHM_s$ )

Para tener información de la cantidad máxima de agua que retiene el suelo utilizado, muestras de suelo se colocaron en envases de plástico provistos de perforaciones en su parte inferior y fueron regadas copiosamente hasta saturar completamente, dejando escurrir. Cuando el agua dejó de escurrir, las muestras se pesaron ( $P_{sat}$ ), se secaron en estufa con corriente de aire a  $80^{\circ}C$  hasta peso constante ( $P_{sec}$ ), con estos datos se calculó la capacidad hídrica máxima del sustrato, que corresponde a la cantidad de agua (en g), que satura 100g de peso seco.

$$CHM_s = (P_{sat} - P_{sec}) * 100 / P_{sec}$$

### 3.2.2.2 *Contenido relativo de agua en el suelo (CRA<sub>s</sub>)*

Experimento 1:

Se tomaron cerca de 50 g de suelo de cada maceta y se registró su peso fresco (P<sub>fre</sub>), enseguida el suelo fue secado a 80°C hasta peso constante en estufa con corriente de aire, obteniéndose el peso seco (P<sub>sec</sub>). El P<sub>sat</sub> del suelo se estimó a partir del CHM<sub>s</sub> y el peso seco de la muestra aplicando la fórmula siguiente:  $P_{sec} * CHM_s + P_{sec}/100$ . Para el cálculo del CRA<sub>s</sub> se procedió como sigue:

$$CRA_s = (P_{fre} - P_{sec}) * 100 / (P_{sec} * CHM_s / 100)$$

Esto corresponde al porcentaje del agua presente en la muestra con respecto a su contenido de saturación.

Experimento 2:

Se determinó la CHM<sub>s</sub> y el peso saturado de cada maceta. A partir de estos valores se calculó el peso de suelo seco que debiera tener cada maceta.

$$P_{sec} = P_{sat} * 100 / CHM_s$$

Con esto es posible calcular el peso que debiera tener cada maceta para estar en el porcentaje de CRA<sub>s</sub> (X% CRA<sub>s</sub>) elegido para inducir cada nivel de estrés.

$$\text{Peso fresco de la maceta al X\% CRA}_s = X/100 * (P_{sat} - P_{sec}) + P_{sec}$$

Estos valores fueron utilizados para mantener grupos en distintos niveles de abastecimiento hídrico.

### 3.2.2.3 *Potencial mátrico del suelo*

Paralelamente a las mediciones anteriores se midió el potencial mátrico ( $\Psi_m$ ) del suelo con un sensor de resistencia eléctrica (Watermarker, Irrrometer Co., Inc, Riverside, CA.), el cual esta rodeado por un cilindro de porcelana, que adquiere equilibrio hídrico con el suelo circundante.

### 3.2.2.2 *Contenido relativo de agua en hojas (CRA<sub>f</sub>)*

Este parámetro corresponde al contenido hídrico foliar en un momento dado, en relación a su contenido hídrico a turgor total. Representa el porcentaje de agua que le falta a la hoja para estar totalmente saturada. Para determinarlo, se procedió a limpiar bien la superficie de las hojas (aproximadamente 5) y a pesarlas (P<sub>fre</sub>). Luego se sumergieron en agua destilada durante 24 horas y luego de secar el exceso de agua, se pesaron nuevamente (P<sub>sat</sub>), entonces se secaron a 80°C hasta peso constante (P<sub>sec</sub>). El CRA<sub>f</sub> se calculó como se indica:

$$CRA_f = (P_{fre} - P_{sec}) * 100 / (P_{sat} - P_{sec})$$

### 3.2.2.3 *Potencial Hídrico (Ψ<sub>h</sub>)*

Se determinó con una cámara de presión (bomba de Scholander), siguiendo las instrucciones de Scholander *et al.*, (1964), Esta cámara opera mediante succión al vacío y produce la presión negativa necesaria para extraer agua de una rama de la planta. Se procedió de la siguiente manera: se cortó una ramilla del ápice de la planta, rodeando el sector del corte con un papel embebido en agua para evitar cavitación, luego la ramilla fue insertada en una goma y colocada en forma invertida en la tapa de una cámara de presión. Paulatinamente se ingresó presión a la cámara mediante un tanque de N<sub>2</sub>, hasta observar la emergencia de la primera gota de agua a través del tallo. La presión a la cual se logra esto corresponde al potencial hídrico xilemático de la hoja.

### 3.2.2.4 *Curvas presión-volumen:*

La técnica de las curvas P-V consiste en mediciones sucesivas de CRA<sub>f</sub> y potencial hídrico de las hojas expuestas a condiciones deshidratantes (ver procedimiento más adelante) Mediante un análisis teórico de estos datos es posible inferir una serie de parámetros hídricos foliares. En el presente

experimento sólo se utilizó para medir el potencial osmótico a turgor total. Las bases teóricas se revisan a continuación.

Se asume que el conjunto de células que forman el tejido foliar se comporta como una célula promedio, donde el potencial hídrico en la célula es igual a la suma de los potenciales osmótico y de pared

$$(1) \Psi_h = \Psi_\pi + \Psi_p$$

Ahora bien, si el conjunto de sustancias osmóticamente activas dentro de la célula permanece cualitativa y cuantitativamente constante, es posible deducir, a partir de la ley de los gases ideales, una función lineal entre el recíproco del potencial osmótico y el  $CRA_f$

$$(2) \Psi_\pi^{-1} = aCRA_f + b$$

Con  $a = -W_t / RT\phi n$  y  $b = W_a / RT\phi n$ , donde  $W_t$  = cantidad de agua en el tejido a turgor total,  $W_a$  = cantidad de agua apoplástica total en el tejido,  $R$  = constante de los gases ideales,  $T$  = temperatura (°K) y  $\phi n$  coeficiente osmótico por número de sustancias en el tejido.

Durante las mediciones sucesivas de  $\Psi_h$  y  $CRA$ , la pérdida de agua en algún momento produce plasmólisis, y en este momento la presión de pared se hace nula

$$(3) \Psi_p = 0. \text{ Y entonces reemplazando en (1) y (2)}$$

$$(4) \Psi_h^{-1} = \Psi_\pi^{-1} = aCRA_f + b.$$

En la gráfica de los datos recogidos  $\Psi_h^{-1}$  versus  $(1 - CRA_f)$ , esta parte lineal es clara, lo que permite elegir puntos que pertenezcan al trazo lineal. Por regresión lineal se busca la recta, y la extrapolación de ella, reemplazando  $CRA_f = 1$ , esto entrega de (4):

$$\Psi_\pi^{-1} = a + b = (W_a - W_t) / RT\phi n; \text{ calculando el recíproco en cada término de la ecuación,}$$

$$\Psi_\pi = RT\phi n / W_{st} = \text{Potencial osmótico a turgor total}$$



Donde  $W_{st} = (W_a - W_t)$  corresponde al agua simplástica a turgor total.

Las determinaciones comenzaron con el material vegetal completamente hidratado. Para ello el día anterior a las determinaciones se cortaron ramillas bajo agua, y se introdujo el tallo en un recipiente con agua y vermiculita, se cubrió con plástico, y se dejó durante 24 h en oscuridad. Con esto se obtuvo el potencial hídrico ( $\Psi_h$ ), determinado con una Bomba de Scholander, el peso túrgido determinado en balanza Acculab V-I mg ( $\pm 0.0005$ ) y los  $CRA_f$  a turgor total. Por determinaciones sucesivas de estos parámetros en las mismas ramillas dejadas a temperatura ambiente, por tiempo variable, se obtuvieron las curvas P-V del material investigado.

Los datos fueron analizados en el software Sigmaplot 5.0.

#### **3.2.2.5 Potencial osmótico ( $\Psi_\pi$ )**

Se determinó con un psicrómetro Wescor HR-33T dotado de un sensor L-51, mediante la técnica de punto de rocío (dew point). Se tomaron aproximadamente 5 hojas de cada planta, las que fueron hidratadas durante 24 horas en agua destilada luego de las cuales se secó el exceso de agua con papel absorbente, se les sumergió en nitrógeno líquido hasta el momento de la medición. Después de descongelar, cada muestra se introdujo en una jeringa de 5ml y fue presionada manualmente hasta lograr empapar con una gota un trozo de papel filtro, el sector humedecido se inserta en la cámara del sensor y se espera equilibrio térmico entre la muestra y el sensor (Brown y Oosterhuis, 1992)

El aire en la cámara adquiere un potencial hídrico igual al de la muestra, cabe recordar que el potencial hídrico del aire es función de su humedad relativa, es decir conociendo la humedad relativa del aire en la cámara podemos saber su potencial hídrico y a través de este el potencial osmótico del jugo celular en la muestra.

Para conocer la H.R. del aire en la cámara, ésta esta dotada de un termopar, que a través de un paso de corriente a travez de él (efecto peltier), es capaz de descender la temperatura del aire a fin de encontrar automáticamente el punto de rocío, es decir, la temperatura a la cual este aire alcanza un 100% de H.R. La intensidad de la corriente necesaria para esto es proporcional a la capacidad de retención de agua de la muestra ( $\Psi_{\pi}$ ).

De cada muestra se midieron tres gotas, se considero el potencial osmótico de la muestra al promedio de estas tres gotas.

### **3.2.3 *Análisis bioquímicos***

#### **3.2.3.1 *Determinación de clorofilas a,b y carotenoides totales***

Se utilizó el protocolo de extracción y cuantificación propuesto por Lichtenthaler y Wellbrum (1983), homogeneizando 0.1g de peso fresco de hoja en mortero frío con acetona fría al 80%. El macerado se filtró (papel filtro MFS N°1, Advantec Mfs, Inc.) y se recolectó en un matraz de 20ml. Se aforó con acetona fría al 80%.

La concentración de clorofilas y carotenoides en el matraz se realizó mediante determinación de la absorbancia en un espectrofotómetro (Metertek SP-850) a longitudes de onda 663, 646 y 470 nm, utilizando acetona al 80% como blanco.

Las concentraciones de clorofilas a,b y carotenoides en los extractos se realizo de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\text{Chl a } (\mu\text{g ml}^{-1} \text{ extracto}) = 12,21 * A_{663} - 2,81 * A_{646}$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g ml}^{-1} \text{ extracto}) = 20,13 * A_{646} - 5,03 * A_{663}$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g ml}^{-1} \text{ extracto}) = 1000 * A_{470} - 3,27 * \text{Chl a} - 104 * \text{Chl b}$$

Paralelamente se determinó la relación entre peso fresco y peso seco foliar, para finalmente expresar los resultados en concentración por unidad de peso seco.

### **3.2.3.2 *Determinación de carbohidratos solubles totales***

La metodología utilizada corresponde, excepto algunas modificaciones, a la descrita por Dubois *et al.*, (1956). La extracción se realizó en 0,25g de peso fresco de hoja homogeneizando la muestra de con 10 mL de etanol 80%. Las muestras se incubaron a 60°C durante 30 minutos, con agitación. Luego de enfriar se centrifugaron a 4000g por 30 minutos.

Se tomó 1 ml del sobrenadante al cual se le agregó 10 µl de TCA (ácido tricloroacético). La muestra se refrigeró a 4°C por 3 horas, luego se centrifugó a 5000g por 15 minutos. Se tomaron 10 µl del sobrenadante a los que se adicionó 390 µl de agua destilada, 10 µl de fenol 90% y 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, incubando posteriormente a 100°C por una hora y enfriando después.

La cuantificación se efectuó mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 485 nm en un espectrofotómetro (Metertek SP-850). Las concentraciones de carbohidratos se obtuvieron de la interpolación en una curva de calibración realizada con glucosa.

Paralelamente se determinó la relación entre peso fresco y peso seco foliar para expresar los resultados en concentración por unidad de peso seco.

### **3.2.3.3 *Extracción y cuantificación de xantófilas***

La extracción se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Law y Rilling (1985), con algunas modificaciones. Se homogeneizó 0,1 g de material foliar fresco con 4 mL de metanol 100% grado HPLC. El sobrenadante se recolectó en tubos Eppendorf de color ámbar y se centrifugó durante 3 minutos a 5000g . Se agregaron 4 mL de metanol 40% y 4 mL de éter de petróleo, se

agitó y posteriormente se dejó la muestra en frío (4°C), durante 30 minutos para lograr la separación de las fases. La fase inferior, donde se encuentran las xantófilas polares (Law & Rilling, 1985) fue almacenada en viales color ámbar a -40°C, para luego realizar la determinación del contenido de xantófilas,

La separación y determinación de las muestras de carotenoides del ciclo de las xantofilas, (zeaxantina, anteraxantina y violaxantina), fueron realizadas por cromatografía HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) de fase reversa en el Instituto de Química de la Universidad Austral de Chile, se utilizó una columna Phenomenex Luna 5  $\mu$  C<sub>18</sub> (250 x 4,60 mm, tamaño de partícula 5  $\mu$ m) provista de precolumna C<sub>18</sub> 5  $\mu$  para eliminar materia en suspensión y contaminantes de los disolventes. 50  $\mu$ L de las muestras (extractos en metanol) previamente filtradas (filtro de teflón ADVANTEC MFS 0,2  $\mu$ m), para eliminar partículas sólidas suspendidas, fueron inyectadas a un flujo de 2,5 mL min<sup>-1</sup>, controlado por una bomba peristáltica a temperatura ambiente.

La longitud de onda de detección fue elegida en 446 nm, utilizando detector UV-visible de doble haz (UNICAM UV500), de acuerdo a los espectros de absorción de las muestras y estándares, y a la comparación de las alturas, separaciones y resoluciones de los picos que permitieran una buena identificación y cuantificación de cada una de las xantofilas en las corridas cromatográficas..

#### **3.2.3.4 Extracción y cuantificación de prolina libre**

La extracción y cuantificación se realizó utilizando el método descrito por Bates *et al.*, (1973). Se utilizaron muestras de 0,2 g de material foliar fresco que se homogenizaron en 10 mL de ácido sulfosalicílico al 3%, filtrando posteriormente (papel filtro MFS N°1, Advantec Mfs, Inc). Luego se tomaron 2 mL del extracto al que se agregaron 2 mL de ácido acético glacial y 2 mL de solución reactiva que contiene ninhidrina 1,4 mM, ácido acético glacial al 60% y ácido ortofosfórico 6M, se

agitó y se incubó en baño termostático a 100°C durante 1 hora. Luego de esto, se llevó a agua con hielo para detener la reacción. El complejo coloreado se extrajo con 4 mL de tolueno.

La cuantificación se realizó tomando un cierto volumen de la fase de tolueno y midiendo su absorbancia a 546 nm, en un espectrofotómetro (Metertek SP-850). Las absorbancias se interpolaron en una curva de calibración usando prolina comercial como estándar.

### **3.3 *Análisis estadísticos***

El diseño de cada experimento fue detallado más arriba. Para cada determinación de parámetros de fluorescencia se utilizaron por lo menos 9 réplicas en los diferentes tiempos y niveles de estrés. Para las determinaciones de potencial hídrico, solutos compatibles, potencial osmótico y curvas presión volumen se utilizaron por lo menos cuatro réplicas en cada nivel de estrés. La elección de las hojas para las diferentes determinaciones fue totalmente al azar. Para averiguar las diferencias entre los tratamientos se realizaron ANOVA de una o más vías según el caso, con el programa computacional Sigma Stat 5.0 (SPSS®Inc, Chicago, IL, USA) Las diferencias significativas entre la medias se establecieron con este mismo programa computacional mediante test de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

## 4

**RESULTADOS****4.1 Cinética de desecamiento****4.1.2 Variaciones de los parámetros hídricos del suelo y hojas**

La relación entre el potencial mátrico ( $\Psi_m$ ) y el contenido relativo de agua del suelo ( $CRA_s$ ) indica que el punto de máxima inflexión de la curva aparece cercano a un 40% de  $CRA_s$  (Fig. 4) reducción de  $CRA_s$  en niveles inferiores influyen cada vez más en la capacidad de retención de agua del suelo. Durante la cinética de desecamiento el punto de inflexión de la curva  $\Psi_m/CRA_s$  se produce aproximadamente el día 35 de ausencia de riego (Fig.5). En esta misma figura se observa que el descenso del  $CRA_s$  es rápido al inicio del desecamiento (día 14), tendiendo a un equilibrio posteriormente, contrariamente a lo que ocurre con  $\Psi_m$  que desciende lento en un principio para luego bajar abruptamente cerca del día 35. Por otra parte, el  $CRA_f$  se mantuvo muy estable (aproximadamente 96%) durante casi toda la cinética de desecamiento, bajando desde aproximadamente el día 38, hasta alcanzar un valor de 82%, al final del tratamiento (día 52).

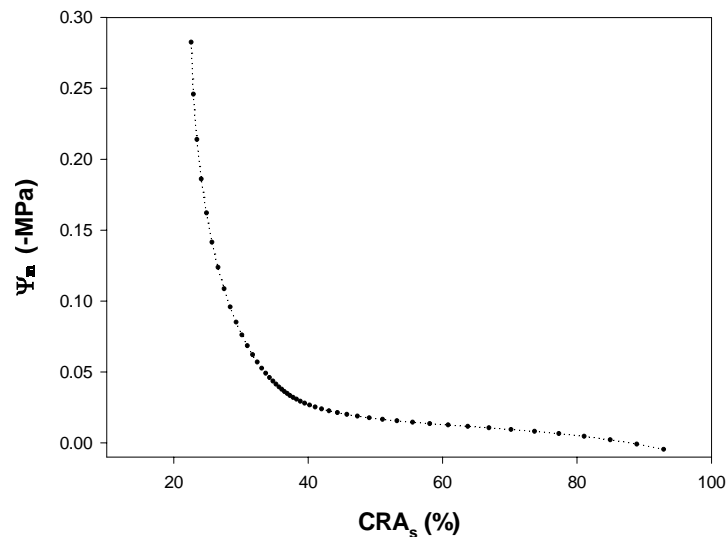


Fig. 4. Curva de regresión (polinomio de 5° orden,  $r^2=0.94$ ) entre contenido relativo de agua ( $CRA_s$ ) y potencial mátrico de suelo ( $\Psi_m$ ). Datos obtenidos simultáneamente durante la cinética de desecamiento desde el sustrato utilizado en las macetas.

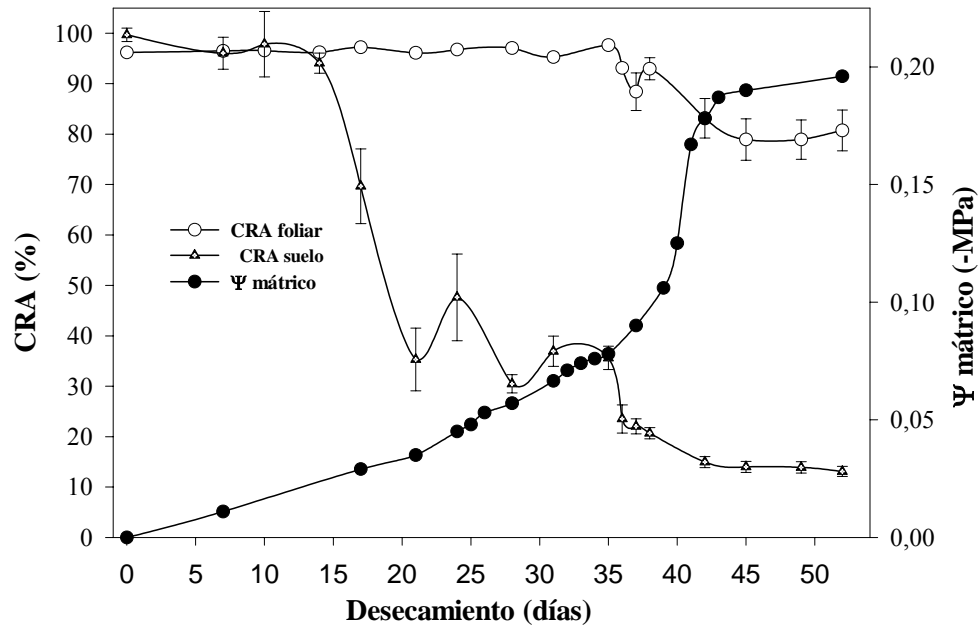


Fig. 5. Variaciones en  $CRA_s$ ,  $\Psi$  mátrico y  $CRA_f$  en *N. dombeyi* a lo largo de 52 días en ausencia de riego. Datos corresponden a:  $CRA_s$ ,  $CRA_f$ ; Promedio $\pm$ error estándar  $n=3$ . Barras no se aprecian cuando la desviación estándar es muy pequeña,  $\Psi$  mátrico  $n=2$

#### 4.1.3 Parámetros de emisión de fluorescencia del PSII y determinación de los niveles de estrés

Para elegir los niveles de estrés se determinaron parámetros de emisión de fluorescencia de la clorofila, que dan cuenta del funcionamiento en la utilización de energía por parte del PSII (Fig. 6). La eficiencia fotoquímica máxima ( $F_v/F_m$ ) fue estable durante el desecamiento (Fig. 6 A), fluctuando entre 0,86 y 0,82 es decir dentro de los límites fisiológicos normales. El rendimiento cuántico efectivo ( $\phi_{PSII}$ ) y el apagamiento fotoquímico ( $qP$ ), oscilaron suavemente desde el inicio hasta el día 35, donde ocurre una abrupta caída, luego de la cual sigue descendiendo ligeramente hasta el final del experimento (Fig. 6 B, C). El coeficiente de apagamiento no fotoquímico ( $q_{NP}$ ) presentó inicialmente valores bajos ( $\approx 0,10$ ) hasta el día 35, luego un fuerte incremento llegando alrededor de 0,50 hasta el día 45 donde desciende nuevamente (Fig. 6 D). Los niveles de estrés fueron establecidos en base al descenso de  $\phi_{PSII}$ , que fue el parámetro de fluorescencia que más se modificó con tratamiento de sequía. La primera caída abrupta del  $\phi_{PSII}$  sirvió para establecer el

estrés moderado (día 36) y el estrés severo se estableció cuando se apreciaron indicios de marchites foliar (día 52). No se observó recuperación del aparato fotosintético después de 3 semanas de irrigación (datos no mostrados).

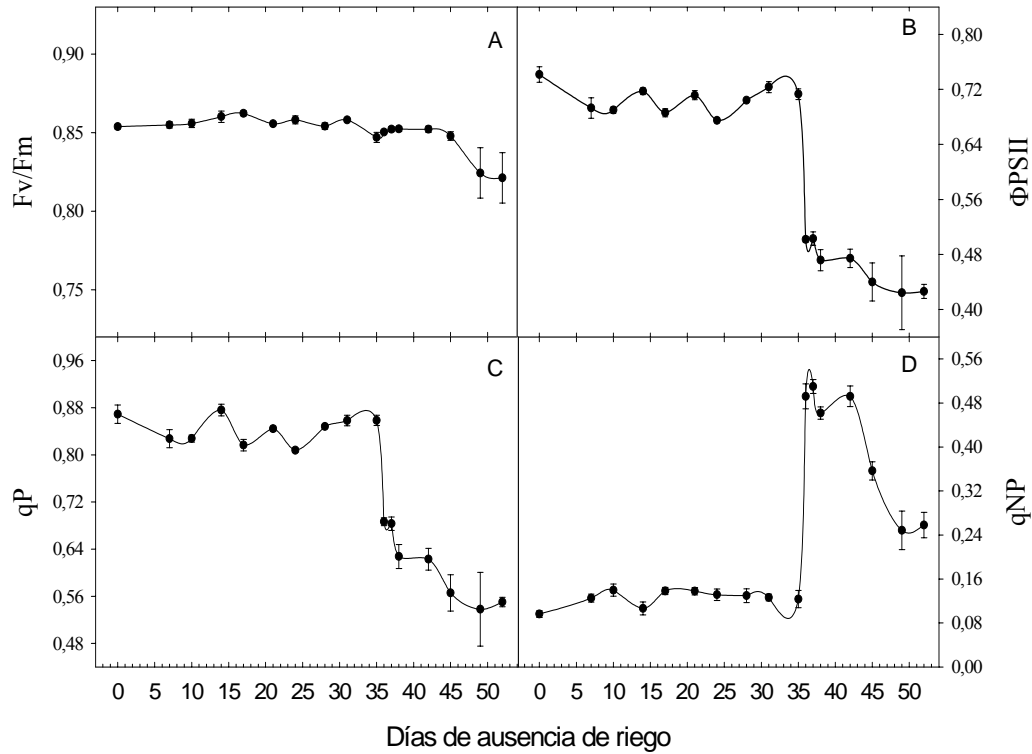


Fig. 6. Efecto de la sequía sobre los parámetros de emisión de fluorescencia del fotosistema II en hojas de *N. dombeyi* a lo largo de 52 días en ausencia de riego, los parámetros de hojas adaptadas a la luz se obtuvieron en hojas iluminadas con luz actínica a una intensidad de  $250 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Cada punto corresponde a promedio  $\pm$  error estándar  $n=9$ . Barras no se aprecian cuando la desviación estándar es muy pequeña.

#### 4.1.4 Pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores

Clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total y carotenoides de plantas estresadas aumentaron a medida que aumentó el nivel de estrés con respecto al control, presentándose diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) sólo entre las plantas controles y el estrés severo (Fig. 7). Las proporciones, clorofila *a*/clorofila *b* y



clorofila total/carotenoides, no experimentaron cambios significativos en ninguno de los niveles de estrés estudiados. Los contenidos en violaxantina (V), anteraxantina (A), zeaxantina (Z) y la sumatoria de estos tres pigmentos disminuyeron significativamente ( $P < 0.05$ ) con el estrés con respecto a los controles (Fig.8). Comparando ambos niveles de estrés se advierte que Z como también V+A+Z se incrementan ante el estrés severo ( $P < 0.05$ ). El estado de deepoxidación no cambia ante ninguno de los niveles de estrés, siendo mayor que en el control a ( $P < 0.05$ ).

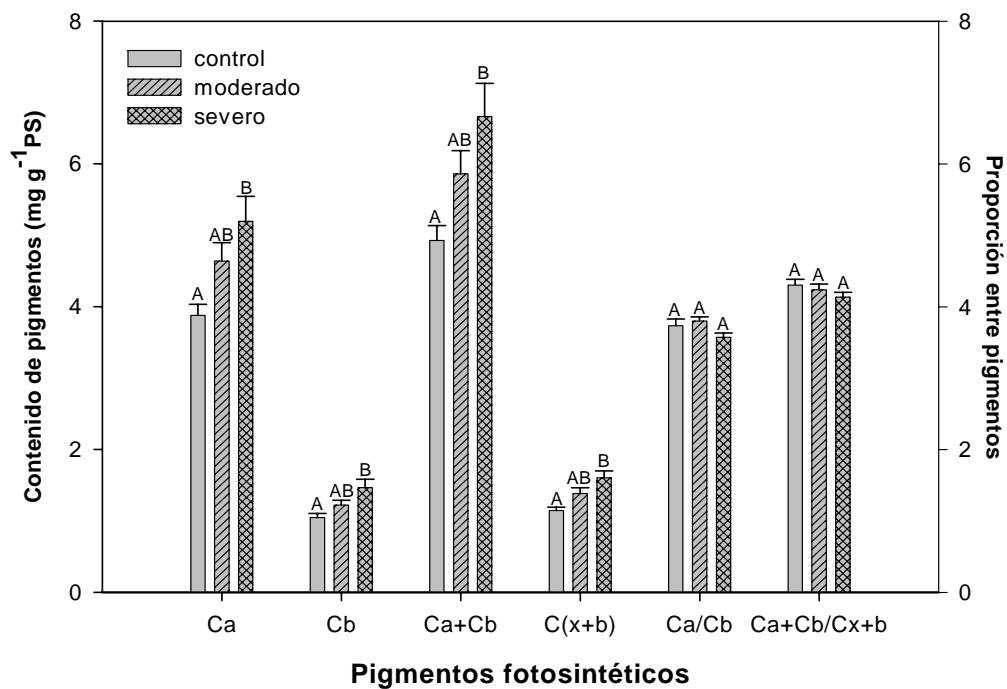


Fig. 7. Efecto del estrés hídrico en la concentración y proporción entre pigmentos fotosintéticos en hojas de *N. dombeyi*. Se midió la concentración de clorofila a y b (Ca, Cb), carotenoides totales (C(x+b)) y se calculó la proporción entre tipos de clorofila (Ca/Cb) y entre clorofilas totales y carotenoides totales (Ca+Cb/ Cx+b), en hojas de plantas bien irrigadas (control) y sometidas 35 y 52 días de ausencia de riego (moderado y severo, respectivamente). Datos corresponden a promedios ± error estándar de 10 muestras independientes (n=10), los valores que presentaron diferencias significativas se destacan con letras mayúsculas distintas, Tuckey ( $P \leq 0.05$ ).

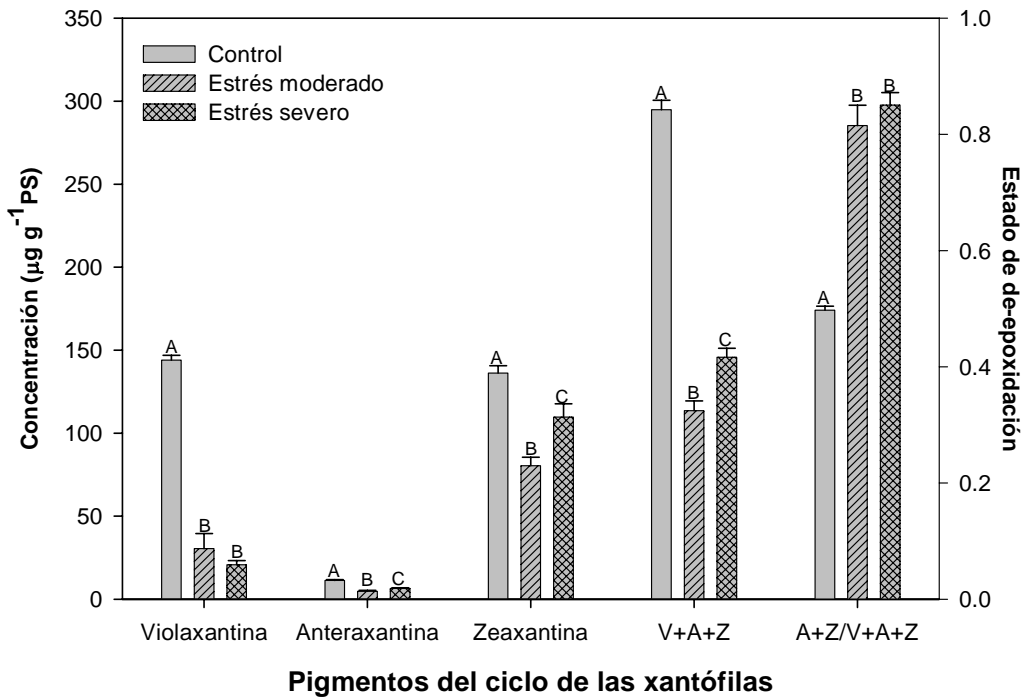


Fig. 8. Efecto del estrés hídrico en la concentración y estado de de-epoxidación foliares de xantófilas en *N. dombeyi*. Se midió la concentración de violaxantina, antheraxantina, zeaxantina, pool total de xantofilas (V+A+Z) y se calculó el estado de de-epoxidación (A+Z/V+A+Z) en hojas de plantas bien irrigadas (control) y sometidas 35 y 52 días de ausencia de riego (moderado y severo, respectivamente). Datos corresponden a promedios±error estándar de 10 muestras independientes (n=10), los valores que presentaron diferencias significativas se destacan con letras mayúsculas distintas, Tuckey ( $P \leq 0.05$ ).

#### 4.1.5 Curvas de presión volumen y grado de ajuste osmótico

Para poder estimar si en esta especie se producía ajuste osmótico en hojas se determinaron curvas presión-volumen. Estas curvas se compararon con otras de ejemplares de la misma edad de *Nothofagus nitida*, especie leñosa siempreverde de la misma familia (Fagaceae), que la de la especie en estudio, las que fueron sometidas a un tratamiento similar de estrés hídrico por Saavedra (2004) (Fig. 9). En las curvas se observa que el  $\Psi_{\pi}$  a turgor total de ambas especies fue más bajo en el mayor nivel de estrés con respecto al control, mientras que bajo condiciones de estrés moderado los valores para *N. dombeyi* fueron similares a los del control y en *N. nitida* fueron más bajos.

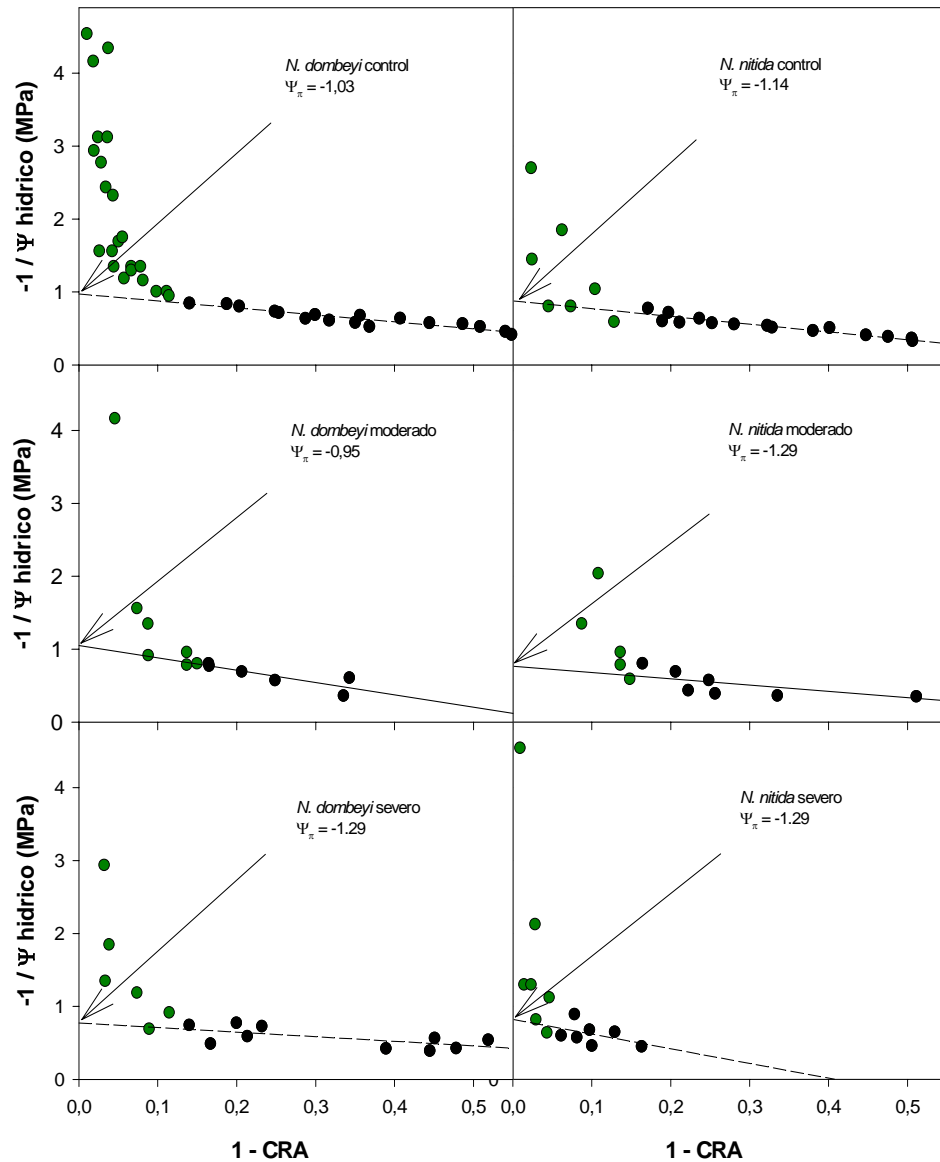


Fig. 9. Curvas presión-volumen en hojas de *N. dombeyi* y *N. nitida* de la misma edad y tratamiento de sequía, cada curva corresponde a mediciones en tres plantas. La extrapolación de la parte lineal de la curva indica la relación lineal entre  $\text{CRA}_f$  y el recíproco del potencial de solutos ( $1/\Psi_{\pi}$ ), su intersección con el eje Y (indicado con flechas) corresponde al  $\Psi_{\pi}$  a turgor completo de la muestra. Datos *N. nitida* fueron tomados de Saavedra (2005).

A partir de las curvas anteriores se estableció el ajuste osmótico en base a la diferencia del  $\Psi_s$  a turgor total entre el control y las plantas sometidas a estrés (Tabla 1), encontrándose un mayor grado de ajuste osmótico en *N. nitida* (14,6%) que en *N. dombeyi* (-7,4%) para el estrés moderado

lo que se revirtió en el nivel de estrés severo en que *N. dombeyi* presentó un mayor ajuste (25,7%) que *N. nitida* (7,0%).

Tabla 1: Ajuste osmótico (AO) a turgor total en hojas de *N. dombeyi* y *N. nitida* estimado a partir de valores entregados por curvas presión-volumen en plantas sometidas a estrés por sequía. El ajuste osmótico absoluto se estimó en base a la diferencia entre el  $\Psi_{\pi}$  en MPa del control y el tratamiento. Los valores relativos corresponden a la diferencia porcentual del ajuste osmótico a cada nivel de estrés relativo con respecto al control.

Especie	Control	Estrés moderado		Estrés severo			
	$\Psi_{\pi}$ (MPa)	$\Psi_{\pi}$ (MPa)	AO absoluto (MPa)	AO Relativo (%)	$\Psi_{\pi}$ (MPa)	AO absoluto (MPa)	AO Relativo (%)
<i>N. dombeyi</i>	-1,03	-0,95	-0,08	-7,4	-1,29	0,26	25,7
<i>N. nitida</i>	-1,14	-1,31	0,17	14,6	-1,29	0,08	7,0

## 4.2 Niveles de abastecimiento hídrico en suelo

### 4.2.1 Estado hídrico de las hojas a los niveles de estrés seleccionados

El  $CRA_f$  y el  $\Psi$  hídrico foliar no sufrió variaciones significativas entre los niveles de abastecimiento (Tabla 2). En cambio el  $\Psi_{\pi}$  descendió significativamente en plantas mal abastecidas ( $P < 0.05$ ), volviendo a valores similares al control en el nivel de recuperación.

Tabla 2: Relaciones hídricas foliares y del suelo en *N. dombeyi*, para los distintos niveles de irrigación estudiados. Datos corresponden a promedio  $\pm$  error estándar  $n = 10$ , los valores que presentaron diferencias significativas se destacan con letras mayúsculas distintas, Tuckey ( $P \leq 0.05$ ).

Abastecimiento	$CRA_s$ (%)	$CRA_f$ (%)	$\Psi$ Hídrico (MPa)	$\Psi$ osmótico (MPa)
Control	65	93,29 $\pm$ 0,42	-0,40 $\pm$ 0,02	-1,04 $\pm$ 0,03 A
Semi abastecido	59	94,04 $\pm$ 0,38	-0,43 $\pm$ 0,03	-1,07 $\pm$ 0,02 A
Mal abastecido	52	93,64 $\pm$ 0,58	-0,39 $\pm$ 0,02	-1,19 $\pm$ 0,05 B
Recuperación	65	92,68 $\pm$ 0,98	-0,35 $\pm$ 0,03	-1,01 $\pm$ 0,03 A

#### **4.2.2 Fracciones de luz absorbida en PSII a distintas densidades de flujo fotónico (DFF).**

La distribución de las fracciones de luz absorbida en el PSII a distintas DFF, para cada nivel de irrigación utilizado y su posterior recuperación se representa en la Fig. 10. Se observa que en los 2 niveles de irrigación estudiados la fracción de luz utilizada fotoquímicamente (P) disminuye al aumentar la DFF empleada, mientras que la fracción de luz disipada (D) y la energía absorbida en exceso (E) aumenta (Fig.10 A, B). Similar comportamiento demostró la distribución de las fracciones de luz absorbida de las plantas control (línea punteada) (Fig.10 A, B, C) y de las plantas recuperadas (Fig.10 C). La fracción de energía disipada (L) en la oscuridad se mantuvo en todos los tratamientos y la disipada térmicamente aumentó con respecto al control, en todos los tratamientos a niveles de DFF altos. E fue mayor en el nivel semi abastecido que en el control, igual en nivel mal abastecido y menor en las plantas en recuperación. Estos resultados indican que la fracción de energía utilizada fotoquímicamente sufre un descenso al nivel semi abastecido y tiende a recuperarse al nivel mal abastecido volviendo a valores normales bajo condiciones de recuperación.

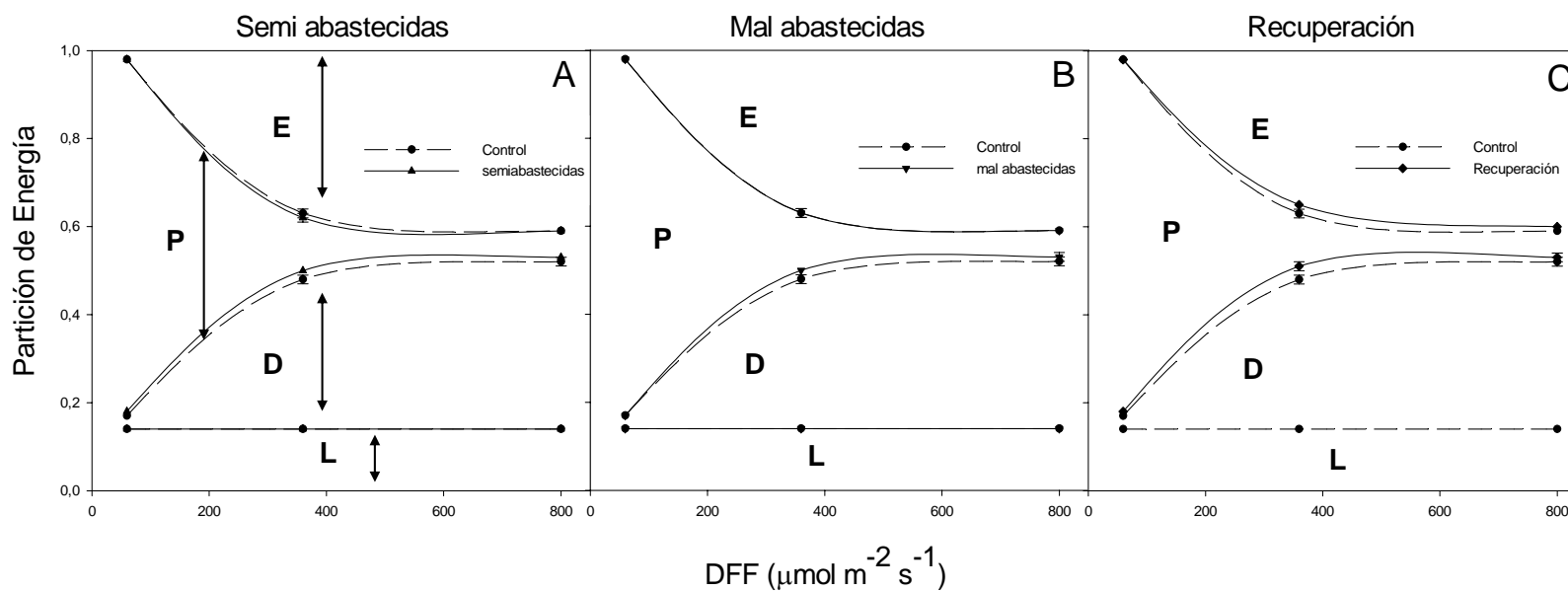


Fig. 10. Respuesta de las fracciones de luz absorbida en PSII (según Demmig-Adams *et al.*, 1996) a distintas densidades de flujo fotónico incidente. Las fracciones, indicadas con flechas en (A), corresponden a: pérdida en oscuridad (L), disipada térmicamente (D), utilizada en transporte de electrones (P) y exceso de energía (E), en hojas de plantas bajo régimen hídrico semi abastecido (A), mal abastecido (B) y recuperación (C), en líneas enteras, comparadas en cada gráfico con aquellas de plantas control en líneas punteadas. Cada punto corresponde promedio  $\pm$  error estándar de 20 mediciones, desviación estándar no se aprecia cuando es menor que el ancho del símbolo.

#### ***4.2.3 Comportamiento del aparato fotosintético en el paso desde la oscuridad a luz***

Hojas oscurecidas fueron iluminadas a una misma DFF ( $80 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ), durante 9 minutos, para establecer el comportamiento del  $\phi\text{PSII}$  y NPQ de plantas sometidas a diferentes niveles de abastecimiento hídrico (Fig. 11). En todas las mediciones se observa que la eficiencia fotosintética efectiva aumenta a medida que transcurre la iluminación, mientras que la disipación térmica disminuye. En plantas control y en nivel semi abastecido los valores de  $\phi\text{PSII}$  bordean los valores de 0.74 y 0.72 respectivamente, para alcanzar un valor estable de 0.81 a los 9 minutos. Similar tendencia aunque con valores iniciales más bajos (0.69) se observa en los niveles semi abastecido y recuperación, mientras NPQ es inicialmente mayor en plantas mal abastecidas y recuperación con respecto a plantas control, para alcanzar valores similares a estas a los 9 minutos de exposición a la luz

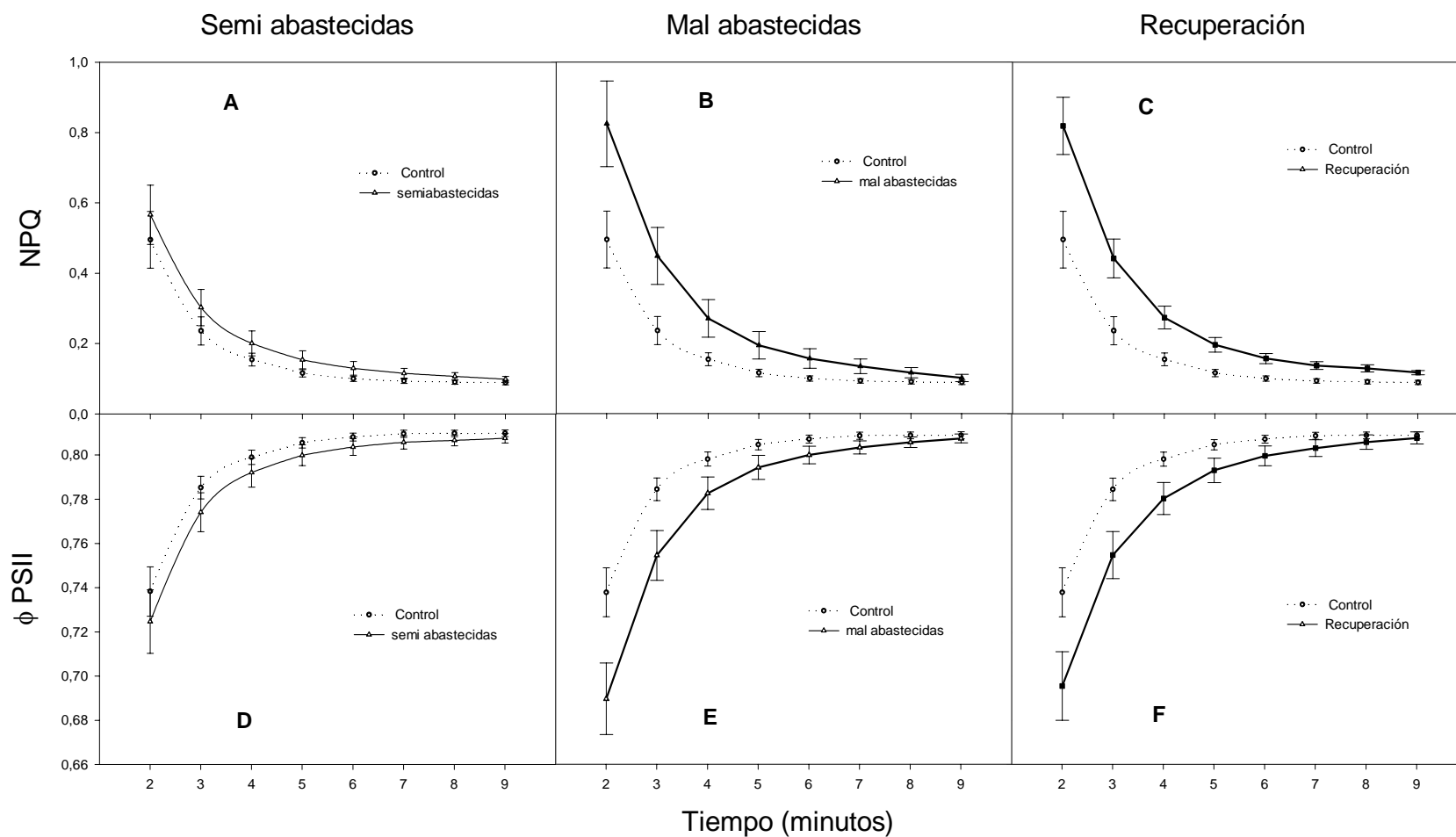


Fig 11. Cambios en los niveles de la eficiencia fotoquímica efectiva ( $\phi$  PSII) y de el apagamiento no fotoquímico (NPQ) durante transición desde oscuridad a luz ( $DFP=80 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ), en hojas de *N. dombeyi* bajo distintos regímenes de abastecimiento hídrico., semi abastecidas (A,D) mal abastecidas(B,E) y Recuperación (C,F) en líneas sólidas. Para cada gráfico plantas control en líneas punteadas. Todos los puntos fueron medidos con los niveles de fluorescencia ya estabilizados. Datos corresponden a promedio  $\pm$  error estándar  $n = 20$ .



#### 4.2.5 Solutos compatibles

La acumulación de carbohidratos solubles totales (CST) sufrió un aumento significativo en plantas del nivel mal abastecido con respecto al control, la que no ocurrió en plantas del nivel semi abastecido, en que los valores decrecieron (Tabla 3). Los contenidos en prolina presentaron un comportamiento contrario, ya que ellos aumentaron, aunque sin alcanzar diferencia significativa, al nivel semi abastecido, y disminuyeron al nivel mal abastecido. Tanto CST como prolina alcanzaron concentraciones muy cercanas al de las plantas control (120,6  $\mu\text{g/g}$  P.S. y 232,4  $\text{mg/g}$  P.S. respectivamente) cuando fueron llevadas a recuperación durante 7 días a el nivel de irrigación control.

Tabla 3: Concentración de los solutos compatibles Prolina y Carbohidratos solubles totales (CST), en hojas de plantas de *N. dombeyi* sometidas a distintos niveles de abastecimiento hídrico. Datos corresponden a promedios $\pm$ error estándar (n=10), los valores que presentaron diferencias significativas se destacan con letras mayúsculas distintas, Tuckey ( $P \leq 0.05$ ).

Abastecimiento	Prolina ( $\mu\text{g/gP.S.}$ )	CST ( $\text{mg/gP.S.}$ )
Control	285.0 $\pm$ 27.5 AB	120.9 $\pm$ 6.8 A
Semi abastecido	369.4 $\pm$ 46.5 A	100.7 $\pm$ 2.2 B
Mal abastecido	135.8 $\pm$ 9.9 C	145.3 $\pm$ 3.0 C
Recuperación	232.4 $\pm$ 29.7 BC	120.6 $\pm$ 4.7 A

## 5

**DISCUSIÓN**

Con el presente trabajo se pretendió averiguar algunas de las propiedades fisiológicas que pudiesen explicar la capacidad que posee *N. dombeyi* de ser pionera en hábitats desfavorables, hipotetizando que esta capacidad estaría relacionada con la habilidad de la especie de mantener una adecuada eficiencia fotoquímica del PSII ante un estrés hídrico y lumínico. Esta capacidad estaría respaldada en la existencia de mecanismos fotoprotectores del aparato fotosintético (carotenoides del ciclo de las xantófilas) que disipan el exceso de radiación absorbida frente a alta luminosidad. Además, podría responder con un adecuado ajuste osmótico y acumulación de solutos compatibles ante un estrés hídrico, lo que le permitiría mantener el turgor celular ante eventos de sequía.

La respuesta al desecamiento de la especie en estudio demostró que sólo a partir de los 35 días de cese de riego su aparato fotosintético muestra signos de alteración en su actividad, evidenciados preferentemente en descensos del rendimiento cuántico efectivo ( $\Phi$ PSII) y del apagamiento fotoquímico (qP) como también en un aumento del apagamiento no fotoquímico (qNP), pero no en cuanto a la eficiencia fotoquímica máxima del PSII (Fv/Fm). Descensos en Fv/Fm ante un estrés hídrico estarían relacionados con pérdida de turgor (Demmig *et al.*, 1988), con la consecuente desestabilización de las proteínas de membrana responsables del funcionamiento del PSII, o mediante la persistencia de zeaxantina a pesar del periodo de oscuridad aplicado previo a la medición, mientras que cambios en la eficiencia fotosintética efectiva  $\Phi$ PSII, podrían deberse al cierre estomático como respuesta al desecamiento, lo que trae aparejado una limitación del intercambio gaseoso y por ende, una alteración en la fotosíntesis por déficit de CO<sub>2</sub> (Lu *et al.*, 2003). Fv/Fm ha sido un parámetro tradicionalmente utilizado como indicador de estrés en plantas (Krause y Weis, 1991; Larcher 2003), en nuestro caso este parámetro se ubicó entre 0.82 y 0.86, es decir en valores fisiológicamente normales (Krause, 1988; Krause y Weis, 1984, 1991; Rizza *et al.*,

2001). Existen evidencias contradictorias respecto al comportamiento de este parámetro en respuesta a la sequía. Mientras en algunas especies, como en *Rosmarinus officinalis* y trigo entre otras, al igual como en nuestro caso, se ha demostrado que no existe descenso de los Fv/Fm ante un desecamiento (Munné-Bosch y Alegre, 2000), en otras especies como *Picea glauca* y *Nerium oleander* se produce descenso (Eastman y Camm, 1995; Demmig *et al.*, 1988). El descenso en Fv/Fm evidenciado bajo estrés hídrico en *N. oleander* sería causado predominantemente por un incremento en la disipación térmica, la que estaría mediada por acumulación de zeaxantina, lo que no ocurrió en nuestro caso, aún cuando el estado de de-epoxidación a ambos niveles de estrés fue alto. Los altos niveles del pool de xantofilas obtenidos en plantas control se debió principalmente a un alto contenido en violaxantina, pigmento no involucrado en la disipación térmica (Niyogi *et al.*, 1997). Pareciera ser que en relación al déficit hídrico la respuesta del Fv/Fm es específica y que en cuanto a la especie objeto de nuestro estudio este tipo de estrés no tendría efecto directo sobre la fotoquímica primaria del PSII en hojas adaptadas a la oscuridad. Por lo tanto Fv/Fm no sería un indicador de estrés hídrico adecuado para *N. dombeyi*, a diferencia de los parámetros que se obtuvieron en hojas adaptadas a la luz, como ser  $\Phi$ PSII, qP, en los cuales se apreció descenso al igual que en otras plantas (Eastmann y Camm, 1995; Jagtap *et al.*, 1998). Nuestros resultados también son coincidentes con los obtenidos en *Nothofagus nitida* por Saavedra (2004) quien obtuvo valores de Fv/Fm superiores a 0.80 en plantas sometidas a sequía.

Las concentraciones de pigmentos fotosintéticos aumentaron a medida que aumentó el estrés hídrico, pero no así las proporciones entre estos. Este comportamiento fue contrario al encontrado en *Lavandula stoechas* (Munné-Bosch y Alegre, 1999), en que las clorofilas decrecieron. Esta pérdida de clorofila evitaría un daño fotoinhibitorio, aún cuando sea una consecuencia negativa del estrés hídrico. Sin embargo, también puede ser considerado como una adaptación a un estrés de

sequía prolongado, ya que reduce la cantidad de luz interceptada por las hojas e incrementa la capacidad de disipar el exceso de energía de excitación por cantidad de luz interceptada (Balaguer *et al.*, 2002). El hecho de que en nuestro caso la concentración de los pigmentos fotosintéticos no descendiera, estaría indicando que la planta no sufrió un exceso de presión lumínica en las condiciones de cultivo utilizadas, incluso en los niveles de sequía más agudos (Loggini *et al.*, 1999).

Llama la atención, que en la cinética de desecamiento, el  $CRA_s$  del suelo desciende mucho antes de que lo haga el  $CRA_f$ , lo que coincidió con un ajuste osmótico (0.26 MPa) que presenta la especie al mayor nivel de estrés hídrico, pero no ante un estrés moderado en que este ajuste prácticamente no existió (-0.08 MPa). Esto indicaría que la especie en estudio necesita una sequía mayor para inducir este mecanismo. Este comportamiento es diferente al de *N. nitida*, que ante un estrés moderado demostró cierto ajuste osmótico (0.17 MPa) el que se pierde ante el estrés severo (0,08 MPa) Saavedra, (2004). Individuos jóvenes de la conífera *Thuja occidentalis* evidenciaron valores de ajuste osmótico ante períodos de sequía, similares a *N. dombeyi*, mientras que los individuos adultos de esta conífera presentaron mayor rango de ajuste osmótico (0,26 a 0,67 MPa), (Edwards y Dickson, 1995). Especies de *Eucaliptus* presentan ajuste osmótico entre 0.20 y 0,50 MPa (Lemcoff *et al.*, 1994). Estos resultados permitieron a estos investigadores concluir que las especies difieren en la magnitud de su ajuste osmótico ante estrés hídrico y que es posible usar esta característica como un criterio para seleccionar genotipos resistentes a la sequía, los que tendrían un desarrollo más exitoso en ambientes propensos a desecamiento que aquellos individuos sin o escaso ajuste osmótico. Basándose en los rangos de ajuste osmótico inducidos por estrés hídrico, mencionados más arriba, *N. dombeyi* se sitúa en un nivel intermedio, mientras que *N. nitida* no alcanza a registrar valores de ajuste osmótico similares a los mostrados por las otras especies. Por lo tanto, *N. dombeyi*

poseería mayor aptitud para instalarse en hábitats más secos o de sequía impredecible con respecto a *N. nitida*, lo que confirma una de las hipótesis planteadas en este trabajo. Por otro lado, los resultados de ajuste osmótico encontrados en ambas Fagáceas, también reflejarían las diferencias de hábitat de ambas especies. El mayor ajuste osmótico permitiría que *N. dombeyi* pueda establecerse en hábitats hídricamente más desfavorables, y poseer un rol de pionera que *N. nitida* no posee. Los carbohidratos solubles totales podrían estar involucrados más que la prolina en este ajuste osmótico, puesto que experimentaron un aumento significativo ( $P \leq 0.05$ ) cuando las plantas fueron sometidas a un estrés hídrico por mantención de diferentes niveles de abastecimiento hídrico del suelo (Tabla 3), como se discute más adelante.

Cuando se indujo sequía manteniendo diferentes niveles de abastecimiento hídrico del suelo, el ajuste osmótico fue de 0,15 MPa al mayor nivel de estrés (mal abastecidas) (Tabla 2), valor muy inferior al alcanzado en la cinética de desecamiento (0,26MPa) (Tabla 1), lo que indicaría que el nivel de estrés logrado en el primer caso fue menor. Probablemente, un mejor ajuste osmótico habría sido obtenido si el abastecimiento del suelo hubiese sido menor. A pesar de esto, los carbohidratos solubles totales aumentaron (20%) en las plantas mal abastecidas de agua con respecto al control, alcanzando niveles similares al control al ser nuevamente irrigadas (recuperación). La prolina, en cambio, no mostró la misma tendencia. Saavedra (2004), no encontró aumentos significativos de ninguno de estos solutos compatibles en *N.nitida*, lo que concuerda con el escaso ajuste osmótico presentado por la especie. El papel de la prolina en el ajuste osmótico ha sido cuestionado por algunos investigadores, quienes señalan que este soluto sería más bien un síntoma de estrés que un modulador de ajuste osmótico (Hanson, 1980).

Las fracciones de luz absorbidas en el PSII a distintos DFF, en cada nivel de irrigación utilizado (Fig. 10), no muestran diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, dan cuenta de

tendencias de cambios a los niveles de DFF más altos ( $360$  y  $800 \mu\text{mols}^{-1}\text{m}^{-2}$ ), en las plantas estresadas, con respecto a los controles. Esto indicaría que el estrés hídrico por sí solo no es capaz de producir cambios en la repartición de las fracciones de luz (utilización en el transporte de electrones P, disipación D y exceso de energía E) a la intensidad de luz de cultivo y que estos cambios aparecen cuando la intensidad lumínica a la cual es expuesta la hoja aumenta. Se observó una disminución de la fracción P y un aumento de la fracción D en hojas semi y mal abastecidas. En recuperación se observó que la fracción P volvió a sus niveles iniciales, D aumentó y E disminuyó. Esto sugiere que las plantas que pasaron por un periodo de sequía, cuentan con mecanismos disipadores de energía más eficientes que aquellas que no han sufrido sequía, este aumento en la disipación no ocurriría a expensas de una disminución de la fracción utilizada en fotosíntesis, sino de la fracción de energía que es absorbida en exceso, lo que conferiría a estas plantas mayor habilidad para evitar daño por exceso de radiación incidente.

Si bien, en hojas expuestas a la intensidad lumínica de cultivo ( $80 \mu\text{mols}^{-1}\text{m}^{-2}$ ), la distribución de la energía capturada por el PSII no sufrió variación entre los grupos estudiados, si se observa diferencia en como se apaga la fluorescencia durante el periodo de tiempo que demora en estabilizarse la fotosíntesis (Fig. 11). Es normal que antes de que el ciclo de Calvin se active completamente, el apagamiento de la fluorescencia a niveles estables se logre primeramente por disipación térmica, esto hace que luego de alcanzada una emisión de fluorescencia estable aparezca un aumento de la eficiencia fotoquímica efectiva ( $\phi\text{PSII}$ ) y una disminución de la cantidad de excitación que se libera térmicamente (NPQ), adquiriendo estos valores de equilibrio luego de algún tiempo de exposición dependiente entre otras cosas de la especie, intensidad lumínica de exposición y estado fisiológico de la planta (Demmig-Adamm B., conversación personal). En hojas de plantas mal abastecidas y en recuperación, con respecto a plantas control y semi abastecidas, se observa que

la disipación térmica es más fuerte a los dos minutos de exposición a luz descendiendo hasta encontrar valores normales a los diez minutos de exposición, esto vuelve a sugerir que los mecanismos de disipación térmica están más activos en plantas que están o han pasado por algún evento de sequía.

Los antecedentes y datos recolectados en esta tesis nos permiten sugerir que *N. dombeyi* es una especie que durante los primeros estadios de su desarrollo, es capaz de tolerar eventos de sequía sin cambiar drásticamente la funcionalidad de su aparato fotosintético. Además esta especie podría ajustar la concentración de osmolitos en el jugo celular a fin de volverse más ávida de agua durante los eventos de sequía y así mantener la turgencia y estabilidad de los procesos metabólicos.

## 6

**BIBLIOGRAFÍA**

- Adams, W., Demmig-Adams, B., Winter, K. and Schreiber, U. (1990). The ratio of variable to maximum chlorophyll fluorescence from photosystem II, measured in leaves at ambient temperature and at 77K as an indicator of the photon yield of photosynthesis. *Planta*, 180, 166-174.
- Agati, G., Mazzinghi, P., diPaola, L., Fusi, F. and Cecchi, G. (1996). The F685/F730 chlorophyll fluorescence ratio as an indicator of chilling stress in plants. *J. Plant Physiol.*, 148, 384-39.
- Alberdi, M., Steubing, L. (1973). Untersuchungen der potentiellen Sticstoff-Mineralisation in Trumao-Böden und einem Pseudogley. *Zt. f. Planzenernährung und Bodenkunde* 133: 193-201.
- Alberdi, M., Weinberger, P., Oliva, M., Romero, M. (1974). Ein Beitrag zur chemischen Kennzeichnung des Skleromorphie-Grades von Blättern immergrüner Gehölze. *Beitr. Biol. Pflanzen*, 50: 305-320.
- Alberdi, M., Romero, M. Ríos, D. and Wenzel, H. (1985). Altitudinal gradients of seasonal frost resistance in *Nothofagus* communities of southern Chile. *Acta Oecologica/Oecol. Plant.*, 6, 21-30.
- Alberdi, M. (1987). Ecofisiología de especies chilenas del género *Nothofagus*. *Bosque*, 8(2), 77-84
- Alberdi, M. (1995). Ecofisiología de especies leñosas de los bosques higrófilos templados de Chile: Resistencia a la sequía y bajas temperaturas. Capítulo 15. *In: Armesto, J.; C. Villagrán; M. Kalin-Arroyo. Ecología de los bosques nativos de Chile. Chile, Universitaria. pp. 279-299.*
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplast: scavenging of active oxigens and disipation of excess photon. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 50, 601-639.
- Balaguer, L., Pugnaire, F.I., Martínez, E., Armas, C., Valladares, F. and Manrique, E. (2002). Ecophysiological significance of chlorophyll loss and reduced photochemical efficiency under extreme aridity in *Stipa tenacissima* L. *Plant and Soil*, 240, 343-352.
- Bates, S., Waldren, P. and Teare, D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39, 205-207
- Bilger, W. and Björkman, O. (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 25:173-185



Björkman, O. and Demmig, B. (1987). Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170, 489-504.

Björkman, O. and Powles, S.B. (1984). Inhibition of photosynthetic reaction under water stress: interaction with light level. *Planta*, 161, 490-504.

Brown, R.W. and Oosterhuis, M.D. (1992). Measuring plant and soil water potential with thermocouple psychrometers: some concerns. *Agron. J.*, 84, 78-86.

Clifford, S., Arndt, S., Corlett, J., Joshi, S., Sankhla, N., Popp, M. and Jones, H. (1998). The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). *J. Exp. Bot.*, 49(323), 967-977.

Cornic, G. (2000). Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture- not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science*, 5, 187-188.

Cornic, G., Ghashghaie, J., Genty, B. and Briantais, J. (1992). Leaf photosynthesis is resistant to a mild drought stress. *Photosynthetica*, 27, 295-309.

Crowe, J.H., Crowe, L.M., Leslie, S.B. and Fisk, E. (1993). Mechanisms of stabilization of dry biomolecules in anhydrobiotic organisms. In: Close TJ, Bray EA (eds.), *Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress*, pp. 11-20. Amer. Soc. Plant Physiology, Riverside, CA.

Demmig-Adams, B. and Adams, W. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 1, 21-26.

Demmig-Adams, B., Adams, W., Baker, D.H., Logan, B.A., Bowling D.R. and Verhoeven, A.S. (1996). Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiol. Plant.*, 98, 253-264.

Demmig-Adams, B. and Adams, W. (1992). Photoprotección and other responses of plants to light stress. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol.*, 43, 599-626.

Demmig, B. and Björkman, O. (1987). Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of O<sub>2</sub> evolution in leaves of higher plants. *Planta*, 171, 171-184.

- Demmig, B., Winter, K., Krüger, A. and Czygan, F. (1987). Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant Physiol.*, 84, 218-224.
- Demmig, B., Winter, K., Krüger, A. and Czygan, F. C. (1988). Zeaxanthin and heat dissipation of excess light energy in *Nerium oleander* exposed to a combination of high light and water stress. *Plant Physiol.*, 87, 17-24.
- Donoso, C. and Lara, A. (1998). Silvicultura de los bosques nativos de Chile. Chile, Universitaria. 421 p.
- Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, M., Rebers, A. and Smith, R. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal of Chemistry*, 28, 350-356.
- Eastman, P.A.K. and Camm, E.L. (1995). Regulation of photosynthesis in interior spruce during water stress: changes in gas exchange and chlorophyll fluorescence. *Tree Physiol.*, 15, 229-235.
- Edwards, D. R. and Dixon, M.A. (1995). Mechanisms of drought response in *Thuja occidentalis* L. I. Water stress conditioning and osmotic adjustment. *Tree Physiol.*, 5, 121-127.
- Figuroa, F.L. and Gómez, I. (2001). Photosynthetic acclimation to solar UV radiation of marine red algae from the warm-temperate coast of southern Spain: A review. *J Appl. Phycol.*, 13, 235-248.
- Foyer, C.H., Lelandais, M. and Kunert, K.J. (1994). Photooxidative stress in planta. *Physiol. Planta.*, 92, 696-717.
- Genty, B., Briantais, J. and Baker, N. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, 990, 87-92.
- Govindjee. 2002. A role for a light-harvesting antenna complex of photosystem II in photoprotection. *Plant Cell*, 14, 1663-1668.
- Grumet, R. and Hanson, A.D. (1986). Genetic evidence for an osmoregulatory function of glycinebetaine accumulation in barley. *Aust J Plant Physiol.*, 13, 353-364.
- Hanson, A. (1980). Interpreting the metabolic responses of plants to water stress. *HortScience*, 15, 623-629.
- Havaux, M. (1998). Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science*, 3, 147-151.
- He, J.X., Wang, J. and Liang, H.G. (1995). Effects of water stress on photochemical function and protein metabolism of Photosystem II in wheat leaves. *Physiol. Planta.*, 93, 771-777.

- Horton, P., Ruban, V. and Walters, G. (1994). Regulation of light harvesting in green plants. Indication by nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol.*, 106, 415-420.
- Jagtap, V., Bhargava, S., Streub, P. and Feierabend, J. (1998). Comparative effect of water, heat and light stresses on photosynthetic reactions in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J. Exp. Bot.*, 49, 1715-1721.
- Ireland, R. Long, R. and Baker, R. (1984). The relationship between carbon dioxide fixation and chlorophyll *a* fluorescence during induction of photosynthesis in maize leaves at different temperatures and carbon dioxide concentrations. *Planta*, 160, 550-558.
- Kautsky, H. and Hirsch, A. (1931). Neue versuche zur kohlenstoffassimilation. *Naturwissenschaften*, 19, 964
- Kato, M. C., Hikosaka, K., Hirotsu, N., Makino, A. and Hirose, T. (2003). The Excess Light Energy that is neither Utilized in Photosynthesis nor Dissipated by Photoprotective Mechanisms Determines the Rate of Photoinactivation in Photosystem II. *Plant and Cell Physiol.*, 44, 318-325.
- Krause, G. (1988). Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol. Plant.*, 74, 566-574.
- Krause, G. and Weis, E. (1984). Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynthesis Research*, 5, 139-157.
- Krause, G. and Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 42, 313-349.
- Kyparissis, S.A., Petropoulou, Y. and Manetas, Y. (1995). Summer survival of leaves in a soft-leaved shrub (*Phlomis fruticosa* L. Labiatae) under mediterranean field conditions; avoidance of photoinhibitory damage through decrease chlorophyll contents. *J. Exp. Bot.*, 46, 1825-1831.
- Law, J. and Rilling, H. (1985). Steroids and isoprenoids; Part B. *Methods in enzymology*, 111, 113-149.
- Larcher, W. (2003). *Physiological Plant Ecology; Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*. 4<sup>th</sup> ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 513 p.
- Lemcoff, J., Guarnaschelli, A., Garau, A., Bascialli, M. and Ghera, C. (1994). Osmotic adjustment and its use as a selection criterion in *Eucalyptus* seedlings. *Can. J. For. Res.*, 24, 2404-2408.

- Levitt, J. (1980). Responses of plants to environmental stresses; Water, radiation, salt and another stresses. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Academic Press Inc. V 1.
- Lichtenthaler, K. and Wellburn, R. (1983). Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvent. *Biochem. Soc. T.*, 11, 591-592.
- Loggini, B., Scartazza, A., Brugnoli, E. and Navarri-Izzo, F. (1999). Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiol.*, 119, 1091-1099.
- Long, S.P., Humphries, S. and Falkowski, P. (1994). Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 45, 633-662.
- Lu, C., Qiu, N., Lu, Q., Wang, B. and Kuang, T. (2003). PSII photochemistry, thermal energy dissipation, and the xanthophyll cycle in *Kalanchoë daigremoyiana* exposed to a combination of water stress and high light. *Physiol. Plant.*, 118, 173-182.
- Lutz, C. (1996). Avoidance of photoinhibition and examples of photodestruction in high alpine *Eriophorum*. *J. Plant Physiol.*, 148, 120-128.
- Maldonado, C. (1992). Respuestas fisiológicas al déficit hídrico en dos genotipos de *Avena sativa* L. con resistencia contrastante a la sequía. Tesis Mag. Cs. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Fac. de Cs. 100 p.
- Maslova, T.G. and Popova, I.A. (1993). Adaptative properties of the plant pigment systems. *Photosynthetica*, 29, 195-203.
- Maxwell, K. and Johnson, G. (2000) Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *J. Exp. Bot.*, 51(345), 659-668.
- Mc. Queen, D.R. (1976). The ecology of *Nothofagus* and associated vegetation in South America. *Tuatara*, 22, 36-68.
- Meza-Basso, L., Alberdi, M., Raynal, M., Ferro-Cardinanos, M.L. and Delseny, M. (1986). Changes in protein synthesis in rapeseed *Brasica napus* seedlings during a low temperature treatment. *Plant Physiol.*, 82, 733-738.
- Mullet, J.E. and Whitsitt, M.S. (1996). Plant cellular responses to water deficit. *Plant Growth Regulation*, 20, 119-124.

- Munné-Bosch, S. and Alegre, L. (1999). Diurnal variations of photosynthesis and dew absorption by leaves in two evergreens shrubs growing in Mediterranean field conditions. *New Phytol.*, 144, 109-119.
- Munné-Bosch, S. and Alegre, L. (2000). Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*, 210, 925-931.
- Niyogi, K., Björkman, O. and Grossman, A.R. (1997). The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94, 14162-14167.
- Parra, R., Rodríguez, J. and González, V. (1999). Transpiración, potencial hídrico y prolina en zarzamora bajo déficit hídrico. *Terra*, 17(2), 125-130.
- Premoli, A.C. (1997). Genetic variation in a geographically restricted and two widespread species of South American *Nothofagus*. *J. Biogeography*, 24, 883-892.
- Rathinasabapathi, B. (2000). Metabolic engineering for stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis pathways. *Annals of Botany*, 86, 709-716.
- Rizza, F., Pagani, D., Stanca, M. and Cattivelli, L. (2001). Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and oats. *Plant Breeding*, 120, 389-396.
- Ruiz-Lozano J.M. (2003). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*, 13, 309-317.
- Sakai, A. and Larcher, W. (1987). Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress. *Ecological Studies* 62. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Saavedra, I. (2004). Respuestas fisiológicas de *Nothofagus nitida* (Phil.) Krasser, ante estrés hídrico y estrés lumínico. Tesis, Ingeniería Forestal, Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Austral de Chile, 40 p.
- Scholander P.F., Hammel, H.T, Hemmingsen, E.A. and Bradstreet, E.D. (1964). Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and other plants. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 52:119-125
- Schultze E.D. (1986 ). Carbon dioxide and water vapour exchange in response to drought in the atmosphere and in the soil. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 37, 247-274.

- Somersalo, S. and Krause, G. (1989). Photoinhibition at chilling temperature. Fluorescence characteristic of unhardened and cold acclimated spinach leaves. *Planta*, 177, 409-416.
- Strasser, J. (1997). Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients. *Photosynth. Res.*, 52, 147-155.
- Taiz, L., and Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. . 3<sup>th</sup> ed. United States of America, Sinauer Associates, Inc., Publishers. 690p.
- Thayer S.S., and Björkman O., (1990). Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynth. Res.*, 23, 331–343.
- Veblen, T.T., Kitzberger, T., Burns, B. and Rebertus, A. (1995). Perturbaciones y dinámica de regeneración en bosques andinos del Sur de Chile y Argentina. Capítulo 9. *In: Armesto, J., Villagrán, C. and Kalin-Arroyo, M. Ecología de los bosques nativos de Chile. Chile, Universitaria. pp. 169-198.*
- Venema, J.H., Posthumus, F. and van Hasselt, P.R. (1999). Impact of suboptimal temperature on growth, photosynthesis, leaf pigments and carbohydrates of domestic and high-altitude wild *Lycopersicon* species. *J. Plant Physiol.*, 155(6), 711-718.
- Weinberger, P. (1973). Beziehungen zwischen mikroklimatische Faktoren und natürlicher Verjüngung araukano-patagonischer *Nothofagus*-Arten. *Flora*, 162, 157-179.
- Weinberger, P., Romero, M. and Oliva, M. (1973). Untersuchungen über die Dürresistenz patagonischer immergrüner Gehölze". *Flora*, 161, 555-561.
- Yancey, P. H., Clark M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., and Somero, G. N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217, 1214-1222.
- Yordanov, I., Velikova, V. and Tsonev, T. (2003). Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulg. J. Plant Physiol.*, Special Issue, 187–206.
- Zhao, Y., Aspinall, D. And Paleg, L.G. (1992) Protection of membrane integrity in *Medicago sativa* L. against the effects of freezing. *J. Plant. Physiol.*, 140, 541-543.
- Zahner, R. (1968). Water deficits and growth of trees. *In: Koslowski, T. Water deficits and plant growth. New York, Academic Press. pp. 191-254.*