

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

RESPUESTA METABÓLICA Y REPRODUCTIVA DE DOS VARIEDADES DE CÍTRICOS
BAJO ESTRÉS HÍDRICO

por

Maías Jesús MANZI FRAGA

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de *Magister*
en Ciencias Agrarias opción
Ciencias Vegetales

MONTEVIDEO

URUGUAY

Mayo 2011

Tesis aprobada por el tribunal integrado por el Dr. Julio Omar Borsani Cambón, el Dr. Aurelio Gómez-Cadenas y el Ingeniero Alfredo Gravina Telechea el 27 de mayo de 2011. Director Dr. Carlos Fernando Rivas Grela.

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar la oportunidad de agradecer a todos los que de una manera u otra han participado no solo en la realización de este trabajo, sino también a aquellos que han colaborado para la realización de la Maestría.

Así, comenzando por la gente de Salto, agradezco a la gente de la Regional Norte, especialmente a Mabel Bernal por su disposición para poder llevar los cursos a través de la videoconferencia. Bastantes kilómetros me hizo ahorrar.

A la gente de la Estación Experimental de INIA Salto Grande, desde la Dirección (F. Carrau), los técnicos quienes colaboraron con los equipos y sugerencias (A. Otero y C. Goñi) y al personal que brindó una mano para la realización de este trabajo, entre ellos Diego Suárez, Rúben Menes, Miguel Albín y especialmente a Eleana Luque por su apoyo en esos momentos de complicados.

En el laboratorio de Bioquímica de Facultad de Agronomía hay que agradecer a uno por uno, ya que todo el equipo me ha proporcionado una estancia más que agradable y productiva. A Jorge, Pedro, Omar, Leticia, Danny, Santi, Esteban, Gastón, Maxi, Yoli, Rodolfo y Bettina, gracias. También a Ale Borges, que siempre me ha aportado su conocimiento en cada momento de consulta y a Mercedes Arias por sus aportes.

A Tato por incentivar-me a trabajar en estos temas desconocidos para mí. Al tribunal por sus aportes para que este trabajo salga lo mejor posible.

Finalmente a la familia, como siempre, por todo su apoyo. Aguantando a cualquier hora que llegara el Agencia.

Por supuesto a mi Joa, por su aguante y su apoyo, por todos los kilómetros que me tuvo que soportar.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	VII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO EN PLANTAS.....	2
1.1.1. <u>Efectos del déficit hídrico sobre la fotosíntesis y fotoinhibición</u>	3
1.1.2. <u>Generación de especies reactivas del oxígeno</u>	6
1.1.2.1. Reacción de Mehler.....	8
1.1.2.2. Fotorespiración.....	9
1.2. DEFENSA DE LAS PLANTAS ANTE CONDICIONES DE FOTOINHIBICIÓN.....	10
1.2.1. <u>Disminución de la absorción de luz</u>	10
1.2.2. <u>Sistema antioxidante</u>	11
1.2.2.1. Sistema enzimático.....	11
1.2.2.2. Antioxidantes no enzimáticos.....	13
1.2.2.3 Prolina.....	14
1.2.3. <u>Disipación térmica</u>	15
1.2.3.1 Carotenoides y ciclo de las Xantofilas.....	16
1.2.4. <u>Fotoinactivación</u>	19
1.3. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO COMO MOLÉCULAS SEÑALIZADORAS.....	20
1.4. EFECTO DE CONDICIONES DE ESTRÉS EN LOS CÍTRICOS.....	22
1.5. OBJETIVOS.....	23

1.5.1. <u>Objetivos específicos</u>	23
2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	24
2.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	24
2.2. DETERMINACIÓN DE LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA <i>a</i>	25
2.3. DETERMINACIONES DE LA CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA...26	
2.4. DETERMINACIONES DE CLOROFILAS Y CAROTENOIDES.....26	
2.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO RELATIVO DE AGUA.....26	
2.6. DETERMINACIÓN DE PROLINA Y AMINOÁCIDOS TOTALES...27	
2.7. CUANTIFICACIÓN DE XANTOFILAS.....28	
2.8. DETERMINACIÓN DE PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS.....28	
2.9. DETERMINACIÓN <i>IN SITU</i> DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....29	
2.10. EVALUACIÓN DE LA BROTACIÓN.....29	
2.11. DISEÑO DEL ENSAYO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....30	
3. <u>RESULTADOS</u>	31
3.1. CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA Y CONTENIDO RELATIVO DE AGUA.....	31
3.2. FLUORESCENCIA DE CLOROFILAS.....	32
3.2.1. <u>Máxima eficiencia fotosintética</u>	32
3.2.2. <u>Eficiencia cuántica del fotosistema II</u>	34
3.2.3. <u>Quenching no fotoquímico</u>	35
3.3. CONTENIDO DE PROLINA.....	36
3.4. CONTENIDO DE PIGMENTOS.....	38
3.5. CONTENIDO DE XANTOFILAS.....	40
3.6. DAÑO OXIDATIVO.....	41
3.7. PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	42
3.8. BROTACIÓN.....	44
4. <u>DISCUSIÓN</u>	48

5. <u>CONCLUSIONES</u>	59
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	61
7. <u>ANEXOS</u>	74
7.1. FIGURAS CON INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA.....	74
7.2. ARTÍCULO A PRESENTAR EN AGROCIENCIA.....	76

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro No	Página
1. Porcentaje de nudos brotados en tres condiciones de disponibilidad de agua.....	45
2. Intensidad de floración (número de flores/100 nudos) en ‘Ellendale’ y ‘Valencia’ en tres condiciones de disponibilidad de agua.....	46
3. Número de brotes por tipo cada 100 nudos según tipo de brote en ‘Ellendale’ y ‘Valencia’ en tres condiciones de disponibilidad de agua.....	46
4. Porcentaje de brotación según tipo de brotes (uniflorales o multiflorales) en ‘Ellendale’ y ‘Valencia’ en tres condiciones de disponibilidad de agua.....	47

Figura No.

1. Representación de los tipos de fotoinhibición propuestos por Osmond (1994).....	4
2. Esquema de la inhibición de la síntesis de la proteína D1.....	6
3. Esquema de formación de las especies reactivas del oxígeno.....	8
4. Mecanismo de reducción del oxígeno en agua en el ciclo Asada-Halliwel...	13
5. Xantofilas involucradas en el ciclo de las xantofilas.....	18
6. Mecanismo de acción de las especies reactivas del oxígeno como moléculas señalizadoras.....	21
7. Contenido relativo de agua (RWC) en ‘Ellendale’ (A) y ‘Valencia’ (B) y conductancia estomática (g_s) en $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ en ‘Ellendale’ (C) y ‘Valencia’ (D) y en tres condiciones de disponibilidad de agua.....	32
8. Máxima eficiencia fotosintética (F_v/F_m) en hojas adaptadas a la oscuridad en ‘Ellendale’ (A) y ‘Valencia’ (B) y fluorescencia basal de las clorofilas (F_o) en ‘Ellendale’ (C) y ‘Valencia’ (D) en tres condiciones de disponibilidad de agua.....	33

9. Eficiencia cuántica del fotosistema II (Φ_{PSII}) en hojas adaptadas a luz (mediciones entre 10:00 y 11:30 hrs.) en ‘Ellendale’ (A) y ‘Valencia’ (B) y eficiencia cuántica del fotosistema II (Φ_{PSII}) diaria en hojas adaptadas a luz en ‘Ellendale’ (C) y ‘Valencia’ (D) en tres condiciones de disponibilidad de agua.....	35
10. Quenching no fotoquímico (NPQ) en ‘Ellendale’ (A) y ‘Valencia’ (B) en tres condiciones de disponibilidad de agua.....	36
11. Contenido de prolina ($\mu\text{mol. gr PF}^{-1}$) en ‘Ellendale’ (A) y ‘Valencia’ (B) y relación prolina/aminoácidos (Pro/aa) en ‘Ellendale’ (C) y ‘Valencia’ (D) en tres condiciones de disponibilidad de agua.....	37
12. Contenido de clorofila <i>a</i> (A, E), clorofila <i>b</i> (B, F), clorofilas totales (C, G) y carotenoides totales (D, H) expresados en mg. gr PF^{-1} , en ‘Ellendale’ y ‘Valencia’ respectivamente, en tres condiciones de disponibilidad de agua.....	39
13. Relación entre el contenido de carotenoides/clorofilas totales en ‘Ellendale’ (A) y ‘Valencia’ (B) en tres condiciones de disponibilidad de agua.....	40
14. Estado de de-epoxidación del ciclo de las xantofilas (Ant+Zeax) / (Ant+Zeax+Viol) en ‘Ellendale’ (A) y ‘Valencia’ (B) en tres condiciones de disponibilidad de agua.....	41
15. Daño oxidativo (expresado como $\text{nmol TBars. gr PF}^{-1}$) en ‘Ellendale’ (A) y ‘Valencia’ (B) en tres condiciones de disponibilidad de agua.....	42
16. Determinación de H_2O_2 <i>in situ</i> en hojas de ‘Valencia’ en tres condiciones de disponibilidad de agua.....	43
17. Determinación de H_2O_2 <i>in situ</i> en hojas de ‘Ellendale’ en tres condiciones de disponibilidad de agua.....	44
18. Contenido de aminoácidos ($\mu\text{mol. gr PF}^{-1}$) en ‘Ellendale’ (A) y ‘Valencia’ (B) en tres condiciones de disponibilidad de agua.....	74
19. Relación unidades F_o /clorofila <i>a</i> con BR como base 100, en ‘Ellendale’ (A) y ‘Valencia’ (B) en tres condiciones de disponibilidad de agua.....	74
20. Radiación solar incidente (calorías.cm^{-3}) y horas de radiación solar durante el período de tratamientos.....	75
21. Temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) durante el período de tratamientos.....	75

RESUMEN

El estrés hídrico promueve la floración en los cítricos, aunque son escasos los conocimientos acerca de las señales y los procesos metabólicos involucrados en la inducción floral. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de tres condiciones hídricas (bien regado (BR): Ψ_w -0,8 a -1,2 MPa; estrés hídrico moderado (DM): Ψ_w -2,2 a -2,8 MPa y estrés hídrico severo (DS): $\Psi_w < -4,0$ MPa) sobre el funcionamiento del aparato fotosintético (F_v/F_m , F_o , Φ_{PSII}), vías metabólicas relacionadas con los procesos de fotoprotección; prolina (Pro) y el estado de de-epoxidación de xantofilas (DPS) y su relación con el daño oxidativo y el H_2O_2 en dos variedades ('Ellendale' y 'Valencia'). La eficiencia del aparato fotosintético (PSII), el daño oxidativo y los niveles de H_2O_2 fueron relacionados con el nivel de floración obtenido luego de 70 días de tratamiento. La condición de DS en ambas variedades promovió la fotoinhibición permanente evidenciado por un descenso en F_v/F_m y Φ_{PSII} , así como un aumento en la intensidad de floración. Bajo esta condición, diversos mecanismos fueron promovidos en respuesta al déficit hídrico, aunque el daño oxidativo y el H_2O_2 fueron mayores en estas condiciones respecto a las plantas BR. El aumento en el contenido de Pro en esta condición podría actuar disminuyendo el daño oxidativo, siendo evidente su acción en 'Ellendale'. Así, el daño oxidativo en 'Valencia' fue 25% mayor que en 'Ellendale', mientras que la intensidad de floración lo fue en un 55%, alcanzando 160 flores/100 nudos. Para el resto de las condiciones hídricas, el daño oxidativo y la intensidad de floración también fueron superiores en 'Valencia' respecto a los mismos tratamientos en 'Ellendale'. Estos resultados sugieren que la floración en *Citrus* en respuesta a condiciones de estrés es dependiente de la variedad. Nuestros resultados permiten relacionar directamente la floración y el daño oxidativo en *Citrus*, el cual podría ser empleado como un indicador de la inducción floral. Además se confirmó la relación entre la floración y el H_2O_2 . Estos datos respaldan la idea de que el H_2O_2 podría estar involucrado como molécula señalizadora de la floración en *Citrus*.

Palabras clave: H_2O_2 , F_v/F_m , F_o , especies reactivas del oxígeno, estrés oxidativo

Metabolic and reproductive response of two *Citrus* varieties under water stress conditions

ABSTRACT

Water deficit promotes flowering in citrus plants, although related signals and metabolic pathways involved flower induction are still unknown. The aim of this work was to evaluate the effect of three water conditions (well watered (BR): Ψ_w - 0,8 a -1,2 MPa; moderate water deficit (DM): Ψ_w -2,2 a -2,8 MPa and severe water deficit (DS): $\Psi_w < -4,0$ MPa) on photosynthetic apparatus behavior (F_v/F_m , F_o , Φ_{PSII}), metabolic pathways related to photoprotection; proline (Pro) and de-epoxidation state of xanthophylls (DPS), and its relationship with oxidative damage and H_2O_2 in two varieties ('Ellendale' and 'Valencia'). Photosynthetic apparatus efficiency (PSII), oxidative damage and H_2O_2 levels were related to flowering after 70 days of treatment. In both varieties, DS treatments promoted permanent photoinhibition evidenced by a decrease in F_v/F_m , Φ_{PSII} and also increased flower intensity. Under this condition, many pathways were promoted in response to water deficit; however, oxidative damage and H_2O_2 were higher than BR plants. Pro content could act as a scavenger against oxidative damage; however, this protection was evident only in 'Ellendale'. Thus oxidative damage in 'Valencia' DS was 25% higher compared to 'Ellendale', while its flower intensity was 55% higher, reaching 160 flowers/100 nodes. Considering the rest water conditions, oxidative damage and flower induction were also higher in 'Valencia' compared to the same treatments in 'Ellendale'. These results suggest that *Citrus* flowering in response to stress conditions is variety-dependent. Our results can directly related flowering with oxidative damage in *Citrus*, which could be used as an estimator of floral induction. Also, it was confirmed the relationship between flowering and H_2O_2 are related. Our data support the idea that H_2O_2 could be involved as a flowering signaling molecule in *Citrus*.

Key words: H_2O_2 , F_v/F_m , F_o , oxidative stress, reactive oxygen species

1. INTRODUCCIÓN

Esta tesis se presenta en siete secciones, comenzando con la introducción la cual incluye los objetivos del trabajo. La segunda sección especifica los materiales y métodos empleados en el trabajo, mientras que los resultados se presentan a su continuación. En la cuarta sección se expone la discusión de los resultados y en la quinta sección las conclusiones. En la sexta sección se cita la bibliografía empleada. Finalmente en los anexos, sección siete, se encuentra información complementaria del trabajo, así como un artículo con formato Agrociencia (Uruguay), para dar cumplimiento a los requisitos de la tesis de Maestría en Ciencias Agrarias.

El proceso de inducción de la floración en especies del género *Citrus* es conocido por su respuesta a diversos estímulos ambientales desfavorables, como las bajas temperaturas (Moss, 1976; Susanto *et al.*, 1992, Iglesias *et al.*, 2007), el déficit hídrico (Nir *et al.*, 1972, Southwick y Davenport, 1986; Srivastava *et al.*, 2000) y el exceso radiación (Agustí, 2003). Este comportamiento ha sido señalado como una estrategia de preservación de las especies (Bauer *et al.*, 1997), que en el caso de los cítricos, aún no se conoce la percepción de dichas condiciones por la planta ni su interacción con factores endógenos de la misma (Agustí, 2003).

Los factores ambientales que inducen la floración en cítricos comparten un mecanismo común que regula dicho proceso (Southwick y Davenport, 1986). Las plantas bajo dichas condiciones exhiben diversos mecanismos que le permiten tolerar el estrés, actuando a través de la formación de nuevas moléculas y diversos mecanismos moleculares. La mayoría de los estreses producen ciertos efectos comunes a pesar de algunos específicos ejercidos por cada condición (Rao, 2006). Estreses como el hídrico, térmico o lumínico incrementan los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales promueven el daño a las membranas (Mittler, 2002; Mittler *et al.*, 2004; Bartels y Souer, 2004, Desikan *et al.*, 2004), proteínas, ADN, ARN (Bartels y Souer, 2004) y a varios procesos celulares (Mittler, 2002; Mittler *et al.*, 2004), llegando a producir la muerte de células (Scandalios, 2002).

1.1. EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO EN PLANTAS

Como se mencionó, las plantas son capaces de tolerar y adaptarse a las diversas condiciones de estrés a las que pueden estar sometidas (Rao, 2006), exhibiendo distintas modificaciones tanto a nivel funcional como anatómico para soportar las mismas (Ruiz-Sánchez *et al.*, 1997; Flexas y Medrano, 2002). Algunos de estos cambios pueden a su vez afectar y modificar diferentes procesos, como los asociados a la fotosíntesis (Flexas y Medrano, 2002).

Una respuesta común ante las condiciones de estrés abiótico es la reducción de la apertura estomática (Kozlowski, 1997). Las plantas son capaces de sentir el incremento en las diferencias de presión de vapor entre el aire y la hoja, llevando a un inmediato cierre estomático (Mott y Parthusr, 1991; Assman, 2000). En condiciones de deficiencia hídrica se ha señalado que el cierre estomático es consecuencia del aumento en los niveles de ácido abscísico (ABA) en las raíces, lo cual es posteriormente detectado en las células guarda, provocando así el cierre estomático (Gómez-Cadenas *et al.*, 1996; Assman *et al.*, 2000). Recientemente se ha involucrado al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por mediar en el cierre estomático inducido por el ABA (Desikan *et al.*, 2004). Como consecuencia del cierre estomático, se reduce la pérdida de agua, aunque se afecta la asimilación de CO_2 (Kozlowski, 1997).

En el caso de la deficiencia hídrica, al aumentar la pérdida de agua, las hojas se marchitan y enrollan como forma de proteger de la radiación a la maquinaria fotosintética (Ruiz-Sánchez *et al.*, 1997). En condiciones de estrés hídrico, la alta intensidad lumínica se convierte en un factor altamente dañino para las plantas (Rao, 2006). Durante los primeros momentos cuando se detecta el déficit hídrico, se registran los mencionados descensos en la conductancia estomática (g_s), sin embargo no se verifican cambios en el contenido relativo de agua (RWC). En la medida que el déficit se acentúa, se registran cambios a nivel bioquímico, entre ellos una disminución de ATP, así como también de la regeneración de la RuBP. Finalmente,

ante condiciones severas de déficit hídrico, se registra inhibición en la cadena de transporte de electrones en el cloroplasto, llevando a que se registre fotoinhibición (Flexas y Medrano, 2002). Al disminuir la utilización de electrones en el proceso fotoquímico, se ven favorecidas otras vías metabólicas donde se canaliza el flujo de electrones, entre ellas se aumenta la tasa de oxigenación de la Rubisco (fotorrespiración) (Noctor *et al.*, 2002).

1.1.1. Efectos del déficit hídrico sobre la fotosíntesis y fotoinhibición

La respuesta de las plantas al déficit hídrico difiere significativamente según la intensidad, duración y estado de desarrollo al momento de impuesto el estrés (Chaves *et al.*, 2003). Sin embargo, independientemente de estos factores, uno de los primeros efectos de las condiciones de estrés es reducir los niveles de fotosíntesis (Lawlor *et al.*, 1995). La reducción en la disponibilidad de agua es detectada en las raíces, lo que provoca una disminución en la g_s (Trejo *et al.*, 1995; Gómez-Cadenas *et al.*, 1996), reduciendo la pérdida de agua a través de los estomas con la consiguiente disminución en la asimilación de CO₂ (Kozłowski, 1997). En estas condiciones el exceso de energía que no puede ser canalizado por el proceso fotoquímico puede afectar diversas funciones celulares, entre ellas, reducir los niveles de fotosíntesis, con el consiguiente aumento en los niveles de fotoinhibición (Flexas y Medrano, 2002).

La luz constituye un requisito fundamental para el proceso fotosintético, sin embargo, un exceso de radiación puede llevar a que se genere fotoinhibición (Hu *et al.*, 2009). Se conoce con el término fotoinhibición al proceso por el cual la alta radiación afecta a organismos fotosintéticos causando un descenso (Medina *et al.*, 2002) o la inhibición de la actividad del fotosistema II (PSII; Niyishama *et al.*, 2006). Este proceso ocurre cuando la energía lumínica recibida por los pigmentos fotosintéticos excede a la consumida en los cloroplastos (Melis, 1999; Takahashi y Murata, 2008).

Se ha sugerido la existencia de dos tipos de fotoinhibición, una denominada fotoinhibición dinámica, en la cual se aprecia una inhibición del aparato fotosintético por un período acotado de tiempo, en donde diversos mecanismos de protección actúan para el mantenimiento del metabolismo. Por otro lado, se conoce como fotoinhibición crónica cuando ocurren procesos de fotodaño o daño oxidativo, vinculado a la pérdida de funcionalidad del PSII (Osmond, 1994).

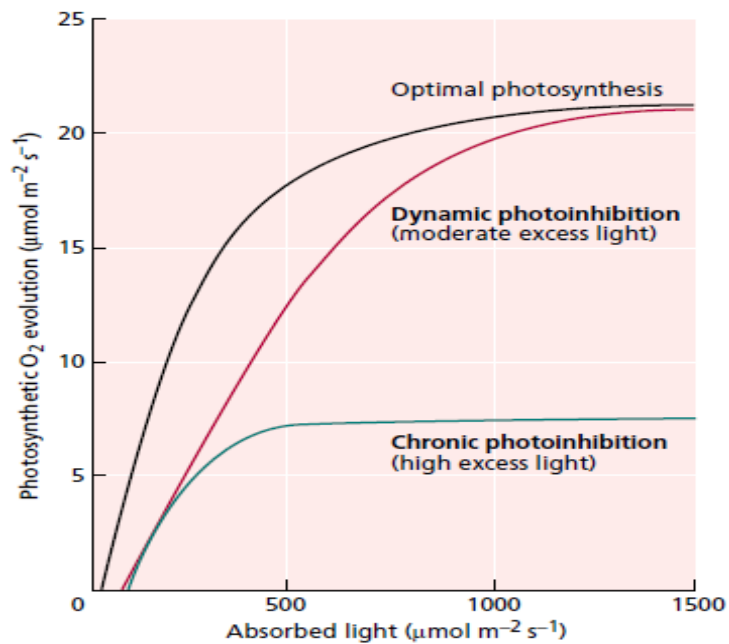


Figura 1. Representación de los tipos de fotoinhibición propuestos por Osmond (1994). Bajo condiciones de fotoinhibición dinámica, aumentos en los niveles de radiación disminuyen los niveles de rendimiento cuántico de la fotosíntesis (Φ_{PSII}), aunque no se afecta el potencial fotosintético. En los casos de fotoinhibición crónica (también conocido como fotoinhibición permanente) el aumento en la radiación lleva a que se vea afectado tanto el rendimiento cuántico así como la máxima eficiencia fotosintética (F_v/F_m), reflejo de una pérdida de funcionalidad del PSII. Tomado de Taiz y Zeiger (2002).

La fotoinhibición resulta naturalmente del balance de la degradación y reparación de la proteína D1, la cual se inserta en la membrana tilacoidal (proteína clave del centro de reacción del PSII). A medida que desciende la fijación fotosintética de CO₂, se acelera el daño del PSII (Nishiyama *et al.*, 2006; Takahashi y

Murata, 2008), a causa del exceso de energía que afecta la reparación de la proteína D1 y por lo tanto del PSII (Allakhverdiev y Murata, 2004; Murata *et al.*, 2007). En condiciones de baja intensidad lumínica, cuando no se registra exceso de energía, la tasa de reparación es mayor que la tasa de daño, por lo cual no se evidencia fotoinhibición. En cambio, cuando la intensidad lumínica es elevada o en condiciones de estrés abiótico (ej: déficit hídrico), el daño excede a la velocidad de reparación, resultando en la fotoinhibición del PSII (Niyishama *et al.*, 2006). En definitiva, la reparación de la proteína D1 afecta el funcionamiento del PSII, por lo que se menciona habitualmente que la fotoinhibición resulta entonces de un balance entre el daño del PSII y de su reparación (Takahashi y Murata, 2008).

Si bien la fotoinhibición es proporcional al aumento en la intensidad de radiación (Park y Chow, 1995), el daño en el PSII puede ocurrir bajo cualquier intensidad lumínica (Tyystjärvi y Aro, 1996). Como se mencionó, cuando el consumo de CO₂ es limitado, aumentan los niveles de fotoinhibición (Takahashi y Murata, 2008), como en ocurrencia de condiciones de déficit hídrico (Medina *et al.*, 2002; Murata *et al.*, 2007) y altas temperaturas (Medina *et al.*, 2002; Guan y Gu, 2009). Estas condiciones provocan una baja asimilación de CO₂, lo que genera exceso de energía y promueve el aumento en los niveles de ROS. Entre ellas, el H₂O₂ ha sido señalado como la principal ROS producida en dichas condiciones (Desikan *et al.*, 2004). El H₂O₂ inhibe la síntesis del precursor de la proteína D1, en el pasaje de ARNm a proteína afectando por tanto, la reparación del PSII (Kojima *et al.*, 2007). Así, varios estreses que incrementan los contenidos intracelulares de H₂O₂ afectan la reparación del PSII (Takahashi y Murata, 2008), acelerando por tanto la fotoinhibición (Nishiyama *et al.*, 2006).

Aquellas condiciones que afectan al ciclo de Calvin, también han sido mencionadas por aumentar la sensibilidad a la fotoinhibición del PSII (Takayashi *et al.*, 2007), mediado por un aumento en los niveles de ROS a causa de la disminución en la fijación de CO₂ (Takayashi y Murata, 2005). El ciclo de Calvin es altamente sensible a los estreses ambientales como la deficiencia hídrica (Murata *et al.*, 2007),

condiciones que promueven el estrés oxidativo por un aumento en la producción de las ROS generadas en el proceso fotoquímico (Niyishama *et al.*, 2006). El daño oxidativo entonces, provoca la pérdida de funcionalidad del PSII por la mencionada inhibición de la reparación de la proteína D1 (Murata *et al.*, 2007).

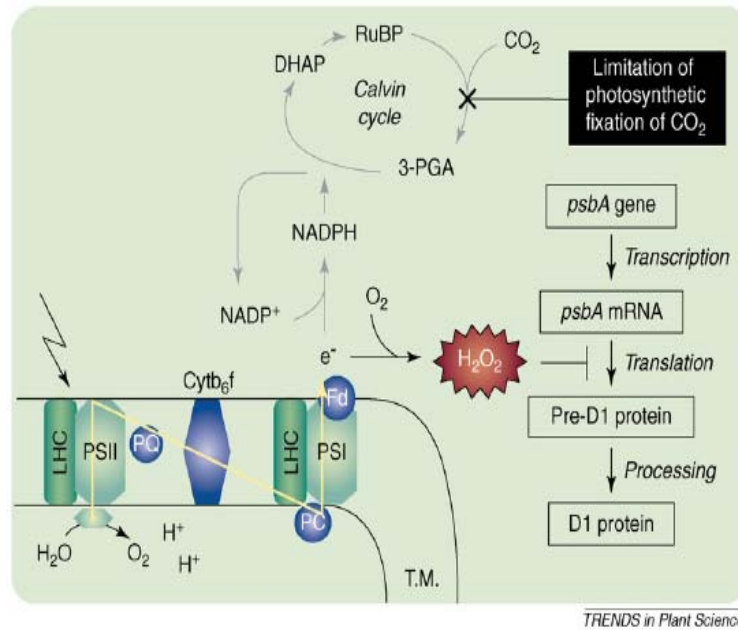


Figura 2. Esquema de la inhibición de la síntesis de la proteína D1. Bajo condiciones de limitada asimilación de CO₂ los electrones en el PSI son transferidos al oxígeno molecular, resultando en la producción de superóxido, el cual es convertido a H₂O₂. El H₂O₂ inhibe la reparación del PSII por afectar la síntesis del precursor de la proteína D1. Tomado de Takayashi y Murata (2008).

1.1.2. Generación de especies reactivas del oxígeno

La producción de ROS en condiciones normales de crecimiento es baja y la planta puede tolerar dichos niveles. Sin embargo, en diversas condiciones estresantes (como el déficit hídrico), la excesiva radiación o las temperaturas extremas aumentan la producción de ROS (Mittler, 2002). La producción de ROS se localiza principalmente en cloroplastos y mitocondrias, organelos que poseen una alta actividad metabólica oxidativa con un intenso flujo de electrones. En condiciones de

estrés abiótico los cloroplastos y peroxisomas cobran relevancia en la producción de ROS, los cuales explican la mayor parte de la producción de dichas sustancias (Noctor *et al.*, 2002). En los cloroplastos la principal fuente de ROS lo constituye la reacción de Mehler y los pigmentos en las antenas (Mittler *et al.*, 2004; Reddy y Raghavendra, 2006). La producción de H₂O₂ en el peroxisoma adquiere relevancia en las plantas con metabolismo C3 bajo condiciones de estrés abiótico (Mittler *et al.*, 2004), aunque los cloroplastos son considerados como los principales generadores de ROS bajo dichas condiciones (Hippeli *et al.*, 1999).

En condiciones óptimas de crecimiento la luz absorbida es empleada para el proceso fotosintético en las hojas y por lo tanto para la asimilación del CO₂, mientras que en condiciones donde la utilización de energía es inferior a la absorbida, las plantas están sujetas al estrés oxidativo (fotooxidativo) (Foyer, 2002). El estrés oxidativo es caracterizado por un aumento en los niveles de ROS en los tejidos, influenciado fuertemente por un exceso de energía que lleva a que ocurra sobre-reducción en la cadena transportadora de electrones (Reddy y Raghavendra, 2006). El exceso de energía entonces se vuelve potencialmente dañino ya que interactúa con el O₂ presente en los tejidos. Los electrones en un ambiente con abundante presencia de O₂ reaccionan con la consiguiente producción de O₂⁻ (radical superóxido) (Reddy y Raghavendra, 2006). Luego de formado el O₂⁻, la presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD) lleva a la generación de H₂O₂. Además, cuando se encuentran las dos ROS mencionadas, el O₂⁻ y el H₂O₂, puede ocurrir la reacción de Haber-Weiss, la cual lleva a la producción de otra ROS, el radical hidroxilo (OH) (Asada, 1999; Reddy y Raghavendra, 2006). Además, existe formación de oxígeno singülete (¹O₂) por la transferencia de energía de excitación desde clorofilas (³Chl*) excitadas al O₂ en el complejo cosechador de luz (del inglés, Light Harvesting Complexes, LHC) (Reddy y Raghavendra, 2006) (Figura 3).

Como se ha mencionado, las ROS son capaces de afectar el funcionamiento celular, provocando daño en estructuras celulares, así como de diversas vías

metabólicas. El $^1\text{O}_2$ y el O_2^- afectan principalmente a las clorofilas y a los ácidos grasos insaturados de las membranas de las células y organelos (Niyogi, 1999).

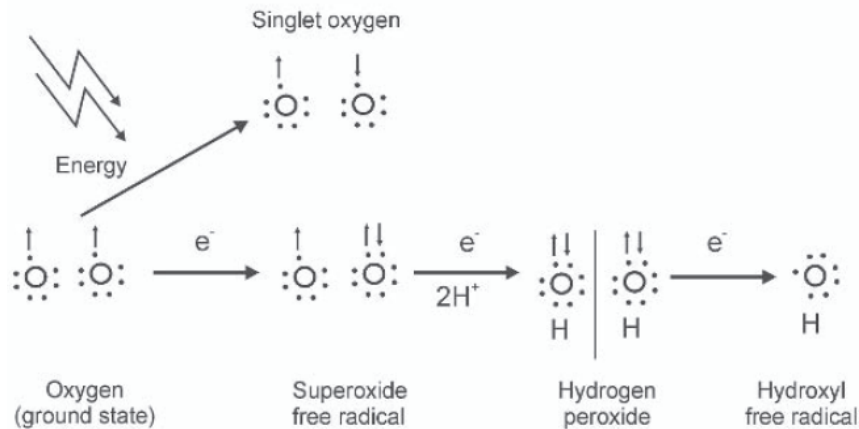
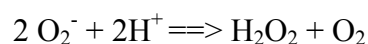
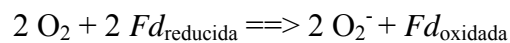


Figura 3. Esquema de formación de las especies reactivas del oxígeno. Por un lado se visualiza la formación de O_2^- por la transferencia de electrones al O_2 , con la posterior generación de H_2O_2 y el OH^\cdot . Por otro lado, la formación del $^1\text{O}_2$ por la transferencia de energía desde las clorofilas al O_2 . Tomado de Rao (2006).

1.1.2.1. Reacción de Mehler

La reacción de Mehler es considerada la reacción más importante en la producción del anión O_2^- . En la misma se produce la reducción del O_2^- que ocurre a nivel del PSI, donde la ferredoxina (*Fd*) transfiere un electrón a la molécula de O_2 produciendo el radical O_2^- , que luego se dismuta a H_2O_2 (Foyer *et al.*, 1994). Los electrones en el PSI que causan la reducción del O_2^- provienen de la cadena transportadora de electrones, situación que ocurre cuando el consumo de NADPH disminuye por descensos en la actividad fotosintética (Asada, 1999).

La reducción del O_2 ocurre según las siguientes reacciones:



La reacción de Mehler es entonces uno de los principales mecanismos por los cuales se generan ROS en condiciones de estrés, los cuales aumentan los niveles de daño oxidativo (Guo *et al.*, 2006).

1.1.2.2. Fotorrespiración

Como consecuencia de la reducción del consumo de ATP y NADPH por el descenso en la actividad fotosintética, los electrones deben ser consumidos en diferentes procesos alternativos al proceso fotoquímico. Como ya se mencionó, la reacción de Mehler con la generación de O_2^- es uno de ellos. Otro de los procesos lo constituye la fotorrespiración (Foyer *et al.*, 1994).

La fotorrespiración implica la reducción del O_2 mediado por la actividad oxigenenasa de la Rubisco, la cual resulta en un consumo de CO_2 y ATP. En dicho proceso intervienen tres organelos, el cloroplasto, el peroxisoma y las mitocondrias. (Flexas y Medrano 2002). Este proceso adquiere especial relevancia en condiciones de estrés hídrico, donde se ha registrado una mayor proporción de electrones que son transportados por el ciclo fotorrespiratorio respecto a los canalizados en la fotosíntesis, lo que plantea que puede aliviar la fotoinhibición (Guan y Gu, 2009).

Además de constituir una vía alternativa para los electrones, se ha mencionado que la fotorrespiración también puede prevenir la excesiva reducción de la quinona (aceptor de electrones entre el PSII y el PSI), ayudando a mantener el transporte de electrones en el cloroplasto (Katona *et al.*, 1992). Se ha propuesto también que la fotorrespiración es capaz de proveer $NADP^+$ como acepto de electrones para el proceso fotoquímico, facilitando así la utilización de la energía lumínica y aliviar la fotoinhibición (Gao *et al.*, 1989). Sin embargo, el transporte de electrones por el proceso fotorrespiratorio ha generado controversia acerca de la efectividad como mecanismo de protección y por lo tanto sobre su efecto en disminuir la fotoinhibición (Osmond y Björkman, 1972).

En el proceso fotorrespiratorio, el paso catalizado por la enzima glicolato oxidasa en el peroxisoma es fuente de H₂O₂. En condiciones normales de crecimiento, dicho H₂O₂ es detoxificado por la presencia de las catalasas (CAT). Sin embargo en condiciones de limitada fijación de CO₂, como las ocurridas bajo condiciones de déficit hídrico, la generación de H₂O₂ en el peroxisoma puede ser responsable de hasta un 70 % del total de H₂O₂ generado en dichas condiciones (Noctor *et al.*, 2002).

1.2. DEFENSA DE LAS PLANTAS ANTE CONDICIONES DE FOTOINHIBICIÓN

En condiciones de exceso de energía las plantas promueven diferentes mecanismos como forma de protección, entre ellos se señalan tres estrategias: 1) las que previenen de absorber una excesiva cantidad de luz, 2) los mecanismos por los cuales las plantas disipan energía y por último 3) aquellos mecanismos que permiten eliminar las ROS que se generan por el exceso de energía (Demmig-Adams y Adams, 1992).

1.2.1. Disminución de la absorción de luz

Bajo condiciones de deficiencia hídrica las plantas responden promoviendo cambios a nivel morfológico como lo constituyen el marchitamiento y el enrollamiento de hojas, lo que permite disminuir la radiación incidente sobre los cloroplastos (Ruiz-Sánchez *et al.*, 1997). Además, en condiciones de alta radiación, los contenidos de clorofilas en hojas de cítricos disminuyen comparado a situaciones de baja radiación (Schwanz *et al.*, 1996). Si bien estos mecanismos pueden ayudar a disminuir el daño en condiciones de estrés, especial atención se brindará a los mecanismos para disipar la energía y eliminar las ROS.

1.2.2. Sistema antioxidante

Bajo condiciones de estrés los mecanismos empleados para eliminar el exceso de energía incluyen entre otros la reacción de Mehler y la fotorrespiración, sin embargo, los mismos promueven incrementos de los niveles de O_2^- y H_2O_2 (Perl-Treves y Perl, 2002), mecanismos que ya se han mencionado en capítulos anteriores.

Varios compuestos antioxidantes y la actividad de varias enzimas han sido estudiadas por su efecto en contribuir a la resistencia de las plantas a condiciones ambientales desfavorables (Arbona *et al.*, 2008). En la mayoría de las situaciones, el sistema antioxidante de las plantas es capaz de remover eficientemente las ROS, manteniendo los niveles de estos a concentraciones basales (Mittler *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando se producen altas cantidades de H_2O_2 , cualquier reducción en el sistema antioxidante puede llevar a que se genere rápidamente daño oxidativo. En ciertos casos, el efecto oxidativo puede ser mediado por un descenso en la actividad antioxidante más que por un efecto en la acumulación de H_2O_2 (Neill *et al.*, 2002).

Una característica atribuida al sistema antioxidante es que su actividad varía incluso entre variedades, siendo entonces un factor clave en explicar las diferencias en el grado de tolerancia de las mismas ante similares condiciones de estrés (Bartoli, *et al.*, 1999).

1.2.2.1. Sistema enzimático

Las enzimas antioxidantes son capaces de actuar en diferentes compartimentos celulares frente a la acción de las ROS. Entre las principales enzimas se destacan la acción de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión reductasa (GR) (Foyer, 2002; Mittler *et al.*, 2004).

La acción de la SOD (SOD Cu/Zn) se considera como la primer defensa de la planta ante las presencia de ROS, catalizando la conversión de O_2^- generado en la reacción de Mehler a H_2O_2 (Reddy y Raghavendra, 2006). La APX posteriormente, es capaz de eliminar el H_2O_2 reduciendo el mismo a agua, vía el ciclo Asada-Halliwell, empleando al ácido ascórbico (AsA) como sustrato (Miller *et al.*, 2004). Bajo condiciones de estrés oxidativo el aumento de la actividad de APX en el tilacoide mantiene el contenido de AsA, el cual también juega un rol en la protección bajo dichas condiciones (Reddy y Raghavendra, 2006). La glutatión reductasa (GR) completa el ciclo Asada-Halliwell por la regeneración del pool de glutatión (GSH) con el NADPH como donador de electrones (Foyer *et al.*, 1994). El ciclo Asada-Halliwell entonces, juega un rol preponderante en eliminar el O_2^- y el H_2O_2 , cuando el glutatión reducido (GSH) dona un electrón regenerando AsA de su forma oxidada, el dehidroascorbato (DHA). La relación AsA/DHA y GSH/GSSG se optimiza en condiciones de estrés oxidativo para atenuar dicho efecto (Reddy y Raghavendra, 2006). Este proceso es conocido también como el ciclo agua-agua, ya que el mismo comienza con la fotooxidación del agua y finaliza con la reducción del H_2O_2 a H_2O en el estroma del cloroplasto (Asada, 1999).

En condiciones de estrés este mecanismo se ve imposibilitado de eliminar todas las ROS que se generan, por lo que ocurre la acumulación de H_2O_2 . En dichas condiciones puede ocurrir que los genes que codifican para las enzimas que descomponen las ROS en los cloroplastos no estén inducidas, llevando a una acumulación de éstas (Yabuta *et al.*, 2002). La acumulación de H_2O_2 es capaz de dañar el PSII (Kojima *et al.*, 2007) y por lo tanto se acelera la fotoinhibición (Nishiyama *et al.*, 2006; Takahashi y Murata, 2008). Se considera entonces que el balance entre la SOD y las diferentes enzimas que detoxifican el H_2O_2 es clave en determinar el nivel basal de O_2^- y H_2O_2 (Mittler *et al.*, 2004).

Las CAT por otra parte, son conocidas por su acción sobre la eliminación del H_2O_2 pero en este caso sobre el generado en el peroxisoma en el proceso de fotorrespiración (Reddy y Raghavendra, 2006).

1.2.2.2. Antioxidantes no enzimáticos

Dentro del sistema antioxidante no enzimático se destaca el AsA, quien previene del daño oxidativo provocado por las ROS (Davey *et al.*, 2002). En este sentido, se lo ha reportado por su capacidad de eliminar varias de las ROS, entre ellas el $^1\text{O}_2$, O_2^- y el OH (Padh, 1990). Además, el AsA juega un papel clave en la fotoprotección como cofactor en el ciclo de las xantofilas (Rivas *et al.*, 2010).

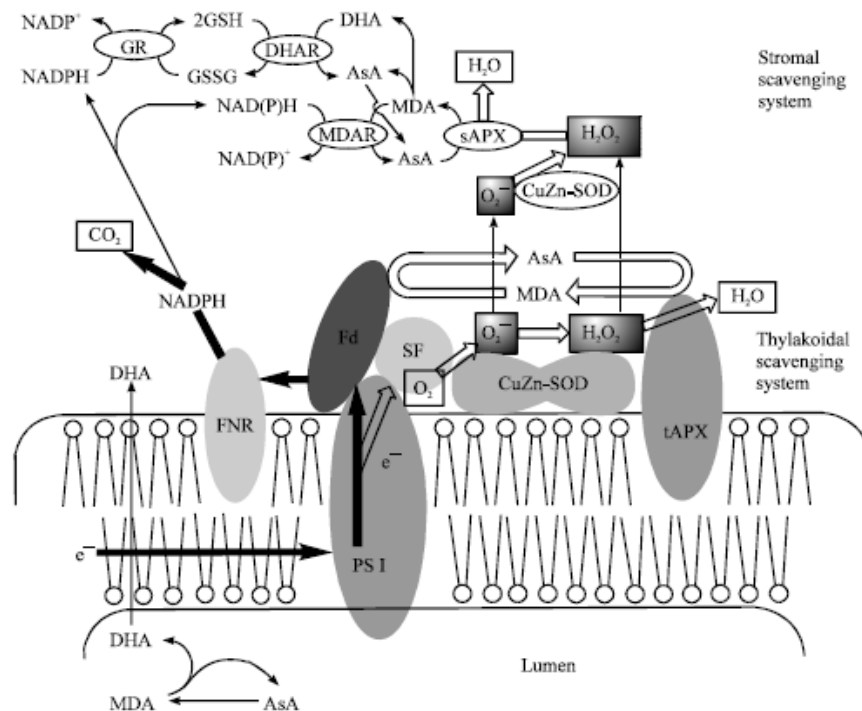


Figura 4. Mecanismo de reducción del oxígeno en agua en el ciclo Asada-Halliwell. El O_2^- es producido directamente en el PSI. El sistema antioxidante incluye en la membrana de los tilacoides la SOD Cu/Zn; APX; Fd (ferredoxina) la cual reduce el MDA directamente a AsA. En el estroma, también la SOD Cu/Zn y la APX; la MDAR, la DHAR (dehidroascorbato reductasa) y la GR (glutación reductasa). El NAD(P)H para la reducción de MDA o DHA es generado vía FNR (ferredoxina NADPC oxidoreductasa). El MDA es generado en el lumen por medio de la Violaxantina de-epoxidasa. Tomado de Asada (1999).

El GSH también juega un papel central en la eliminación del H₂O₂ generado en condiciones de estrés fotooxidativo. Además de su función en el ciclo Asada-Halliwell, donde junto al AsA y NADPH son capaces de eliminar el H₂O₂ (Reddy y Raghavendra, 2006), se lo ha identificado como antioxidante también en las mitocondrias, peroxisoma, citosol y núcleo (Noctor *et al.*, 2002). Las ROS inducen la producción de GSH por un aumento de la actividad de las enzimas asociadas a su biosíntesis, incrementando así la capacidad de eliminar las ROS por parte del ciclo Asada-Halliwell (Noctor *et al.*, 2002). Sin embargo, en ocasiones donde la respuesta al estrés es muy lenta o débil, el daño oxidativo actúa sobre el GSH, disminuyendo la capacidad de eliminación de las ROS (Reddy y Raghavendra, 2006).

1.2.2.3. Prolina

La Pro es un aminoácido al cual se le atribuyen numerosas funciones en situaciones de estrés abiótico, entre ellas la protección celular, especialmente bajo déficit hídrico. Dicha molécula forma parte de los conocidos osmolitos compatibles u osmoprotectores que ven favorecida su síntesis en estas condiciones. Dichos compuestos se caracterizan por alcanzar altas concentraciones sin afectar el funcionamiento de los procesos celulares (Rao, 2006).

La Pro es mencionada por su aporte en la tolerancia del estrés hídrico debido a su alta solubilidad en agua, lo que le permite “sustituir” a las moléculas de agua, (Akashi *et al.*, 2001) aumentando la presión osmótica dentro de las células (Delauney y Verma, 1993), ayudando por tanto a mantener la turgencia y el contenido de agua (Rao, 2006). Su constitución hidrofílica es la responsable de la protección de ácidos nucleicos, proteínas y membranas durante los déficits hídricos (Hoesktra *et al.*, 2001). Además, al deshidratarse las células y aumentar la concentración de iones, la Pro es capaz de prevenir la interacción de los iones con los componentes celulares, protegiendo por tanto contra la desestabilización de las moléculas (Rao, 2006).

Además se ha mencionado su capacidad de eliminar y proteger las células de las ROS (Akashi *et al.*, 2001). En este sentido, en plantas transformadas que acumulan mayores niveles de Pro se ha detectado menores concentraciones de ROS (Hong *et al.*, 2000). Por otro lado, empleando plantas transformadas que inducen la expresión constitutiva de la enzima P5CS en el portainjerto cítrico citrange Carrizo, se relacionó los mayores niveles de Pro con una mayor asimilación neta de CO₂ y menores descensos en la g_s en condiciones de deficiencia hídrica (Mollinari *et al.*, 2004).

1.2.3. Disipación térmica

El aparato fotosintético es capaz de responder rápidamente a variaciones en la cantidad y calidad de luz y a la disponibilidad de CO₂. Las respuestas pueden variar en su velocidad, destacándose las de corto plazo, las cuales implican la disipación de energía en forma de calor. La conversión de la energía lumínica a calor es conocido como NPQ (Ma *et al.*, 2003). Dicho proceso permite que la energía no quede disponible para el proceso fotoquímico, reduciendo el flujo de electrones por la cadena transportadora (Szabo *et al.*, 2005). Este mecanismo se basa en que la energía que es recibida en el cloroplasto puede seguir tres procesos, el fotoquímico, ser disipado como calor o ser re-emitida como luz fluorescente. Estos tres procesos son competitivos entre ellos, por lo que un cambio en alguno de ellos resulta en una variación en los otros (Maxwell y Johnson, 2000).

Incrementos en los niveles de NPQ son detectados en hojas en condiciones donde la energía lumínica excede a la que puede ser procesada por la fotosíntesis, suceso que ocurre comúnmente en condiciones de estrés hídrico, salino o alta intensidad lumínica (Golding y Johnson, 2003). El NPQ ha sido señalado como un proceso que es capaz de evitar el daño oxidativo (Demmig-Adams y Adams, 2002), por una disminución del exceso de energía. Así, se ha propuesto que el NPQ actúa

impidiendo la generación de ROS por disminuir la energía que es recibida en el LHC y disminuyendo por tanto la energía en el PSII (Niyishama *et al.*, 2006).

Este proceso además ha sido relacionado frecuentemente con el ciclo de las xantofilas. La alta relación encontrada entre el NPQ y el DPS en condiciones de estrés, disminuye los niveles de utilización de la energía en el proceso fotoquímico, reduciendo por tanto el daño oxidativo (Verhoeven *et al.*, 1997) y evitando así el daño del PSII (Demmig-Adams y Adams, 1996).

1.2.3.1. Carotenoides y ciclo de las Xantofilas

El complejo de la antena está conformado por diferentes pigmentos (clorofilas y carotenoides) que absorben la energía solar (Szabo *et al.*, 2005). Los carotenoides actúan como pigmentos cosechadores de luz, absorbiendo a longitudes de onda a las cuales las clorofilas son incapaces de absorber (Reddy y Raghavendra, 2006). La energía absorbida por los pigmentos es transferida a los centros de reacción donde posteriormente ocurre la transferencia de electrones desde el PSII hacia el PSI (Szabo *et al.*, 2005).

Además de absorber la energía, los carotenoides pueden jugar un rol en prevenir el daño oxidativo en condiciones de fotoinhibición. Se destaca que los mismos pueden prevenir la formación del $^1\text{O}_2$ y disipar el exceso de energía directamente por la eliminación del estado triplete de las clorofilas ($^3\text{Chla}^*$). Las $^3\text{Chla}^*$ se acumulan en condiciones de exceso de energía y transfiriendo esa energía al O_2 para la formación del $^1\text{O}_2$. Los carotenoides entonces pueden eliminar el $^3\text{Chla}^*$ evitando así la formación de ROS y protegiendo a las clorofilas de la fotooxidación (Demmig-Adams *et al.*, 1996; Miller, *et al.*, 1996; Szabo *et al.*, 2005). El proceso de absorción de energía desde el $^1\text{O}_2$ para producir carotenoides de triple estado (^3Car), es el principal mecanismo para la protección frente al daño oxidativo (Demmig-Adams *et al.*, 1996, Miller *et al.*, 1996).

Se señala además que dichos pigmentos modifican las propiedades físicas de las membranas fotosintéticas a través del ciclo de las xantofilas (Demmig-Adams y Adams, 1996). En el estado ^3Car se promueven cambios en la fluidez de la membrana, lo cual juega un rol fundamental en la de-epoxidación de Violaxantina (Viol) a Zeaxantina (Zeax) (Havaux y Niyogi, 1999).

El ciclo de las xantofilas (carotenoides oxigenados) se señala como un mecanismo eficiente en disipar energía en forma de calor cuando las clorofilas en la antena se encuentran en estado singülete ($^1\text{Chla}^*$). Dicho rol se lo ha atribuido especialmente a la Zeax (Szabo *et al.*, 2005). En condiciones de exceso de energía, el pH del lumen tilacoidal desciende hasta un umbral crítico, promoviendo la de-epoxidación de la Viol a Zeax, por medio de la enzimas Violaxantina de-epoxidasa (VDE) y Zeaxantina epoxidasa, en el proceso conocido como ciclo de las xantofilas. Este ciclo tiene como paso intermedio la formación de Antheraxantina (Ant) con el consumo de AsA (Havaux y Niyogi, 1999). Todos los carotenoides son capaces de disipar energía, pero solo aquellos que cuentan con 10 o más dobles enlaces de carbono conjugados tienen un nivel de energía lo suficientemente bajo como para aceptar energía de la $^1\text{Chla}^*$, pasando a formar un estado singülete excitado (S1) (Horton *et al.*, 1996; Polivka *et al.*, 2002). La capacidad de secuestrar energía está dada por una cadena de residuos de isopreno y los dobles enlaces conjugados con electrones deslocalizados en el orbital D, lo que le permite la fácil absorción de energía desde moléculas excitadas así como la disipación en forma de calor (Edreva, 2005). La presencia de un mayor número de dobles enlaces conjugados tanto en la Zeax y Ant (Figura 5), le proporciona una mayor eficiencia en la desexcitación del $^1\text{O}_2$ respecto a la V (Reddy y Raghavendra, 2006). La Zeax entonces es la xantofila más eficiente en disipar la energía, mientras que la Ant es solamente la mitad de efectiva (Taiz y Zieger, 2002). Se ha determinado que el estado S1 de la Zeax posee una vida media de 10 picosegundos, lo que permite una rápida disipación de la energía de excitación (Ma *et al.*, 2003).

Además, diferentes roles se han propuesto a la Zeax en su función de protección contra el daño oxidativo. En este sentido, se propone que la Zeax es capaz de inducir monomerización del LHCII, lo que puede llevar a un aumento en la fotoadaptación de largo plazo (Havaux *et al.*, 2004). Por otro lado se propone que provoca cambios conformacionales en las antenas, debido a que la Zeax induce a las clorofilas a ligarse con proteínas (CP26; CP29), lo que permite la pérdida de energía por el gradiente de pH entre ambos lados de la membrana tilacoidal (Horton y Ruban, 2005; Dall'Osto *et al.*, 2005).

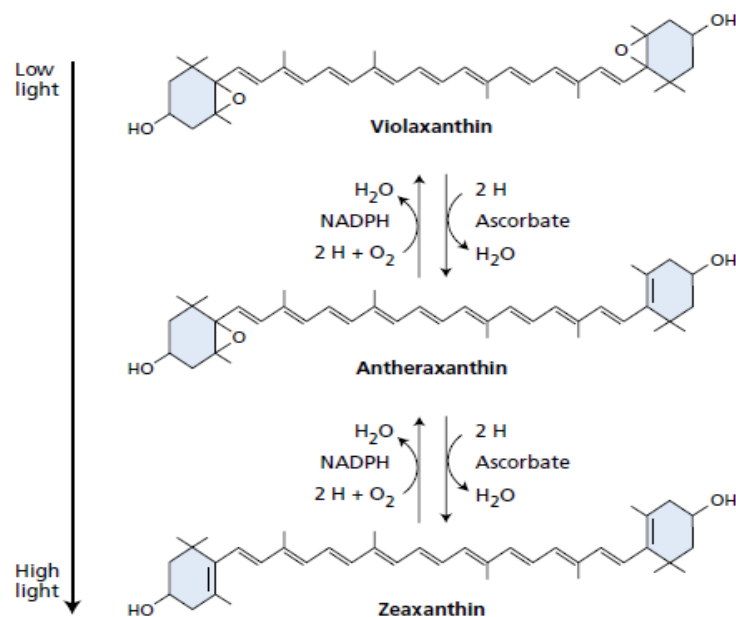


Figura 5. Xantofilas involucradas en el ciclo de las xantofilas. La Viol en condiciones de bajo pH en el lumen de los tilacoides es de-epoxidada a Ant y posteriormente a Zeax. Dichas reacciones están catalizadas por la Violaxantina de-epoxidasa y la Zeaxantina epoxidasa, ambas empleando el AsA como cofactor. Nótese el número de dobles enlaces conjugados. Tomado de Taiz y Zieger (2002).

Según lo expuesto anteriormente el DPS es empleado como un índice para indicar el rol de las xantofilas en la protección de la planta. El DPS es obtenido de la suma de la Zeax y la Ant sobre la suma de las tres xantofilas involucradas en el ciclo (Gilmore *et al.*, 1998).

En definitiva, la de-epoxidación de las xantofilas se ha reconocido como un mecanismo protector bajo diferentes condiciones de estrés ambiental, como el déficit hídrico (Demmig *et al.*, 1988). El incremento en los niveles de Zeax en condiciones de estrés puede ayudar a proteger a las clorofilas por una disminución del daño oxidativo. En este sentido se ha demostrado que las clorofilas son más tolerantes a las altas temperaturas cuando es inducida la de-epoxidación de las xantofilas (Havaux *et al.*, 1996). Además, si bien el ciclo de las xantofilas representa una disminución de la eficiencia del PSII, es un mecanismo que permite un balance entre la síntesis de ATP y NADPH con la tasa a la cual estos metabolitos son utilizados en la fotosíntesis (Noctor y Foyer, 2000). Sin embargo, la cantidad de energía que puede ser disipada por los diversos mecanismos con los cuales las xantofilas pueden actuar, varía entre otros, según la especie, la irradiancia y condiciones de crecimiento en las que esté expuesta la planta (Demmig-Adams y Adams, 1996).

1.2.4. Fotoinactivación

En condiciones de alta radiación puede ocurrir la pérdida de funcionalidad del PSII, en particular de la proteína D1 ubicada en el centro de reacción (proteína clave en el funcionamiento del aparato fotosintético). Dicha proteína está expuesta a un permanente recambio aún en condiciones óptimas para las plantas, por su constante degradación seguida de una eficiente síntesis (Aro *et al.*, 2005; Rao, 2006). La vida media de la misma es muy corta, perdiendo rápidamente su función en los centros de reacción (Anderson *et al.*, 1995).

Se señala además que este proceso de inactivación del PSII puede ser considerado un mecanismo de protección del aparato fotosintético lo que permite la aclimatación en situaciones de estrés (Anderson *et al.*, 1995; Krause, 1988). El continuo recambio de la proteína D1, la cual está bajo un estricto control del estado redox, funcionaría como un “fusible” el cual evita que el exceso de energía afecte a todo el aparato fotosintético, limitándose la planta a la reparación únicamente de dicha proteína (Nilsen y Orcutt, 1996). Al constituir un proceso que es reversible en

períodos acotados de tiempo (minutos a horas), se estima que puede ser un mecanismo controlado para la disipación de energía (Krause, 1998).

1.3. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO COMO MOLÉCULAS SEÑALIZADORAS

Como se mencionó anteriormente, las condiciones de estrés aumentan los niveles de ROS (Mittler *et al.*, 2004). Si bien es conocido el efecto del H₂O₂ como metabolito tóxico, recientemente se ha reportado su función como molécula señalizadora que actúa en respuestas específicas a varios estímulos, especialmente en condiciones de estrés (Zhang *et al.*, 2001; Uchida *et al.*, 2002; Mittler *et al.*, 2004). En dichas condiciones juega un rol clave en la aclimatación y defensa de la planta, actuando en numerosas vías metabólicas (Bienert *et al.*, 2006) por medio de la activación de enzimas y expresión de genes (Neill *et al.*, 2002). Entre los genes involucrados en la defensa de la planta se señalan aquellos vinculados con el sistema antioxidante, como la APX, CAT, GR, DHAR, y SOD (Gogorcena *et al.*, 1995). El H₂O₂ se vincula también con la activación de canales iónicos y de agua, la formación de solutos compatibles y la degradación de proteínas. Además regula la expresión de genes vinculados a varios procesos fisiológicos y de desarrollo (Neill *et al.*, 2002; Rao, 2006). En este sentido se sugiere que los niveles de H₂O₂ inducen la expresión y actividad de las diferentes proteínas y enzimas, siendo éstas las que modulan el desarrollo, metabolismo y la defensa de las plantas (Neill *et al.*, 2002; Mittler *et al.*, 2004). Recientemente además, se lo ha vinculado por inducir el cierre estomático en condiciones de déficit hídrico, mecanismo mediado por la acción del ABA (Desikan *et al.*, 2004). La intensidad y la duración del estrés influyen la intensidad, duración y localización de las diferentes señales inducidas por las ROS (Mittler *et al.*, 2004). Se sugiere además que la doble función atribuida al H₂O₂, tanto de producir daño oxidativo como actuar como molécula señalizadora, implica que la misma debe estar sujeta a una fuerte regulación entre su producción y metabolización, así como también en su distribución (Bienert *et al.*, 2006).

Ésta función es atribuida especialmente al H_2O_2 por su capacidad de difundir fácilmente a través de acuoporinas. Dada la similitud electroquímica y el tamaño de las moléculas de H_2O_2 y H_2O , se sugiere que dicho pasaje permite una rápida difusión del H_2O_2 entre diferentes compartimentos celulares, lo que es señalado por conferir una alta capacidad de promover cambios fisiológicos (Henzler y Steudle, 2000; Bienert *et al.*, 2006). Así es que por ejemplo, el H_2O_2 generado en los cloroplastos ha sido reportado como inductor de respuestas relacionadas a la tolerancia al estrés oxidativo fuera de dicho plastidio (Reddy y Raghavendra, 2006). También se ha reportado que un aumento en el nivel de H_2O_2 en el apoplasto es capaz de inducir la actividad antioxidante en los cloroplastos (Hu *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha señalado que el H_2O_2 posee una mayor estabilidad comparado a otras ROS, debido a su menor reactividad y mayor vida media (Bienert *et al.*, 2006).

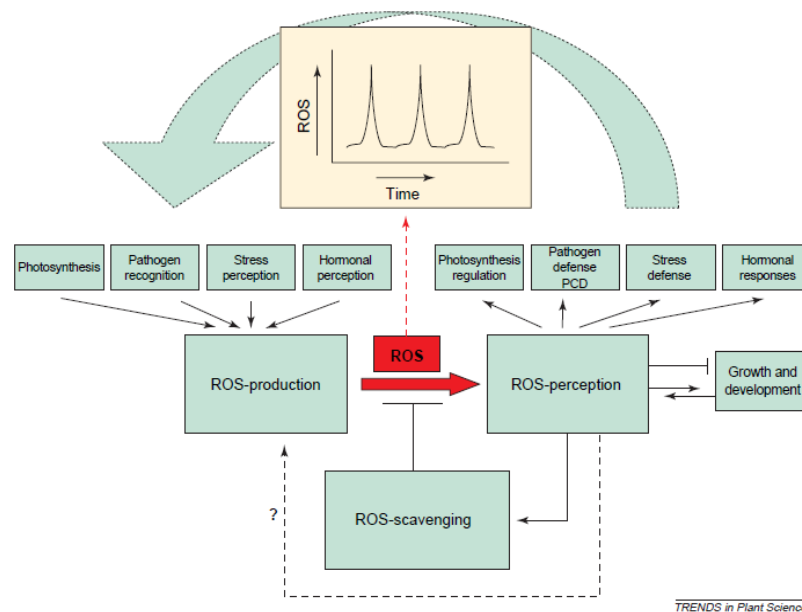


Figura 6. Mecanismo de acción de las especies reactivas del oxígeno como moléculas señalizadoras. Diferentes señales son disparadas en las plantas en respuesta a diversos factores como las condiciones de estrés, las cuales llevan a un aumento en los niveles de ROS. Dichos aumentos inducen al sistema antioxidante para el mantenimiento de los niveles basales de ROS. Además las ROS inducen diferentes respuestas hormonales y otras específicas del factor de estrés. La percepción del aumento en las ROS afecta además al crecimiento y desarrollo de las plantas. Tomado de Mittler *et al.* (2004).

1.4. EFECTO DE CONDICIONES DE ESTRÉS EN LOS CÍTRICOS

Como se ha señalado anteriormente, las condiciones de estrés hídrico inducen la floración en los cítricos (Nir *et al.*, 1972; Southwick y Davenport 1986; Nakajima *et al.*, 1993). De hecho, la intensidad y duración del estrés afecta al número de flores inducidas, siendo mayor el número de flores formadas al ser más severa la deficiencia hídrica (Souhtwick y Davenport, 1986).

Los cítricos bajo condiciones de déficit hídrico promueven diversos mecanismos para tolerar dicha situación. Primero se detecta el déficit hídrico en las raíces y desde dichos órganos se sintetizan y transportan señales hacia las hojas, siendo la principal señal el ABA. Bajo esas condiciones se induce el cierre estomático, el enrollamiento de las hojas y en casos severos la caída de las mismas (Gómez-Cadenas *et al.*, 1996; Ruiz-Sánchez *et al.*, 1997; Sauter *et al.*, 2002). Además, se ha reportado que bajo diversas condiciones de estrés abiótico, los cítricos ponen en funcionamiento otros mecanismos para evitar y tolerar las condiciones de estrés. Así se señalan entre otras, aumentos en los niveles de Pro, respuestas enzimáticas y no enzimáticas ante condiciones de estrés oxidativo (Rivas *et al.*, 2008), modificaciones del balance hormonal (Arbona y Gómez-Cadenas, 2008) y promover la de-epoxidación de las xantofilas (Rivas *et al.*, 2010).

A pesar de la similitud de respuestas que pueden ejercer las distintas variedades cítricas en condiciones de estrés, se sugieren diferencias varietales que pueden estar explicando los diferentes grados de tolerancia. La arquitectura de las plantas por ejemplo, ya sea por el menor ángulo de inserción de las hojas respecto a los brotes, las menores distancias entre las hojas, como una menor tasa de transpiración cuticular, pueden explicar la mayor tolerancia de la variedad 'Ellendale' respecto a las naranjas dulces sometidas a similares niveles de deficiencia hídrica (Savé *et al.*, 1995). Según los mismos autores, la canopia de las naranjas permite una mejor eficiencia en la absorción de la luz, mientras 'Ellendale' es más eficiente en la conservación de agua en condiciones de estrés hídrico.

Se ha señalado además que las distintas variedades cítricas responden de manera diferente ante similares condiciones de estrés (Agustí, 2003; Valiente y Albrigo, 2004). Estas diferencias por tanto podrían ser las responsables de las diferentes intensidades de floración registradas entre las variedades. En este sentido, las variedades poseen distinta capacidad de florecer, destacándose que ‘Ellendale’ es capaz de obtener profusas floraciones, que pueden alcanzar las 120 a 250 flores/100 nudos (Gravina *et al.*, 1997). En cambio ‘Valencia’ logra intensidades de floración menores a las registradas en híbridos como ‘Ellendale’, alcanzando floraciones de aproximadamente 110 flores/100 nudos (Gravina, 1999).

1.5 OBJETIVOS

En función de lo expuesto anteriormente se planteó como objetivo el estudio de la respuesta fisiológica y metabólica de dos variedades de cítricos bajo condiciones de estrés hídrico y su relación con la inducción floral.

1.5.1. Objetivos específicos

Específicamente se planteó:

1) determinar la influencia de tres condiciones hídricas sobre funcionamiento del aparato fotosintético, los niveles de daño oxidativo y la síntesis de compuestos relacionados con mecanismos de fotoprotección en cada condición hídrica.

2) relacionar el daño oxidativo y el H₂O₂ con la intensidad de floración obtenida luego de un período de rehidratación.

3) determinar cómo estos parámetros pueden explicar las diferencias reportadas en los niveles de floración entre ‘Ellendale’ y ‘Valencia’, dos variedades que presentan en campo diferentes intensidades de floración.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES EXPERIMENTALES

En la Estación Experimental INIA Salto Grande (Salto, Uruguay, 31° 16' S; 57° 53' O), dos variedades cítricas, naranja 'Valencia' (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) y tangor 'Ellendale' (*C. sinensis* (L.) Osb. x *C. reticulata* Bl.) de dos años de edad e injertados sobre el mismo portainjerto (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) fueron sometidas a tres regímenes de riego durante un período de 70 días con el fin de establecer los diferentes tratamientos (comenzando el 3 de febrero de 2010). Los mismos consistieron en el mantenimiento del potencial hídrico foliar (Ψ_w) previo al amanecer en los siguientes rangos: bien regado o control (BR): de -0,8 a -1,2 MPa; déficit hídrico moderado (DM) de -2,2 a -2,8 MPa y déficit hídrico severo (DS): < -4,0 MPa. Al final de dicho período, las plantas fueron rehidratadas (Ψ_w : -0,8 a -1,2 MPa) para permitir la brotación y floración. Los potenciales fueron determinados antes del amanecer por constituir la mejor forma de estimación de agua en las raíces (Jones, 1990). Las determinaciones del Ψ_w fueron realizadas con la cámara de presión (Scholander *et al.*, 1965). Las plantas se encontraban en macetas de 15 L en una mezcla de turba y arena 1:1 en volumen. Previo al inicio del ensayo, las plantas fueron mantenidas en iguales condiciones de manejo (riego, manejo sanitario, fertilización). Al comienzo de la imposición de los tratamientos (día 0), se suspendió la fertilización por el período de duración de los mismos, de forma de evitar la concentración de sales en plantas de los tratamientos con reducidos niveles hídricos. Las plantas fueron mantenidas en invernáculo bajo condiciones de radiación solar reducida (malla sombra negra 50%), alcanzando un PPF máximo de 850 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$, justo por encima del punto de saturación por luz en cítricos (Syvertsen, 1984), de forma de disminuir la fotoinhibición natural por exceso de radiación. La temperatura dentro del invernáculo fue registrada con un sensor Hobo® H8 Pro Temperature (Onset Computer Co, MA, EE.UU) cada 1 h, mientras que la radiación fue determinada con un sensor PAR Quantum Sensor type QS (Delta-T Devices, Ltda. R.U.) Para las determinaciones de las variables destructivas se realizaron muestreos

foliares en los días 28; 50 y 70 desde el comienzo de los tratamientos. Las muestras foliares fueron congeladas en nitrógeno líquido inmediatamente luego de la extracción y almacenadas a -40 °C hasta su análisis.

Al inicio del ensayo se seleccionó un grupo de plantas sobre las cuales se determinó las variables fisiológicas no destructivas (medidas de fluorescencia de clorofila *a* y g_s) y la brotación y floración una vez restablecidas las condiciones de buen riego. Las determinaciones fueron realizadas en 5 hojas adultas por planta, de un promedio de 6 meses de edad. Para evitar las posibles interferencias con las variables fisiológicas, en dichas plantas no se extrajo material vegetal.

2.2. DETERMINACIÓN DE LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA *a*

Se realizaron mediciones para la determinación de la fluorescencia de clorofila *a* con un fluorómetro de pulso de amplitud modulada OS5-FL (Opti-Science, Inc., Hudson, NH, EE.UU.). Para las evaluaciones del máximo rendimiento cuántico del PSII (F_v/F_m , donde F_v es la fluorescencia variable y F_m es la fluorescencia máxima), las determinaciones fueron realizadas periódicamente, en todos los casos previo al amanecer (adaptadas a la oscuridad), cuando todos los centros de reacción del PSII están abiertos. Para ello se ajustó un pulso de luz actínica saturante a una intensidad de $4000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ por 0,8 s. Para la determinación de la mínima fluorescencia de la clorofila *a* (F_o), se empleó un pulso débil de luz roja lejana a una intensidad $< 0,1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. La fluorescencia variable se calculó como la diferencia entre F_m y F_o . Las determinaciones del rendimiento cuántico del PSII en hojas adaptadas a la luz (Φ_{PSII}) fueron obtenidas según $\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_s)/F_m'$, donde F_m' y F_s corresponden a la máxima fluorescencia y la fluorescencia en estado estable respectivamente. La F_s fue determinada empleando un pulso de luz actínica de $400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, mientras que F_m' fue inducida con un pulso de luz actínica de $3000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de 1,0 s de duración. Para la evaluación del Φ_{PSII} se utilizaron las mismas 5 hojas por planta empleadas para la determinación de F_v/F_m , sobre las cuales se realizaron 4 medidas en cada hoja (dos en cada lado de la nervadura central). Las determinaciones Φ_{PSII}

fueron realizadas luego de un período de adaptación a la luz (entre las 9:30 y 10:30 h). A partir de los anteriores parámetros se cuantificó el exceso de energía que no puede ser empleado para el proceso fotoquímico y que es disipada en forma de calor (non-photochemical quenching, NPQ), mediante la fórmula $NPQ = (F_m/F_m') - 1$ (Genty *et al.*, 1989).

2.3. DETERMINACIONES DE LA CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA

Las mismas 5 hojas utilizadas para el análisis de fluorescencia fueron empleadas para la determinación de la g_s , la cual fue evaluada con un porómetro AP4 (Delta-T Devices, Cambridge, R.U.). Las medidas fueron realizadas entre las 9:30 y 11:00 en días despejados.

2.4. DETERMINACIONES DE CLOROFILAS Y CAROTENOIDES

Las determinaciones de los contenidos de pigmentos, clorofilas totales (clorofila *a* y clorofila *b*) y carotenoides fueron realizados en hojas extraídas en los días 0; 28; 50 y 70. Para la extracción de las clorofilas 75 mg de muestra fresca fueron macerados en 250 μ L acetona (80%), agregándose posteriormente otros 250 μ L acetona (80%). El extracto fue mantenido en hielo y centrifugado a $11.000 \times g$ dos veces durante 5 min a 4 °C. La concentración de las clorofilas fue estimada según Wellburn (1994), determinando para ello la absorbancia de los pigmentos con espectrofotómetro a diferentes longitud de onda; 663,2 nm para clorofila *a*; 646,8 nm para clorofila *b* y 470 nm para carotenoides.

2.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO RELATIVO DE AGUA

Para la determinación del RWC se extrajeron 5 hojas adultas por planta. El muestreo fue realizado entre las 8:00 y 8:30 h. Inmediatamente de recogidas las hojas, se les determinó el peso fresco (PF), posteriormente se mantuvieron durante 24 h en agua destilada en oscuridad para determinar el peso turgente (PT) y se

secaron en estufa por 48 horas a 70 °C para la determinación del peso seco (PS). El RWC fue determinado según la formula:

$$\text{RWC} = \frac{(\text{PF-PS})}{(\text{PT-PS})} \times 100$$

2.6. DETERMINACIÓN DE PROLINA Y AMINOÁCIDOS TOTALES

Para el análisis de Pro, 25 mg de muestra fueron macerados con 400 µL de MCA (metanol-cloroformo-agua: 12-5-1) y luego se agregó 400 µL de MCA por inversión. El homogeneizado se centrifugó a 5.000 x g durante 2 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue extraído y se le adicionó 200 µL de cloroformo, 300 µL de agua destilada y se centrifugó a 5.000 x g por 1 min. La fase superior se utilizó para la cuantificación de Pro (Troll y Lindsley, 1955), a la cual se le agregó 1 mL de ácido acético y 1 mL de reactivo ninhidrina ácida, consistente en una mezcla de H₃PO₄ 6,0 M; ácido acético 12,6 M y ninhidrina 0,14 M. Para que ocurra la reacción, se llevó a baño a 90 °C durante 1 h y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 6,0 mL de tolueno y se agitó vigorosamente durante 1 min. Se centrifugó a 2.000 x g por 1 min y la fase superior fue leída a una absorbancia de 515 nm. Como estándar se empleó Pro (Sigma Chemical, MO, EE.UU). Los datos se expresaron en µmoles. gr PF⁻¹.

Los aminoácidos se extrajeron según Izaguirre-Mayoral *et al.* (1992), macerando 30 mg de tejido en 0,5 mL de tampón fosfato potásico 10,0 mM pH 7,2/etanol 96° (1:1). El macerado se centrifugó a 5.000 x g durante 5 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se usó para la cuantificación de aminoácidos. Los aminoácidos totales se determinaron según Moore y Stein (1948). A 0,1 mL de muestra se le adicionaron 0,5 mL de tampón citrato-NaOH, 0,9 M pH 5,0; 0,5 mL ninhidrina, 53,8 mM disuelta en 2-metoxietanol (Cellosolve®) y AsA 2,0 mM. Las muestras se calentaron en baño de agua a 100 °C durante 25 min, se

dejaron enfriar y se agregó 3,0 mL de etanol 60%. La absorbancia se midió a 570 nm y como estándar se utilizó una solución de glutamato de sodio (Sigma Chemical, MO, EE.UU). La concentración de aminoácidos fue obtenida por la suma de la concentración a dicha absorbancia más la suma del contenido de Pro. Los datos se expresaron en $\mu\text{moles. gr PF}^{-1}$.

2.7. CUANTIFICACIÓN DE XANTOFILAS

Para la cuantificación de xantofilas se empleó el sobrenadante utilizado para la determinación de las clorofilas. Las muestras fueron filtradas con filtros de celulosa regenerada (poro de 0,45 μm y diámetro de 25 mm, Millipore) y almacenadas a -20 °C hasta su análisis por HPLC, según Bungard *et al.*, (1999). Dichos extractos fueron analizados en HPLC (Shimadzu®) con un *loop* de 20 μL usando una columna Ultra C18 (5 μm 250 x 4,6 mm, Restek®) para su elución y separación. Como fase móvil se utilizó acetonitrilo-metanol (85:15 v/v) a un flujo de 2 mL. min^{-1} , con una presión aproximada de 15 MPa. Los distintos pigmentos separados por la columna fueron detectados midiendo su absorbancia a 445 nm usando detector de arreglo de fotodiodo (Shimadzu®). Como estándar se utilizó Luteína (Lut) (Sigma Chemical, MO, EE.UU). Se obtuvo el contenido de xantofilas totales, así como el grado de de-epoxidación de los componentes del ciclo de las xantofilas (DPS), mediante el calculo de la siguiente relación: $(\text{Ant}+\text{Zeax})/(\text{Ant}+\text{Zeax}+\text{Viol})$.

2.8. DETERMINACIÓN DE PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

La peroxidación de lípidos fue determinada a través de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBars), según Minotti y Aust (1987). Se maceraron 100 mg de muestra fresca en 1,0 mL de ácido metafosfórico al 5% (p/v) y 20 μL de butil de hidroxitolueno (BHT) al 2% (p/v) disuelto en etanol. La muestra se centrifugó a 15.000 x g durante 10 min a 4 °C. Para el desarrollo del cromógeno se mezclaron 0.5 mL del sobrenadante con 50 μL de BHT al 2%, 250 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1% (p/v) disuelto en NaOH 50 mM y 250 μL de HCl al 25%

(v/v). La mezcla incubó a 95 °C durante 30 min. Para la cuantificación de los TBars el cromógeno fue extraído agregando 1,5 mL de 1-butanol. La mezcla fue agitada vigorosamente y centrifugada a 2.000 x g durante 1 min. Se determinó la absorbancia a 532 nm y se restó la absorbancia inespecífica a 600 nm. La peroxidación de lípidos se expresó como la cantidad de TBars formado, utilizando un coeficiente de extinción (E) de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.9. DETERMINACIÓN *IN SITU* DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

La detección *in situ* de H_2O_2 se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Thordal-Christensen et al., (1997) con modificaciones. Se infiltraron láminas foliares en vacío con tampón fosfato potásico 10 mM pH 7,8; NaN_3 10 mM y 0,1% (p/v) de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) durante 5 min. Se incubaron en oscuridad por 12 h y luego se clarificaron con ácido tricloroacético 0,15% en etanol:cloroformo 4:1 (v/v) durante 48 h antes de ser fotografiadas.

2.10. EVALUACIÓN DE LA BROTAÇÃO

Luego del día 70 de tratamiento, 5 plantas de cada tratamiento fueron sometidas a un régimen de BR para permitir la brotación y floración. En la brotación se cuantificó el número de nudos y la cantidad de yemas que brotaron en toda la planta. En el caso de brotes reproductivos se cuantificó además el número de flores formadas. Con estos datos se determinó el porcentaje de brotación como:

$$\% \text{ Br} = \frac{\text{Número de nudos brotados}}{\text{Número de nudos totales}} \times 100$$

la intensidad de floración como:

$$\text{Fl/nudos} = \frac{\text{Número de flores totales}}{\text{Número de nudos totales}} \times 100$$

y la brotación según tipo de brotes como:

$$\text{TBr/nudos} = \frac{\text{Número de nudos brotados por tipo de brotes}}{\text{Número de nudos totales}} \times 100$$

Para evaluación de la floración se consideraron brotes reproductivos y vegetativos. Los diferentes tipos de brotes reproductivos fueron: inflorescencias, solitarios, mixtos y terminales (Gravina, 1999). Los dos primeros presentan solo flores, mientras que los últimos poseen hojas junto con flor. Además, las inflorescencias y mixtos forman parte de los brotes con más de una flor, mientras que los brotes solitarios y terminales poseen una flor en el brote.

2.11. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental consistió en el empleo de 20 plantas por tratamiento distribuidas en un diseño completo al azar dentro de cada variedad. En cada fecha de muestreo se utilizaron 5 repeticiones (plantas) por tratamiento y por variedad. Del total de plantas, 15 fueron empleadas para los muestreos en las fechas mencionadas (días 28; 50 y 70), mientras las 5 restantes fueron rehidratadas luego de los 70 días desde el comienzo de los tratamientos. Además, 5 plantas por variedad fueron empleadas para el muestreo de hojas al comienzo de los tratamientos (día 0). Para la evaluación de los efectos de los tratamientos se realizó un análisis de la varianza (ANOVA), comparando las diferencias de medias mediante el test de Tukey ($p \leq 0,05$), asumiendo una distribución normal para todas las variables estudiadas.

3. RESULTADOS

3.1. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA Y CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA

Los Ψ_w propuestos para los diferentes tratamientos fueron alcanzados en los días 6 y 10 en DM y DS respectivamente, desde que se privó el suministro de agua. En lo que refiere al RWC, el tratamiento DS de ambas variedades disminuyó tanto respecto a las plantas BR como a las DM (Figura 7 A, B). Las plantas bajo BR y DM no presentaron diferencias entre ellas en la mayoría de las fechas de muestreo, logrando valores cercanos al 90% en todos los casos.

Por su parte, la g_s disminuyó en el tratamiento DS de ambas variedades respecto a las plantas BR y DM. Luego de establecidas las diferencias, aproximadamente desde el día 20, las mismas se mantuvieron hasta el fin del período de tratamientos (día 70). Las plantas DS registraron niveles de g_s menores a 20 $\text{mmol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, mientras que el tratamiento DM presentó registros similares a las plantas control (Figura 7 C, D).

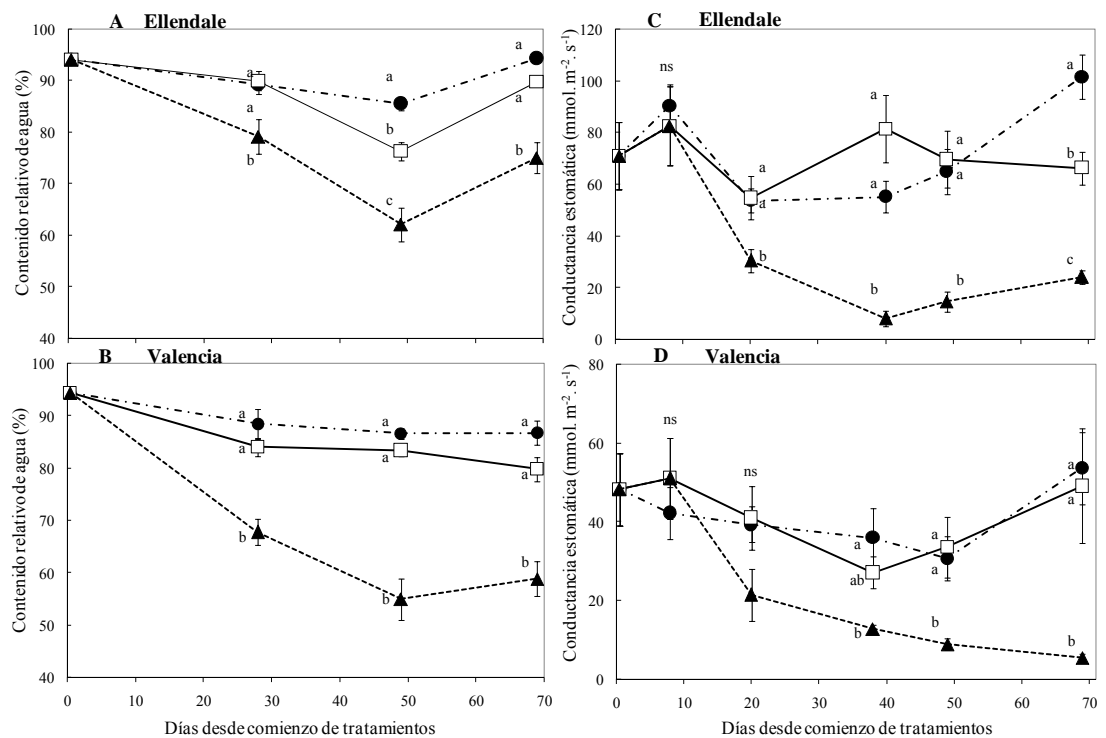


Figura 7. Contenido relativo de agua (RWC) en ‘Ellendale’ (A) y ‘Valencia’ (B) y conductancia estomática (g_s) en $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ en ‘Ellendale’ (C) y ‘Valencia’ (D) en tres condiciones de disponibilidad de agua; bien regado (Ψ_w : -0,8 a -1,2 MPa) (●), déficit hídrico moderado (Ψ_w : -2,2 a -2,8 MPa) (□), y déficit hídrico severo (Ψ_w : < -4,0 MPa) (▲). Cada punto corresponde a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas en una misma fecha difieren significativamente entre sí (Test de Tukey; $p \leq 0,05$). ns= sin diferencias estadísticas.

3.2. FLUORESCENCIA DE CLOROFILAS

3.2.1. Máxima eficiencia fotosintética

La máxima eficiencia del proceso fotoquímico es presentado por la relación F_v/F_m en la figura 8 (A, B). En ambas variedades el tratamiento con DS disminuyó la eficiencia en el proceso de la fotosíntesis respecto a las plantas sin estrés a partir de los 40 a 50 días desde el comienzo de la aplicación de los tratamientos. Las plantas

bajo DM presentaron iguales valores respecto al tratamiento control durante todo el período y en ambas variedades.

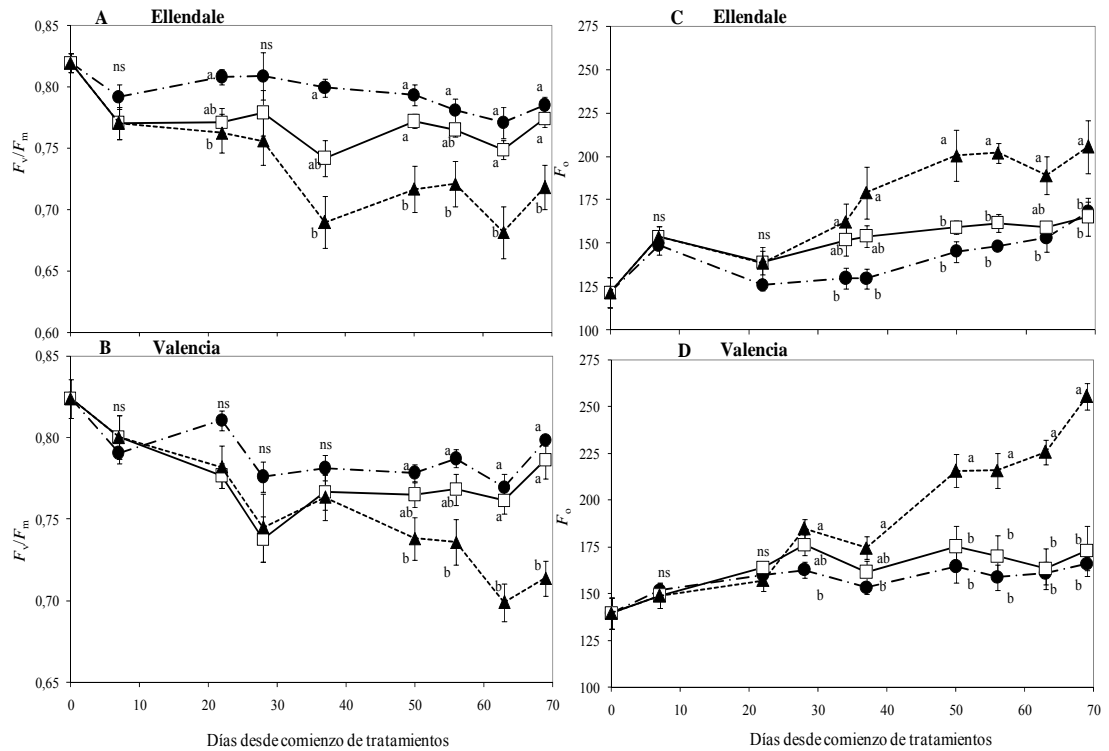


Figura 8. Máxima eficiencia fotosintética (F_v/F_m) en hojas adaptadas a la oscuridad en 'Ellendale' (A) y 'Valencia' (B) y fluorescencia basal de las clorofilas (F_o) en 'Ellendale' (C) y 'Valencia' (D) en tres condiciones de disponibilidad de agua; bien regado (Ψ_w : -0,8 a -1,2 MPa) (●), déficit hídrico moderado (Ψ_w : -2,2 a -2,8 MPa) (□) y déficit hídrico severo (Ψ_w : < -4,0 MPa) (▲). Cada punto corresponde a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas en una misma fecha difieren significativamente entre sí (Test de Tukey; $p \leq 0,05$). ns= sin diferencias estadísticas.

Por su parte, la F_o evidenció similares tendencias entre los tratamientos de cada variedad. Así, aumentos en F_o se registraron en las plantas DS respecto a las plantas BR aproximadamente a partir de los 30 días desde inicio de los tratamientos. Por otro lado, las plantas de los tratamientos DM y BR no se diferenciaron en ambas variedades (Figura 8 C, D).

3.2.2. Eficiencia cuántica del fotosistema II

Para la Φ_{PSII} los resultados son similares a los evidenciados en los anteriores parámetros de fluorescencia, registrando un descenso en el tratamiento DS luego de 30 días de comenzado los tratamientos en ‘Ellendale’ y 40 días en ‘Valencia’ (Figura 9 A, B). En las plantas bajo DM no se registraron diferencias respecto a las plantas BR, así como tampoco a las plantas bajo DS, permaneciendo en valores intermedios entre ambos tratamientos.

Al considerar la evolución diaria del Φ_{PSII} durante un día soleado y sobre el final del período de imposición de los tratamientos (día 60), se observó un marcado descenso de este parámetro en las horas con mayores niveles de radiación en todas las condiciones hídricas de las dos variedades, restableciéndose los valores sobre horas de la tarde. A pesar de este comportamiento común entre los tratamientos, se detectaron diferencias entre ellos. Las plantas con DS disminuyeron el Φ_{PSII} respecto a las plantas control a lo largo de toda la jornada en las dos variedades. Se destaca además, que aún en las horas sin radiación, temprano en la mañana y durante la tarde, el tratamiento DS no es capaz de igualar los valores del tratamiento control. En el caso de las plantas con DM en cambio, los valores de Φ_{PSII} obtenidos no se diferenciaron del tratamiento control durante toda la jornada, sin embargo, en las horas con mayor radiación, el descenso registrado llevó a que este tratamiento tampoco se diferenciara del DS (Figura 9 C, D).

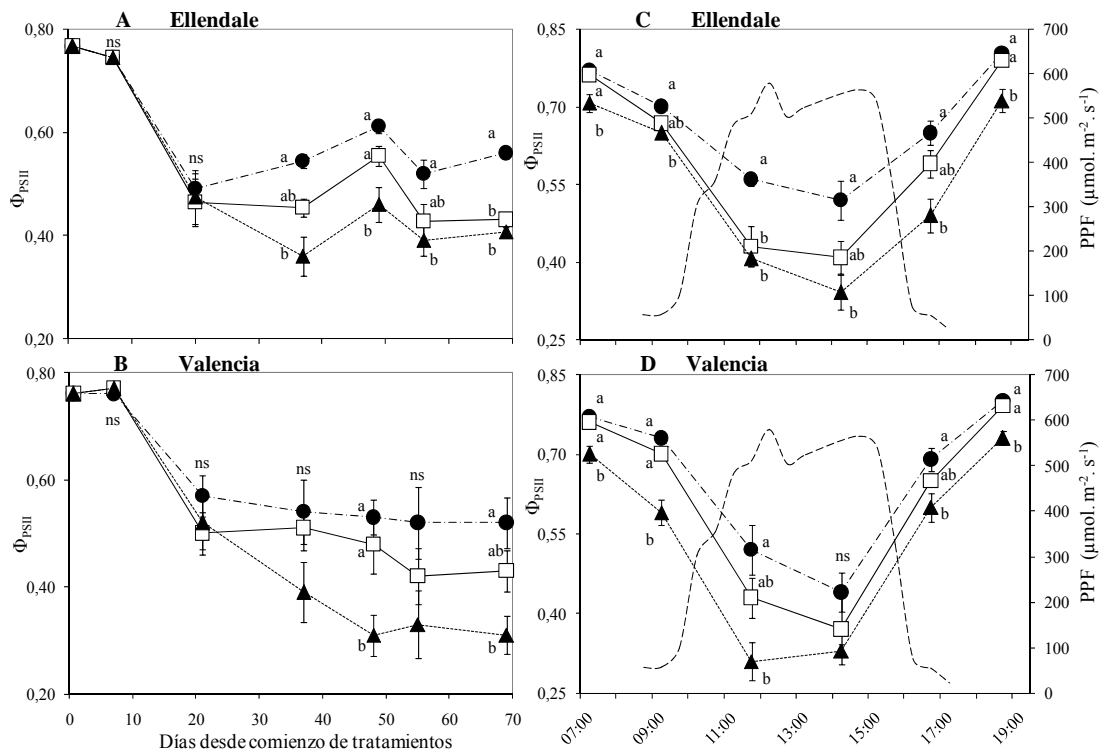


Figura 9. Eficiencia cuántica del fotosistema II (Φ_{PSII}) en hojas adaptadas a luz (mediciones entre 10:00 y 11:30 hrs.) en ‘Ellendale’ (A) y ‘Valencia’ (B) y eficiencia cuántica del fotosistema II (Φ_{PSII}) diaria en hojas adaptadas a luz en ‘Ellendale’ (C) y ‘Valencia’ (D) en tres condiciones de disponibilidad de agua; bien regado (Ψ_w : -0,8 a -1,2 MPa) (●), déficit hídrico moderado (Ψ_w : -2,2 a -2,8 MPa) (□) y déficit hídrico severo (Ψ_w : < -4,0 MPa) (▲). C y D presentan en línea punteada (- -) densidad de flujo de fotones (PPF). Cada punto corresponde a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas en una misma fecha difieren significativamente entre sí (Test de Tukey; $p \leq 0,05$). ns= sin diferencias estadísticas.

3.2.3. Quenching no fotoquímico

En lo que refiere al parámetro NPQ, en ambas variedades solo se registraron diferencias sobre el fin del período de tratamientos. En ‘Ellendale’ el tratamiento DS aumentó los valores de NPQ en la última fecha de evaluación, mientras que en ‘Valencia’ las diferencias entre DS y el tratamiento control fueron apreciables desde los 50 días desde el comienzo de los mismos. En el caso del tratamiento DM, no se

registraron diferencias respecto al tratamiento control en ninguna de las fechas de evaluación en ninguna variedad (Figura 10).

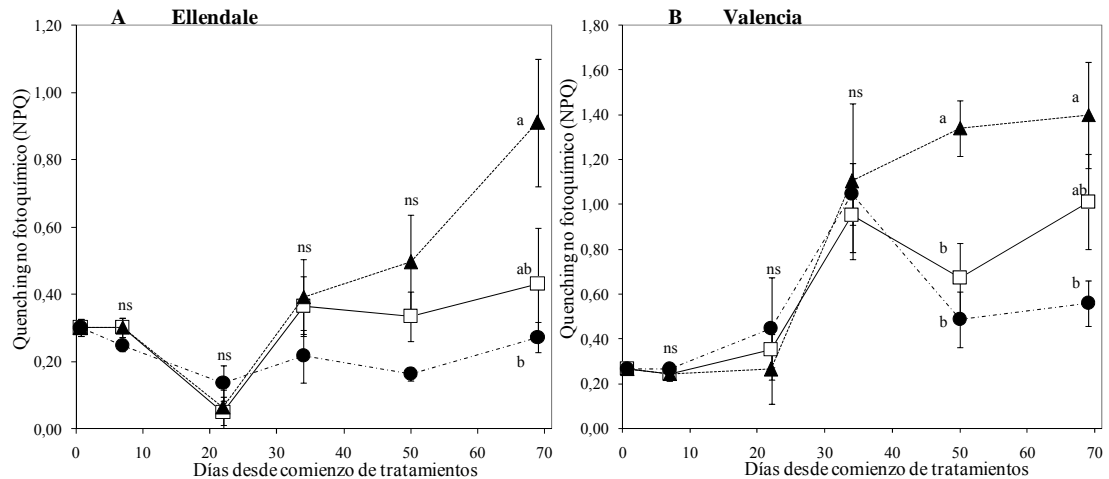


Figura 10. Quenching no fotoquímico (NPQ) en ‘Ellendale’ (A) y ‘Valencia’ (B) en tres condiciones de disponibilidad de agua; bien regado (Ψ_w : -0,8 a -1,2 MPa) (●), déficit hídrico moderado (Ψ_w : -2,2 a -2,8 MPa) (□) y déficit hídrico severo (Ψ_w : < -4,0 MPa) (▲). Cada punto corresponde a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas en una misma fecha difieren significativamente entre sí (Test de Tukey; $p \leq 0,05$). ns= sin diferencias estadísticas.

3.3. CONTENIDO DE PROLINA

Aumentos en los contenidos de Pro fueron registrados como consecuencia del DS en ambas variedades respecto a las plantas sin estrés. En dicho tratamiento la concentración obtenida al final del período de estrés fue aproximadamente 5 veces mayor que al comienzo de los tratamientos (145 vs 30 $\mu\text{moles. gr PF}^{-1}$ en ‘Valencia’ y 167 vs 32 $\mu\text{moles. gr PF}^{-1}$ en ‘Ellendale’) y 2,5 veces mayor (65 y 60 $\mu\text{moles. gr PF}^{-1}$ en ‘Valencia’ y ‘Ellendale’, respectivamente) al contenido en las plantas sin estrés en la misma fecha (día 70). En lo que refiere al tratamiento DM, en la mayoría de los momentos de evaluación no se registraron diferencias respecto al tratamiento BR. Además, los contenidos fueron siempre menores a los registrados en las plantas DS (Fig. 11 A, B). Por otro lado, se registró un aumento en el contenido de Pro en el tratamiento sin estrés durante el período de estudio, siendo también verificable por la

relación Pro/AA. En este sentido, los aumentos en las plantas BR fueron moderados pero constantes durante el período de tratamientos, lo que permitió que en ambas variedades la relación Pro/AA fuera el doble al final del período de tratamientos respecto al día inicial (Fig. 11 C, D). También se apreciaron aumentos en la relación Pro/AA en el tratamiento DS de ambas variedades respecto a las plantas BR, alcanzando sobre el día 70 de tratamientos valores promedio superiores de 25,8 % y 28,9 % en ‘Ellendale’ y ‘Valencia’ respectivamente.

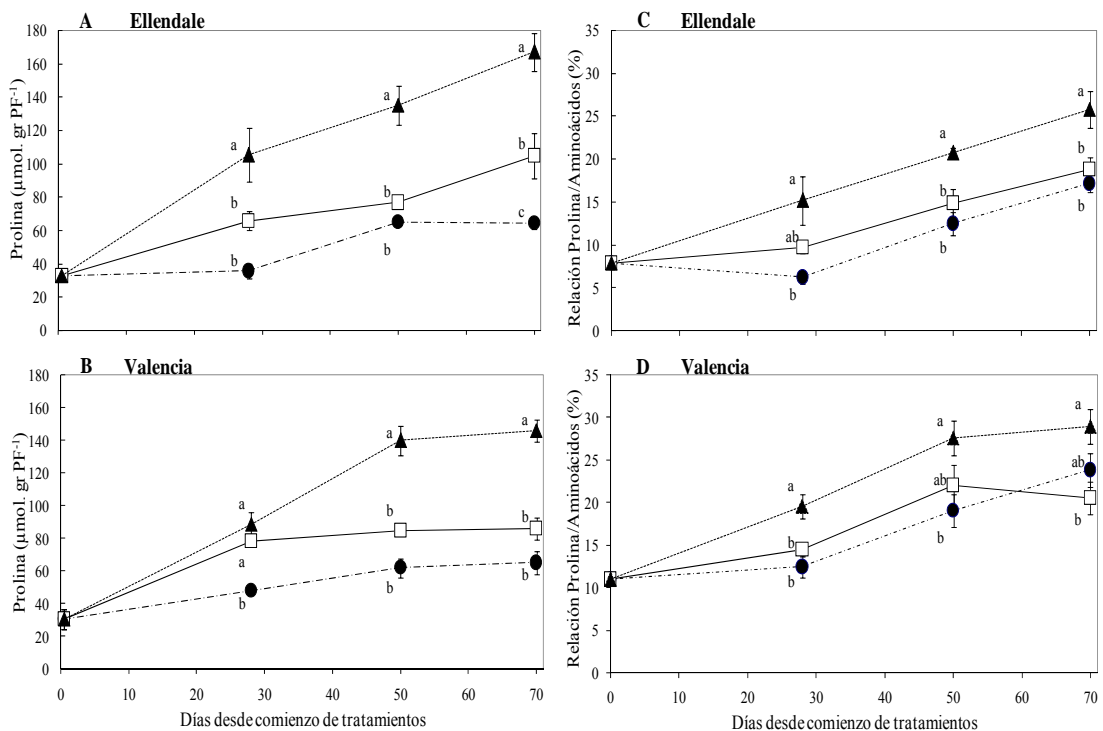


Figura 11. Contenido de prolina ($\mu\text{mol. gr PF}^{-1}$) en ‘Ellendale’ (A) y ‘Valencia’ (B) y relación prolina/aminoácidos (Pro/AA) en ‘Ellendale’ (C) y ‘Valencia’ (D) en tres condiciones de disponibilidad de agua; bien regado (Ψ_w : -0,8 a -1,2 MPa) (\bullet), déficit hídrico moderado (Ψ_w : -2,2 a -2,8 MPa) (\square), y déficit hídrico severo (Ψ_w : < -4,0 MPa) (\blacktriangle). Cada punto corresponde a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas en una misma fecha difieren significativamente entre sí (Test de Tukey; $p \leq 0,05$). ns= sin diferencias estadísticas.

3.4. CONTENIDO DE PIGMENTOS

En la mayoría de las fechas analizadas se registró un descenso en los niveles de clorofilas *a*, *b*, clorofilas totales y carotenoides totales en ambas variedades en las plantas bajo DS comparado a las plantas sin estrés. En cuanto al tratamiento DM en ‘Ellendale’, el contenido de clorofilas fue superior al DS e iguales a las plantas BR hasta el día 50. Posteriormente los contenidos de cada uno de los pigmentos en este tratamiento disminuyeron, siendo en el día 70 iguales a los contenidos registrados por el tratamiento DS y menores a las plantas sin estrés (Figura 12 A, B, C, D). En el caso de ‘Valencia’, el tratamiento DM presentó en general valores intermedios entre los tratamientos BR y DS hasta los 50 días desde comienzo de los tratamientos. Posteriormente, al igual que en el caso de ‘Ellendale’, disminuyeron, lo que llevó a que se registraran menores contenidos respecto al control (Figura 12 E, F, G, H).

A diferencia de ‘Ellendale’, en ‘Valencia’ no existieron diferencias en los niveles de pigmentos entre los tratamientos DM y DS a excepción de lo ocurrido con los carotenoides, en donde el tratamiento DS registró un descenso significativo respecto a DM. Dicha situación ocurrió hasta los 50 días de comenzado el ensayo.

Por otra parte, los niveles de clorofila *a/b* no fueron modificados entre los tratamientos en el caso de ‘Ellendale’, mientras que para ‘Valencia’, dichos niveles disminuyeron ($p \leq 0,05$) en el tratamiento DS respecto a las plantas control (2,01 vs 1,72 mg. gr PF⁻¹, en DS y BR respectivamente) hacia el fin del período de tratamientos (día 70). El tratamiento DM por su parte, permaneció con relaciones similares respecto a las plantas sin estrés (datos sin presentar).

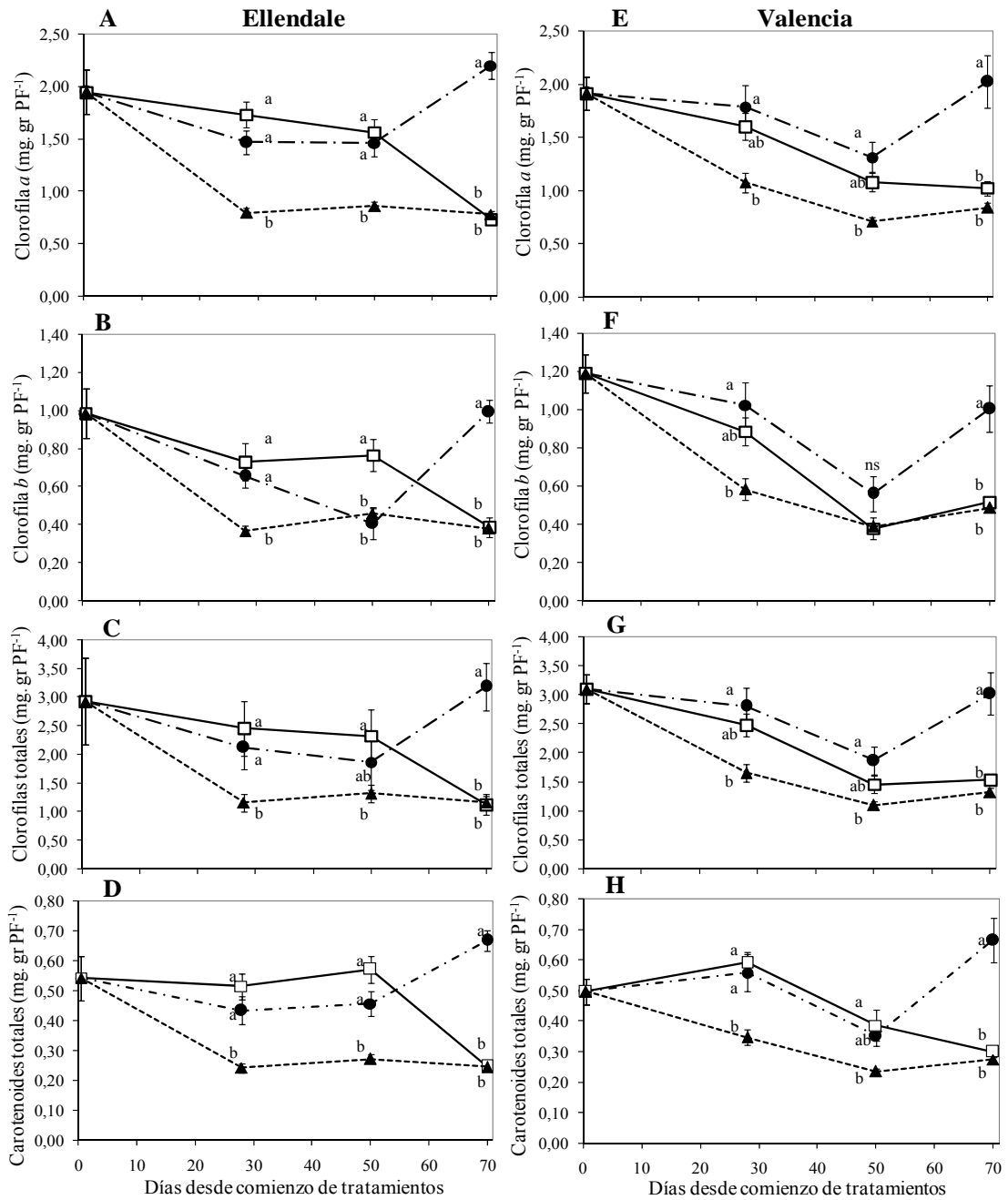


Figura 12. Contenido de clorofila *a* (A, E), clorofila *b* (B, F), clorofilas totales (C, G) y carotenoides totales (D, H) expresados en mg. gr PF⁻¹, en ‘Ellendale’ y ‘Valencia’ respectivamente, en tres condiciones de disponibilidad de agua; bien regado (Ψ_w : -0,8 a -1,2 MPa) (●), déficit hídrico moderado (Ψ_w : -2,2 a -2,8 MPa) (□), y déficit hídrico severo (Ψ_w : < -4,0 MPa) (▲). Cada punto corresponde a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas en una misma fecha difieren significativamente entre sí (Test de Tukey; $p \leq 0,05$). ns= sin diferencias estadísticas.

La relación carotenoides totales sobre el contenido total de clorofilas no sufrió modificaciones en la variedad ‘Ellendale’ en los diferentes tratamientos, a excepción del tratamiento DS en el día 50, donde disminuyó respecto al control. En ‘Valencia’, dicha relación aumentó significativamente en las plantas bajo DM respecto a las plantas BR hasta el día 50. Posteriormente disminuyó respecto a las plantas BR. En cambio, el tratamiento DS siempre presentó similares valores respecto al control (Figura 13 A, B).

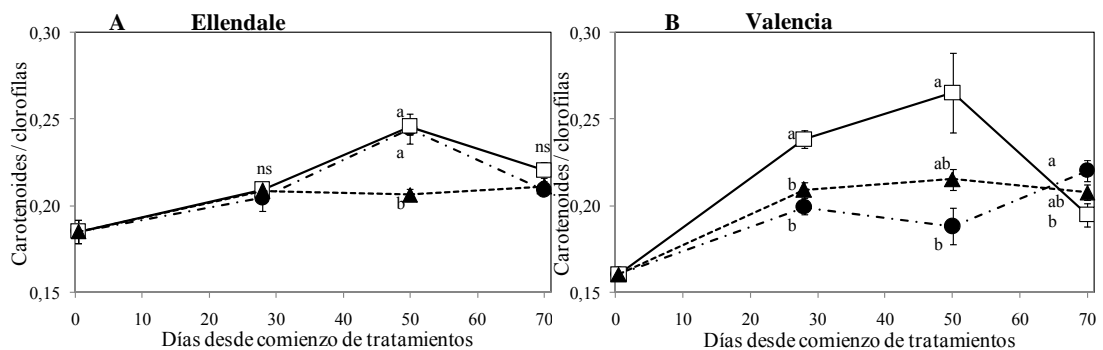


Figura 13. Relación entre el contenido de carotenoides/clorofilas totales en ‘Ellendale’ (A) y ‘Valencia’ (B) en tres condiciones de disponibilidad de agua; bien regado (Ψ_w : -0,8 a -1,2 MPa) (●), déficit hídrico moderado (Ψ_w : -2,2 a -2,8 MPa) (□), y déficit hídrico severo (Ψ_w : < -4,0 MPa) (▲). Cada punto corresponde a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas en una misma fecha difieren significativamente entre sí (Test de Tukey; $p \leq 0,05$). ns= sin diferencias estadísticas.

3.5. CONTENIDO DE XANTOFILAS

El contenido de xantofilas totales (Viol+Zeax+Ant+Lut+Neox) (Neoxantina (Neox)) no fue modificado por las condiciones hídricas de los tratamientos en ninguna de las variedades, ni tampoco se verificaron diferencias en el contenido de las xantofilas involucradas en el ciclo de las xantofilas (Zeax+Ant+Viol; $p \leq 0,05$, datos sin presentar). Sin embargo, se detectaron diferencias en el DPS y diferencias entre variedades. En ‘Ellendale’, se verificó un aumento en la relación de depoxidación en los dos tratamientos de déficit hídrico. El aumento de las xantofilas

de-epoxidadas (Ant+Zeax) fue superior durante todo el período de tratamientos en estas condiciones. En cambio, en la variedad ‘Valencia’ solo se registraron diferencias en el tratamiento DM luego de los 50 días de comenzado los tratamientos (Figura 14 A, B). En este caso, los niveles de Ant+Zeax llegaron a representar el 90 % del contenido de las xantofilas que juegan un rol fotoprotector en el ciclo de las xantofilas (Ant+Zeax+Viol).

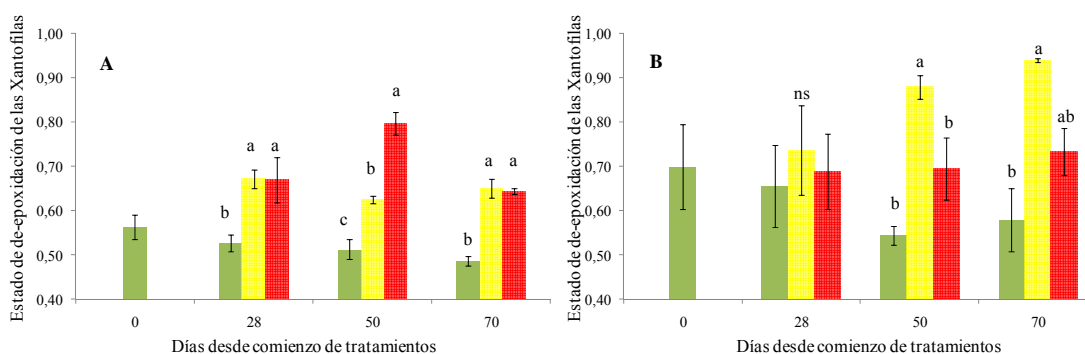


Figura 14. Estado de de-epoxidación del ciclo de las xantofilas (Ant+Zeax)/(Ant+Zeax+Viol) en ‘Ellendale’ (A) y ‘Valencia’ (B), en tres condiciones de disponibilidad de agua; bien regado (Ψ_w : -0,8 a -1,2 MPa) (verde), déficit hídrico moderado (Ψ_w : -2,2 a -2,8 MPa) (amarillo) y déficit hídrico severo (Ψ_w : < -4,0 MPa) (rojo). Cada barra corresponde a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas en una misma fecha difieren significativamente entre sí (Test de Tukey; $p \leq 0,05$). ns= sin diferencias estadísticas.

3.6. DAÑO OXIDATIVO

La evidencia de daño oxidativo registrada por el contenido de sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBars) presentó similares comportamientos entre los tratamientos de cada variedad. El daño oxidativo en los tratamientos DS aumentó respecto a las plantas sin estrés en las dos variedades, mientras que las plantas con DM presentaron en general valores intermedios entre las plantas con DS y las control. Por otro lado se destacan los aumentos en el contenido de TBars

evidenciados por los tratamientos sin estrés en ambas variedades conforme avanzaba los días desde el comienzo de los tratamientos (Figura 15 A, B).

Por otro lado, se destacan mayores niveles de daño en la variedad ‘Valencia’ respecto a ‘Ellendale’ cuando se comparan los mismos tratamientos en las mismas fechas de muestreo. Así, el nivel de daño entre el tratamiento DS de ‘Valencia’ fue 25 % superior al tratamiento DS de ‘Ellendale’ en todas las fechas. En el caso de los tratamientos BR, el nivel de daño en ‘Valencia’ fue entre 10 a 30 % superior respecto al tratamiento BR de ‘Ellendale’ durante el período de tratamientos.

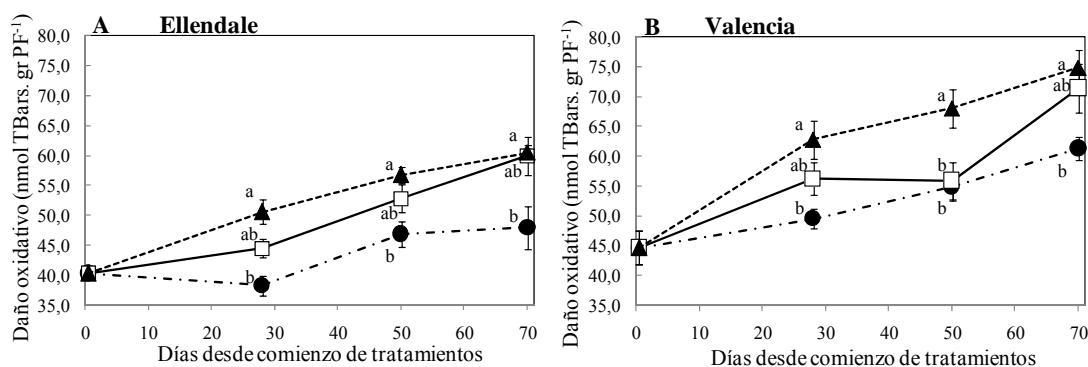


Figura 15. Daño oxidativo (expresado como nmol TBARS. gr PF⁻¹) en ‘Ellendale’ (A) y ‘Valencia’ (B) en tres condiciones de disponibilidad de agua; bien regado (Ψ_w : -0,8 a -1,2 MPa) (●), déficit hídrico moderado (Ψ_w : -2,2 a -2,8 MPa) (□) y déficit hídrico severo (Ψ_w : <-4,0 MPa) (▲). Cada punto corresponde a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas en una misma fecha difieren significativamente entre sí (Test de Tukey; $p \leq 0,05$).

3.7. PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

La condición DS en las plantas aumentó significativamente los niveles de H₂O₂ en ambas variedades comparado a los tratamientos BR, según lo visualizado en la tinción con DAB (Figura 16 y 17). Dichos aumentos se hacen visibles luego de 50 y 70 días desde comenzado el período de tratamientos. Para el caso de los tratamientos DM y BR de ambas variedades, no se visualizaron diferencias entre

ellos en ninguna de las fechas analizadas, con excepción de las plantas DM el día 70. Si bien la técnica empleada no permite cuantificar los niveles de H_2O_2 , la estimación por esta técnica verifica un mayor nivel de tinción en el tratamiento DS de ‘Valencia’ comparado al mismo tratamiento de ‘Ellendale’.

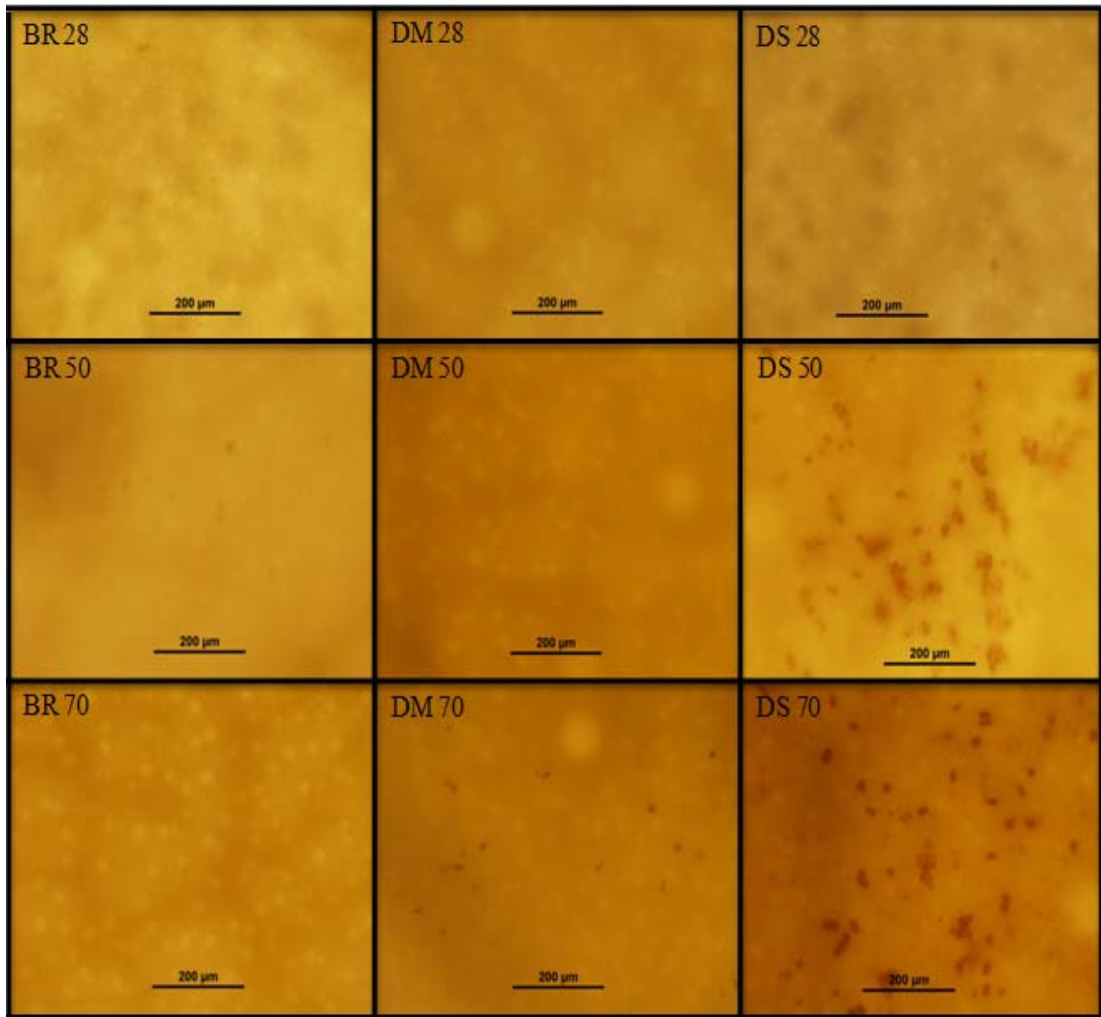


Figura 16. Determinación de H_2O_2 *in situ* en hojas de ‘Valencia’ en tres condiciones de disponibilidad de agua; BR: bien regado (Ψ_w : -0,8 a -1,2 MPa), DM: déficit hídrico moderado (Ψ_w : -2,2 a -2,8 MPa) y DS: déficit hídrico severo (Ψ_w : <-4,0 MPa), en los días 28; 50 y 70 desde inicio de los tratamientos.

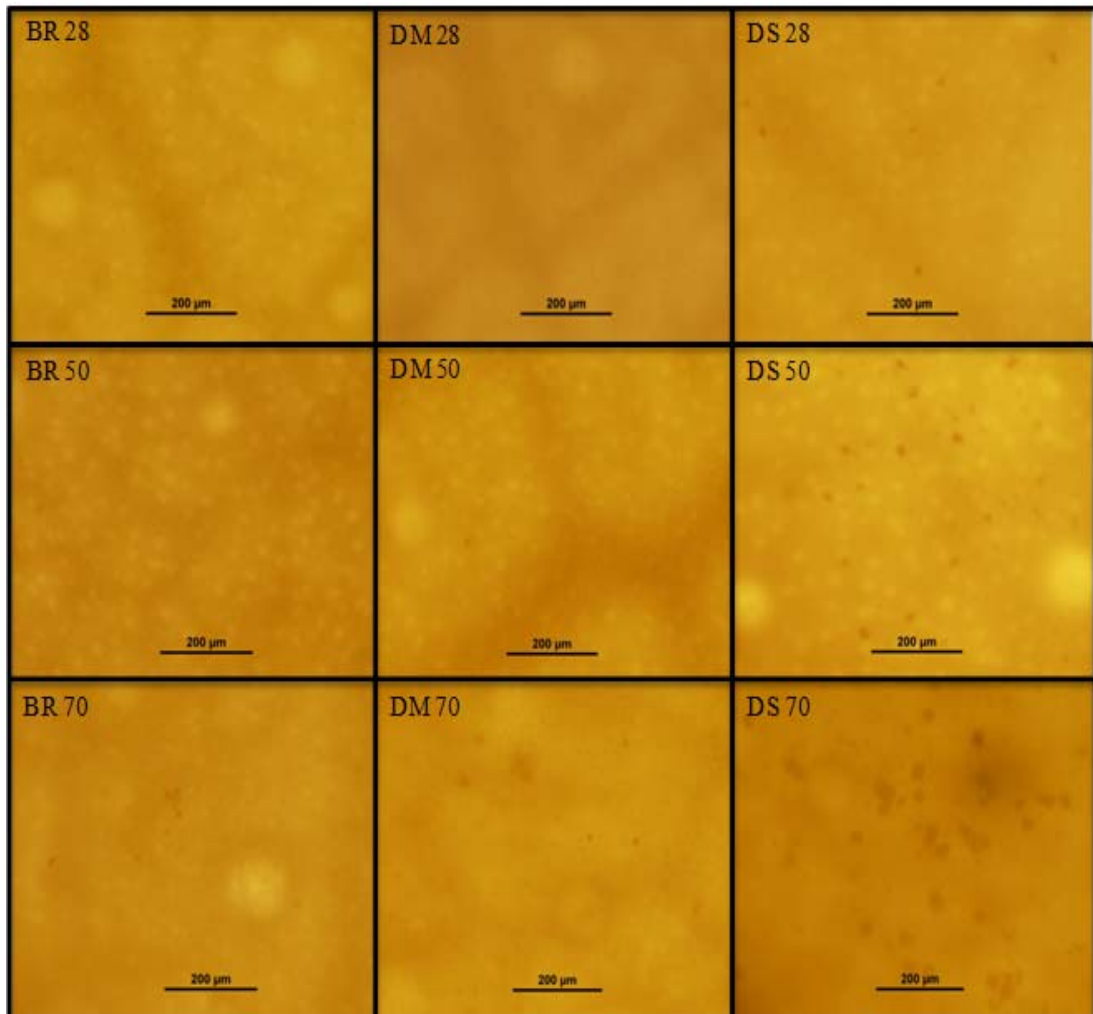


Figura 17. Determinación de H_2O_2 *in situ* en hojas de 'Ellendale' en tres condiciones de disponibilidad de agua; BR: bien regado (Ψ_w : -0,8 a -1,2 MPa), DM: déficit hídrico moderado (Ψ_w : -2,2 a -2,8 MPa) y DS: déficit hídrico severo (Ψ_w : <-4,0 MPa), en los días 28; 50 y 70 desde inicio de los tratamientos.

3.8. BROTACIÓN

Durante los 70 días de aplicación de los tratamientos no se registró la formación de ninguna flor en ambas variedades. En el tratamiento BR ambas variedades se registró un flujo de brotación, de brotes exclusivamente vegetativos aproximadamente a los 30 días desde el comienzo de los tratamientos. Posteriormente al fin del período de imposición de los mismos (día 70),

transcurrieron aproximadamente 30 días para evidenciar la brotación y floración. Si bien no fue cuantificado, existió una brotación anticipada en aquellas plantas que presentaron las mayores intensidades de floración. En lo que refiere a la intensidad de brotación y floración, la misma aumentó significativamente en los tratamientos con DS en ambas variedades, comparado con las plantas sin estrés. Las plantas con DM no aumentaron la intensidad de brotación ni inducir un mayor número de flores que el tratamiento BR. Por otro lado es de destacar la inducción de flores que se registró en la brotación de los tratamientos sin estrés de ambas variedades, especialmente en ‘Valencia’ (Cuadro 1 y 2).

Cuadro 1. Porcentaje de nudos brotados en tres condiciones de disponibilidad de agua; BR (Ψ_w : -0,8 a -1,2 MPa), DM (Ψ_w : -2,2 a -2,8 MPa) y DS (Ψ_w : < -4,0 MPa). Cada valor corresponde a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas en una misma fecha difieren significativamente entre sí (Test de Tukey; $p \leq 0,05$).

Tratamiento	Porcentaje de nudos brotados					
	Ellendale			Valencia		
BR	12,5	\pm	6,1	b	16,2	\pm 2,8 b
DM	35,9	\pm	7,0	ab	17,5	\pm 3,9 b
DS	44,3	\pm	8,5	a	32,0	\pm 2,3 a

Se destaca además el mayor número de flores inducidas en la variedad ‘Valencia’ respecto a ‘Ellendale’ cuando se comparan similares tratamientos. En este sentido, los tratamientos BR y DS son los que mayores diferencias presentan entre las variedades, especialmente el DS. Si bien tanto en ‘Ellendale’ como en ‘Valencia’ la intensidad de floración en plantas bajo DS es elevada, la floración en ‘Valencia’ fue aproximadamente un 55% superior que en ‘Ellendale’ (Cuadro 2).

Cuadro 2. Intensidad de floración (número de flores/100 nudos) en ‘Ellendale’ y ‘Valencia’ en tres condiciones de disponibilidad de agua; BR (Ψ_w : -0,8 a -1,2 MPa), DM (Ψ_w : -2,2 a -2,8 MPa) y DS (Ψ_w : < -4,0 MPa). Cada valor corresponde a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas en una misma fecha difieren significativamente entre sí (Test de Tukey; $p \leq 0,05$).

Tratamiento	Número de flores/100 nudos				
	Ellendale			Valencia	
BR	12,3	\pm 8,1	b	46,5	\pm 11,3 b
DM	44,2	\pm 11,1	ab	67,4	\pm 10,7 b
DS	104,7	\pm 27,9	a	160,5	\pm 13,2 a

Al considerar la brotación por tipo de brote, se evidenció que el DS modificó el tipo de brote en el cual se formaron las flores en la variedad ‘Valencia’, obteniéndose un mayor número de inflorescencias en dicho tratamiento respecto a las plantas sin estrés. Por otro lado, en la variedad ‘Ellendale’ no se modificó la brotación por tipo de brote floral (Cuadro 3).

Cuadro 3. Número de brotes por tipo cada 100 nudos en ‘Ellendale’ y ‘Valencia’ en tres condiciones de disponibilidad de agua; BR (Ψ_w : -0,8 a -1,2 MPa), DM (Ψ_w : -2,2 a -2,8 MPa) y DS (Ψ_w : < -4,0 MPa). Cada valor corresponde a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas en una misma fecha difieren significativamente entre sí (Test de Tukey; $p \leq 0,05$).

Variedad Tratamiento	Número de brotes por tipo/100 nudos					
	Solitarios	Mixtos	Terminales	Inflorescencias	Vegetativos	
Ellendale	BR	3,4 \pm 1,2 a	5,1 \pm 4,3 a	1,2 \pm 0,7 a	1,5 \pm 1,2 a	1,5 \pm 1,2 a
	DM	6,3 \pm 1,7 a	8,5 \pm 2,2 a	9,8 \pm 2,6 a	3,1 \pm 2,6 a	9,9 \pm 2,7 b
	DS	14,7 \pm 5,0 a	12,5 \pm 4,7 a	8,7 \pm 4,0 a	2,6 \pm 1,7 a	6,5 \pm 1,9 ab
Valencia	BR	2,1 \pm 0,7 a	8,8 \pm 3,4 a	0,2 \pm 0,1 a	3,4 \pm 0,6 b	1,9 \pm 1,0 a
	DM	2,8 \pm 1,0 a	8,3 \pm 0,6 a	0,6 \pm 0,2 a	5,8 \pm 2,0 ab	0,4 \pm 0,3 a
	DS	5,3 \pm 1,5 a	15,6 \pm 1,9 a	0,1 \pm 0,1 a	12,8 \pm 2,9 a	0,6 \pm 0,5 a

Cuando se analiza la brotación según el número de flores formadas en los brotes; uniflorales (solitarios y terminales) o multiflorales (mixtos e inflorescencias), se evidenciaron claras diferencias varietales en respuesta a las condiciones de déficit hídrico. En este sentido, las plantas bajo DS en ‘Ellendale’ indujeron en promedio un mayor número de brotes uniflorales respecto a las plantas sin estrés, sin afectar el número de brotes multiflorales. En cambio, en ‘Valencia’ los brotes multiflorales aumentaron en respuesta al DS, sin modificar el número de brotes uniflorales que brotaron (Cuadro 4). Además, en el tratamiento DS de ‘Valencia’ se obtuvo un mayor número de brotes florales ($p \leq 0,05$) sin hojas (solitarias e inflorescencias) que en el tratamiento BR (datos sin presentar).

El aumento en el porcentaje de brotación de los brotes uniflorales en el tratamiento DS de ‘Ellendale’ se multiplicó 5 veces respecto a los generados en las plantas sin estrés. En ‘Valencia’ por su parte, el aumento de los brotes multiflorales en el tratamiento DS más que duplicó la brotación de las plantas bajo los tratamientos DM y BR.

Cuadro 4. Porcentaje de brotación según tipo de brotes (uniflorales o multiflorales) en ‘Ellendale’ y ‘Valencia’ en tres condiciones de disponibilidad de agua; BR (Ψ_w : -0,8 a -1,2 MPa), DM (Ψ_w : -2,2 a -2,8 MPa) y DS (Ψ_w : < -4,0 MPa). Cada valor corresponde a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas en una misma fecha difieren significativamente entre sí (Test de Tukey; $p \leq 0,05$).

Porcentaje de brotación según tipo de brotes				
Tratamiento	Ellendale		Valencia	
	Uniflorales	Multiflorales	Uniflorales	Multiflorales
BR	4,6 \pm 1,8 b	6,6 \pm 5,5 a	2,2 \pm 0,6 a	12,1 \pm 3,6 b
DM	16,0 \pm 4,9 ab	11,6 \pm 4,3 a	3,4 \pm 0,9 a	14,0 \pm 2,1 b
DS	23,4 \pm 5,3 a	15,1 \pm 6,2 a	5,4 \pm 1,6 a	28,4 \pm 2,1 a

4. DISCUSIÓN

Los cítricos sometidos a condiciones de deficiencia hídrica presentan una estrategia conservativa del agua, siendo ésta función controlada por el cierre estomático. Se establece además que las variedades como ‘Ellendale’ presentan una mejor conservación del agua que las naranjas, característica conferida por factores como una menor evaporación cuticular o la propia arquitectura de la planta (Savé *et al.*, 1995). En este trabajo las plantas de ambas variedades fueron sometidas a iguales Ψ_w en los diferentes tratamientos como forma de uniformizar el estatus hídrico en las mismas. Si bien el Ψ_w antes del amanecer es señalado como el mejor estimador del contenido de agua en las raíces (Jones, 1990), la g_s constituye un parámetro integrador del estado de hidratación de la planta en condiciones de estrés hídrico, por reflejar entre otros aspectos, el estado hídrico del xilema y las hojas, el contenido de ABA y otros factores que afectan la apertura estomática (Flexas *et al.*, 2004).

Condiciones de deficiencia hídrica promueven diversas respuestas para tolerar y adaptarse a dicho estrés (Rao, 2006), siendo las mismas dependientes del nivel de la deficiencia hídrica a las que están expuestas (Flexas y Medrano, 2002). En las condiciones experimentales de este trabajo, las plantas bajo DM de ambas variedades no vieron afectadas la mayoría de las variables estudiadas respecto a las plantas sin estrés, mientras que el tratamiento DS, indujo cambios fisiológicos y metabólicos que llevaron a diferenciarse de las plantas control. Las primeras evidencias de esto lo constituyen los descensos registrados en el RWC y la g_s en los tratamientos DS. Los descensos registrados en la g_s luego de transcurrido el primer mes desde el comienzo de los tratamientos marcan la pauta que la deficiencia hídrica en DS afectó de forma significativa el contenido de agua en dichas plantas, dado los valores extremadamente bajos de g_s que se registraron, menores a $20 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para ambas variedades. En cambio, las plantas sometidas a DM promovieron respuestas que le permitieron entre otros, mantener el RWC y la g_s en valores similares a las plantas sin estrés. Los cítricos bajo condiciones de estrés hídrico (moderado) son

capaces de mantener la turgencia de las células debido a la alta elasticidad de las paredes celulares (módulo ϵ), lo que le permite entre otras, mantener procesos tan importantes como los relacionados a la fotosíntesis (Savé *et al.*, 1995; Ruiz-Sánchez *et al.*, 1997). Es común a varias especies entonces, que el RWC no sea modificado bajo condiciones de DM, mientras que cuando el déficit hídrico se intensifica, se registra un descenso en dicha variable (Nayyar y Gupta, 2006). En este sentido, Flexas y Medrano (2002) han propuesto que el RWC no constituye un buen indicador para evaluar diferentes parámetros en condiciones de estrés hídrico, siendo solamente capaz de aportar información del proceso fotoquímico y de condiciones de fotoinhibición permanente cuando ocurren condiciones de estrés severas.

Bajo condiciones de DS las plantas promovieron el cierre estomático, lo que se ha correlacionado con un descenso en la asimilación de CO_2 , generando por tanto un exceso de electrones a partir de la energía recibida la cual no puede ser empleada en el proceso fotoquímico (Yokota *et al.*, 2006). En consonancia con nuestros resultados, se ha señalado que el proceso fotoquímico es solamente afectado cuando se ven fuertemente reducidos los niveles de g_s (Cornic y Fresnau, 2002; Flexas *et al.*, 2004) y los niveles de RWC descienden a valores entre 50 a 80% (Flexas y Medrano, 2002). En nuestro caso, descensos en los niveles de Φ_{PSII} como de F_v/F_m y aumentos en F_o fueron registrados en los tratamientos con DS, mientras las plantas bajo DM no se diferenciaron mayormente de los registros logrados en las plantas sin estrés.

Bajo esas condiciones de reducida g_s , el exceso de energía entonces promueve la fotoinhibición (Takahashi y Murata, 2008), disminuyendo por tanto el Φ_{PSII} (Golding y Johnson, 2003) y la F_v/F_m . Si bien se propone que la fotoinhibición puede ser un mecanismo protector que mantiene la integridad del aparato fotosintético, por lo cual únicamente se daña la proteína D1 del PSII (Krause, 1988), en nuestro trabajo debemos distinguir dos situaciones. En primera instancia, la fotoinhibición generada en condiciones de DM la podemos incluir dentro de lo que Osmond (1994) propuso llamar fotoinhibición dinámica. Este tipo de fotoinhibición tiene como característica una disminución transitoria en el funcionamiento del aparato fotosintético. En

nuestro trabajo se aprecia un marcado descenso en Φ_{PSII} en su evolución diaria en este tratamiento en ambas variedades. Si bien no llegan a ser diferentes respecto a las plantas sin estrés, el descenso en este parámetro es suficiente como para igualar los valores del tratamiento DS. Al evaluar el parámetro F_v/F_m y F_o no se verifica ninguna modificación respecto a las plantas sin estrés, indicando que el descenso en la actividad fotosintética se ve restringido únicamente a las horas de mayor radiación, no verificándose una fotoinhibición permanente.

En el caso del tratamiento DS en cambio, los datos sugieren que existe una fotoinhibición crónica o permanente por el daño causado al PSII (Osmond, 1994). Los descensos obtenidos en el parámetro F_v/F_m previo al amanecer se han propuesto como una medida de fotoinhibición permanente e irreversible en el centro de reacción del PSII (Guan y Gu, 2009). El parámetro F_v/F_m refleja la eficiencia cuántica potencial del PSII, siendo un indicador de la performance fotosintética de las plantas, con valores óptimos cercanos a los 0,83 (Johnson *et al.*, 1993). En nuestro trabajo no solo se verifica un marcado descenso en dicho parámetro, llegando a valores de 0,70 en promedio, sino que dicho tratamiento tampoco es capaz de alcanzar valores de Φ_{PSII} de las plantas sin estrés cuando se encuentran en condiciones de baja o nula radiación incidente (en la tarde o al amanecer). El descenso en el Φ_{PSII} refleja una menor capacidad de destinar energía al proceso fotoquímico, evidenciado una sobre-reducción de la cadena transportadora de electrones en el cloroplasto (Medina *et al.*, 2002).

Por otro lado se evidencia que el descenso en el parámetro F_v/F_m registrado únicamente en las plantas DS, es producido en parte por un aumento en los niveles de F_o . Esto sugiere que en las plantas sometidas a DS existiría daño a nivel del LHCII (Arbona *et al.*, 2008), quizá en parte reflejo del descenso en los niveles de clorofilas encontrados en nuestro trabajo. Nuestro trabajo evidencia además que la F_o se muestra como un buen indicador de la ocurrencia de condiciones de estrés hídrico severo en los cítricos. Además, los aumentos alcanzados en el parámetro F_o en el tratamiento DS, ocurren previamente a los cambios registrados en F_v/F_m para el caso

de 'Valencia'. Por otro lado, es de destacar que al final del período de tratamientos (día 70), mientras los valores de F_v/F_m en las plantas DS de ambas variedades presentaron similares valores, para el caso de F_o se verifican diferencias que pueden estar explicando diferente sensibilidad entre las variedades. De hecho en cítricos, se ha propuesto que F_o puede constituir un mejor indicador de los niveles de daño oxidativo (Rivas *et al.*, 2008). Además, la evolución de este parámetro, así como las diferencias entre variedades en el día 70, puede ser de relevancia, ya que los valores iniciales (día 0) son similares entre las dos variedades, mientras que al final del período de estrés, los registros alcanzados por 'Valencia' llegan a ser 25 % superiores que 'Ellendale'.

El exceso de energía promovido por las condiciones de estrés lleva a que se registre un descenso en el flujo de electrones del PSII, que lo constituye un indicador del proceso fotosintético y por tanto proporciona una estimación de la fotosíntesis potencial. El PSII además constituye la parte más vulnerable del aparato fotosintético cuando existe exceso de energía (Maxwell y Johnson, 2000). Sin embargo, el daño producido en condiciones de estrés puede también afectar al contenido de clorofilas totales, siendo mayor el descenso en la medida que las condiciones de estrés son más severas (Loggini *et al.*, 1999; Nayyar y Gupta, 2006). Dicho descenso de estos pigmentos es mencionado como una forma de aclimatación a las condiciones de estrés (Anderson *et al.*, 1995), lo que permite que ante condiciones de exceso de energía se generen menores niveles de ROS por el descenso en el contenido de clorofilas (Herbinger *et al.*, 2002). Descensos en la relación clorofilas *a/b* ha sido señalado en condiciones de déficit hídrico (Giardi *et al.*, 1996), como una forma de defensa que se dispara en las variedades con mayor susceptibilidad a dichas condiciones (Loggini *et al.*, 1999). Nuestros resultados no solo confirman las reducciones en el contenido de clorofilas totales en los tratamientos con deficiencia hídrica de ambas variedades, sino que en el caso de 'Valencia' el descenso en la relación de las clorofilas *a/b* en el tratamiento DS, sería indicativo de una mayor adaptación a dichas condiciones, pero a su vez de un mayor nivel de daño.

En lo que refiere al marcado descenso en el contenido de clorofilas en las plantas BR, especialmente en ‘Valencia’, este puede ser debido a un aumento en el número de días con alta radiación entre los 28 y 50 días, comparado al período previo (desde el día 0 al 28; ver anexos). Se ha corroborado que los niveles de clorofilas en las hojas de cítricos expuestas al sol es menor comparado al contenido en condiciones de baja radiación (Schwanz *et al.*, 1996).

Un dato relevante del análisis lo constituye la relación entre la F_o y el contenido de clorofila a en los diferentes tratamientos. En hojas adaptadas a la oscuridad, donde los centros de reacción permanecen abiertos (Maxwell y Johnson, 2003), aumentos en los niveles de F_o serían indicativos de una mayor fluorescencia a nivel de la antena del PSII. En este sentido, aumentos en los niveles F_o fueron registrados en los tratamientos DS de ambas variedades, tratamientos en los cuales se registró un descenso en los contenidos de clorofila a . Así, la emisión de fluorescencia (F_o) en función del contenido de clorofila a aumenta en más de 4 veces hacia el final del período de tratamientos en DS respecto a las plantas BR (ver anexos). Estos datos indicarían entonces que una parte importante de la energía recibida es reemitida como fluorescencia a nivel de la antena en el LHCII. Además, se propone que en estas condiciones, dichos niveles de F_o por unidad de clorofila a pueden ser alcanzados solamente cuando las condiciones de daño promuevan el desacople de las clorofilas a nivel del LHCII (Rivas *et al.*, 2008).

El déficit hídrico promueve aumentos en la relación entre los carotenoides y las clorofilas totales, aún cuando las modificaciones en los contenidos de estos pigmentos sean proporcionales (Verhoeven *et al.*, 1997) como en este trabajo. Únicamente se registraron aumentos permanentes en el tiempo en dicha relación en ‘Valencia’ bajo DM, lo cual sería indicativo de una mayor disipación de energía en esta condición hídrica (Verhoeven *et al.*, 1997). Así, el aumento en los niveles de carotenoides se ha relacionado con la protección de las clorofilas en condiciones de estrés (Kenneth *et al.*, 2000) por secuestrar directamente la energía desde las $^3\text{Chla}^*$ evitando la formación de ROS y protegiendo a las clorofilas de la fotooxidación

(Demmig-Adams *et al.*, 1996; Miller, *et al.*, 1996; Szabo *et al.*, 2005). Este mecanismo permite por tanto reducir el daño que es causado por efecto del estrés al aparato fotosintético (Young, 1991) y a su vez mantener los niveles de clorofilas similares a las plantas sin estrés. El posterior descenso en la relación carotenoides/clorofilas se vincula entonces con una menor protección de las clorofilas, lo que puede explicar el descenso en el contenido de clorofilas en las plantas bajo DM luego de los 50 días desde el comienzo de tratamientos.

El ciclo de las xantofilas promueve la protección del aparato fotosintético en condiciones de exceso de energía mediante la disipación térmica (Demmig *et al.*, 1988; Havaux *et al.*, 1996; Frank, 1999), por secuestrar energía directamente desde las clorofilas en estado singülete ($^1\text{Chla}^*$) y del $^1\text{O}_2$ (Reddy y Raghavendra, 2006). Dicho rol es atribuido a la Z (Szabo *et al.*, 2005), pero también en parte a la A (Taiz y Zieger, 2002), promoviendo un menor nivel de energía que llega al centro de reacción, protegiendo por tanto las membranas de los cloroplastos del daño oxidativo (Havaux *et al.*, 1996). En condiciones de estrés disminuye el pH del lumen de los tilacoides lo que promueve la de-epoxidación de V a Z (Havaux y Niyogi, 1999). En este sentido, el aumento en los niveles de Z es indicativo de adaptación de las plantas a condiciones de estrés (Demmig-Adams *et al.*, 1988). Así, en varias especies se ha confirmado la presencia de este mecanismo en condiciones de estrés (Davison *et al.*, 2002) y también en cítricos (Chen *et al.*, 2005; Rivas *et al.*, 2010). Nuestro trabajo confirma que los cítricos en condiciones de estrés abiótico son capaces de promover la de-epoxidación de las xantofilas, pero dicha modificación es dependiente del genotipo y la condición hídrica. Así, en ‘Ellendale’ la de-epoxidación de las xantofilas ocurre independientemente del nivel de déficit hídrico aplicado. En ‘Valencia’ en cambio, solo se induce en condiciones de DM. Las plantas bajo DS no registran variaciones en el DPS de las xantofilas, por lo que en dichas condiciones no existiría protección por este mecanismo. Si bien anteriormente se ha mencionado que la cantidad de energía que puede ser disipada por las xantofilas depende de la especie, la radiación y las condiciones de crecimiento a las cuales están expuestas las plantas (Demmig-Adams y Adams, 1996), en nuestro

trabajo al igual que lo reportado anteriormente, no se ha encontrado correlación entre la DPS y NPQ en cítricos (Chen *et al.*, 2005; Rivas *et al.*, 2010).

Aumentos en los niveles de Pro en todos los tratamientos respecto al comienzo de los mismos (día 0) es indicativo de una condición de estrés. En el caso de los tratamientos DS y DM de ambas variedades es consecuencia de una síntesis *de novo*, resultado de las condiciones de deficiencia hídrica (Bauer *et al.*, 1997; Lutts *et al.*, 1999). En este sentido, los niveles de AA durante el período de los tratamientos no fueron afectados (ver anexos), lo que lleva a aumentar la relación Pro/AA en estos tratamientos. Se ha señalado que bajo condiciones de estrés, los aumentos en los niveles de Pro provienen tanto de una activación de la síntesis, así como una disminución de la degradación de la misma (Stewart *et al.*, 1977). Sin embargo, en el caso de las plantas control de ambas variedades, el aumento de la Pro podría asociarse tanto a una síntesis *de novo* como a un aumento en la proteólisis, resultado esta última de la removilización de nutrientes durante el período de tratamientos. La removilización de nutrientes incrementa la degradación de proteínas, lo cual constituye una fuente de N para las hojas en formación (Wisniewski y Zagdanske, 2001), explicando por tanto los incrementos en los niveles de Pro (Fukutoku y Yamada, 1984). Dicha removilización puede ser atribuida a un flujo de brotación (exclusivamente de brotes vegetativos) que se registró aproximadamente a los 30 días desde el comienzo de los tratamientos únicamente en las plantas control. Esta removilización llevó por tanto a que se registraran descensos en el contenido de AA del orden del 40 y 50 % respecto al día 0 para ‘Ellendale’ y ‘Valencia’ respectivamente, incrementando por tanto la relación Pro/AA en las plantas bajo BR. Esta brotación por tanto inducir un descenso en el nivel nutricional de las hojas muestreadas, lo que junto a las altas temperaturas puede llevar a que se registren condiciones de estrés, promoviendo entonces la síntesis de Pro.

La Pro ha sido señalada por sus diversas funciones en plantas bajo condiciones de estrés, como la de protección celular en su función de osmoprotector (Rao, 2006), aumentar la presión osmótica para mantener la turgencia en las células (Delauney y

Verma, 1993) y eliminar y proteger a las células ante las ROS (Akashi *et al.*, 2001), aumentando la tolerancia de las plantas bajo condiciones de estrés abiótico (Nanjo *et al.*, 1999). Independientemente de su función, su mayor contenido se ha asociado a mayores niveles de estrés en plantas (Lutts *et al.*, 1999; Wu y Xia, 2006). En nuestro caso, mayores contenidos de Pro fueron registrados en las plantas de los tratamientos de DS en ambas variedades comparado a las plantas BR. Las diferencias varietales obtenidas en el contenido de Pro bajo estas condiciones (DS) de este trabajo, podrían ser indicativos del rol de protección que se le asigna a este aminoácido bajo dichas condiciones (Rao, 2006). Así, en ‘Ellendale’ el contenido siempre se mantuvo en aumento en la medida que el período de estrés avanza. Por su parte en ‘Valencia’, la capacidad de síntesis *de novo* alcanzó un máximo en el día 50 desde el comienzo de los tratamientos, manteniéndose constante luego de esa fecha y siendo estos valores inferiores a los alcanzados por ‘Ellendale’. Sin embargo el rol de protección no estaría dado por su capacidad de ajuste osmótico, ya que se ha señalado que en tangors y naranjas bajo déficit hídrico no se registran modificaciones en el potencial de solutos (Savé *et al.*, 1995), aunque existen otros reportes que sostienen que en condiciones de estrés (salino) existe ajuste osmótico donde la Pro podría estar jugando un rol central (Gómez-Cadenas *et al.*, 1998). Si bien en cítricos se ha mencionado anteriormente que la Pro no puede ser empleada en la comparación de genotipos (Ashraf y Foolad, 2007; Arbona *et al.*, 2008), la protección conferida por la Pro puede estar relacionada a su capacidad de disminuir los niveles de daño oxidativo. En este sentido se ha verificado que la Pro puede mitigar el daño causado por la presencia de H₂O₂, resultando en un descenso del propio contenido de H₂O₂, teniendo un rol fundamental en la estabilización de las membranas celulares (Hamilton y Heckathorn, 2001; Ashraf y Foolad, 2007; Ozden *et al.*, 2009). Además, en cítricos capaces de expresar constitutivamente la P5CS, se presentan niveles más altos de g_s y de asimilación neta de CO₂ en condiciones de deficiencia hídrica (Molinari *et al.*, 2004). El H₂O₂ es ampliamente conocido por afectar a la proteína D1 en el centro de reacción del PSII, aumentando por tanto la fotoinhibición (Niyogi, 1999). Así, el elevado contenido de Pro en el tratamiento DS de ‘Ellendale’ podría ser asociado con los menores niveles de daño oxidativo registrado en dicha variedad

respecto a 'Valencia'. Pareciera existir entonces una limitación (saturación) en la biosíntesis de Pro en 'Valencia' DS posterior al día 50, la cual no se verifica en 'Ellendale', lo que promovería un aumento en los niveles de daño de la primera.

El daño oxidativo reportado en el tratamiento DS de ambas variedades aporta evidencia para afirmar lo anteriormente sugerido; los niveles de daño oxidativo en 'Valencia' fueron superiores respecto a 'Ellendale'. El contenido de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico refleja el producto de la peroxidación de los lípidos, lo cual es un indicador del daño de las membranas (Nayyar y Gupta, 2006). Por lo expuesto anteriormente, el aumento en el contenido de Pro puede ser entonces clave para evitar el aumento en las ROS y por lo tanto evidenciar las diferencias en los niveles de daño entre las variedades en dicha condición hídrica. En este sentido, en 'Valencia', variedad que registró los mayores niveles de TBars y descensos en la relación clorofila *a/b*, reflejarían una menor protección por parte de la Pro frente a una condición de estrés hídrico severo. Sin embargo, independientemente del contenido de Pro alcanzado por los tratamientos DS en cada variedad, los niveles de daño oxidativo aumentaron respecto a las plantas BR lo que es indicativo que la Pro es únicamente capaz de aliviar en parte el daño oxidativo promovido por esta condición hídrica. Además, si bien la estimación de H₂O₂ por medio del DAB constituye técnica semicuantitativa, resulta clara la evidencia de que los niveles de H₂O₂ en las plantas DS aumentó respecto a las plantas BR y DM sobre el final del período de tratamientos, coincidiendo con los mayores niveles de daño oxidativo registrado en esta condición hídrica.

En condiciones de estrés salino en cítricos se ha demostrado que los niveles de daño oxidativo son proporcionales a la duración del estrés (Arbona *et al.*, 2003), mientras que en este trabajo se evidencia además que los mismos dependen del genotipo considerado, siendo para el caso de 'Valencia' mayor la sensibilidad cuando se compara una misma condición hídrica respecto a 'Ellendale'

De modo similar a lo evidenciado con el contenido de Pro, los niveles de daño oxidativo aumentaron en todas las condiciones hídricas durante el período de tratamientos. Estos resultados sugieren entonces que las plantas bajo BR de ambas variedades estuvieron sometidas a condiciones de estrés durante el período de tratamientos (Nayyar y Gupta, 2006).

Las condiciones de DS promovieron un aumento en los niveles de brotación y en la intensidad de floración, coincidiendo con los tratamientos donde se registraron los mayores niveles de daño oxidativo y H_2O_2 . Además, cuando se comparan las floraciones obtenidas entre las variedades en el tratamiento DS, se verificó una mayor inducción floral en 'Valencia', lo que coincide con un mayor nivel de daño oxidativo respecto al mismo tratamiento de 'Ellendale'. Para el caso del tratamiento DM de ambas variedades, los niveles de floración y de daño oxidativo (y la estimación de H_2O_2 por DAB) son iguales a los obtenidos en las plantas control. Además, si bien se ha mencionado que la intensidad del estrés hídrico modifica el patrón de floración, aumentado la floración en los brotes generativos cuando el estrés hídrico es más severo (Southwick y Davenport, 1986), este trabajo demuestra que bajo dichas condiciones, la distribución de la brotación según el tipo de brotes es dependiente del material genético considerado. Así, en el caso de 'Valencia' el DS indujo un mayor número de brotes multiflorales, especialmente aquellos que producen únicamente flores (inflorescencias), mientras que en el caso de 'Ellendale' son inducidos aquellos que poseen una única flor en el brote, con o sin presencia de hojas. Estas diferencias entre los brotes en los cuales se genera la floración en cada variedad, explica las diferencias en la intensidad de floración en este tratamiento.

Por otro lado es de destacar la inducción floral que se registró en condiciones de BR, situación que puede ser explicada por las altas temperaturas alcanzadas en condiciones de invernáculo (ver anexos). En cítricos se ha demostrado que en condiciones de alta temperatura, especialmente al mediodía, la absorción de agua se ve reducida comparada con los niveles de transpiración, lo que lleva a que se

registren déficits hídricos temporales, aún en condiciones de suelos bien regados (Cohen *et al.*, 1997).

Nuestro trabajo evidencia que la condición de DS promueve un aumento en los niveles de floración lo que coincide con aumentos en los niveles de daño oxidativo y H₂O₂ en este tratamiento, situación que es independiente de la variedad considerada. En condiciones de estrés se promueve un aumento en los niveles de ROS y por lo tanto se registran mayores niveles de daño oxidativo (Asada, 1999; Reddy y Raghavendra, 2006). Dentro de las ROS, diversos autores apuntan a la doble función del H₂O₂ por su capacidad de provocar daño oxidativo, así como de molécula señalizadora (Zhang *et al.*, 2001; Uchida *et al.*, 2002; Mittler *et al.*, 2004; Bienert *et al.*, 2006). En este sentido, su capacidad de difundir fácilmente a través de la membrana celular (Henzler y Steudle, 2000; Bienert *et al.*, 2006), así como su mayor estabilidad, dada por una menor reactividad y mayor vida media que otras ROS (Bienert *et al.*, 2006), promueve la inducción de genes involucrados en diversos procesos fisiológicos y del desarrollo (Neill *et al.*, 2002; Rao, 2006), modulando por tanto el desarrollo de las plantas (Neill *et al.*, 2002; Mittler *et al.*, 2004). Así, nuestro trabajo aporta evidencia que permite relacionar los niveles de daño oxidativo con la inducción de la floración en los cítricos, sugiriendo que las condiciones de estrés que modifican el estado redox de las plantas, por aumento de las ROS, entre ellas el H₂O₂, podrían ser responsables de provocar la inducción floral.

5. CONCLUSIONES

- Déficit hídrico severos ($\Psi_w < -4,0$ MPa) promueven descensos en los niveles de RWC y en la g_s en cítricos.
- En dichas condiciones de disponibilidad de agua, se afecta el proceso fotoquímico, evidenciado por un descenso en los niveles de F_v/F_m y Φ_{PSII} y por aumentos en los niveles de F_o .
- Estas condiciones además promueven aumentos en los niveles de Pro respecto a las plantas BR en ambas variedades.
- Por otro lado, el descenso en la disponibilidad de agua en el tratamiento DS de ambas variedades promovió un descenso en los niveles de pigmentos (clorofilas a , b y totales, así como de carotenoides totales)
- Las condiciones de deficiencia hídrica promueven la de-epoxidación de las xantofilas, situación que es dependiente del nivel de hidratación de las plantas en ‘Valencia’, mientras que en ‘Ellendale’ la conversión de las xantofilas no es dependiente del nivel de la deficiencia hídrica. Sin embargo, el DPS no pudo ser asociado con el NPQ.
- Las plantas bajo DS de ambas variedades promovieron un descenso en los contenidos de clorofila a , lo que indica que los niveles de F_o son disparados al considerar la emisión de fluorescencia por unidad de clorofila a , sugiriendo un daño a nivel del LHCII.
- Los niveles de daño oxidativo y H_2O_2 en plantas bajo DS de ambas variedades, aumentaron respecto a las plantas BR.

- El tratamiento DS indujo una mayor brotación de los nudos así como un mayor número de flores que las plantas sin estrés en las dos variedades. Además esta deficiencia hídrica afectó el tipo de brote donde se formaron las flores, induciendo en ‘Valencia’ un mayor número de brotes multiflorales, mientras que en ‘Ellendale’ aumentó el número de brotes uniflorales.
- En las plantas bajo una restricción hídrica moderada (Ψ_w : -2,2 a -2,8 MPa), la mayoría de las variables analizadas no diferenciaron sus valores respecto al tratamiento BR, indicativo de que bajo dichas condiciones no se registró un estrés suficiente para promover cambios a nivel metabólico ni en la inducción de la floración.
- La aumento de Pro en condiciones de estrés promovería la protección contra el daño oxidativo, especialmente en ‘Ellendale’ en condiciones de DS, disminuyendo los niveles de daño oxidativo esta variedad, respecto al mismo tratamiento de ‘Valencia’.
- Este trabajo finalmente aporta evidencia de que el daño oxidativo puede asociarse con los niveles de floración en las variedades cítricas, proponiéndose al H_2O_2 como posible molécula señalizadora relacionada con la inducción de la floración en los cítricos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agustí, M. 2003. Citricultura, 2da Edición. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. España. 422 p.
- Akashi, K; Miyake, C; Yokota, A. 2001. Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. FEBS Letters 508: 438-442.
- Allakhverdiev, S; Murata, N. 2004. Environmental stress inhibits the synthesis de novo of proteins involved in the photodamage repair cycle of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Biochim. Biophys. Acta 1657: 23-32.
- Anderson, J. M; Chow, W; Park, Y. 1995. The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. Photosynth. Res. 46, 129-139.
- Arbona, V; Gómez-Cadenas. 2008. Hormonal modulation of *Citrus* responses to flooding. J. Plant Growth Regul.27:241–250.
- Arbona, V; Hossain, Z; López-Climent, F; Pérez-Clemente, R; Gómez-Cadenas, A. 2008. Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus *Physiologia Plantarum* 132: 452–466.
- Arbona, V; Flors, F; Jacas, J; García-Agustín, P; Gómez-Cadenas, A. 2003. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive *Citrus* rootstock, to different levels of salinity. *Plant Cell Physiol.* 44: 388–394.
- Aro, E; Suorsa, M; Rokka, A, Allahverdiyeva, Y; Paakkarinen, V; Saleem, A; Battchikova, N; Rintamäki, E. 2005. Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *J. Exp. Bot.* 56: 347-356.
- Asada, K. 1999. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601–639.
- Ashraf, M. Foolad, M. 2007. Roles of glycine betain and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59: 206-216.

- Assman, M; Snyder, J; Lee, Y. 2000. ABA-deficient (*aba1*) and ABA-insensitive (*abi1-1*, *abi2-1*) mutants of *Arabidopsis* have a wild-type stomatal response to humidity. *Plant Cell Environ.* 23: 387-395.
- Bartels, D; Souer, E. 2004. Molecular responses of higher plants to dehydration. In *Plant responses to abiotic stress*. Ed. Springer, Berlin. pp 9-36.
- Bartoli, C; Simontacchi, M; Tambussi, E; Beltrano, J; Montaldi E; Puntarulo, S. 1999. Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. *J. Exp. Bot.* 50: 375-383.
- Bauer, D; Bielher, K, Fock; H; Carrayol; Hirel, B; Migge, A; Becker, T. 1997. A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress in tomato. *Physiol. Plant.* 99: 241-248.
- Bienert, G; Schjoerring, J; Jahn, T. 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758: 994–1003.
- Bungard, R; Ruban, A; Hibberd, J; Press, M; Horton, P; Scholes, J. 1999. Unusual carotenoid composition and a new type of xanthophyll cycle in plants. *Proc. Nat. Acad. Soc. U.S.A.* 96: 1135-1139.
- Chaves, M; Maroco, J; Pereira, J. 2003. Understanding plant response to drought- from gene to whole plant. *Funct. Plant Biol.* 30: 239-264.
- Chen, L.I; Qi, Y.P; Liu, X.H. 2005. Effects of aluminium on light energy utilization and photoprotective system in citrus leaves. *Ann. Bot.* 96, 35–41.
- Cohen, S; Moreshet, S; Guillou, L; Simon, J.C; Cohen, M. 1997. Response of citrus trees to modified radiation regime in semi-arid conditions. *J. Exp Bot.* 48: 35-44.
- Cornic, G; Fresnau, C. 2002. Photosynthetic carbon reduction and carbon oxidation cycles are the main electron sinks for Photosystem II activity during a mild drought. *Ann. Bot.* 89: 887-894.
- Dall'Osto, L; Caffarri, S; Bassi, R. 2005. A mechanism of nonphotochemical energy dissipation, independent from PsbS, revealed by a conformational change in the antenna protein CP26. *The Plant Cell* 17: 1217–1232.
- Davison, P.A; Hunter, C.N; Horton, P. 2002. Overexpression of carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nature* 418: 203–206.

- Dekov, I; Tsonev, T; Yordanov, I. 2000. Effects of water stress and high-temperature stress on structure and activity of photosynthetic apparatus of *Zea mays* and *Helianthus annuus*. *Photosynthetica* 38: 361-366.
- Delauney, A. J; Verna, D. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4: 215-223.
- Demmig-Adams, B; Adams, W. 2002. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science* 298: 2149–2153.
- Demmig-Adams, B; Adams, W. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis *Trends in Plant Sci.* 1: 21-26.
- Demmig-Adams, B; Adams, W. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 599-626.
- Demmig-Adams, B; Winter, K; Kruger, A; Czygan, F.C. 1988. Zeaxanthin and the heat dissipation of excess light energy in *Nerium oleander* exposed to a combination of high light and water stress. *Plant Physiol.* 87: 17–24.
- Desikan, R; Hancock, J; Neill, S. 2004. Oxidative stress signalling. In *Plant responses to abiotic stress*. Ed. Springer. Berlin. Germany. pp 121-149.
- Edreva, A. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agri. Ecosyst. Environ.* 106: 119-133.
- Flexas, J; Bota, J; Cifre, J; Escalona, J; Galmés, J; Gulías, J; Lefi, E; Martínez-Cañellas, S; Morena, M; Ribas-Carbó, M; Riera, M; Sampol, B; Medrano, H. 2004. Understanding down-regulation of photosynthesis under water stress: future prospects and searching for physiological tools for irrigation management. *Ann. Appl. Biol.* 144: 273-283.
- Flexas, J; Medrano, H. 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann. Bot.* 89: 183-189.
- Foyer, Ch; Lelandais, M; Kunert, K. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* 92: 696-717.
- Foyer, Ch; Vanacker, H; Gómez, L; Harbinson, J. 2002. Regulation of photosynthesis and antioxidants metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures: review. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 659-668.

- Fukutoku, Y; Yamada, Y. 1984. Sources of proline-nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max*). II. Fate of ¹⁵N-labelled protein. *Physiologia Plantarum*. 61: 622-628.
- Frank, A. 1999. Incorporation of carotenoids into reaction center and light-harvesting pigment-protein complexes. In *The Photochemistry of Carotenoids* Edited by Frank, A; Young, J; Richard, G; Cogdell J. Academic Publishers New York, 235–244.
- Gao, S; Chen, S; Li, M. 1989. Effects of phosphorus nutrition on photosynthesis and photorespiration in tobacco leaves. *Acta Phytophysiol. Sinica* 15: 281-287.
- Genty, B; Briantais, J.M; Baker, N.R. 1989. The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87-92.
- Giardi, M; Cona, A; Geiken, B; Kucera, T; Masojidek, J; Matoo, A. 1996. Long-term drought stress induces structural and functional reorganization of photosystem II. *Planta* 199: 118-125.
- Gilmore, A.M; Shinkarev, V.P; Hazlett, T.L; Govindjee. 1998. Quantitative analysis of the effects of intrathylacoidal pH and xanthophyll cycle pigments on chlorophyll a fluorescence life time distributions and intensity in thylakoids. *Biochemistry* 37: 13582-13593.
- Gogorcena, Y; Iturbe-Ormaetxe, I; Escuredo, P; Becana, M. 1995. Antioxidant Defenses against activated oxygen in Pea nodules subjected to water stress. *Plant Physiol.* 108: 753-759.
- Golding, A; Johnson, G. 2003. Down-regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. *Planta* 218: 107-114.
- Gómez-Cadenas, A; Tadeo, R; Primo-Millo, E; Talon, M. 1998. Involvement of abscisic acid and ethylene in responses of citrus seedlings to salt shock. *Physiologia Plantarum* 103: 475-484.
- Gómez-Cadenas, A; Tadeo, R; Talon, M; Primo-Millo, E. 1996. Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of *Cleopatra* mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiol.* 112: 401-408.

- Gravina, A. 1999. Floración. In Ciclo fenológico-reproductivo en *Citrus*. Bases fisiológicas y manejo. Ed. Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo. pp 21-32.
- Gravina, A; Arbiza, H; Arias, M; Ronca, F. 1997. Estudio de la floración en el tangor 'Ellendale' (*Citrus sinensis* L.Osb.x *C.reticulata* Bl.) y su relación con el cuajado de frutos y productividad. *Agrociencia (Uruguay)* 1: 55-59.
- Guan, X; Gu, S. 2009. Photorespiration and photoprotection of grapevine (*Vitis vinífera* L. cv. Cabernet Sauvignon) under water stress. *Photosynthetica* 47: 437-444.
- Guo, Y; Zhou, H.; Zhang, L. 2006. Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against photooxidation during high temperature stress in two citrus species. *Scientia Horticulturae*. 108: 260-267.
- Hamilton, E; Heckathorn, S. 2001. Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiol* 126: 1266–1274.
- Havaux, M; Dall'Osto, L; Cuine, S; Giuliano, G; Bassi, R. 2004. The effect of zeaxanthin as the only xanthophyll on the structure and function of the photosynthetic apparatus in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 279: 13878–13888.
- Havaux M, Niyogi K. 1999. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 8762-8767.
- Havaux, M; Tardy, F; Ravenel, J; Chanu, D; Parot, P. 1996. Thylakoid membrane stability to heat stress studied by flash spectroscopic measurements of the electrochromic shift in intact potato leaves: influence of the xanthophyll content. *Plant, Cell Environ.* 19: 1359–1368
- Henzler, T; Steudle, E. 2000. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. *J. Exp. Bot.* 51: 2053-2066.

- Herbinger, K; Tausz, M; Wonisch, A; Soja, G; Sorger, A; Grill, D. 2002. Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defence systems of two wheat cultivars. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 691–696.
- Hippeli, S; Heiser, I; Elstne, E. 1999. Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: New insights and analogies between animals and plants. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 167-178.
- Hoekstra, F; Golovina, E; Buitink, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* 6: 431-438.
- Hong, Z; Lakkineni, K; Zhang, Z; Verma, D. 2000. Removal of Feedback Inhibition of Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.* 122: 1129-1136.
- Horton, P; Ruban, A. 2005. Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *J. Exp. Bot.* 56: 365–373.
- Horton P, Ruban A, Walters R. 1996. Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 655-684.
- Hu, M; Guo, Y; Shen, Y; Guo, D; Li, D. 2009. Midday depression of photosynthesis and effects of mist spray in citrus. *Ann. App. Biol.* 154: 143-155.
- Hu, X; Jiang, M; Zhang, A; Lu, J. 2005. Abscisic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. *Planta* 223: 57–68
- Iglesias, D; Cercós, M; Colmenero-Flores, J; Naranjo, M; Rios, G; Carrera, E; Ruiz-Rivero, O; Lliso, I; Morillon, R; Tadeo, F; Talon, M. 2007. Physiology of citrus fruiting. *Braz. J. Plant Physiol.* 19: 333-362.
- Izaguirre-Mayoral, M; Carballo, O; Flores, S; Sicardi de Mallorca, M; Oropeza, T. 1992. Quantitative analysis of the symbiotic N₂-fixation, non-structural carbohydrates and chlorophyll content in sixteen native legume species collected in different savanna sites. *Symbiosis* 12: 293-312.
- Johnson, G; Young, A; Scholes, J; Horton, P. 1993. The dissipation of excess excitation energy in British plant species. *Plant Cell Environ.* 16: 673-679.

- Jones, H. 1990. Physiological aspects of the control of water status in horticultural crops. *Hortscience* 25: 19–26.
- Katona, E; Neimanis, S; Schönknecht, G; Heber, U. 1992. Photosystem I-dependent cyclic electron transport is important in controlling photosystem II activity in leaves under conditions of water stress. *Photosynthesis Res.* 34: 449-464.
- Kenneth, E; Pallet, K.E; Young, J. 2000. Carotenoids. In: *Antioxidants in Higher Plants*. Eds. Ruth, G.A; Hess, J.L. CRC Press, USA, pp. 60–81.
- Khairi, M; Hall, A. 1976. Temperature and humidity effects on net photosynthesis and transpiration of citrus. *Plant Physiol.* 36: 29-34.
- Kojima, K; Oshita, M; Nanjo, Y; Tozawam Y; Hayashi, H; Nishiyama, Y. 2007. Oxidation of elongation factor G inhibits the synthesis of the D1 protein of photosystem II. *Mol. Microbiol.* 65: 936-947.
- Kolowski, T. 1997. Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiol. Monograph No. 1*: 1-29
- Krause, G. 1994. Photoinhibition induced by low temperatures. In *Photoinhibition of photosynthesis, from molecular mechanisms to the field*. Eds. Baker, N; Bowyer, J. BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp 331-348.
- Lawlor, D. 1995. Photosynthesis, productivity and environment. *J. Exp. Bot.* 46: 1449-1461.
- Loggini, B; Scartazza, A; Brugnoli, E; NavariIzzo, F. 1999. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiol.* 119: 1091–1099.
- Lutts, S; Majerus, V; Kine, J. 1999. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum* 105: 450–458.
- Ma, Y; Holt, N; Li, X; Niyogi, K; Fleming, G. 2003. Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100: 4377-4382.
- Maxwell, K; Johnson, G. 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51: 659-668.

- Medina, C; Souza, R; Machado, E; Ribeiro, R; Silva, J. 2002. Photosynthetic response of citrus grown under reflective aluminized polypropylene shading nets. *Scientia Horticulturae* 96:115-125.
- Melis, A. 1999. Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends Plant Sci.* 4:130-135.
- Miller, N; Sampson, J; Candeias, L; Bramley, P; Rice-Evans, C. 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls *Fed. Eur. Biochem. Soc.* 384: 240-242.
- Minotti, G.; Aust, S. 1987. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 262: 1098-1104.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.
- Mittler, R; Vanderauwera, S; Gollery, M; Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9: 490-498.
- Molinari, C; Marur, C; Besspalhok, J; Kobayashi, A; Pileggi, M; Leite, R; Protasio, L; Gonzaga, L. 2004. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Obs. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Sci.* 167: 1735-1781.
- Moore, S; Stein, W. 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography amino acids. *J. Biol. Chem.* 192: 367-388.
- Moss, G.1976. Temperature effect of flower initiation in sweet orange. *Aust. J. Agric. Res.* 22: 625-629.
- Mott, K; Parkhurst, D. 1991. Stomatal responses to humidity in air and helox. *Plan Cell. Environ.* 14: 509-515.
- Murata, N; Takahashi, S; Nishiyama, N; Allakhverdiev, S. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Bioch. Biophys. Acta* 1767: 414-421.
- Nakajima, Y; Susanto, S; Hasegawa, K. 1993. Influence of water stress in autumn on flower induction and fruiting young pomelo tree (*Citrus grandis* (L.) Osbeck). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 62: 15-20.

- Nanjo, T; Kobashashi, M; Yoshiba, Y; Sanada, Y; Wada, K; Tsukaya, H; Kakubari, Y; Yamaguchi-Shinozaki, K; Shinozaki, K. 1999. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18: 185-193.
- Nayyar, H; Gupta, D. 2006. Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: association with oxidative stress and antioxidants. *Environ. Exp. Bot.* 58: 106-113.
- Neill, S; Desikan, R; Hancock, J. 2002. Hydrogen peroxide signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 388-395
- Nilsen, E; Orcutt, D. 1996. The physiology of plants under stress: abiotic factors. John Wiley, New York. pp 689.
- Nir, I; Goren, R; Lesham, B. 1972. Effects of water stress, gibberellic acid and 2-chloroethyl trimethylammonium chloride (CCC) on flower differentiation in Eureka lemon tress. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 97: 774-778.
- Nishiyama, Y; Allakhverdier, S; Murata, N. 2006. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 742-749.
- Niyogi, K. 1999. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 333-359.
- Noctor, G; Foyer, Ch. 2000. Homeostasis of adenylate status during photosynthesis in a fluctuating environment. *J. Exp. Bot.* 51: 347-356.
- Noctor, G; Veljovic-Jovanovic, S; Driscoll, S; Novitskaya, L; Foyer, C. 2002. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration? *Ann. Bot.* 89: 841-850.
- Osmond, C. 1994. What is photoinhibition? Some insights from comparison of shade and sun plants. In *Photoinhibition of photosynthesis from molecular mechanisms to the field*. Ed. Baker, N; Boyer, J. Bios Scientific Publishers, Oxford. pp: 1-24.
- Osmond, C; Bjorkman, O. 1972. Effects of O₂ on photosynthesis. Simultaneous measurements of oxygen effects on net photosynthesis and glycolate

- metabolism in C3 and C4 species of *Atriplex*. *Camegie Inst Washington Yearbook*, pp: 141-148.
- Ozden, M.; Demirel, U; Karhaman, A. 2009. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. *Scientia Horticulturae*. 119: 163-168.
- Padh, H. 1990. Cellular functions of ascorbic acid. *Bioch. Cell. Biol.* 68: 1166-1173.
- Park, Y; Chow, W; Anderson, J. 1995. Light inactivation of functional photosystem II in leaves of peas grown in moderate light depends on photon exposure. *Planta* 196: 401–411.
- Perl-Treves, R; Perl, A. 2002. Oxidative stress: an introduction. In *Oxidative Stress in Plants*. Montagu MV (eds). Taylor & Francis, London, pp 1–32.
- Polívka, T; Zigmantas, D; Sundström, V; 2002. Carotenoid S₁ State in a Recombinant Light-Harvesting Complex of Photosystem II. *Biochemistry* 41: 439–450.
- Rao, M. 2006. Introduction. In *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Ed. Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp: 1-14.
- Reddy, A; Raghavendra, A. 2006. Photooxidative stress. In *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Ed, Rao, K; Raghavendra, A; Reddy, K. Springer. The Netherlands. pp: 157-186.
- Rivas; F, Fornes; M, Agustí. 2008. Girdling induces oxidative damage and triggers enzymatic and non-enzymatic antioxidative defences in Citrus leaves. *Environ. Exp. Bot.* 64: 256–263.
- Rivas, F; Fornes, F; Rodrigo, M; Zacarías, L; Agustí, M. 2010. Changes in carotenoids and ABA content in *Citrus* leaves in response to girdling. *Scientia Horticulturae* 127: 482-487.
- Ruiz-Sánchez, M; Domingo, R; Savé, R; Biel, C; Torrecillas, A. 1997. Effect of water stress and rewatering on leaf water relations of lemon plant. *Biol. Plantarum*. 39: 623-631.

- Salvucci, M; Crafts-Brandner, S. 2004. Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis *Physiologia Plantarum* 120: 179-186.
- Sauter, A; Dietz, K; Hartung, W. 2002. A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signaling. *Plant Cell Environ.* 25: 223-228.
- Savé, R; Biel, C; Domingo, R; Ruiz-Sánchez, MC; Torrecillas, A. 1995. Some physiological and morphological characteristics of citrus plants for drought resistance. *Plant Sci.* 110: 167-172.
- Scandalios, J. 2002. The rise of ROS. *Trends Biochem. Sci.* 27: 483-486.
- Scholander, P; Hammel, H; Bradstreet, E; Hemmingen, E. 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339-345.
- Schwanz, P; Kimball, B; Idso, S; Hendrix, D; Polle, A. 1996. Antioxidants in sun and shade leaves of sour orange trees (*Citrus aurantium*) after long-term acclimation to elevated CO₂. *J. Exp. Bot.* 47: 1941-1950.
- Southwick, S; Davenport, T. 1986. Characterization of water stress and low temperatures effects in flower induction in *Citrus*. *Plant Physiol.* 81: 26-29.
- Srivastava, A; Singh, S; Huchche, A. 2000. An analysis on *Citrus* flowering – a review. *Agric. Rev.* 21: 1-15.
- Stewart, C; Bogess, S; Aspinall, D; Paleg, L. 1977. Inhibition of proline oxidation by water stress. *Plant Physiol.* 59: 930-932.
- Susanto, S; Nakajima, Y; Hasegawa, K; Ozawa, Y. 1992. Effect of early season day/night temperatures on vegetative and reproductive growth of cultivar “Tosa Buntan” pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) *Scientia Horticulturae.* 50: 147-151.
- Syvertsen, G. 1984. Light acclimation in Citrus leaves. II. CO₂ assimilation and light, water, and nitrogen use efficiency. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 812-817.
- Szabó, I; Bergantino, E; Giacometti, G; 2005. Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *Eur. Mol. Biol. Organization* 6: 629-634.

- Taiz, L; Zeiger, E. 2002. Plant Physiology, 3^{er} Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA. pp 623.
- Takahashi, S; Bauwe, H; Badger, M. 2007. Impairment of the photorespiratory pathway accelerates photoinhibition of photosystem II by suppression of repair but not acceleration of damage processes in Arabidopsis. Plant Physiol. 144:487-494.
- Takahashi, S; Murata, N. 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? Trends Plant Sci. 13: 178-182.
- Takahashi, S; Murata, N. 2005. Interruption of the Calvin cycle inhibits the repair of photosystem II from photodamage. Biochim. Biophys. Acta 1708: 352-361.
- Thordal-Christensen, H; Zhang, Z; Wei, Y; Collinge, D. 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. The Plant J. 11: 1187–1194.
- Trejo, C; Clephan, A; Davie, W. 1995. How do stomata read abscisic acid signals? Plant Physiol. 109: 803-811.
- Troll, W.; Linsdley, J. 1955. A photometric method for the determination of proline. J. Biol. Chem. 215: 655-660.
- Tyystjärvi, E; Aro, E. 1996. The rate constant of photoinhibition, measured in lincomycin-treated leaves, is directly proportional to light intensity, Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 2213–2218.
- Uchida, A; Jagendorf, A; Hibino, T; Takabe, T; Takabe, T. 2002. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. Plant Sci. 163: 515-523.
- Valiente, J; Albrigo, G. 2004. Flower bud induction of sweet orange trees (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck): effect of low temperatures, crop load, and bud age. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 129: 158-164.
- Verhoeven, A; Demmig-Adams, B; Adams, W. 1997. Enhanced employment of the xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in spinach exposed to high light and N stress. Plant Physiol. 11: 817-824

- Wellburn, A. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvent with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant. Physiol.* 144: 307-313.
- Wisniewski, K; Zagdanska, B. 2001. Genotypic-dependent proteolytic response of spring wheat to water deficiency. *J. Exp. Bot.* 52: 1455-1463.
- Wu, Q.; Xia, R. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus in well-watered and water stress conditions. *J. Plant Physiol.* 163: 417-425.
- Yabuta, Y; Motoki, T; Yoshimura, K; Takeda, T; Ishikawa, T; Shigeoka, S. 2002. Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress. *Plant J.* 32: 915–925.
- Yokota, A; Takahara, K; Akashi, K. 2006. Water stress. In *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Ed. Springer. The Netherlands. pp 15-39.
- Young, A; 1991. The protective role of carotenoids in higher plants. *Physiology Plantarum* 83: 702-708.
- Zhang, X; Zhang, L; Dong, F; Gao, J; Galbraith, D; Song, C. 2001. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induce stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiol.* 126: 1438-1448.

7. ANEXOS

7.1. FIGURAS CON INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

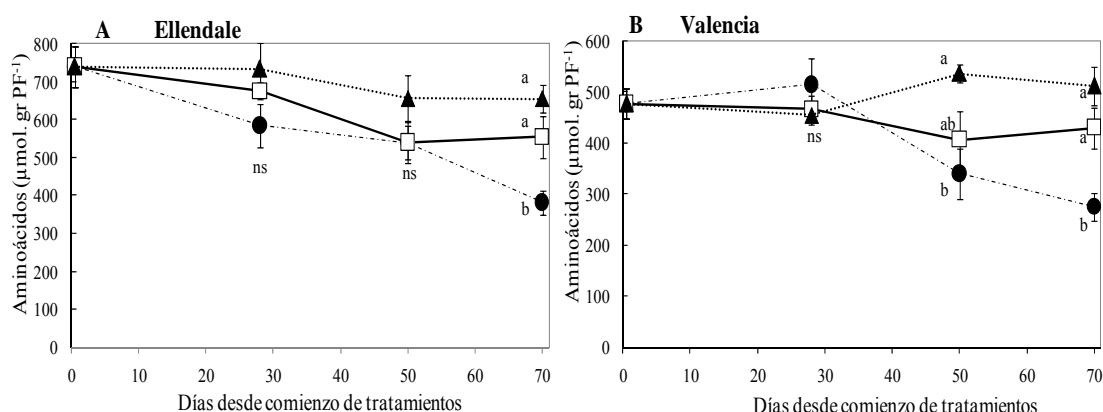


Figura 18. Contenido de aminoácidos ($\mu\text{mol. gr PF}^{-1}$) en 'Ellendale' (A) y 'Valencia' (B) en tres condiciones de disponibilidad de agua; bien regado (Ψ_w : -0,8 a -1,2 MPa) (●), déficit hídrico moderado (Ψ_w : -2,2 a -2,8 MPa) (□), y déficit hídrico severo (Ψ_w : < -4,0 MPa) (▲). Cada punto corresponde a la media \pm E.E. (n=5). Letras distintas en una misma fecha difieren significativamente entre sí (Test de Tukey; $p \leq 0,05$). ns= sin diferencias estadísticas.

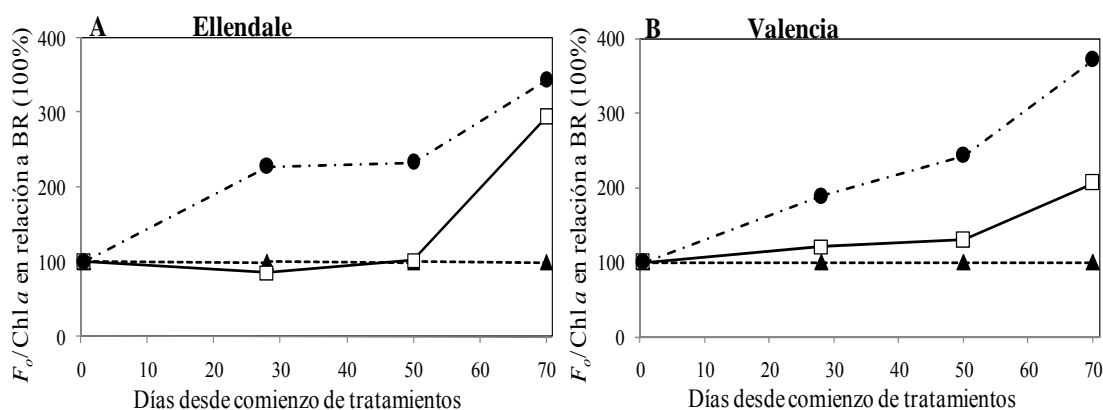


Figura 19. Relación unidades $F_0/\text{clorofila } a$ con BR como base 100, en 'Ellendale' (A) y 'Valencia' (B) en tres condiciones de disponibilidad de agua; bien regado (Ψ_w : -0,8 a -1,2 MPa) (●), déficit hídrico moderado (Ψ_w : -2,2 a -2,8 MPa) (□), y déficit hídrico severo (Ψ_w : < -4,0 MPa) (▲). Cada punto corresponde a la relación promedio de 5 plantas.

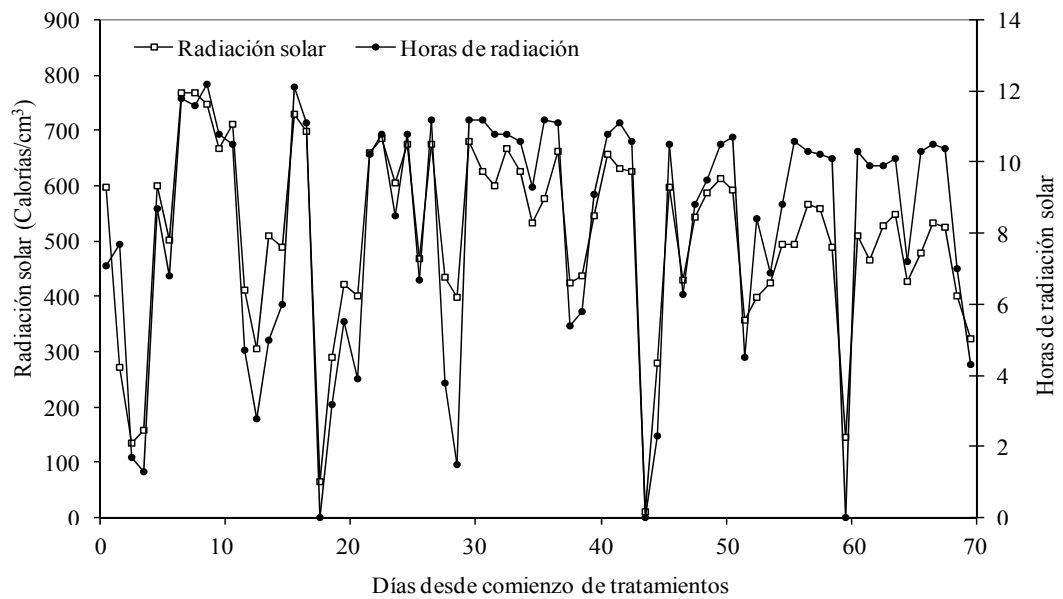


Figura 20. Radiación solar incidente (calorías.cm^{-3}) y horas de radiación solar durante el período de tratamientos.

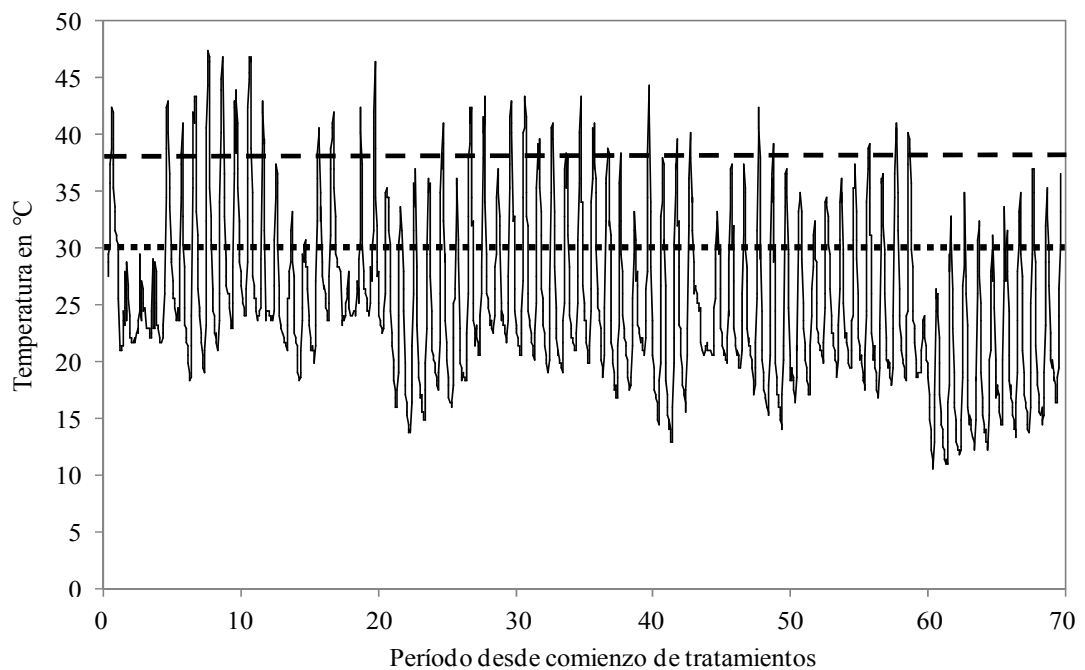


Figura 21. Temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) durante el período de tratamientos. Se señalan además 30°C , temperatura en la cual se comienza a disminuir conductancia estomática en *Citrus* (Khairi y Hall, 1976) y 38°C , temperatura en la cual es afectada la asimilación neta y comienza la acumulación de H_2O_2 en *Citrus* (Guo *et al.*, 2006).