

Efecto de la temperatura, el estrés hídrico y luminoso sobre la heterogeneidad del fotosistema II en cuatro variedades de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.)

Effect of temperature, water and light stress on PSII heterogeneity in four bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.)

JAVIERA GONZÁLEZ¹, CLAUDIO PASTENES¹ & PETER HORTON²

¹Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Casilla 1004, Santiago, Chile, e-mail¹: cpastene@abello.dic.uchile.cl

²Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, Western Bank, Sheffield S10 2TN, United Kingdom

RESUMEN

Las plantas superiores, requieren de mecanismos que permitan proteger a los centros fotosintéticos de daño oxidativo, particularmente en condiciones ambientales que determinen una absorción luminosa en exceso de su capacidad de utilización fotoquímica, como son las altas intensidades de luz, propiamente tal, restricción de agua y aumentos de temperatura. En el mediano y largo plazo los centros PSII tendrían la capacidad de modificar su localización y estructura, formando los centros PSII del tipo β y los estados de transición, cuya variación no depende, exclusivamente, de la intensidad luminosa. En el presente estudio se determinó el efecto de distintos estréss ambientales sobre la heterogeneidad del PSII, en cuatro cultivares de poroto: Arroz Tuscola (AT), Orfeo INIA (OI), Bayos Titán (BT) y Hallado Dorado (HD). En plantas desarrolladas en cámaras de crecimiento, la proporción de centros PSII $_{\beta}$ aumentó hasta en un 100 % en la medida que se incrementó la temperatura. Dicho efecto fue magnificado por el estrés hídrico, en estas plantas. En condiciones de campo, el estrés lumínico impuesto por la fijación de folíolos a la posición horizontal, aumentó aun más el efecto del estrés hídrico sobre la proporción de tales centros, desde un 27 %, en plantas regadas y hoja en posición normal, hasta un 63 % en plantas estresadas y hojas forzadas a la horizontalidad. En cuanto a los estados de transición, se observó, en plantas desarrolladas a 20 °C en cámaras de crecimiento, un aumento de estos al someter sus hojas a 15 °C. Así mismo, temperaturas de 25 a 35 °C indujeron aumentos en los estados de transición. El estrés hídrico, en los cultivares AT y OI, aminoró la magnitud del efecto de la temperatura, al contrario de lo observado en BT. En el cultivar HD, no se distingue un efecto claro del estrés hídrico, sobre la formación de los estados de transición inducidos por cambios en la temperatura. Aún cuando existen diferencias en la magnitud de los cambios observados en las diferentes variedades de poroto, en todos ellos se aprecia la tendencia a modificar la estructura de los centros PSII, de manera de favorecer una menor sobreexcitación de los centros de reacción de dichos complejos, en las situaciones de estrés estudiadas.

Palabras clave: PSII $_{\beta}$, estados de transición, *Phaseolus vulgaris*, fluorescencia de la clorofila, fotosíntesis, estrés hídrico, temperatura.

ABSTRACT

Higher plants have developed multiple mechanisms of photoprotection in order to efficiently use the absorbed energy, as well as protecting the photosynthetic apparatus against oxidative damage. Particularly, under environmental conditions, restrictive for the photochemical use of the absorbed energy, such as high light, water stress and high temperatures. PSII complexes are able to change their location and structure as in PSII $_{\beta}$ and state transitions, but not exclusively upon light intensity. In the present study, the effect of different environmental stresses on PSII heterogeneity in four bean cultivar (*Phaseolus vulgaris* L.): Arroz Tuscola (AT), Orfeo INIA (OI), Bayos Titán (BT) and Hallado Dorado (HD), has been assessed. In chamber grown plants, the proportion of the PSII $_{\beta}$ centers increases up to a 100 % as the temperature rises. A stronger response was observed, upon water stress. Under field conditions, light stress induced by fixing leaves to horizontal position, further increased the water stress dependent effect on PSII $_{\beta}$ centers, from 27 % in free leaves from watered plants up to a 63 % in horizontal leaves from water stressed plants. As for state transitions, an increase was observed in 20 °C grown plants when exposed to 15 °C. Also, temperatures from 25 to 35 °C induced increases in state transitions. Such increases were lowered by water stress, in cultivars AT and OI, maintained in HD and further increased in BT. Even though differences were observed in the extent of the changes on PSII $_{\beta}$ and state transitions among varieties, a clear trend to modify the PSII structure in order to decrease its excitation pressure under the stress conditions studied were observed.

Key words: PSII $_{\beta}$, state transitions, *Phaseolus vulgaris*, chlorophyll fluorescence, photosynthesis, water stress, temperature.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las condiciones ambientales estresantes limitan la habilidad de las plantas para utilizar la energía luminosa absorbida, produciéndose sobreexcitación de los fotosistemas, incluso, a intensidades moderadas de luz (Demming-Adams & Adams 1992). Consecuentemente el daño fotooxidativo, especialmente al fotosistema II (PSII), una de las estructuras más sensibles a estrés abiótico (Havaux 1992), pareciera ser una consecuencia de la actividad fotosintética y, además, el mayor factor causante de reducciones sostenidas en la eficiencia de este proceso (Aro et al. 1993). Sin embargo, los organismos fotosintéticos han desarrollado numerosos mecanismos de protección tendientes a evitar o disminuir los efectos de la absorción excesiva de luz, ya sea disminuyendo la intercepción de luz por medio del movimiento de hojas y cloroplastos (Moshelion & Moran 2000), disipando como calor la energía absorbida en exceso (Horton & Black 1981, Demmig-Adams & Adams 1992) y/o detoxificando las especies reactivas que originan daño, tales como clorofilas en estado de triplete excitado, oxígeno singlete excitado, superóxido, etc. (Cogdell & Frank 1987). Entre todos estos, se cree que la disipación como calor del exceso de energía absorbida es la más relevante en prevención de daño fotooxidativo del aparato fotosintético (Demmig-Adams & Adams 1992). La naturaleza de los mecanismos capaces de inducir la des-excitación no fotoquímica de la energía absorbida, no obstante, es diversa y se puede facilitar por la acidificación del lumen de los tilacoides y mediante la des-epoxidación de carotenoides xantófilos (Bilger & Björkman 1990, Demmig-Adams et al. 1990, Gilmore & Yamamoto 1993, Nigoyi et al. 1997). Además, a partir de cambios conformacionales en el aparato fotosintético, componentes de los complejos PSII se asocian con los PSI, traspasando energía a estos últimos, los que son capaces de des-excitar pigmentos espontáneamente (Horton & Black 1981, Anderson & Andersson 1988, Anderson 1989, Timmerhaus & Weis 1990). Esto denota la existencia de PSII funcionales con distintas conformaciones moleculares, es decir heterogéneos (Melis & Ow 1982, Lavergne & Briantais 1996, André et al. 1998).

La heterogeneidad de los PSII está modulada por la intensidad lumínica, por la capacidad del sistema de utilizarla fotoquímicamente y por la temperatura. Una alteración observada por aumentos de temperatura, es la separación de los centros de reacción (CR) de los PSII de sus complejos de antena periférica (LHCII), migrando los primeros

a las regiones expuestas al estroma de los tilacoides y ubicándose en las cercanías de los fotosistemas I (PSI) (Melis & Homann 1976, Timmerhaus & Weis 1990). El PSII, que se encuentra en su estado y ubicación normal se denomina PSII_α, mientras que al separado de su antena y ubicado en las regiones del tilacoide expuestas al estroma, PSII_β (Thielen & Van Gorkom 1981, Melis 1989). Los centros β fueron identificados mediante el análisis de la cinética rápida de emisión de fluorescencia, en condiciones de bloqueo del transporte de electrones en el PSII, por infiltración con DCMU (Melis & Homann 1976, Melis 1991). Disminuciones en la proporción PSII_α/PSII_β, ocurren al aumentar la temperatura y se cree corresponden a un mecanismo de protección del PSII_α contra la fotoinhibición y/o contra desbalances en la relación ATP/NADPH (Melis & Anderson 1983, Melis 1991, Pastenes & Horton 1996). Otro mecanismo desarrollado por las plantas para optimizar la utilización de la energía capturada y regular así la producción de ATP y NADPH es el llamado estado de transición. Este es considerado una respuesta a mediano plazo del aparato fotosintético frente a cambios en la proporción de excitación recibida por el PSII y PSI (Horton & Black 1981). Si el PSII absorbe más energía que el PSI se crea un desbalance en el flujo de electrones en la membrana tilacoidal, resultando en una reducción de los intermediarios del transporte de electrones. Se cree que la reducción del pool de plastoquinonas y del citocromo b6/f activa una quinasa unida a la membrana tilacoidal que fosforila las proteínas del LHCII (Allen 1995). Esto causa la disociación de la antena (LHCII) del centro de reacción del PSII. La influencia de cargas negativas introducidas por la fosforilación permiten que las membranas apiladas se desempaquen parcialmente permitiendo la difusión del LHCII fosforilado desde la zona entre granas a la zona expuesta al estroma, cerca del PSI. Con esto se reduce el tamaño de la antena funcional del PSII con lo que aumenta la distribución de excitación entre los fotosistemas, disminuyendo así la probabilidad de fotoinhibición (Demmig-Adams & Winter 1988, Melis 1996). Cuando la tasa de absorción de luz del PSI excede la del PSII, la plastoquinona y el citocromo b6/f se oxidan, induciéndose la defosforilación del LHCII por la activación de la fosfatasa unida a las membranas tilacoidales (Melis 1996). Este fenómeno es medido como un apagamiento no fotoquímico de la fluorescencia y ocurre en condiciones de alta intensidad luminosa.

La importancia de estos mecanismos, y su dependencia de los cambios de temperatura se ha atribuido a que con frecuencia en condiciones de campo, altas temperaturas ocurren simultánea-

mente con elevadas intensidades luminosas y, por lo mismo, prevendrían problemas de fotoinhibición (Melis 1991). Los climas caracterizados por altas temperaturas y alta radiación solar normalmente se acompañan, además, por restricciones de agua, ya sea porque el régimen pluviométrico presenta veranos secos, o bien porque incluso contando con agua de riego, la evapotranspiración supera la capacidad de mantener potenciales hídricos altos y constantes a lo largo del día. Es sabido que el déficit hídrico, también afecta al proceso fotosintético, por aumentar considerablemente la resistencia estomática (Cornic 1994). Incluso, en condiciones muy severas, puede causar disfunciones en el centro de reacción de los fotosistemas (Matthews & Boyer 1984) y en las reacciones sucesivas del transporte fotosintético de electrones (Björkman & Powles 1984), alterar la fotofosforilación (Younis et al. 1979, Wise et al. 1990) y el funcionamiento de diversas enzimas que participan en la fijación de carbono (Vu & Yelenosky 1988).

De acuerdo a observaciones anteriores (Sundby et al. 1986, Pastenes & Horton 1996) que demuestran una correlación entre aumentos de temperatura y formación de centros del tipo β , y su interpretación como un mecanismo de fotoprotección, es posible suponer que dichos ajustes también se relacionen con otros factores ambientales estresantes, tales como el déficit hídrico y altas intensidades lumínicas. En el presente estudio se propuso analizar el efecto combinado de la temperatura y disponibilidad hídrica sobre la proporción de los PSII $_{\beta}$ y estados de transición en cuatro cultivares de poroto desarrollados en una cámara de crecimiento. Además, en condiciones de campo, se estudió la variación de la proporción de PSII $_{\beta}$ en dos variedades de poroto sometidas a riego normal y restrictivo, con hoja forzada a la horizontalidad y en posición normal. Las plantas de poroto, en efecto, tienden a modificar el ángulo de sus hojas de manera de evitar la exposición directa del sol. Así, la mantención de las hojas en una posición forzada a la horizontalidad, significa que estas, en vez de recibir intensidades de luz de 300 a 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, PAR, se exponen a niveles de 2.200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante medio día en verano, en Santiago. Esto es, más del doble de la intensidad de saturación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Plantas cultivadas en cámara de crecimiento. Las semillas de poroto de los cultivares Arroz Tuscola

(AT), Orfeo INIA (OI), Bayos Titán (BT) y Hallados Dorados (HD) obtenidos de la colección de germoplasma del Laboratorio de Leguminosas de grano del Departamento de Producción Agrícola de la Universidad de Chile, fueron sembradas en macetas plásticas de 3,5 L. El sustrato utilizado consistió en una mezcla de arena, tierra de hojas y suelo (1:1:1). Las plantas crecieron en una cámara de ambiente controlado, con temperaturas de 22/18 °C (día/noche), un fotoperíodo de 12 h y una intensidad lumínica moderada de 500 $\mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$, utilizando lámparas de sodio (400 W). Las macetas fueron regadas periódicamente con solución nutritiva Hoagland número 2 hasta que alcanzaron el estado de primera hoja trifoliada, luego de lo cual se procedió a la diferenciación del tratamiento hídrico. Las plantas sometidas a estrés fueron regadas con 50 mL de agua destilada dos veces por semana, hasta que alcanzaron un potencial hídrico foliar cercano a -1,2 MPa, determinado a medio día, con una cámara de presión Schollander (Schollander et al. 1965). Las plantas sin déficit hídrico, en cambio, se continuaron regando, con la misma frecuencia de riego, con 300 mL de agua destilada hasta el momento de las mediciones. Se consideró un potencial hídrico para estas plantas mayor a -0,5 MPa, determinado de igual manera que en las plantas con déficit hídrico.

Plantas en condiciones de campo. Se realizó un ensayo en condiciones de campo con los cultivares Orfeo INIA y Arroz Tuscola, con un diseño de bloques al azar con parcela dividida. Cada bloque constó de dos parcelas, una con riego normal y la otra con riego restringido, las que a su vez se dividieron en dos subparcelas de acuerdo al cultivar. La superficie total del ensayo fue de 518 m², en el que las parcelas tuvieron un largo de 19 m, con sub-parcelas de 9 m separadas por un pasillo de 1 m. El ancho de las parcelas varió dependiendo de la distancia entre hileras de cada cultivar, resultando en un ancho de 3 m para AT y de 3,6 m para OI, con seis hileras cada parcela.

El riego de las parcelas se llevó a cabo restituyendo el 100 % de la evapotranspiración (ET) diaria del cultivo calculada de acuerdo a los datos de evaporación de bandeja medidos, diariamente, en la Estación Agroclimatológica de la Estación Experimental La Platina del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA). El riego se realizó por medio de cintas (Chapin-Turbulent, U.S.A.) de 4,83 L m⁻¹ h⁻¹ de capacidad de suministro de agua, impulsada por una bomba de 5,5 HP desde un tranque de acumulación. Cuando las plantas alcanzaron el estado de segunda hoja trifoliada, se procedió a realizar la diferenciación hídrica: las parcelas de riego normal continuaron

regándose con el 100 % de la ET hasta madurez fisiológica mientras que las de riego restringido con sólo el 40 % de la ET.

Mediciones

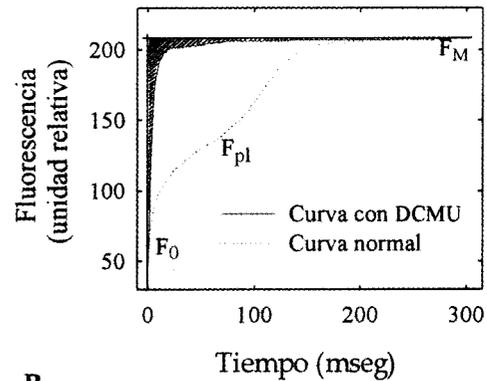
Medición de la cinética rápida de emisión de fluorescencia: La primera hoja trifoliada de plantas cultivadas en maceta fue colocada, sin desprender, sobre la superficie húmeda de una cámara de agua, en oscuridad por 30 min. La temperatura de la superficie de la cámara se ajustó a 15, 20, 25, 30 y 35 °C por medio de un baño termostático de circulación de agua (Poli-Science, U.S.A.). Posteriormente, se tomaron discos de hoja de 1cm de diámetro de estos folíolos, a los que se les realizó una suave abrasión en la superficie abaxial con carborundum. Inmediatamente después, los discos fueron sumergidos en una solución de 50 μ M de 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-Dimethylurea (DCMU) por 10 min de acuerdo al método descrito por Hipkins & Baker (1986) y Pastenes & Horton (1996). Luego se procedió a realizar la medición de la cinética rápida de emisión de fluorescencia en los discos de hoja, utilizando un fluorímetro portátil no modulado Hansatech (PEA, Inglaterra). El procedimiento se realizó en completa oscuridad.

El DCMU, ingrediente activo de herbicidas como el Diurón, se une irreversiblemente al sitio de unión de la quinona B (QB) en la proteína D1 del centro de reacción del PSII, inhibiendo el transporte de electrones más allá de la quinona A (QA) (Melis 1985). Entonces, el área sobre la curva de inducción de fluorescencia, entre F_0 y F_m , es directamente proporcional a la fracción de (QA) reducidas (Fig. 1B) y, por lo tanto, a la proporción de PSII abiertos existentes, es decir capaces de realizar separación de cargas (Melis 1989, Horton & Bowyer 1990).

En el caso de las plantas cultivadas en campo, la cinética de fluorescencia se realizó a temperatura ambiente en hojas colectadas a las 10:00 h y mantenidas en oscuridad durante una hora, de manera de contar con valores de F/F_m máximos. Además, las mediciones fueron realizadas sobre hojas en posición normal y en hojas que fueron forzadas a permanecer en posición horizontal por 72 h, considerando la capacidad de esta especie de mover sus hojas evadiendo la radiación directa del sol.

La función que describe la curva de inducción de emisión de fluorescencia en muestras infiltradas con DCMU entre F_0 y F_m se transformó con la siguiente fórmula:

A



B

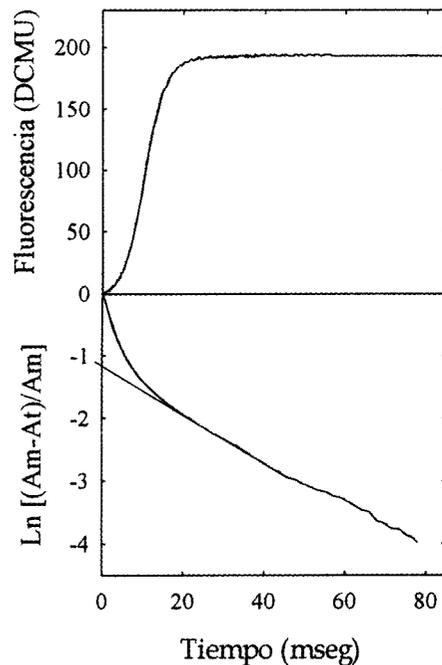


Fig. 1: Inducción de fluorescencia en hojas de poroto de la variedad Orfeo INIA. (A) Cinética normal de fluorescencia del PSII. El área achurada de la curva entre F_0 y F_m representa la energía utilizada por el PSII en la fotoquímica. (B) Logaritmo del área sobre la curva de inducción de fluorescencia con DCMU. La prolongación de la fase lenta hacia el eje Y entrega la concentración relativa de centros β . Am corresponde al área total sobre la curva de inducción; At corresponde al área variable dependiente del tiempo.

Fluorescence induction curves in bean leaves, cv. Orfeo INIA. (A) Normal PSII fluorescence kinetics. Dashed area, from F_0 to F_m , represents the absorbed energy used in photochemistry. (B) Logarithm of the area over the fluorescence induction curve, in DCMU treated leaves. The slow phase of the curve, projected to the Y axis, indicates the relative proportion of PSII_o centers. Am corresponds to the total area over the induction curve; At corresponds to the time dependent area.

$$\text{Ln} [(A_m - A_t)/A_m]$$

donde A_m representa el área total sobre la curva entre F_o y F_m , y A_t el área variable dependiente del tiempo. A partir de la curva resultante se determinó la proporción de centros PSII_β , prolongando la línea de la pendiente de la fase lenta hacia el eje y en el tiempo cero (Fig. 1B). El antilogaritmo del valor interceptado representa el porcentaje de este componente (Melis & Homann 1976, Melis 1985).

Fluorescencia a baja temperatura. Se utilizó el rendimiento de fluorescencia en muestras de hojas a 77 °K para determinar los estados de transición. Los discos de hojas, previamente mantenidos en oscuridad a temperaturas de 15, 20, 25, 30, y 35 °C, fueron iluminados con luz actínica de 1200 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad, durante 35 min, manteniendo la temperatura previa. Posteriormente se oscurecieron por 5 min y se sumergieron en nitrógeno líquido. La medición de la fluorescencia a 77 °K fue realizada de acuerdo al protocolo descrito por Ruban et al. (1991).

Determinación de contenido de clorofila y carotenoides totales: La determinación del contenido de clorofilas a y b, y de carotenoides, se realizó a partir de la primera hoja trifoliada expandida de las plantas desarrolladas en la cámara de crecimiento, de acuerdo a la metodología de Lichtenthaler & Wellburn (1983), con cuatro repeticiones. Se maceraron dos discos de hoja de 0,785 cm^2 en un mortero a -20 °C, con 400 μL de etanol 80 %. El macerado fue centrifugado por 2 min a 1.200 g. El contenido de pigmentos se determinó por medio de un espectrofotómetro, leyendo la absorbancia a 649, 665 y 470 nm (Shimadzu, UV-1601). El cálculo del contenido de pigmentos se realizó de acuerdo a Lichtenthaler & Wellburn (1983) como se detalla en las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \text{Clorofila-a } (\mu\text{g cm}^{-2}) &= 13,96 A_{665} - 6,88 A_{649} \\ \text{Clorofila-b } (\mu\text{g cm}^{-2}) &= 24,96 A_{649} - 7,32 A_{665} \\ \text{Carotenoides } (\mu\text{g cm}^{-2}) &= (1000 A_{470} - 2,05 \\ &\text{Clorofila-a} - 114,8 \text{ Clorofila-b}) / 245 \end{aligned}$$

Análisis estadístico

El diseño aleatorizado para los cultivares de poroto desarrollados en cámaras de crecimiento correspondió a un modelo factorial 4 x 5 x 2 (cultivar, temperatura y condición hídrica), con cuatro repeticiones. Se realizó un análisis de varianza, luego de una prueba de normalidad previa y cuando se encontraron diferencias significativas se utilizó el test de comparación múltiple de Duncan.

Para las plantas de campo, en cambio, se utilizó un modelo de tres factores correspondientes a cultivar, condición hídrica y posición de la hoja, en parcela dividida en bloques completos al azar, con tres repeticiones por sub-parcela. Las unidades completas (parcelas) correspondieron a los niveles hídricos y las subunidades (sub-parcelas) a los distintos cultivares. Se realizó un análisis de varianza de tres vías.

RESULTADOS

Fotosistemas II_β

La curva de inducción de fluorescencia en presencia de DCMU es de tipo bifásica, con una fase inicial sigmoidea rápida seguida de otra fase exponencial lenta (Fig. 1A), lo que muestra la existencia de dos poblaciones de centros PSII con diferente tasa de utilización de luz debido a su tamaño de antena (Melis & Homann 1976, Melis & Anderson 1983, Melis 1991).

En la totalidad de las plantas desarrolladas bajo condiciones controladas se encontraron diferencias significativas en el contenido de PSII_β entre las diferentes temperaturas y condiciones hídricas (Fig. 2). Se puede observar claramente que la proporción de centros PSII_β aumenta con la temperatura, en forma similar a lo descrito por Sundby et al. (1986) en cloroplastos de espinaca y por Pastenes & Horton (1996) en dos variedades de poroto, pero en este caso, el efecto es magnificado por la restricción de riego para todas las temperaturas entre 15 y 30 °C, e incluso a 35 °C en el cultivar AT.

Al analizar el contenido de centros β por temperatura, se observó que no hubo diferencias significativas entre las variedades, para una misma condición hídrica, en los 15, 20, 25 y 30 °C. A los 35 °C el porcentaje de centros β alcanzó su máximo en todas las variedades en ambas condiciones de riego. En la variedad AT, la proporción de centros β de las plantas sometidas a riego normal, fue significativamente menor al resto de las variedades, ya sea regadas normalmente o sometidas a restricción de agua.

La determinación de los centros β en las plantas desarrolladas en el campo se llevó a cabo con una temperatura ambiental de 28 ± 2 °C. En esta condición, al igual que lo observado en las plantas cultivadas en cámaras, también se apreció una mayor proporción de centros PSII_β en las plantas con déficit hídrico en comparación con aquellas con riego normal (Fig. 3). El número de centros β aumentó cuando las hojas fueron forzadas a permanecer horizontales, es decir, obligadas a reci-

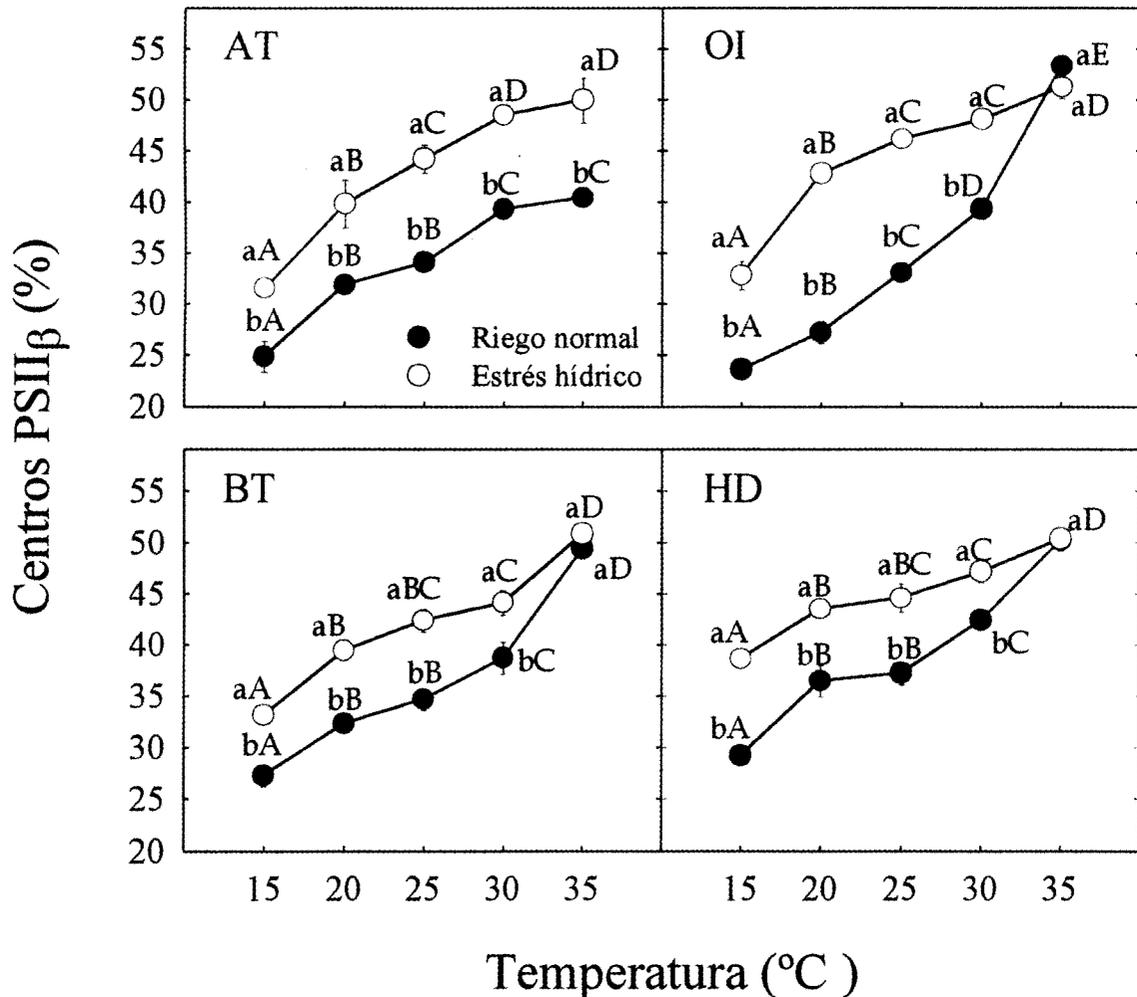


Fig. 2: Proporción de centros PSII β en hojas provenientes de plantas con riego normal y estrés hídrico de diferentes variedades de poroto, Arroz Tuscola (AT), Orfeo INIA (OI), Bayos Titán (BT) y Hallado Dorado (HD), cultivadas en cámara de crecimiento, y sometidas a distintas temperaturas. Letras minúsculas distintas, indican diferencias significativas entre tratamiento de riego, letras mayúsculas indican diferencias significativas entre temperaturas; las barras representan el error estándar, con $P \leq 0.05$.

PSII β centers in leaves from well watered and water stressed bean plants, cvs. Arroz Tuscola (AT), Orfeo INIA (OI), Bayos Titán (BT) and Hallados Dorado (HD), from growth chamber, upon different temperatures. Small letters indicate differences between water regimes; capital letters indicate differences between temperatures. Bars represent standard error, $P \leq 0.05$.

bir toda la luz incidente, tanto en la variedad OI como en AT, sin observarse diferencias significativas entre ellas. La interacción entre los diferentes factores no resultó significativa.

Estados de transición

La menor relación PSI/PSII ocurre a los 20 °C en todas las variedades ya sea con riego normal o restricción hídrica, aumentando al disminuir o aumentar la temperatura (Fig. 4). Las plantas de

OI y AT bajo riego normal mostraron un aumento fuerte y constante en esta relación entre los 20 y 35 °C, mientras que las de estrés mostraron una sensibilidad menor a los aumentos de temperatura (Fig. 4). En el caso del cultivar BT el efecto de la condición hídrica fue distinto, pues se observó un aumento en la proporción de estados de transición por efecto de la temperatura, pero en las plantas con estrés hídrico la pendiente de la curva fue mayor, sobre todo a los 35 °C. La variedad HD no mostró diferencias por efecto del riego.

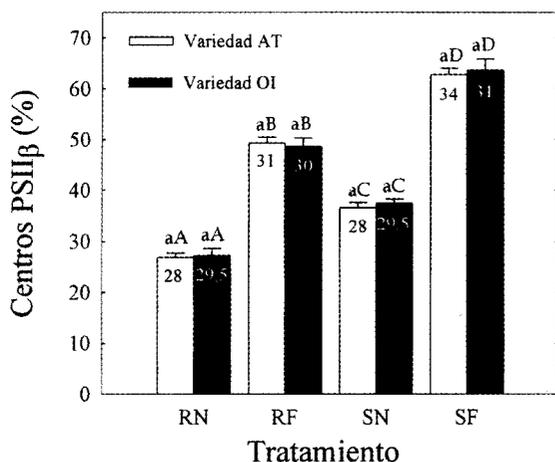


Fig. 3: Proporción de centros PSII_β en hoja proveniente de plantas de poroto de las variedades Arroz Tuscola (AT) y Orfeo INIA (OI), cultivadas en campo, en condiciones de riego normal y hoja con posición normal (RN); riego normal y hoja forzada (RF); estrés hídrico y hoja con posición normal (SN) y estrés hídrico y hoja forzada (SF). La temperatura foliar promedio para cada tratamiento se indica en °C en cada barra. La misma letra minúscula indica no existencia de diferencias significativas entre cultivar; letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamiento de riego y posición de la hoja; las barras representan el error estándar, con $P \leq 0,05$.

PSII_β centers in leaves from field grown bean plants cvs. Arroz Tuscola (AT) and Orfeo INIA (OI). Samples were taken from leaves in its actual position from watered (RN) and water stressed (SN) plants, and leaves maintained horizontally from watered (RF) and water stressed (SF) plants. Average leaf temperature for each treatment is shown inside bars in °C. Same small letters indicate no differences between cultivars for the same leaf position and water regime. Capital letters indicate differences between treatments of water regime and leaf position for each cultivar. Bars represent standard error, $P \leq 0.05$.

Contenido de pigmentos

Se detectaron diferencias significativas en el contenido de clorofila total, clorofila-a, clorofila-b y carotenoides, por efecto del factor variedad (Fig. 5). La condición hídrica no resultó en diferencias significativas en esta medición, salvo en el contenido de clorofila a y carotenoides del cultivar BT. En este último se encontraron los valores promedio extremos, el mínimo en las plantas de riego, con un contenido de clorofila a de 25,3 mg cm⁻² y de carotenoides de 4,2 mg cm⁻² y el máximo en las plantas de estrés hídrico en que la clorofila-a alcanzó 39,9 mg cm⁻² y los carotenoides a 9,2 mg cm⁻². La relación clorofila-a/-b, al igual que en las

mediciones anteriores presentó diferencias significativas entre las variedades, pero fue independiente del tratamiento hídrico.

DISCUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos, se aprecia que los aumentos en la proporción de centros PSII_β reflejan las condiciones de estrés de la planta, tanto térmico como hídrico o luminoso. No resulta del todo claro, sin embargo, si la conversión de los centros PSII de α a β resultan de una adaptación al estrés, que previene la fotoinhibición, son un cambio sin consecuencias, o son el resultado de un daño en este centro. Esta es una discusión que aún está vigente, puesto que todavía no existe evidencia suficiente para concluir si se trata de protección o daño. Más aún, no existe un método directo que permita observar el cambio de estado del PSII.

Algunos autores (Melis 1985, Neale & Melis 1990, Melis 1991) consideran que el PSII_β participa en el ciclo de reparación de los PSII fotoinhibidos. En condiciones de exceso de luz, algunos PSII_α pierden su antena periférica y se movilizan a la región expuesta al estroma en la membrana tilacooidal (PSII_β), para ser reparados, reemplazando la proteína D1 del centro de reacción. Durante este proceso la QB de estos centros perdería la habilidad de reducirse y, por lo tanto, de reducir al pool de plastoquinonas; estos centros son conocidos como centros PSII_β-QB-no reductor o centros inactivos. Una vez reparados, estos centros serían activados por efecto de la luz, uniéndose a su antena periférica y volviendo posteriormente a la región apresada de la membrana del tilacoide (Melis 1991).

La existencia de un rápido recambio de la proteína D1 en la zona del tilacoide expuesta al estroma, coincide con la presencia de estos centros β en la región del margen del grana (Anderson 1989, André et al. 1998). Esta es una zona intermedia entre la región donde se localiza el PSII_α y la no apresada, expuesta al estroma, en donde se supone la presencia del PSII_β junto al PSI (Anderson 1989). Esta ubicación intermedia podría significar una etapa de transición entre el PSII_α y el PSII_β.

Un análisis teórico en base a la comparación de la tasa de incremento de la curva de inducción de fluorescencia entre F_0 y F_{pi} (Fig. 1A) con la cinética de fluorescencia de la fase a, asume que los centros de reacción QB-no reductor son un componente menor de los PSII_α que comparten una antena común con los centros activos (Lavergne & Briantais 1996). Lavergne & Leci (1993) ob-

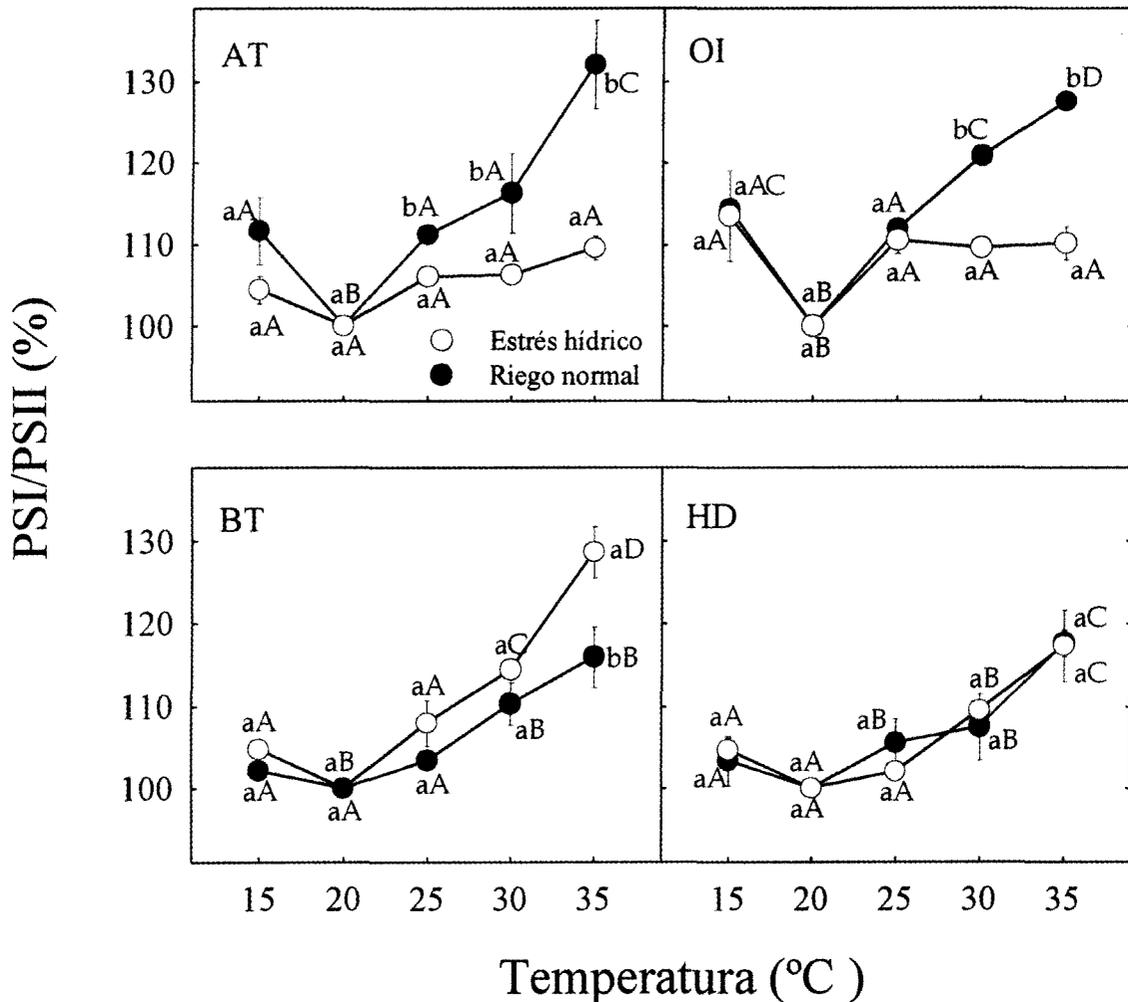


Fig. 4: Relación entre la fluorescencia a 77 °K emitida por los centros PSI/PSII a distintas temperaturas, en hoja proveniente de plantas con riego normal y estrés hídrico de las variedades de poroto Arroz Tuscola (AT), Orfeo INIA (OI), Bayos Titán (BT) y Hallado Dorado (HD), cultivadas en cámara de crecimiento. Los resultados se expresan en porcentaje respecto de la relación observada a 20 °C (temperatura de crecimiento). Letras minúsculas distintas, indican diferencia significativa entre tratamiento de riego; letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre temperaturas; las barras representan el error estándar, con $P \leq 0,05$.

PSI/PSII fluorescence ratio at 77 °K upon different temperatures on leaves from watered and water stressed plants, cvs. Arroz Tuscola (AT), Orfeo INIA (OI), Bayos Titán (BT) and Hallados Dorado (HD), from growth chamber. Results are expressed as percent of 20 °C (growth temperature). Small letters indicate differences between water regimes, capital letters indicate differences between temperatures. Bars represent standard error, $P \leq 0,05$.

servaron, con mediciones de cambios de absorbancia, que estos centros inactivos y los PSII_α tienen una eficiencia fotoquímica similar y una antena en común. Graan & Ort's (1986) dedujeron, a partir de experimentos de reactivación de centros inactivos, que los CR-QB-no reductor son distintos de los PSII que se encuentran en la zona expuesta al estroma (PSII_β). Por lo tanto, bajo condiciones fisiológicas, no existe evidencia que relacione la heterogeneidad del PSII con el recambio del complejo PSII.

Otro aspecto importante que no considera la teoría del recambio del PSII es el efecto de la temperatura, independiente de la intensidad luminosa, sobre la proporción de centros PSII_β. Específicamente cuando aumenta la temperatura dentro del rango de crecimiento de las plantas (15-35 °C), en condiciones de baja intensidad luminosa, no fotoinhedoras, la proporción de centros b aumenta. No obstante no sólo no existe daño por exceso de luz, sino que además es poco

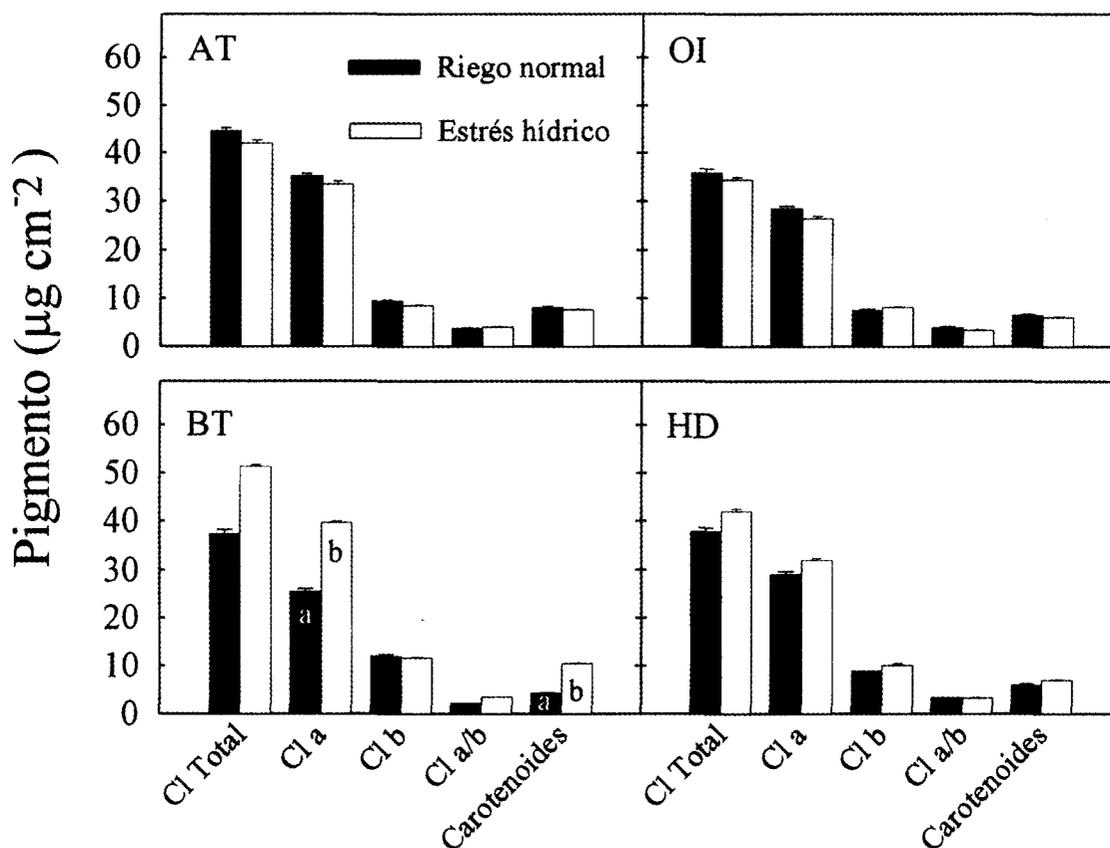


Fig. 5: Efecto de la condición hídrica sobre el contenido de pigmentos (clorofila-a, clorofila-b y carotenoides), en cuatro variedades de poroto, Arroz Tuscola (AT), Orfeo INIA (OI), Bayos Titán (BT) y Hallado Dorado (HD), desarrolladas en cámara de crecimiento. Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de riego, las barras representan el error estándar, con $P \leq 0,05$.

Pigment content (chlorophyll-a, chlorophyll-b and carotenoids) in watered and water stressed beans cvs. Arroz Tuscola (AT), Orfeo INIA (OI), Bayos Titán (BT) and Hallados Dorado (HD) from growth chamber plants. Small letters indicate differences between water regimes. Bars represent standard error, $P \leq 0.05$.

probable que temperaturas de 20 a 25 °C induzcan daño a nivel de fotosistemas.

Una interpretación alternativa es que los centros B son un mecanismo ya no de reparación, sino de defensa de la planta para evitar la foto-inhibición. Los PSII_o activos al encontrarse separados de su antena periférica disminuyen la captura de luz de excitación permitiendo una relajación al sistema transportador de electrones que se encuentra eventualmente sobre reducido por excesos de luz (Sundby et al. 1986, Anderson & Andersson 1988, Pastenes & Horton 1996). Es sabido que el PSII_o es sensible a la fotoinhibición, pero en el caso de los complejos PSII_o, existe evidencia que se afecta menos frente a la misma circunstancia (Neale & Melis 1990, André et al. 1998). Esto último por el hecho que se encuentran en las cercanías del PSI, lo que podría significar

un traspaso de energía a este otro fotosistema, el cual tiene la capacidad de disipar el exceso de energía más fácilmente en forma de calor (Laverne & Briantais 1996). Ruban (1991) encontró en cloroplastos a 40 °C una transferencia de energía a los PSI desde la antena interna del PSII. Pastenes & Horton (1996) observaron un aumento de los centros B a altas temperatura en poroto, asociado a un aumento en la tasa de transporte de electrones a través de los centros de reacción de los PSI, en comparación a los PSII.

Una observación interesante es el hecho que aumentos de temperatura a 35 °C tienden a eliminar las diferencias en la concentración de PSII_o producidas por el estrés hídrico en las plantas cultivadas en cámara, excepto en la variedad AT (Fig. 2). En las plantas de campo, por su parte, los diferentes estreses parecieran tener un efecto adi-

tivo (Fig. 3). Es poco probable que estos cambios reflejen un daño directo por déficit de agua pues el PSII posee una alta tolerancia al estrés hídrico. Se ha observado en plantas con un contenido relativo de agua de 70 % que el rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica del PSII solo disminuye un 15 % (Havaux 1992). Sin embargo, más allá de ese límite, la fijación de CO₂ se ve afectada producto del cierre estomático. La disminución de la concentración interna de CO₂ a nivel foliar, altera el funcionamiento del aparato fotosintético y, por lo tanto, el rendimiento cuántico y la fotosíntesis neta máxima (Havaux 1992, Cornic 1994). En estas condiciones la planta sigue absorbiendo energía luminosa y para evitar la formación de especies altamente tóxicas, debe activar sus mecanismos de disipación de energía o disminuir su absorción. Es posible que los PSII_β contribuyan con esta función, siendo la razón por la cual la proporción de estos centros es mayor en condiciones de estrés hídrico que bajo riego normal, a la misma temperatura en las plantas desarrolladas en la cámara de crecimiento (Fig. 2) y en condiciones de campo en hojas sin forzar (Fig. 3). Havaux (1992) observó que el rendimiento cuántico máximo del PSII en condiciones de alta intensidad luminosa y temperatura, disminuyó menos en plantas con estrés hídrico que en plantas con riego normal y sugiere que el estrés hídrico ayuda a disminuir el daño por fotoinhibición del PSII en plantas sometidas a alta temperatura. Lo anterior debido a que, producto de cambios en la composición lipídica de la membrana del tilacoide por aumentos en el contenido de ácidos grasos saturados, la interacción proteína-lípido se estrecha, evitándose la fluidez de la membrana y los cambios conformacionales de las proteínas tilacoidales que ocurre por las altas temperaturas. Es posible que el alto contenido relativo de PSII_β obtenido en las plantas de campo bajo condiciones de estrés hídrico y luminoso se relacione con este efecto de resistencia al daño por fotoinhibición observado por Havaux (1992).

En el caso de las hojas forzadas a la horizontalidad en plantas cultivadas en campo es poco probable que el gran aumento en el contenido de centros PSII_β se deba a daño fotoinhibitorio, debido que se observó en dichas plantas, una recuperación completa del rendimiento cuántico máximo en las horas de la mañana siguiente al día de medición (datos no incluidos).

Aparentemente, el estrés luminoso sería más determinante en la formación de centros β que el estrés hídrico (Fig. 3). Cuando el aparato fotosintético está expuesto a alta intensidad luminosa por un tiempo prolongado, puede sufrir se-

veros daños como consecuencia directa de la absorción de energía en los PSII, más allá de la utilizada por el transporte de electrones (Demmig-Adams & Adams 1992, Osmond 1993). Por lo general, bajo condiciones de campo, una fuerte intensidad luminosa se acompaña de altas temperaturas. De acuerdo con lo discutido anteriormente, los PSII_β al carecer del complejo de antena periférica y al encontrarse en la región de la membrana del tilacoide expuesta al estroma, lejos del PSII_α, disminuyen la absorción de energía del PSII. Esto evita la acumulación prolongada de estados excitados de pigmentos de clorofila que puedan reaccionar con el oxígeno para formar especies oxígeno activas, altamente tóxicas.

Los estados de transición, que también se consideran un cambio estructural importante a nivel de los PSII, dependen de la luz, y su magnitud podría estar modulada por la temperatura (Pastenes & Horton 1996), el gradiente de pH, la composición iónica de la fase acuosa en contacto con la superficie estromal y el estado de desarrollo del cloroplasto (Horton & Bowyer 1990). Se cree que los estados de transición están involucrados en la redirección de la energía hacia el PSI, pero aún no hay un acuerdo acerca de la eficiencia con la que la energía redirigida es finalmente utilizada en la fotoquímica de dicho fotosistema (Horton & Black 1981).

Se asume que la relación de emisión de fluorescencia a 77 °K entre 685-695 y 740 nm, refleja la variación en la proporción de estos centros. Se ha demostrado que la fosforilación de la antena LHCII se acompaña de una disminución en la emisión de fluorescencia a 77 °K de 685-695 nm (PSII) en comparación con la de 735 nm (PSI), lo que significa que existe una redistribución de la energía absorbida desde el complejo PSII al PSI (Horton & Black 1981, Horton & Bowyer 1990).

Se ha sugerido, de acuerdo a mediciones de emisión de fluorescencia a 77 °K, que el LHCII fosforilado (LHCII-p) se asocia estructural y funcionalmente con el PSI para disminuir el desbalance en la distribución de energía de excitación entre los dos fotosistemas. Sin embargo, químicamente no se ha podido realizar una unión entre la LHCII-p y el PSI (Melis 1996). Más aún, demostraciones de transferencia de energía de excitación de la clorofila b al P₇₀₀ realizados en preparaciones de tilacoides con un alto contenido de LHCII-p muestra una baja eficiencia de interacción entre el LHCII-p y el PSI (Deng & Melis 1986).

El estado de transición involucra cambios organizacionales, y no cambios en la composición, que ocurren en la membrana tilacoidal en el transcurso de pocos minutos, como una respuesta

a la variación en la calidad de luz (Melis 1996). Este se ha interpretado como un control fino de la distribución de la energía de excitación entre el PSII y el PSI que no se considera una respuesta suficiente o eficiente en casos de desbalances fuertes y prolongados de la excitación entre los dos fotosistemas (Anderson & Andersson 1988).

Al someter las plantas a temperaturas menores a las de crecimiento (Fig. 4), se espera una sobre reducción del pool de plastoquinonas, con la consecuente fosforilación de la antena periférica del PSII (Horton & Black 1981), lo que explica la tendencia a aumentar la relación PSI/PSII a 15 °C (Fig. 4). Sin embargo, al aumentar la temperatura, aún cuando se espera que los procesos enzimáticos que consumen el poder reductor y la energía producida en la fase clara de la fotosíntesis, aumenten, y por lo tanto, disminuya el nivel de reducción del pool de plastoquinonas, la relación PSI/PSII indica un aumento en los estados de transición. Es sabido que, a temperaturas fisiológicas superiores a las de crecimiento, como las utilizadas en el presente estudio, ocurre un desempacamiento de las granas en el cloroplasto, lo que podría causar una distribución aleatoria de los CR-LHCII y el PSI. Este efecto independiente de los centros β y los estados de transición, provoca que la redistribución de energía a los fotosistemas sea diferente (Horton & Black 1983). En este caso, sin embargo, es poco probable que los cambios en la relación PSI/PSII a 77 °K (Fig. 4) se deban a dicho efecto, pues estos sólo se observan en condiciones de iluminación (Pastenes & Horton 1996).

Cuando por acción de la temperatura se presentan simultáneamente el estado de transición y la formación de PSII $_{\beta}$ podría ocasionarse un efecto sinérgico, el LHCII fosforilado puede conectar el PSII $_{\beta}$ con el PSI permitiendo así la redistribución de energía entre ellos (Timmerhaus & Weis 1990). Una disminución de los niveles de fluorescencia, F_0 y F_M observado durante la formación de estados de transición, indica que estos no se unen a los PSII estromales, sino que probablemente sirvan como antena del PSI (Lavergne & Briantais 1996).

De acuerdo con los datos experimentales obtenidos, los estados de transición no serían el mecanismo disipador de energía de mayor importancia en los cultivares OI y AT bajo condiciones de estrés hídrico y sometidas a alta temperatura. Lo anterior debido a que la relación PSI/PSII a temperaturas superiores de 25 °C, en estas plantas, varía muy poco (Fig. 4). La causa de este efecto puede estar relacionada con la formación de los centros PSII $_{\beta}$. La ocurrencia de conversión de centros PSII al tipo β , implica que la presión por reducir el pool de plastoquinonas, disminuye. Siendo este factor, principalmente, el que induce

la activación de la quinasa responsable de la fosforilación y posterior migración de las antenas colectoras, es posible pensar que en AT y OI, la disminución de los centros PSII $_{\alpha}$, disminuya la probabilidad de ocurrencia de los estados de transición.

La variación obtenida en la medición de la relación PSI/PSII de las plantas de la variedad BT, en donde las plantas sometidas a déficit hídrico poseen una mayor proporción de estados de transición que las plantas de riego normal, puede deberse a una distorsión del espectro de fluorescencia. En plantas superiores, la emisión de luz para el PSII es absorbida fuertemente por la clorofila-b, mientras que la emisión de luz para el PSI es absorbida más fuertemente por la clorofila a (Melis 1991). Normalmente las moléculas de clorofila pueden reabsorber fotones emitidos por otras moléculas de este pigmento, causando una sobreestimación en la medición de la emisión de fluorescencia. Este efecto puede anularse si el contenido de clorofila permanece constante entre las plantas (Hipkins & Baker 1986). Debido a que se encontraron diferencias significativas en el contenido de clorofila-a entre las plantas de BT con estrés hídrico y las con riego normal (Fig. 5), no se puede descartar la presencia de errores experimentales en la determinación de estados de transición. Eso sí, las tendencias en la variación de los estados de transición son similares a las demás variedades, en donde no se encontraron diferencias significativas en el contenido de clorofila entre las plantas con riego y estrés (Fig. 5).

Los resultados obtenidos en la presente investigación, confirman el hecho de que los complejos fotosintéticos, en particular el PSII, se presentan como unidades flexibles, capaces de modificar, no sólo su estructura, si no, presumiblemente su ubicación. Esto es evidente en condiciones estresantes, como lo son el déficit hídrico y la sobre exposición a la luz. En ambos casos, se trata de situaciones de riesgo para la estabilidad del aparato fotosintético, pues se traducen en disminuciones en la disponibilidad de CO $_2$ en los sitios de carboxilación. En el caso particular, del cultivo de poroto, se pudo constatar una tendencia a escapar de la sobre-reducción de centros PSII, mediante la formación de PSII del tipo β y la formación de estados de transición, no obstante, se aprecian marcadas diferencias en la magnitud de dichos cambios, entre variedades.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue financiado por el proyecto FONDECYT 1960961 y el proyecto British

Council-CONICYT 1996-02-103. Los autores agradecen al Dr. Manuel Pinto por su colaboración y facilidades de laboratorio y al Profesor Alberto Mansilla por su colaboración en el tratamiento estadístico de los resultados.

LITERATURA CITADA

- ALLEN JF (1995) Thylakoid protein phosphorylations, state 1-state 2 transitions and photosystem stoichiometry adjustment: redox control at multiple levels of gene expression. *Plant Physiology* 93: 196-205.
- ANDERSON JM & B ANDERSSON (1988) The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. *Trends in Biochemical Sciences* 13: 351-355.
- ANDERSON JM (1989) The grana margins of plant thylakoid membranes. *Plant Physiology* 76: 243-248.
- ANDRÉE S, E WEIS & A KRIEGER (1998) Heterogeneity and photoinhibition of photosystem II studied with thermoluminescence. *Plant Physiology* 116: 1053-1061.
- ARO EM, I VIRGIN & B ANDERSSON (1993) Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta* 1143: 113-134.
- BILGER W & O BJÖRKMAN (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25: 173-185.
- BJÖRKMAN O & SB POWLES (1984) Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: Interactions with light levels. *Planta* 164: 490-504.
- COGDELL RJ & HA FRANK (1987) How carotenoids function in photosynthetic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1020: 1-24.
- CORNIC G (1994) Drought stress and high light effects on leaf photosynthesis. En: Baker NR & JR Bowyer (eds) *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field*: 297-313. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, United Kingdom.
- DEMING-ADAMS B & K WINTER (1988) Characterization of three components of non-photochemical fluorescence quenching and their response to photoinhibition. *Plant Physiology* 15: 163-178.
- DEMMIG-ADAMS B, WW ADAMS III, U HEBER, S NEIMANIS, K WINTER, A KRÜGER, FC CZYGAN, W BILGER & O BJÖRKMAN (1990) Inhibition of zeaxanthin formation and of rapid changes in radiationless energy dissipation by dithiothreitol in spinach leaves and chloroplasts. *Plant Physiology* 92: 293-301.
- DEMMIG-ADAMS B & WW ADAMS III (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* 43: 599-626.
- DENG X & A MELIS (1986) Phosphorylation of the light-harvesting complex in higher plant chloroplasts: effect on PSII and PSI absorption cross section. *Photobiochemistry and Photobiophysics* 13: 41-52.
- GILMORE AM & HY YAMAMOTO (1993) Linear models relating xanthophylls and lumen acidity to non-photochemical fluorescence quenching. Evidence that antheraxanthin explains zeaxanthin-independent quenching. *Photosynthesis Research* 35: 67-78.
- GRAAN T & DR ORT'S (1986) Detection of oxygen-evolving photosystem II centers inactive in plastoquinone reduction. *Biochimica et Biophysica Acta* 852: 320-330.
- HAVAUX M (1992) Stress tolerance of photosystem II in vivo: antagonistic effects of water, heat and photoinhibition stresses. *Plant Physiology* 100: 424-432.
- HIPKINS MF & NR BAKER (1986) Spectroscopy. En: Hipkins MF & NR Baker (eds) *Photosynthesis, energy transduction*: 51-101. IRL Press, Oxford, United Kingdom.
- HORTON P & MT BLACK (1981) Light-dependent quenching of chlorophyll fluorescence in pea chloroplasts induced by adenosine 5-triphosphate. *Biochimica et Biophysica Acta* 635: 53-62.
- HORTON P & MT BLACK (1983) A comparison between cation and protein phosphorylation effects on the fluorescence induction curve in chloroplasts treated with 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea. *Biochimica et Biophysica Acta* 722: 214-218.
- HORTON P & JR BOWYER (1990) Chlorophyll fluorescence transients. En: Harwood JL & JR Bowyer (eds) *Methods in plant biochemistry*, 4: 259-296. Academic Press, New York, New York.
- LAVERGNE J & E LECI (1993) Properties of inactive photosystem II centers. *Photosynthesis Research* 35: 323-343.
- LAVERGNE J & JM BRIANTAIS (1996) Photosystem II heterogeneity. En: Ort DR & CF Yocum (eds) *Oxygenic photosynthesis: the light reaction*: 265-287. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- LICHTENTHALER HK & AR WELLBUR (1983) Determination of total carotenoids and chlorophyll *a* and *b* of leaf extract in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 603: 591-592.
- MATTHEWS MA & JS BOYER (1984) Acclimation of photosynthesis to low leaf water potentials. *Plant Physiology* 74: 161-166.
- MELIS A & P HOMANN (1976) Heterogeneity of the photochemical centers in system II of chloroplasts. *Photochemistry and Photobiology* 23: 343-350.
- MELIS A & RA OW (1982) Photoconversion kinetics of chloroplast photosystems I and II, effect of Mg²⁺. *Biochimica et Biophysica Acta* 682: 1-10.
- MELIS A & JM ANDERSON (1983) Structural and functional organization of the photosystem in spinach chloroplasts. Antenna size, relative electron-transport capacity, and chlorophyll composition. *Biochimica et Biophysica Acta* 724: 473-484.
- MELIS A (1985) Functional properties of photosystem II_B in spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 808: 334-342.

- MELIS A (1989) Spectroscopic methods in photosynthesis: photosystem stoichiometry and chlorophyll antenna size. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 323: 397-409.
- MELIS A (1991) Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta* 1058: 87-106.
- MELIS A (1996) Excitation energy transfer: functional and dynamic aspects of Lhc (cab) proteins. En: Ort DR & CF Yocum (eds) *Oxygenic photosynthesis: the light reaction*: 523-538. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- MOSHELION M & N MORAN (2000) Potassium-efflux channels in extensor and flexor cells of the motor organ of samanea saman are not identical. Effects of cytosolic calcium. *Plant Physiology* 124: 911-919.
- NEALE PJ & A MELIS (1990) Activation of a reserve pool of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* counteracts photoinhibition. *Plant Physiology* 92: 1196-1204.
- NIGOYI KK, OBJÖRKMAN & AR GROSSMANN (1997) The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 14162-14167.
- OSMOND CB (1993) What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants: En: Baker NR & JR Bowyer (eds) *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field*: 1-24. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, United Kingdom.
- PASTENES C & P HORTON (1996) Effect of high temperature on photosynthesis in beans. I. Oxygen evolution and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology* 112: 1245-1251.
- RUBAN AV (1991) The use of excitation fluorescence spectroscopy in the study of short-term chloroplast membrane reorganisation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1058: 411-415.
- RUBAN AV & VA TRACH (1991) Heat-induced reversible changes in photosystem I absorption cross-section of pea chloroplasts and sub-chloroplast preparations. *Photosynthesis Research* 29: 157-169.
- SCHÖLLANDER PF, HT HAMMEL, ED BRADSTREET & EA HEMMINGSEN (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339-346.
- SUNDBY C, A MELIS, P MAENPAA & B ANDERSSON (1986) Temperature dependent changes in the antenna size of photosystem II. Reversible conversion of photosystem II alpha to photosystem II beta. *Biochimica et Biophysica Acta* 851: 475-483.
- THIELEN AMPG & HJ VAN GORKOM (1981) Quantum efficiency and antenna size of photosystem II_α, II_β and I in tobacco chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 635: 111-120.
- TIMMERHAUS M & E WEIS (1990) Regulation of photosynthesis: α- to β-conversion of photosystem II and thylakoid protein phosphorylation. En: Baltscheffsky M (ed) *Current Research in Photosynthesis*: 771-774. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- VU JCV & G YELENOSKY (1988) Water deficit and associated changes in some photosynthetic parameters in leaves of Valencia orange (*Citrus sinensis* L.). *Plant Physiology* 88: 375-378.
- WISE RR, JR FREDERICK, DM ALM, DM KRAMER, JD HESKETH, AR CROFTS & DR ORT (1990) Investigation of the limitations to photosynthesis induced by leaf water deficit in field-grown sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell and Environment* 13: 923-931.
- YOUNIS HM, JS BOYER & E GOVINDJE (1979) Conformation and activity of chloroplast coupling factors exposed to low chemical potential of water in cell. *Biochimica et Biophysica Acta* 548: 328-340.

Editor Asociado: L. Corcuera

Recibido el 30 de noviembre de 2000; aceptado el 12 de julio de 2001