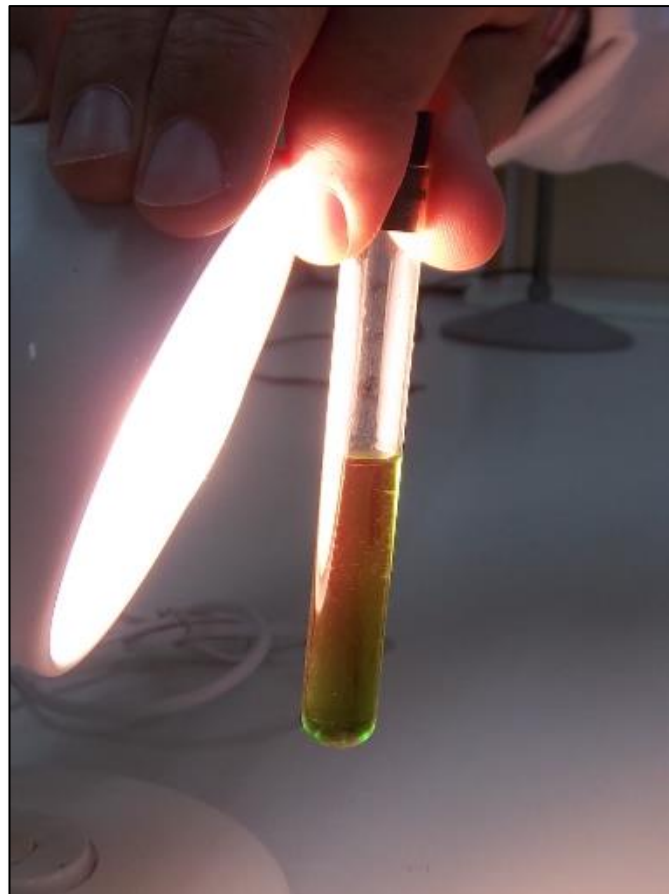


ENSAYOS PARA ESTUDIAR LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA α

Cuaderno de prácticas

Alicia Victoria Perera-Castro



ÍNDICE

MARCO CONCEPTUAL.....	2
Antecedentes históricos.....	2
Fracciones de energía: las tres vías de un fotón.....	3
Rendimiento cuántico máximo y efectivo del PSII.....	3
Photoprotección y photoinhibición mediante fluorescencia de la clorofila.....	6
Fotosíntesis y fluorescencia de la clorofila. Tasas de transporte electrónico.....	8
FASE EXPERIMENTAL.....	10
Ensayo 1. Curvas de inducción + recuperación.....	10
Cuantificación de la fotoinhibición dinámica y crónica.....	
Ensayo 2. Curvas de luz. ETRmax y PPFDsat.	14
CASOS DE ESTUDIOS.....	19
Ejemplo 1. Determinación de límites térmicos del rosalito del Teide (<i>Pteroccephalus lasiospermus</i>) mediante curvas de inducción.....	19
Ejemplo 2. Plasticidad fenotípica de la capacidad fotosintética en plantas alpinas.....	21
Ejemplo 3. Análisis de la fotoinhibición dinámica y crónica en relación con la temperatura en plantas vasculares de la Antártida.....	26
REFERENCIAS.....	29

MARCO CONCEPTUAL

Antecedentes históricos

En 1834, David Brewster reportó que, al hacer incidir un rayo de sol sobre una extracción alcohólica de hojas de laurel, el líquido verde debido a la presencia de clorofilas mostraba un tono rojo brillante que retornaba al verde en cuanto la iluminación directa del líquido cesaba. Esta emisión de luz roja de la clorofila en solución (con un pico máximo a 685 nm) se denominó fluorescencia. Müller (1874) observó que la fluorescencia registrada en una hoja intacta era mucho más débil que en una dilución de clorofilas e intentó establecer sin éxito una relación entre esta fluorescencia y la fotosíntesis. Fue Kautsky y colaboradores en el Instituto de Química de la Universidad de Heidelberg, Alemania, quienes pudieron demostrar la relación propuesta por Müller en un artículo publicado en menos de una página titulado “*Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation*” (en castellano, Nuevos experimentos sobre la asimilación del dióxido de carbono), en 1931. En él concluían que, al iluminar una hoja, la fluorescencia de la clorofila incrementa rápidamente a un máximo y desciende hasta una fase estable. Al repetir el experimento en hojas sometidas a un tratamiento con ácido cianhídrico (HCN) o temperaturas de 30 o 0°C, observaron que el descenso de la clorofila se veía impedido en las hojas envenenadas con HCN y expuestas a bajas temperaturas, concluyendo por tanto que la cinética de la fluorescencia estaba intrínsecamente relacionada con la asimilación de CO₂. Los autores sugirieron que cuando se observaba un descenso en la fluorescencia de la clorofila, mayor cantidad de fotones eran destinados a producir energía química. A la cinética típica de la fluorescencia descrita por Kautsky e Hirsch se le denomina cinética o efecto Kautsky, inducción de la fluorescencia o transición de la fluorescencia (del inglés, *fluorescence transient*).

Desde la década de los 80 esta técnica ha ido adquiriendo complejidad y en la actualidad la fluorescencia de la clorofila a es una medida indirecta y no destructiva del estado funcional de la planta, fundamental en numerosos estudios de Ecofisiología Vegetal.

Fracciones de energía: las tres vías de un fotón

La luz puede ser entendida como una fuente no continua de energía. Cada partícula o unidad de energía de la luz se denomina *quantum* o fotón. Cuando un fotón alcanza la clorofila de los complejos antena (LHCII y LHCI), ésta incrementa su estado de excitación. La clorofila en este estado de excitación puede ceder su energía hacia una de las tres vías posibles (Krause y Weis, 1991):

- 1) Vía fotoquímica. La energía de excitación se transfiere a otra molécula de clorofila del complejo antena hasta alcanzar finalmente las clorofilas de los centros de reacción, en donde será utilizado en la hidrólisis del agua y las subsecuentes reacciones bioquímicas.
- 2) Vía no-fotoquímica de disipación térmica (disipación no radiactiva). La clorofila excitada retorna a su estado basal de energía mediante disipación térmica. En este proceso ningún fotón es emitido.
- 3) Vía no-fotoquímica de fluorescencia (disipación radiactiva). La clorofila excitada emite un fotón de longitud de onda mayor (680-760 nm) y menos energética. Esta luz emitida es la denominada fluorescencia. La mayor parte de la fluorescencia registrada en una hoja a temperatura ambiente se emite por la clorofila *a* del PSII. Sin embargo, la fluorescencia originaria de la clorofila *a* asociada al PSI puede incrementarse cuando el tejido se enfría a 77K.

Estos tres procesos son competitivos y excluyentes. La fracción de energía que es disipada por la vía de la fluorescencia *in vivo* es relativamente pequeña, del 3-5% de la energía total incidente (Walker, 1987). A pesar de ello la medición de la variación de la fluorescencia permite indirectamente conocer de un modo no destructivo la contribución de las vías fotoquímicas y de disipación por calor. En los apartados siguientes se explica el modo de medir e interpretar la fluorescencia de la clorofila.

Rendimiento cuántico máximo y efectivo del PSII

En una hoja iluminada, los procesos de captación de luz, canalización hacia las clorofilas de los centros de reacción del PSII y reducción del pool de plastoquinonas son mucho más rápidos que los pasos posteriores en la cadena de transporte electrónico, por lo que se tiende a producir una cierta acumulación de quinonas reducidas (plastohidroquinonas, Q_A o el aceptor primario de electrones) a la espera de ser oxidadas por el siguiente aceptor de electrones. Consecuentemente, aquellos centros de reacción del PSII cuyas

quinonas estén reducidas no podrán, temporalmente, canalizar más energía procedente de las antenas, lo que conlleva a un aumento en la disipación de esta energía en forma de emisión de fluorescencia. Estos centros de reacción reciben el nombre de centros “cerrados” (reducidos), en contraposición a los centros “abiertos” (oxidados), que sí son capaces de procesar energía y reducir de ese modo la emisión de fluorescencia.

En una hoja previamente adaptada a oscuridad todos los centros de reacción estarán abiertos. Al iluminar el material con la denominada **luz de medida** la proporción de centros de reacción cerrados sigue siendo prácticamente nula. La luz de medida es lo suficientemente débil y de baja frecuencia para no inducir el transporte electrónico pero lo suficientemente alta para registrar el nivel mínimo de fluorescencia, denotado como F_0 . Es entonces cuando se aplica un pulso saturante de alta intensidad ($>5000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) durante un periodo muy corto de tiempo ($< 1 \text{ s}$), de modo que los centros de reacción se cierran (las quinonas se reducen) y al no poder ceder los electrones al siguiente aceptor, permanecen cerrados haciendo que la emisión de fluorescencia se incremente a su nivel máximo, denotado como F_m . La fluorescencia variable F_v no es más que la diferencia entre F_m y F_0 . De esta forma se obtiene el parámetro F_v/F_m , el cual se define como el **rendimiento cuántico máximo del PSII**. Al estar inactivada la vía de la disipación por calor como resultado de la adaptación a oscuridad, la F_v es equivalente a la energía máxima que puede ser canalizada por la vía fotoquímica. Los valores óptimos de F_v/F_m varían entre 0,75 y 0,85 (Bjorkman y Demming, 1987; Maxwell y Johnson, 2000; Lichtenthaler *et al.*, 2005). Un descenso de estos valores puede ser indicativo de daño del aparato fotosintético (eg. Lee *et al.*, 1999), por lo que este parámetro ha sido utilizado en numerosos estudios para testar la respuesta de las plantas a diferentes estreses ambientales. Valores mayores a los indicados son probablemente consecuencia de un error de medida.

Por el contrario, en una hoja no adaptada a oscuridad la vía de disipación por calor y la cadena de transporte electrónico sí estarán activadas, por lo que tras medir la fluorescencia basal (denotada en este caso como F' o F_s) e inmediatamente después aplicar un pulso saturante de luz, la fluorescencia solo se incrementará hasta alcanzar la llamada fluorescencia máxima aparente (F_m'), cuyo valor siempre será menor al F_m . La diferencia entre F_m' y F_s , relativizado a F_m' es lo que se conoce como **rendimiento cuántico actual o efectivo del PSII**, denotado como $Y(\text{II})$, $\Delta F/F_m'$, ϕ_{II} o ϕ_{PSII} , cuyos valores serán siempre menores a

los de F_v/F_m , dependiendo de la contribución de esa vía de disipación por calor y de la activación de procesos fotoquímicos.

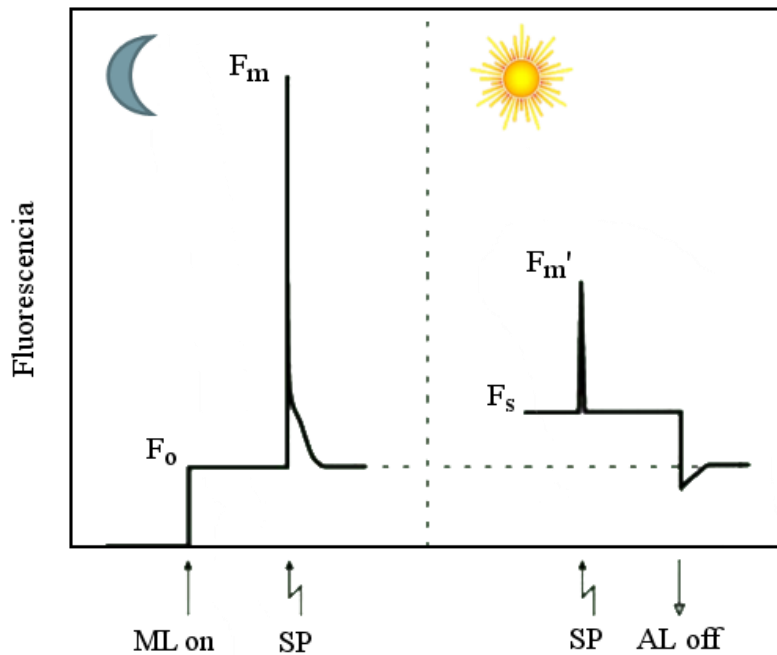


Figura 1. Niveles de fluorescencia obtenidos mediante la aplicación de un pulso saturante (SP) a hojas adaptadas a oscuridad (izq.) o a luz (der.). ML= luz de medida. AL = luz actínica.

A partir de los valores de fluorescencia obtenidos mediante la aplicación de un pulso saturante en hojas adaptadas a oscuridad o a luz (F_0 , F_m , F_s y F_m' , Figura 1), se pueden calcular infinidad de parámetros, los cuales se desarrollarán a continuación. Entre estos parámetros se incluye el rendimiento cuántico de las otras dos vías no fotoquímicas descritas en el apartado anterior (vías de disipación radiactiva y no radiactiva). Hendrickson *et al.* (2004) definió las eficiencias cuánticas de las tres vías energéticas posibles (Figura 2), respetando la distinción que Cailly *et al.* (1996) y Kramer *et al.* (2004) realizaron de las vías de disipación térmica regulada (NPQ, reformulado por Hendrickson *et al.* 2004 como ϕ_{NPQ}) y constitutiva (NO, denotado como ϕ_D).

ϕ_D no varía a corto plazo con la intensidad de la luz y está relacionada con la pérdida inevitable de energía absorbida por la antena LHCII consecuencia de su transferencia hacia los centros de reacción. Por el contrario, ϕ_{NPQ} implica procesos dependientes de un gradiente de pH que se genera a medida que se va activando y saturando la cadena de transporte electrónico. Ejemplos de estos procesos dependientes de un gradiente de pH son el ciclo de las xantofilas y el

ciclo luteína epoxi, ambos considerados mecanismos de fotoprotección (ver siguiente apartado).

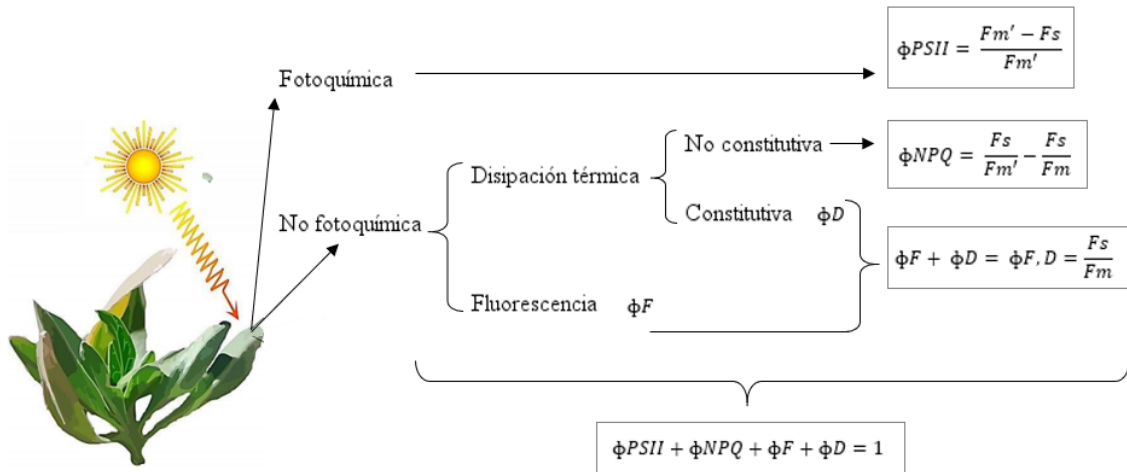


Figura 2. Representación esquemática de las tres vías de energía a las que se puede canalizar un fotón: vía fotoquímica (ϕ_{PSII}), vía no fotoquímica de disipación térmica (ϕ_{NPQ} y ϕ_D) y vía no fotoquímica de fluorescencia (ϕ_F). Formulación de Hendrickson *et al.* (2004).

El mayor contribuyente al $\phi_{F,D}$ es ϕ_D . Valores altos de $\phi_{F,D}$ pueden ser indicativo de que tanto la conversión fotoquímica de la energía como los mecanismos de disipación térmica regulados son ineficientes. Esto puede observarse mediante el uso de herbicidas específicos del PSII, los cuales no solo bloquean los centros de reacción, sino que también impiden la generación de un gradiente de protones, indispensable para activar los mecanismos de fotoprotección mencionados anteriormente, los cuales se detallarán en el siguiente apartado.

Photoprotección y photoinhibición mediante fluorescencia de la clorofila.

El concepto de photoinhibición se introdujo originariamente por Kok (1956) para hablar de una reducción en la eficiencia en el uso de la luz por el aparato fotosintético. Aunque Kok se refirió a la eficiencia cuántica en términos de liberación de O_2 (fotohidrólisis del agua), el término se ha extrapolado igualmente a la fijación de CO_2 (ej. Foyer y Harbinson, 1994).

La photoinhibición puede ser evaluada por la reducción de F_v/F_m . Este parámetro puede descender tanto por un incremento de F_0 como por un

descenso de F_m . En el caso concreto de la variación de F_m , se pueden distinguir dos componentes: 1) aquel descenso que es debido a una fotoinhibición dinámica, por lo que esta parte del valor de F_m puede recuperar sus niveles iniciales rápidamente (Osmond, 1994), y 2) aquel descenso que es debido a una fotoinhibición crónica, en donde el valor de F_m restante permanece “cuencheado” por un largo periodo de tiempo y solo se recupera tras horas o incluso días de aclimatación a oscuridad o a una luz baja (Long *et al.*, 1994).

La **fotoinhibición dinámica** está involucrada en la fotoprotección del PSII a la sobreexcitación (Jahns y Holzwarth, 2012). Por ejemplo, cambios no permanentes en la deepoxidación de las xantofilas, elicitación de sistemas antioxidantes o descenso de la concentración de clorofilas suelen ser procesos no permanentes de fotoinhibición. La disipación térmica asociada al ciclo de las xantofilas (Figura 3) suele darse a corto plazo y revertirse a lo largo de un día.

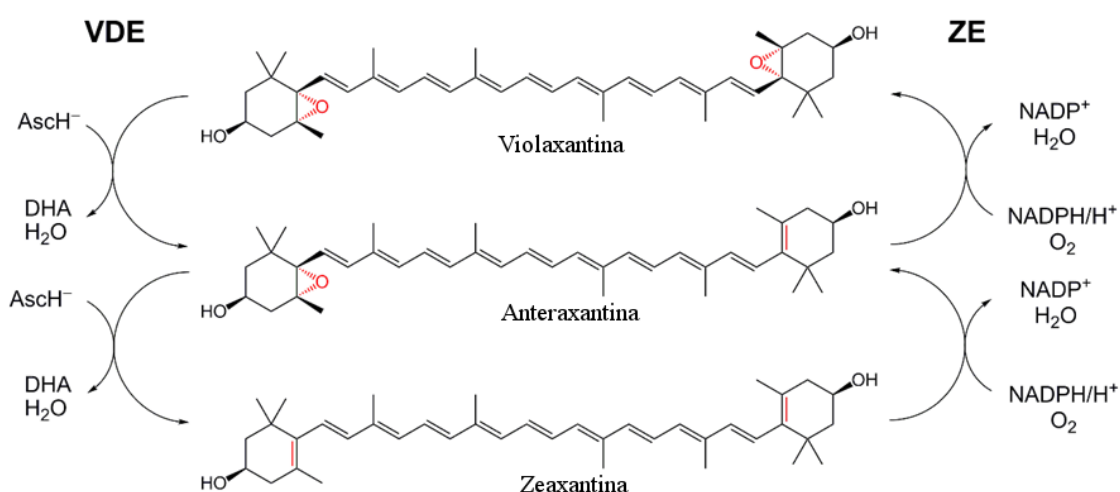


Figura 3. Ciclo de las xantofilas. En condiciones de alta luminosidad y, por lo tanto, de un gradiente de pH, la violaxantina se de-epoxida (se rompe un grupo epoxi), convirtiéndose en anteraxantina y finalmente zeaxantina con la actuación de la enzima violaxantina de-epoxidasa (VDE) y con el ascorbato ($AsCH^-$) como cofactor. En condiciones de oscuridad el proceso se revierte, actuando en este caso la enzima zeaxantina epoxidasa (ZE) y el $NADPH/H^+$ (adaptado de Pfündel y Bilger 1994).

La **fotoinhibición crónica** ha sido considerada un indicador de daño en el PSII, especialmente en la proteína D1. Esta inhibición crónica puede deberse a una excesiva exposición a alta radiación o a una combinación entre alta irradiación, temperaturas extremas, sequía y/o déficits nutricionales (Morales *et al.*, 2008). Uno de los efectos más importante de una deficiencia en nitrógeno es

principalmente una reducción de las enzimas que participan en el ciclo de Calvin. Por lo tanto, la capacidad de aprovechar la luz incidente de una planta con deficiencias en nitrógeno disminuye y esto hace se den fenómenos de fotoinhibición a intensidades de PPFD menores (Terashima y Evans, 1988). Por otro lado, la incapacidad de reposición o “*turn over*” de la proteína D1 del PSII dañada hace que las plantas con deficiencia en nitrógeno sean más susceptibles a sufrir fotoinhibición crónica. Sin embargo, este daño en los fotosistemas y el descenso de los niveles de proteína D1 a su vez reduce la probabilidad de producción de especies reactivas de oxígeno, especialmente de radicales superóxidos, por lo que, en este caso, la fotoinhibición crónica también puede entenderse como un mecanismo de fotoprotección (Adams *et al.*, 2004) y la proteína D1 como un fusible del proceso fotosintético.

La fluorescencia de la clorofila permite conocer los niveles de fotoinhibición dinámica y crónica de una planta mediante la realización de las denominadas **curvas de inducción** (cinética lenta de Kautsky) y **recuperación**. Con este tipo de curvas es posible calcular el **quenching no fotoquímico** (NPQ, en sus diferentes fórmulas) y sus componentes a partir de la cinética de recuperación de F_m durante un periodo de oscuridad (Ensayo 1 del apartado Fase experimental).

Fotosíntesis y fluorescencia de la clorofila. Tasas de transporte electrónico.

Björkman y Demming (1987) demostraron que los valores de F_v/F_m y Φ_{PSII} obtenidos de plantas con distintos grados de fotoinhibición están altamente correlacionados con la eficiencia cuántica de la liberación de O_2 (fotohidrólisis del agua). Sin embargo, la relación entre los rendimientos cuánticos del PSII obtenidos mediante fluorescencia y el rendimiento cuántico de la asimilación de CO_2 no siempre puede relacionarse directamente, especialmente en plantas C3, en donde las tasas elevadas de fotorrespiración y otros procesos que limitan o consumen el ATP y/o el poder reductor generado durante la cadena de transporte electrónico (reacción de Mehler, flujo cíclico de electrones, reducción de nitratos, etc.) hacen que esta relación no se pueda establecer de forma tan directa (Genty *et al.*, 1989; Krall y Edwards, 1992; Flexas *et al.*, 1998; Flexas *et al.*, 2002; Baker, 2008; Perera-Castro y Flexas, 2023).

A pesar de ello, Φ_{PSII} es un buen indicador de la capacidad fotosintética en condiciones de luz, al menos en lo que a síntesis de ATP y poder reductor se

refiere. Este parámetro se utiliza para calcular la tasa de transporte electrónico (ETR, a veces denominado también J) mediante la fórmula desarrollada por Krall y Edwards (1992) (aunque a veces se cita incorrectamente a Genty *et al.* 1989):

$$\text{ETR} = \text{PPFD} \cdot \phi_{\text{PSII}} \cdot \alpha \cdot \beta$$

donde PPFD es la densidad de flujo fotónico (*Photosynthetic Photon Flux Density*), a veces denotado como I (*irradiance*) o simplemente PAR (*Photosynthetic Active Radiation*) aludiendo al hecho de que esa densidad de fotones pertenece al espectro fotosintéticamente activo. α es la absorbanza de la hoja y β es la partición de fotones entre los dos fotosistemas. Comúnmente se suele asumir una absorbanza de 0.84 (Böjrkman y Demmig, 1987) y una partición equitativa entre fotosistemas ($\beta = 0.5$). Sin embargo, dependiendo de la especie y del tipo de tratamiento ensayado, estas asunciones no son recomendadas. Por ejemplo, especies adaptadas a una alta insolación suelen tener mecanismos para reducir la absorción de luz (pelos, ajuste de clorofilas, etc.), por lo que, en este caso, medidas de la absorbanza son imprescindibles para un cálculo correcto de la ETR y una comparativa entre las ETR de cada especie.

Las tasas de transporte electrónico y su comportamiento durante una curva de luz aportan información adicional de relevancia, como la intensidad de radiación a la cual se satura el fotosistema (PPFD_{sat}) o la tasa de transporte electrónico máximas (ETR_{max}). Ambos parámetros se describen en el Ensayo 2 del apartado de Fase experimental.

Fase experimental

Ensayo 1. Curvas de inducción + recuperación. Cuantificación de la fotoinhibición dinámica y crónica.

Material

Material biológico: hojas de plantas en maceta o recolectadas en campo y adaptadas a oscuridad.

Otros materiales: bolsas con cierre hermético, papel y agua destilada (opcional).

Equipos: Fluorímetro (eg. Mini-PAM, JUNIOR-PAM, etc).

Metodología

El primer paso para medir un *quenching* no fotoquímico (NPQ en sus diferentes fórmulas) es adaptar la planta a oscuridad y medir F_v/F_m aplicando un pulso de saturación. El objetivo de este paso es medir una F_m inicial no fotoinhibida. El mejor método para hacerlo es aprovechar la adaptación a oscuridad que ha tenido lugar a lo largo de toda la noche y medir antes del amanecer (es decir, medir en “*pre-down*”). Si esto no es posible, se puede aceptar una medición en un *pre-down* artificial, es decir, adaptando las plantas a oscuridad durante el día. ¿Cuánto tiempo de oscuridad es suficiente para que la F_m inicial medida no esté “cuencheada” tras un *pre-down* artificial? Dependerá de la especie estudiada y del tipo de tratamiento utilizado. En ocasiones, se aceptan 30 minutos de adaptación a oscuridad. Sin embargo, en plantas que han sido expuestas a intensidades de radiación elevadas este tiempo no es suficiente para alcanzar la F_m real, infraestimándose el NPQ en consecuencia. Por ejemplo, en especies del género *Pinus*, una hora es el tiempo mínimo de inactivación de todas las enzimas implicadas en el proceso fotosintético, incluida la ferredoxina-NADP⁺-reductasa, del PSI (Schansker *et al.*, 2008). Lo recomendable es realizar pruebas previas para cada especie y cada ensayo con el objetivo de determinar el mínimo tiempo de adaptación a oscuridad en el que la F_m medida se iguale significativamente a la F_m real y, de ese modo, justificar y defender adecuadamente el tiempo de adaptación a oscuridad seleccionado.

Para obtener más información sobre los test de adaptación a oscuridad, así como otros aspectos metodológicos de la fluorescencia de la clorofila, es muy recomendable la lectura de Kalaji *et al.* (2014).

Tras la obtención de F_v/F_m , la hoja se debe iluminar con luz actínica durante 3 o 5 minutos hasta alcanzar el denominado *steady-state*. En ese momento, un pulso de saturación permite la medición de F_m' y F_s , con los que se puede medir el NPQ (Figura 4).

Tradicionalmente se han desarrollado fórmulas que calculan la partición entre el cuenching debido a procesos fotoquímicos (q_P) y no fotoquímicos (q_N), los cuales se definieron como:

$$q_P = \frac{F_m' - F_s}{F_m' - F_0'}$$

$$q_N = 1 - \frac{F_m' - F_0'}{F_m - F_0}$$

La medición de F_0' es complicada, ya que requiere de la iluminación de la hoja con infrarojo cercano al final de la curva de inducción, justo después del pulso de saturación, lo cual no es posible en todos los fluorímetros y complica las mediciones de campo. Este hecho, junto a lo inapropiado de asumir una partición entre únicamente la vía fotoquímica y la de disipación térmica, ha hecho que estos parámetros queden relegados. Otra fórmula fue desarrollada por Bilger y Björkman (1990) para calcular el NPQ sin requerir a la medición de F_0' :

$$NPQ = \frac{F_m - F_m'}{F_m'}$$

El NPQ calculado de esta manera puede adoptar valores de 0-3 y es teóricamente infinito, por lo que, al contrario que el q_N (con valores siempre comprendidos entre 0 y 1), es más indicado para comparar especies y/o tratamientos, ya que el q_N tiende asintóticamente a 1 a luz saturante. Sin embargo, en la actualidad, cada vez se van imponiendo aquellos parámetros que respetan de una manera más asertiva las tres vías de distribución de energía, como son las fórmulas de Hendrickson *et al.* (2004), descritas anteriormente:

$$\Phi_{PSII} = \frac{F_m' - F_s}{F_m'}$$

$$\Phi_{NPQ} = \frac{F_s}{F_m'} - \frac{F_s}{F_m}$$

$$\Phi_{f,D} = \frac{F_s}{F_m}$$

Una vez finalizada la curva de inducción y calculado el Φ_{NPQ} , la luz actínica debe apagarse y durante un periodo de oscuridad (generalmente 25 min) se deben realizar pulsos de saturación y mediciones de la **recuperación de F_m** (Figura 4). A partir de la cinética de recuperación de la F_m se pueden calcular los **componentes del Φ_{NPQ}** : el **componente energético (Φ_{qE})**, el **componente de transición (Φ_{qT})**, el **componente dependiente de zeaxantina (Φ_{qZ})** y el **componente fotoinhibitorio (Φ_{qI})**. El significado fisiológico de cada uno se ha determinado gracias al uso de inhibidores y plantas mutantes (Krause *et al.*, 1982; Krause, 1988; Horton y Hague, 1988; Nilkens *et al.*, 2010).

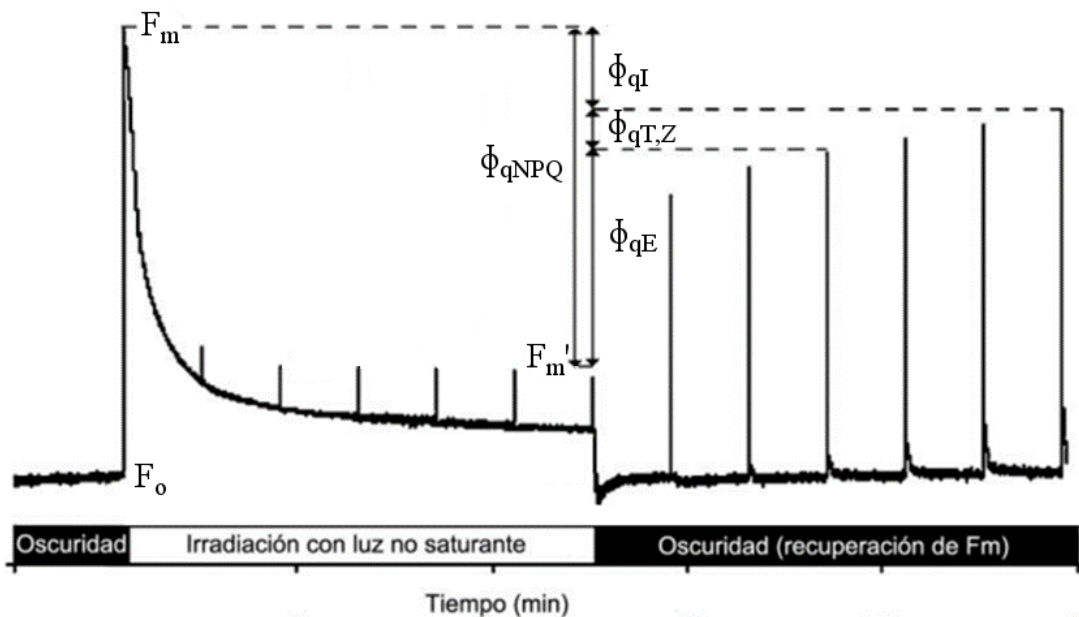


Figura 4. Curva de inducción (también denominada cinética lenta de Kautsky) y recuperación (adaptado de Müller *et al.*, 2001).

Φ_{qE} es el mayor constituyente de Φ_{NPQ} y su relajación se produce entre 2-5 minutos. Es dependiente de la generación de un gradiente de protones a través de la membrana tilacoidal y, por lo tanto, está relacionada con la activación de ciclos de las xantofilas (eg. ciclo VAZ o ciclo de la luteína-5,6-epoxi, Müller *et al.*, 2001). Entre 12 y 30 minutos se relajan tanto Φ_{qT} como Φ_{qZ} . El componente derivado del estado de transición (Φ_{qT}), por el que el complejo antena del PSII

(LHCII) es fosforilado y escindido del PSII para asociarse al PSI, no contribuye significativamente al ϕ_{NPQ} en plantas vasculares. Por el contrario, la epoxidación más permanente de la zeaxantina juega un papel importante en el ϕ_{NPQ} remanente a largo plazo. Es por ello que ambos componentes se suelen agrupar en $\phi_{qT,Z}$. El último componente, ϕ_{qI} , muestra la relajación más lenta, con un rango de horas e incluso días y está asociado al daño de la proteína D1 del PSII. Se asume que estos componentes son excluyentes, por lo que:

$$\phi_{NPQ} = \phi_{qE} + \phi_{qT} + \phi_{qZ} + \phi_{qI}$$

Para calcular los componentes de ϕ_{NPQ} , algunos autores asumen unos tiempos de relajación intermedios seleccionados de forma arbitraria (Ahn *et al.*, 2009; Ioannidis N.E *et al.*, 2016; Perera-Castro *et al.*, 2017). Sin embargo, es mucho más correcto utilizar el método desarrollado por Walters y Horton (1991) (ligemente modificado por Guadagno *et al.*, 2010). Éste se basa en la representación semilogarítmica de ϕ_{NPQ} vs. el tiempo de relajación (Figura 5). Cambios claros en la pendiente están asociados a los tiempos de relajación de ϕ_{qE} (t_{qE}) y ϕ_{qT} (t_{qT}).

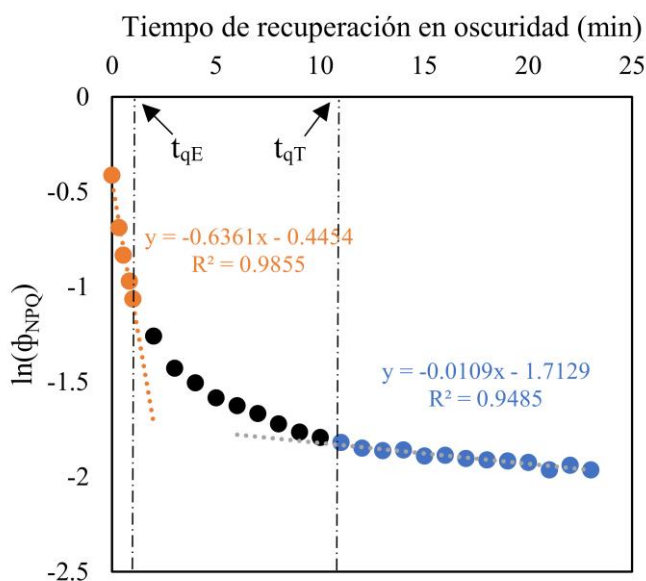


Figura 5. Representación semilogarítmica de la cinética de relajación de ϕ_{NPQ} durante un periodo de oscuridad. Cambios en la pendiente de la curva delimitan los tiempos de relajación de ϕ_{qE} (t_{qE}) y ϕ_{qT} (t_{qT}).

En la plantilla de Excel asociada a este material docente y disponible en ADDI (addi.ehu.es) se muestra un ejemplo de una curva de inducción + recuperación. Sobre la misma se explicará a continuación el procedimiento a realizar para obtener los componentes del ϕ_{NPQ} :

1. En primer lugar, se deben sustituir los datos de Tiempo de relajación y ϕ_{NPQ} del ejemplo (en verde) por los observados.
2. Automáticamente se calculará el logaritmo neperiano del ϕ_{NPQ} , el cual es el que se representará en la gráfica.
3. En la gráfica, se debe seleccionar la serie de datos de color naranja y seleccionar todos los datos que se ajusten a una recta desde el tiempo 0, usando la variación del R^2 como criterio de optimización. El último punto seleccionado delimita el tiempo de relajación del t_{qE} (en el ejemplo, celda A14) y permite calcular el ϕ_{qE} (C5).
4. El mismo procedimiento que el anterior se debe realizar para la serie azul, siendo el primer punto de la serie el indicador del t_{qT} (A24), permitiendo así el cálculo de ϕ_{qT} (C6) y el ϕ_{qI} (C7).

Las características de las cinéticas de relajación de los componentes pueden variar en condiciones de estrés. Normalmente, ϕ_{qE} es el componente mayoritario, pero el ϕ_{qI} puede aumentar considerablemente en condiciones de estrés en donde se restringe el consumo del ATP y el $NADH^2$ originado en la cadena de transporte electrónico.

Para mayor información sobre el *quenching* no fotoquímico y sus componentes consultar a Müller *et al.* (2001), Lichtenthaler *et al.* (2005), Lambrev *et al.* (2007) y Jahns y Holzwarth (2012).

Ensayo 2. Curvas de luz. ETRmax y PPFDsat.

Material

Material biológico: hojas de plantas

Otros materiales: bolsas con cierre hermético, papel y agua destilada (opcional).

Equipos: Fluorímetro (eg. Mini-PAM, JUNIOR-PAM, etc).

Metodología

El objetivo de la realización de las curvas de luz es el de conocer la capacidad máxima de transporte electrónico (ETRmax) y la mínima intensidad lumínica a la cual se produce la saturación del proceso (PPFDsat). En este caso, la adaptación a oscuridad no es un requisito imprescindible para el desarrollo de

las curvas de luz, ya que solo se pretende calcular el parámetro ETR. Sin embargo, se recomiendan 20 min de adaptación a una luz tenue para eliminar algún posible remanente de fotoinhibición sin inactivar completamente los fotosistemas, evitando de esta manera una infraestimación de la luz saturante calculada a partir de las curvas (Rascher *et al.*, 2000).

Para la construcción de una curva de luz es necesario someter cada muestra a intensidades de PPFD crecientes. Cada intervalo de PPFD requiere entre 3 y 5 min para que la cadena de transporte electrónico alcance el *steady-state*. En ocasiones, en la bibliografía se describen curvas rápidas de luz con intervalos de 30-50 s o incluso menores por cada PPFD (ej., White y Critchley, 1999), aunque estas curvas no son recomendables para un correcto cálculo de la ETR, ya que en esos tiempos no es probable que el *steady-state* se alcance y se infraestimaría la ETR. En cualquier caso, comprobaciones previas de los intervalos requeridos en cada especie y tratamiento son aconsejables.

Al final de cada intervalo se aplica un pulso saturante y se registra la F_s y la F_m' . A partir de estos valores se calcula ϕ_{PSII} y la ETR correspondiente a cada PPFD mediante la fórmula de Krall y Edwards (1992) descrita anteriormente:

$$ETR = PPFD \cdot \phi_{PSII} \cdot \alpha \cdot \beta$$

Si α y β son desconocidos, se puede asumir con cierto riesgo los valores de 0.84 para α y 0.5 para β . Además, es importante tener en cuenta que a medida que el PPFD crece, el ϕ_{PSII} decrece hasta llegar a valores no medibles por el fluorímetro (la F_m' y la F_s no se distinguen de la fluorescencia basal o de ruido generada por el fluorímetro). En ese momento, la ETR se vuelve ruidosa y no es posible calcularla correctamente. Es necesario determinar para cada caso los valores máximos de PPFD en los que ϕ_{PSII} sigue siendo medible, especialmente en especies aclimatadas a vivir en ambientes sombríos.

Si representamos gráficamente el crecimiento de la ETR frente a PPFD crecientes, se obtendrá una curva similar a las de la Figura 6. En la Figura 6A se representa una curva con una tendencia asintótica hacia la ETR máxima, mientras que en la Figura 6B la ETR desciende. El motivo de este decrecimiento es controvertido, aunque en general se suele atribuir a un fenómeno de fotoinhibición (Longstaff *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2004; Ralph y Gademann, 2005). A partir de ambos tipos de curvas se pueden obtener ETR_{max} y PPFD_{sat} mediante el ajuste de los valores observados a un modelo mediante el método de los mínimos cuadrados. Se han descrito numerosos modelos para realizar este ajuste (Jassby y Platt, 1976; Ritchie y Bunthawin, 2010; Apichatmeta *et al.*,

2017). A continuación, se describe un protocolo para realizar el ajuste a algunos de los modelos descritos en la bibliografía mediante el uso de la herramienta Solver de Excel, utilizando la plantilla de Excel asociada a este material docente.

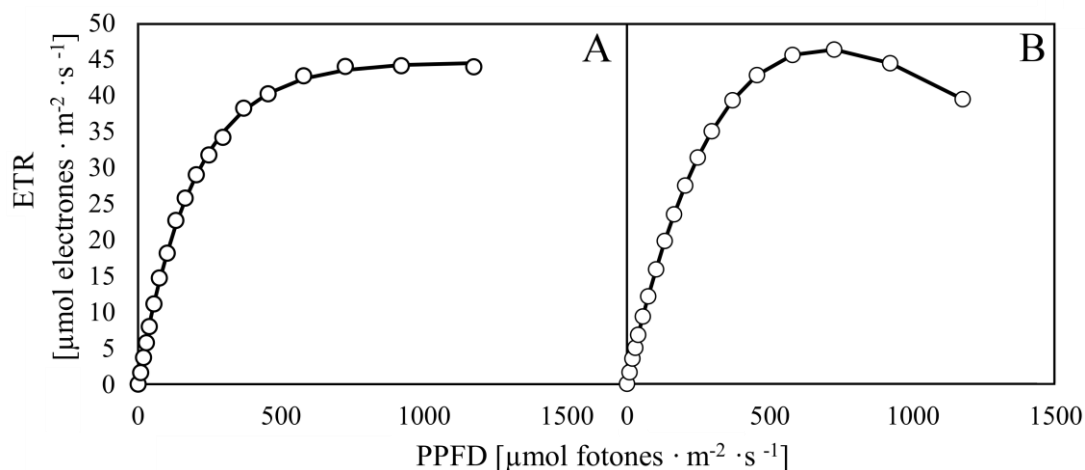


Figura 6. A) Curva de luz en la que ETRmax es asintótica. B) Curva de luz en donde se observa un descenso de la ETR a intensidades de PPFD altas.

En la plantilla de Excel, destacado en **verde**, en las dos columnas con el encabezado de “Datos medidos”, se deben sustituir los datos del ejemplo por los valores de ETR y PPFD obtenidos durante la curva de luz. **Es importante no dejar ninguna celda vacía entre los datos y hacerlo en orden creciente de radiación.** Automáticamente se calcula la ETR estimada de acuerdo con 5 modelos mostrados en la Tabla 1 y sus errores respecto al valor de ETR medido (columnas K-T). Los valores de los parámetros ETRmax y AQE (eficiencia cuántica aparente, de sus siglas en inglés *Apparent Quantum Efficiency*, correspondiente con la pendiente de la parte lineal inicial de la gráfica) presentes en los modelos son obtenidos gracias a la herramienta Solver del Excel (casillas variables resaltadas en **naranja**), mientras que el resto de los parámetros son calculados a partir de los mismos.

El cálculo de PPFDsat es controvertido, ya que teóricamente la ETRmax se alcanza a intensidades de radiación infinitas. Muchos autores (ej., Sakshaug *et al.*, 1997) definen la mínima irradiancia saturante como el intercepto entre AQE y ETRmax y la denominan E_k ($E_k = \text{ETRmax}/\text{AQE}$). Sin embargo, aunque comparativa, esta luz está lejos de ser realmente saturante, ya que la ETR sigue aumentando considerablemente a PPFD mayores que E_k calculada de esta manera. Por ello, otros autores (Rascher *et al.*, 2000) consideran PPFDsat al

PPFD al cual se alcanza el 90% de la ETRmax. En la Tabla 1 se muestran las fórmulas para el cálculo de PPFDsat de esta manera, las cuales están incluidas en la plantilla de Excel (PPFDsat(90)). Por otro lado, en aquellas curvas que experimenten un descenso de la ETR a intensidades de PPFD altas (Figura 6B), es posible calcular la intensidad de luz a la cual se produce este descenso de la ETR, denominándose en este caso PPFDi ($PPFDi = ETRmax \cdot e / AQE$), solo para uno de los modelos (Ritchie, 2008).

Tabla 1. Modelos para el ajuste de las curvas de ETR vs. PPFD. Los parámetros ETRmax y AQE son ajustados por la herramienta Solver. El resto de parámetros son calculados a partir de los anteriores. Para consultar otros modelos de ajuste ver Lobo *et al.* (2013).

Nombre del modelo	Fórmula	PPFDsat
Waiting-in-line (Ritchie, 2008)	$ETR = \frac{ETRmax \cdot AQE \cdot PPFD \cdot e^{1-AQE \cdot PPFD / (ETRmax \cdot e)}}{ETRmax \cdot e}$	$= \frac{1.53181 \cdot ETRmax \cdot e}{AQE}$
Michaelis-Menten	$ETR = \frac{ETRmax \cdot PPFD}{\left(\frac{ETRmax}{AQE}\right) + PPFD}$	$= 9 \cdot ETRmax / AQE$
Saturación exponencial (Goudriaan, 1982)	$ETR = ETRmax \cdot (1 - e^{-AQE \cdot PPFD / ETRmax})$	$= \frac{\ln 0.1 \cdot ETRmax}{-AQE}$
Tangente hiperbólica (Jassyby y Platt, 1976)	$ETR = ETRmax \cdot \tanh (AQE \cdot PPFD / ETRmax)$	$= \frac{1.47222 \cdot ETRmax}{AQE}$
Smith (1936)	$ETR = \frac{AQE \cdot ETRmax \cdot PPFD}{\sqrt{AQE^2 + (ETRmax \cdot PPFD)^2}}$	$= \frac{ETRmax^2 \cdot 0.9}{AQE \cdot \sqrt{ETRmax^2 - (ETRmax \cdot 0.9)^2}}$

La herramienta Solver no está activada por defecto en el Excel, hay que hacerlo manualmente. En Archivo/Opciones/Complementos, se debe seleccionar la opción Solver y hacer clic en Aceptar. Automáticamente, en la pestaña Datos se habilitará la tecla de Solver. Al hacer clic sobre ella, se abrirá la ventana “Parametros de Solver”. Para cada uno de los modelos, se debe proceder de la siguiente manera:

- 1) En el apartado “Establecer objetivo”, se debe seleccionar una de las denominadas **celdas objetivo**, que en este caso se trata de la suma de errores de nuestro modelo (destacadas en azul). Si el modelo que

- estamos ajustando a la curva es el de Michaelis-Menten, por ejemplo, se debe seleccionar la celda C11.
- 2) En el siguiente paso “Para”, se debe seleccionar la opción “Min”, ya que lo que nos interesa es obtener el ajuste del modelo con el mínimo error.
 - 3) En “Cambiando las celdas variables”, se deben seleccionar las dos celdas correspondientes marcadas en naranja del modelo para el que queremos hacer el ajuste. Para el ejemplo de Michaelis-Menten esas celdas son los valores de ETRmax (C6) y AQE (C7).
 - 4) Hacer clic en “Resolver”. Entonces, la herramienta devolverá aquellos valores de las celdas variables óptimos para obtener el mínimo valor de la celda objetivo. Automáticamente se calcularán el resto de los parámetros de interés de la columna. Los datos de ejemplo de la plantilla ya están ajustados. Para ver el ajuste realizado por el solver es recomendable utilizar datos nuevos.
 - 5) Se debe realizar el mismo procedimiento para todos los modelos de la plantilla. Al finalizar, se seleccionará aquel modelo que haya obtenido un mejor ajuste, es decir, que tenga la mínima suma de errores, y tomar los parámetros de interés del mismo. Una vez que observamos cuál de los modelos es el que mejor se ajusta a nuestros datos, realizar el ajuste para el resto de curvas de luz con el mismo modelo.

Finalmente, si combinamos este ensayo con el anterior, es decir, una curva de luz realizada tras la correcta medición de una F_v/F_m , sí sería posible ver la variación del *quenching* no fotoquímico a lo largo de la curva e, incluso, registrar la recuperación de F_m posterior a la misma y calcular los componentes del ϕ_{NPQ} .

CASOS DE ESTUDIOS

Ejemplo 1. Determinación de límites térmicos del rosalito del Teide (*Pterocephalus lasiospermus*) mediante curvas de inducción.

El objetivo de este estudio fue el de determinar los límites térmicos de una especie alpina, el rosalito del Teide (*Pterocephalus lasiospermus*), utilizando dos parámetros de fluorescencia de la clorofila: F_v/F_m y R_{fd} (adaptación de Perera-Castro *et al.*, 2017).

En el Parque Nacional del Teide (Tenerife, España), a 2070 m de altitud se recolectaron penachos de las ramas de este arbusto y se introdujeron en una bolsa hermética con un papel humedecido en su interior para favorecer una atmósfera casi saturante y reducir el riesgo de deshidratación durante el transporte del material al laboratorio. Una vez en el laboratorio, se seleccionaron hojas adultas del penacho muestreado y se fijaron a films de acetato. Tandas de 5 hojas por film se introdujeron en bolsas herméticas con papel humedecido y se sometieron a baños térmicos (Hetofrig CB11E, Heto, Birkerød, Dinamarca) sumergiendo las bolsas en un líquido anticongelante previamente estabilizado a una temperatura determinada (de -20 a 0 °C, de 30 a 50 °C, y 20 y 25 °C como control) durante 30 min (Larcher 2003, González-Rodríguez *et al.* 2005). Un sensor de temperatura acoplado a una de las hojas permite determinar exactamente la temperatura a la que está sometido realmente el tejido.

Antes y después de cada tratamiento térmico se realizaron curvas de inducción a luz saturante. Un primer pulso de saturación en hojas adaptadas a oscuridad (30 min como mínimo) permitió calcular el parámetro F_v/F_m . A continuación, la muestra fue iluminada durante 5 minutos con una luz actínica saturante hasta alcanzar el *steady-state* y registrar la F_s , necesaria para calcular el *vitality index* o R_{fd} .

$$F_v/F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

$$R_{fd} = \frac{F_m - F_s}{F_s}$$

A partir de estos datos, para cada muestra se calculó el porcentaje de reducción de F_v/F_m y R_{fd} . Se graficaron ambos indicadores de daño respecto a la temperatura a la que fue sometida cada muestra y se calculó el LT_{50} , es decir, la temperatura a la cual se produce el 50% de reducción del indicador utilizado, F_v/F_m o R_{fd} (Figura 7). La desviación estándar de cada valor de LT_{50} se obtuvo a partir de los intervalos de confianza de los valores predichos a partir de los modelos de regresión lineal. Se observa que los valores de LT_{50} varían según el parámetro utilizado para estimar el porcentaje de daño de la muestra, existiendo una diferencia mínima de 4,2 grados para las bajas temperaturas y de 1,2 grados para las altas.

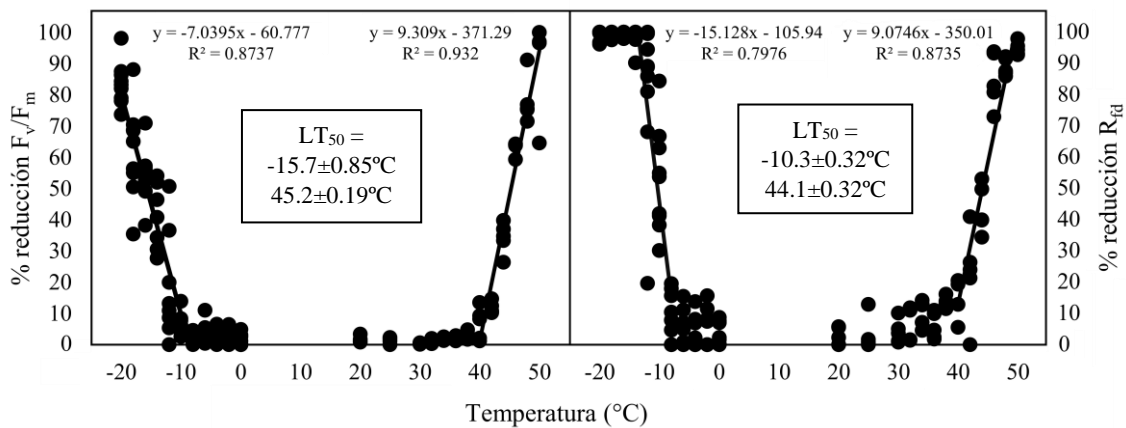


Figura 7. Curvas de temperatura a partir de los porcentajes de reducción de F_v/F_m (izq.) y de R_{fd} (der.). En la parte superior se muestra el modelo de correlación lineal entre temperatura y porcentaje de reducción de cada parámetro para altas y bajas temperaturas. A partir de este modelo se obtuvieron los valores de LT_{50} (temperatura a la cual se produce el 50% de daño) \pm desviación estándar.

En la Figura 8 se muestran las regresiones obtenidas entre los porcentajes de daño calculados a partir de F_v/F_m y R_{fd} para altas y bajas temperaturas. La regresión lineal observada para las altas temperaturas se pierde para las bajas. Es decir, el parámetro R_{fd} resulta ser más sensible a las bajas temperaturas que el F_v/F_m .

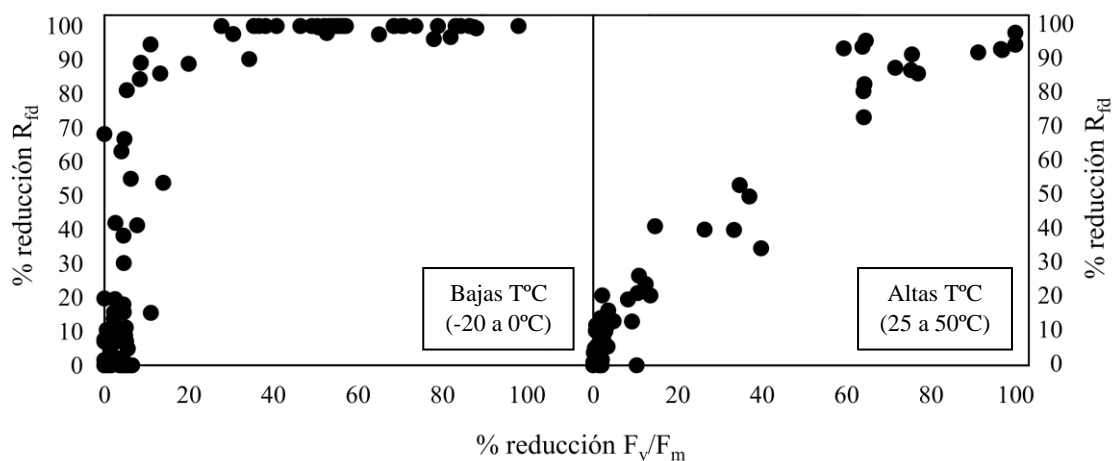


Figura 8. Regresiones entre los porcentajes de daño calculados a partir de F_v/F_m y R_{fd} para altas (der.) y bajas temperaturas (izq.).

A la hora de interpretar los resultados hay que tener en cuenta el significado fisiológico de cada parámetro. La F_v/F_m implica únicamente excitación de clorofilas, fotólisis del agua y oxidación de los aceptores primarios (Q_A), mientras que el R_{fd} requiere de iluminación con luz saturante durante un periodo de tiempo suficiente para la activación de toda la cadena de transporte electrónico. La diferencia entre la sensibilidad de ambos parámetros es indicativa de una mayor susceptibilidad de las membranas tilacoidales y de la cadena de transporte electrónico a las bajas temperaturas, presentándose el PSII operativo durante mayor rango de temperaturas.

Se concluye que el PSII y las membranas tilacoidales presentan una sensibilidad térmica diferenciada, especialmente a las bajas temperaturas. Teniendo en cuenta que el factor limitante para la funcionalidad de la fotosíntesis en este caso son las membranas tilacoidales, los límites térmicos de este proceso para *Pteroccephalus lasiospermus* son $-10.3 \pm 0.32^\circ\text{C}$ y $44.1 \pm 0.32^\circ\text{C}$.

Ejemplo 2. Plasticidad fenotípica de la capacidad fotosintética en plantas alpinas

El objetivo de este ensayo fue el de determinar la respuesta de la tasa de transporte electrónico frente a tratamientos de sombreamiento en 5 especies alpinas del Parque Nacional del Teide (Tenerife, España) (adaptación de Perera-Castro et al., 2018).

Se seleccionaron 5 especies endémicas de la alta montaña canaria: *Pteroccephalus lasiospermus* Link ex Buch (Dipsacaceae), *Spartocytisus supranubius* (L. f.) Christ ex G. Kunkel (Fabaceae), *Scrophularia glabrata* Aiton (Scrophulariaceae), *Echium wildpretii* Pearson ex Hook. f. (Boraginaceae) y *Adenocarpus viscosus* (Willd.) Webb & Berthel. (Fabaceae). Éstas se plantaron en macetas con sustrato nativo a 2070 m de altitud. Plantas de dos meses de edad se expusieron durante casi dos años a una intensidad de radiación solar diferente, ubicando un grupo bajo un umbráculo que redujo en un 50% la radiación solar (EXP₅₀) y otro grupo fuera del mismo (EXP₁₀₀). El efecto borde resultante de una posible entrada de radiación difusa se solventó por una disposición aleatoria de las plantas bajo esta cobertura. También es recomendable la rotación reiterada de las macetas para evitar este efecto borde, aunque en este ejemplo no fue posible.

Al menos en 5 individuos de cada grupo experimental se realizaron curvas de luz con el Imaging-PAM (luz azul, versión mini, Walz GmbH, Efeltrich, Alemania). En primer lugar, se realizaron estimaciones de la absorbancia (α) de la hoja o tallo fotosintético mediante el método propuesto para el Imaging-PAM (porcentaje de luz roja absorbida respecto a la luz infrarroja). A continuación, se sometieron las hojas a 50 s de intensidades crecientes de PPF_D (de 10 a 1856 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Al final de cada intervalo de luz, se aplicó un pulso saturante y se registraron los valores de F_s y F_m' , con los que se calculó, para cada intensidad de PPF_D, el ϕ_{PSII} y las tasas de transporte electrónico. Recordemos que de acuerdo con Krall and Edwards (1992):

$$ETR = \phi_{PSII} \cdot PPF_D \cdot \alpha \cdot \beta$$

α adoptará el valor calculado a partir de las estimaciones del Imaging-PAM, mientras que para β se asume un valor de 0,5. Recordar que para una medición más precisa de ETR se recomienda aplicar intervalos de suficiente duración y verificar que el *steady-estate* se alcanza realmente (por ejemplo, aplicando pulsos reiterados de luz saturante y verificando que la ETR ha alcanzado su valor estable). Otro aspecto importante a tener en cuenta es la de realizar las curvas de luz no en orden creciente de intensidad (opción establecida por defecto en la mayoría de los fluorímetros comerciales), sino en orden decreciente. Si los valores de F_v/F_m o NPQ no son un objetivo, como es el caso, es más recomendable realizar las curvas empezando con plantas irradiadas a una intensidad elevada para asegurarnos la completa activación de la fotosíntesis (de la rubisco y de los procesos de disipación térmica). En ese

sentido, el trabajo presentado por Perera-Castro et al. (2018) no es un buen ejemplo en ese sentido (*mea culpa*).

A partir de estas curvas de luz (Figura 9) se calcularon los parámetros de ETRmax, AQE, PPFDsat y PPFDi (Tabla 2) mediante el protocolo expuesto en el Ensayo 2. En general, todas las especies estudiadas respondieron al tratamiento de sombreado modulando las tasas de transporte electrónico o sus niveles de saturación, a excepción de *A. viscosus*. Esta especie no mostró diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados, ni siquiera en la reducción de la absorbancia de la hoja en condiciones de alta radiación, un método extendido como mecanismo primario de fotoprotección (Ishida *et al.*, 1999; Valladares *et al.*, 2002). Dos especies, *P. lasiospermus* y *S. supranubius* (tallo y hoja), al desarrollarse en la sombra, aumentaron sus tasas de transporte electrónico y su capacidad para lidiar con intensidades de radiación mayores antes de saturarse. *S. glabrata* y *E. wildpretii* mostraron el comportamiento opuesto.

Esto podría indicar que las poblaciones naturales de *P. lasiospermus* y *S. supranubius* localizadas en las latitudes cercanas al lugar de estudio experimentan una mayor fotoinhibición crónica en comparación con las poblaciones sombreadas localizadas por debajo del *timberline* (límite forestal del pino canario). Algunos autores han señalado la fotoinhibición del PSII como un mecanismo de fotoprotección y no de fotodaño, ya que la degradación de la proteína D1 y la desregulación de la actividad fotoquímica evita la superproducción de especies reactivas de oxígeno y el daño oxidativo (Demmig-Adams y Adams, 2006; Adams *et al.*, 2006, 2013). La reducción de la capacidad productiva (ETRmax) no es relevante en condiciones ambientales desfavorables, cuando el crecimiento está limitado por otros factores, tales como la falta de nutrientes o las bajas temperaturas. Sin embargo, durante la estación favorable, periodo durante el cual se llevó a cabo este ensayo, la fotoinhibición del PSII implica un descenso de la capacidad productiva que puede perjudicar la producción de semillas y, por lo tanto, el *fitness* de la población.

En el caso de *S. glabrata*, un aumento significativo de la ETRmax indica no solo la ausencia de una fotoinhibición crónica relevante, sino también la activación de un mecanismo de fotoprotección basado en el consumo de un excedente de ATP y/o poder reductor (fijación de CO₂, reducción de nitratos y/o sulfatos, transporte cíclico de electrones, etc) que permitiría acelerar la cadena de transporte electrónico y evitar la producción de especies reactivas de oxígeno. Aunque *E. wildpretii* no varía significativamente el ETRmax, sí aumenta

su capacidad para lidiar con intensidades de radiación mayores antes de saturarse. Por lo tanto, es probable que esta especie active mecanismos de fotoprotección no abordados en este estudio, como la capacidad de disipación por calor o la capacidad antioxidante.

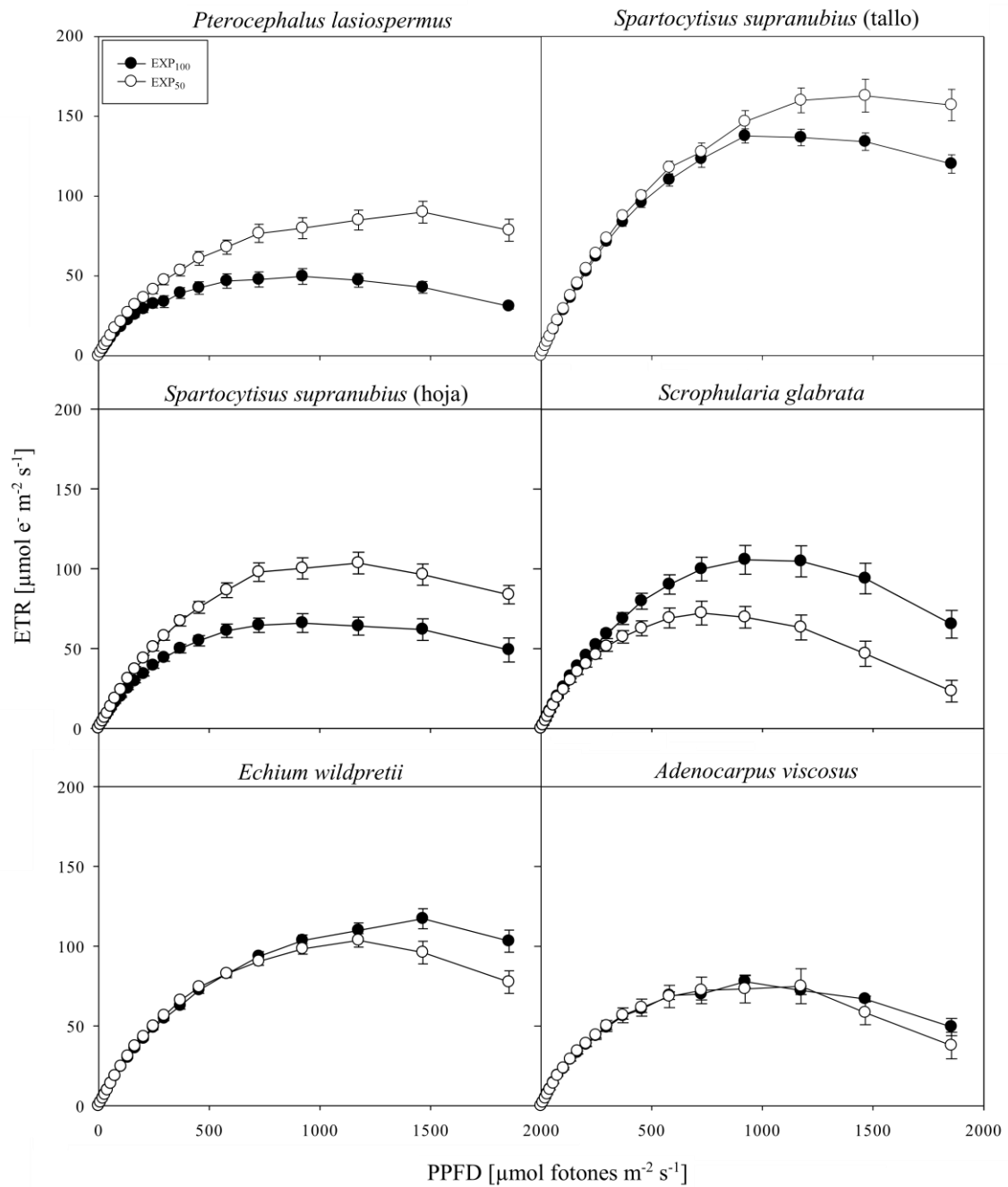


Figura 9. Tasas de transporte electrónico a intensidades de luz actínica creciente de las 5 especies estudiadas.

Se concluye que la plasticidad fenotípica es un carácter mayoritario en la alta montaña canaria, aunque no absoluto. Además, los mecanismos de fotoprotección activados por las diferentes especies son diversos y pueden ser indicadores de las condiciones en las que se sitúa el óptimo fisiológico de las especies estudiadas (en términos de capacidad productiva): 1) *P. lasiospermus* y *S. supranubius* recurren a la fotoinhibición crónica y probablemente su óptimo fisiológico se encuentre por debajo del *timberline*, en condiciones de sombreado mayores, 2) *S. glabrata* incrementa el consumo de un excedente de ATP y poder reductor, y 3) *E. wildpretii* probablemente active mecanismos de fotoprotección no analizados, como la capacidad de disipación por calor o la capacidad antioxidante, los cuales explicarían el retraso de la saturación de la cadena de transporte electrónico a intensidades de luz mayores.

Tabla 2. Valores de ETRmax, AQE, PPFDsat, PPFDi y Abs de las 5 especies estudiadas (promedio \pm error estándar). Minúsculas indican diferencias significativas entre las especies (ANOVA de una vía y Tukey como *Post hoc*). *: diferencias significativas entre EXP₁₀₀ y EXP₅₀ de cada especie ($\alpha = 0.05$).

		<i>Pterocephalus lasiospermus</i>	<i>Spartocytisus supranubius</i> (tallo)	<i>Spartocytisus supranubius</i> (hoja)	<i>Scrophularia glabrata</i>	<i>Echium wildpretii</i>	<i>Adenocarpus viscosus</i>
ETRmax	EXP ₁₀₀	49.5 \pm 4.8 ^{a*}	135.6 \pm 5.4 ^{d*}	67.1 \pm 5.0 ^{ab*}	103.3 \pm 8.1 ^{c*}	109.3 \pm 5.1 ^c	76.3 \pm 2.3 ^b
	EXP ₅₀	80.8 \pm 8.6 ^{ab}	163.2 \pm 8.8 ^c	101.6 \pm 6.25 ^b	70.5 \pm 6.3 ^a	99.2 \pm 2.8 ^b	74.6 \pm 8.3 ^a
AQE	EXP ₁₀₀	0.18 \pm 0.01 ^a	0.31 \pm 0.01 ^c	0.21 \pm 0.01 ^{ab*}	0.28 \pm 0.01 ^c	0.22 \pm 0.006 ^b	0.23 \pm 0.01 ^b
	EXP ₅₀	0.19 \pm 0.01 ^a	0.30 \pm 0.01 ^c	0.26 \pm 0.01 ^{bc}	0.27 \pm 0.01 ^{bc}	0.25 \pm 0.002 ^{bc}	0.24 \pm 0.01 ^b
PPFDsat	EXP ₁₀₀	482.4 \pm 18.8 ^{a*}	722.9 \pm 16.8 ^{c*}	542.4 \pm 30.9 ^{ab*}	604.6 \pm 27.6 ^{b*}	777.2 \pm 28.6 ^{c*}	546.2 \pm 14.5 ^{ab}
	EXP ₅₀	671.0 \pm 55.1 ^b	888.6 \pm 46.6 ^c	650.0 \pm 20.7 ^b	425.7 \pm 23.4 ^a	651.0 \pm 16.6 ^b	497.0 \pm 36.8 ^a
PPFDi	EXP ₁₀₀	824.8 \pm 27.2 ^a	1205. \pm 23.5 ^{c*}	932.6 \pm 61.04 ^{ab}	993.9 \pm 45.4 ^{b*}	1239.9 \pm 62.2 ^{c*}	897.9 \pm 23.9 ^{ab}
	EXP ₅₀	1080.9 \pm 93.5 ^b	1460.7 \pm 76.6 ^c	1072.3 \pm 37.9 ^b	699.8 \pm 38.5 ^a	1070.2 \pm 27.2 ^b	816.9 \pm 60.5 ^a
Abs	EXP ₁₀₀	0.6 \pm 0.05 ^{a*}	0.81 \pm 0.09 ^c	0.75 \pm 0.05 ^{b*}	0.78 \pm 0.04 ^{bc*}	0.74 \pm 0.04 ^{b*}	0.8 \pm 0.02 ^{bc}
	EXP ₅₀	0.84 \pm 0.03 ^{bc}	0.85 \pm 0.03 ^c	0.86 \pm 0.02 ^c	0.84 \pm 0.02 ^{bc}	0.8 \pm 0.01 ^a	0.81 \pm 0.03 ^{ab}

Ejemplo 3. Análisis de la fotoinhibición dinámica y crónica en relación con la temperatura en plantas vasculares de la Antártida.

El objetivo de este ensayo fue el de determinar la respuesta de la fotoinhibición dinámica y crónica en respuesta a bajas temperaturas en las dos únicas plantas vasculares que habitan en la Antártida: *Colobanthus quitensis* y *Deschampsia antarctica* (datos no publicados).

Ambas especies se recolectaron en la isla Livingston (Islas Sheatland del Sur, la Antártida) durante el verano antártico del 2018 (mediados de febrero) y se incubaron toda la noche en condiciones de laboratorio y oscuridad. Al día siguiente, se midió la fluorescencia de la clorofila con un Junior-PAM (luz blanca, Walz GmbH, Effeltrich, Alemania) a 20 y 5°C en 5 plantas de cada especie. Tras la realización de un primer pulso de saturación para determinar los valores de F_0 y F_m , se realizó una curva de luz iluminando la hoja con 12 intensidades de luz (25–1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) durante 4 min cada una. Al final de cada intervalo, un pulso de saturación permitió la medición de F_s y F_m' , con los que se calculó para cada intensidad lumínica las eficiencias de las vías fotoquímica y no fotoquímicas de acuerdo con las fórmulas desarrolladas por Hendrickson *et al.* (2004), descritas anteriormente:

$$\Phi_{PSII} = \frac{F_m' - F_s}{F_m'} \quad ; \quad \Phi_{NPQ} = \frac{F_s}{F_m'} - \frac{F_s}{F_m} \quad ; \quad \Phi_{f,D} = \frac{F_s}{F_m}$$

Tras finalizar la curva de luz, un periodo mínimo de 20 min de oscuridad permitió medir la recuperación de F_m , aplicando un pulso de saturación cada 15 s durante el primer minuto y cada 1 min durante el tiempo de recuperación restante. Esto permitió calcular los componentes de Φ_{NPQ} de acuerdo con el método de Walters y Horton (1991) y Guadagno *et al.* (2010) descrito en el ensayo 1.

Los resultados obtenidos muestran una modulación del *quenching* no fotoquímico con un patrón diferente entre las dos especies (Figura 10). Si bien en ambas especies el Φ_{PSII} decrece a 5°C, el Φ_{NPQ} solo se incrementa en las mismas condiciones de temperatura en *C. quitensis*, mientras que en *D. antarctica* es el $\Phi_{f,D}$ el que se incrementa a bajas temperaturas. Es decir, ante el decrecimiento de la actividad fotosintética o fotoinhibición provocado por las bajas temperaturas (probablemente debidas a un descenso de la fluidez de las

membranas, del transporte electrónico y/o a una ralentización de la actividad enzimática) ambas especies utilizan mecanismos distintos para disipar la energía sobrante. *C. quitensis* recurre a un incremento de la disipación térmica regulable, especialmente aquella vinculada a procesos de fotoinhibición dinámica (qE y gradiente de protones a través de la membrana tilacoidal) (Figura 11), mientras que *D. antártica* no modula su ϕ_{NPQ} ni ninguno de sus componentes y disipa el exceso de energía en forma de fluorescencia o de disipación térmica constitutiva, no asociada al establecimiento de un gradiente de protones.

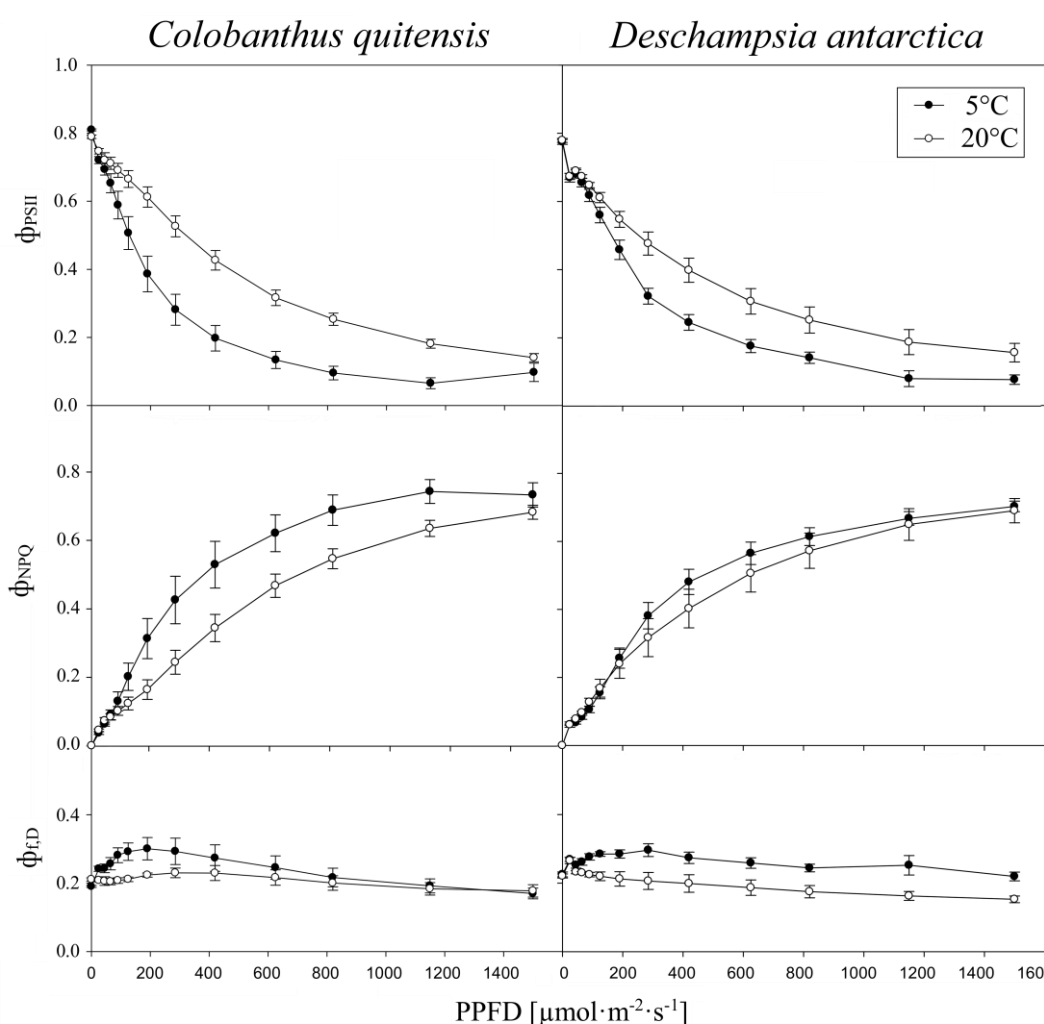


Figura 10. Variación con la intensidad lumínica y la temperatura de la eficiencia cuántica de las tres vías de energía que puede seguir un fotón: vía fotoquímica (ϕ_{PSII}), vía no fotoquímica no constitutiva (ϕ_{NPQ}) y vía no fotoquímica constitutiva y de fluorescencia ($\phi_{f,D}$). Parámetros calculados para las dos únicas especies de plantas vasculares que habitan en la Antártida, *Colobanthus quitensis* y *Deschampsia antarctica*, a partir de las fórmulas de Hendrickson *et al.*, (2004).

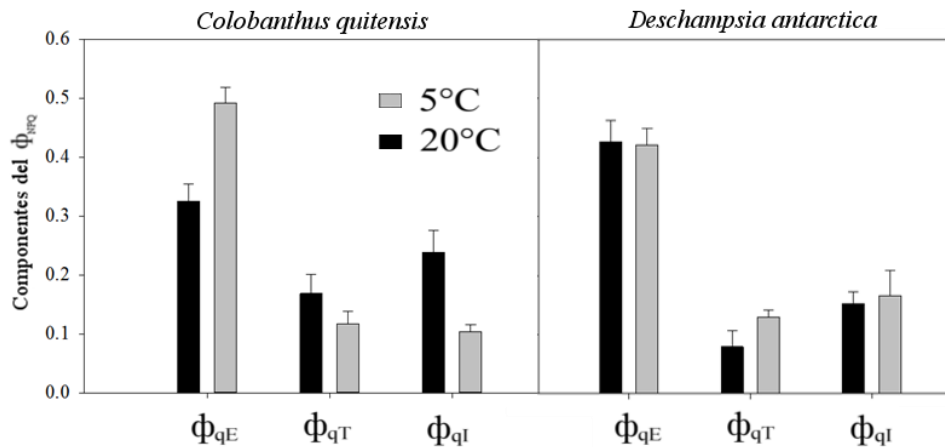


Figura 11. Componentes del *quenching* no fotoquímico calculados para cada especie y temperatura según el método de Walters y Horton (1991) y Guadagno *et al.* (2010).

Se concluye que el exceso de energía que deja de canalizarse a una vía fotoquímica debido a la fotoinhibición provocada por las bajas temperaturas se disipa mediante dos mecanismos distintos: 1) mediante la activación de mecanismos dinámicos de disipación de calor, en *C. quitensis*, y 2) mediante el incremento de la disipación por calor constitutiva o de la reemisión en forma de fluorescencia, en *D. antarctica*.

REFERENCIAS

- Adams WW, Zarter CR, Ebbert V, Demmig-Adams B** (2004) Photoprotective strategies of overwintering evergreens. *Bioscience* **54(1)**, 41-49.
- Adams WW, Muller O, Cohu CM, Demmig-Adams B** (2013) May photoinhibition be a consequence, rather than a cause, of limited plant productivity? *Photosynth Res* **117**, 31-44.
- Adams WW, Zarter CR, Mueh KE, Amiard V, Demmig-Adams B** (2006) Energy dissipation and photoinhibition: a continuum of photoprotection. In: Demmig-Adams B, Adams WW, Mattoo AK (Eds.), *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment. Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol. 21. Springer Science & Business Media, Dordrecht, pp. 49-64.
- Ahn TK, Avenson TJ, Peers G, Li Z, Dall'Osto L, Bassi R, Niyogi KK, Fleming G** (2009) Investigating energy partitioning during photosynthesis using an expanded quantum yield convention. *Chemical Physics* **357**, 151-158.
- Apichatmeta K, Sudsiri CJ, Ritchie RJ** (2017) Photosynthesis of oil palm (*Elaeis guineensis*). *Sci. Hortic. Amsterdam* **214**, 34-40.
- Bilger W, Björkman O** (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth Res* **25**, 173-185.
- Björkman O, Demming B** (1987) Photon yield of oxygen evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77°K among vascular plants of diverse origin. *Planta* **170**, 489-504
- Cailly AL, Rizzal F, Genty B, Harbinson J** (1996) Fate of excitation at PS II in leaves, the non-photochemical side. Abstract book of 10th FESPP Meeting, September 9-13, Florence, Italy. Supplement of *Plant Physiol Biochem* p.86
- Brewster D** (1834) On the colours of natural bodies. *Trans Roy Soc Edinburgh* **12**, 538-545.

- Demmig-Adams B, Adams WW** (2006) Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol* **172**, 11-21.
- Flexas J, Escalona JM, Medrano H** (1998) Down-regulation of photosynthesis by drought under field conditions in grapevine leaves. *Functional Plant Biology* **25(8)**, 893-900.
- Flexas J, Bota J, Escalona JM, Sampol B, Medrano H** (2002) Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Functional Plant Biology* **29(4)**, 461-471.
- Foyer CH, Harbinson J** (1999) Relationships between antioxidant metabolism and carotenoids in the regulation of photosynthesis. In: Frank HA, Young AJ, Britton G, Cogdell RJ, The photochemistry of carotenoids. Dordrecht: Springer Netherlands. pp. 305-325
- Genty B, Briantais JM, Baker NR** (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **990(1)**, 87-92.
- González-Rodríguez AM, Jiménez MS, Morales D** (2005) Seasonal and intraspecific variation of frost tolerance in leaves of three Canarian laurel forest tree species. *Annals of Forest Science* **62(5)**, 423-428.
- Goudriaan J** (1982) Potential production processes. In: Penning de Vries FWT, Van-Laar HH (Eds), *Simulation of plant growth and crop production*. Pudoc. Wageningen, pp 98-113.
- Guadagno CR, Virzo De Santo A, D'Ambrosio N** (2010) A revised energy partitioning approach to assess the yields of non-photochemical quenching components. *Biochimica et Biophysica Acta* **1797**, 525-530.
- Hendrickson L, Furbank RT, Chow WS** (2004) A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynth Res* **82**, 73-81.
- Hill R, Larkum AWD, Frankart C, Kühl M, Ralph PJ** (2004) Loss of functional photosystem II reaction centres in zooxanthellae of corals exposed to bleaching conditions: using fluorescence rise kinetics. *Photosynth Res* **82**, 59-72.

- Horton P, Hague A** (1988) Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts. IV. Resolution of non-photochemical quenching. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **932**, 107-115.
- Ioannidis NE, Malliarakis D, Torné JM, Santos M, Kotzabasis K** (2016) The over-expression of the plastidial transglutaminase from maize in Arabidopsis increases the activation threshold of photoprotection. *Frontiers in Plant Science* **7**, 635.
- Ishida A, Uemura A, Koike N, Matsumoto Y, Hoe AL** (1999) Interactive effects of leaf age and self-shading on leaf structure, photosynthetic capacity and chlorophyll fluorescence in the rain forest tree, *Dryobalanops aromatica*. *Tree Physiol* **19**, 741-747.
- Jahns P, Holzwarth AR** (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* **1817**, 182-193.
- Jassby AD, Platt T** (1976) Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnol Oceanogr* **21**, 540-547.
- Kalaji HM, Schansker G, Ladle RJ, Goltsev V, Bosa K, Allakhverdiev SI, Brestic M, Bussotti F, Calatayud A, Dąbrowski P, Elsheery NI** (2014) Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynth Res* **122(2)**, 121-158.
- Kautsky H, Hirsch A** (1931). Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Die Naturwissenschaften* **19**, 964.
- Kok B** (1956) On the inhibition of photosynthesis by intense light. *Biochimica et Biophysica Acta* **21(2)**, 234-244.
- Krall JP, Edwards GE** (1992) Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves. *Physiologia Plantarum* **86(1)**, 180-187.
- Kramer DM, Avenson TJ, Edwards GE** (2004) Dynamic flexibility in the light reactions of photosynthesis governed by both electron and proton transfer reactions. *Trends in Plant Science* **9(7)**, 349-357.
- Krause GH, Klosson RJ, Tröster U** (1982) Effect of low temperature on the glutathione status of plant. In: Li PH, Sakai A (Eds), *Plant cold hardiness and freezing stress*, New York: Academic Press, pp. 55-75.

- Krause AG, Weis E** (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Biology* **42(1)**, 313-349.
- Krause GH** (1988) Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiologia Plantarum* **74(3)**, 566-574.
- Lambrev PH, Tsonev T, Velikova V, Georgieva K, Lambreva MD, Yordanov I, Kovács L, Garab G** (2007) Trapping of the quenched conformation associated with non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence at low temperature. *Photosynth Res* **94**, 321-332.
- Larcher W** (2003) *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer Science & Business Media.
- Lee H-Y, Chow WS, Hong Y-N** (1999) Photoinactivation of photosystem II in leaves of *Capsicum annuum*. *Physiol Plant* **105**, 377-384
- Lichtenthaler HK, Buschmann C, Knapp N** (2005) How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R_{fd} of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* **43**, 379-393.
- Lobo FDA, De Barros MP, Dalmagro HJ, Dalmolin ÂC, Pereira WE, De Souza EC, Vourlitis GL, Rodríguez Ortíz CE** (2013) Fitting net photosynthetic light-response curves with Microsoft Excel—a critical look at the models. *Photosynthetica* **51(3)**, 445-456.
- Long SP, Humphries S, Falkowski PG** (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**, 633-662.
- Longstaff BJ, Kildea T, Runcie JW, Cheshire A, Dennison WC, Hurd C, Kana T, Raven JA, Larkum, AW** (2002) An *in situ* study of photosynthetic oxygen exchange and electron transport rate in the marine macroalga *Ulva lactuca* (Chlorophyta). *Photosynth Res* **74**, 281-293.
- Maxwell K, Johnson GN** (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J Exp Bot* **51(345)**, 659-668.
- Morales F, Abadía A, Abadía J** (2008) Photoinhibition and Photoprotection under Nutrient Deficiencies, Drought and Salinity. In: Demmig-Adams B, Adams WW, Mattoo AK (Eds), *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 65-85.

- Müller P, Li X, Niyogi KK** (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology* **25**, 1558-1566.
- Müller NJC** (1874) Beziehungen zwischen Assimilation, Absorption und Fluoreszenz im Chlorophyll des lebenden Blattes. *Jahrb Wiss Bot* **9**, 42-49.
- Nilkens M, Kress E, Lambrev P, Miloslavina Y, Müller M, Holzwarth AR, Jahns P** (2010) Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in Arabidopsis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1797(4)**, 466-475.
- Osmond CB** (1994) What is photoinhibition: some insights from comparisons of sun and shade plants. In: Baker NR, Bowyer JR (Eds), *Photoinhibition: Molecular Mechanisms to the Field*. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK, pp 1-24
- Perera-Castro AV, Brito P, Gonzalez-Rodriguez AM** (2017) Light response in alpine species: different patterns of physiological plasticity. *Flora* **234**, 165-172.
- Perera-Castro AV, Brito P, González-Rodríguez AM** (2018) Changes in thermic limits and acclimation assessment for an alpine plant by chlorophyll fluorescence analysis: F_v/F_m vs. R_{fd} . *Photosynthetica* **56**, 527-536.
- Perera-Castro AV, Flexas J** (2023) The ratio of electron transport to assimilation (ETR/A_N): underutilized but essential for assessing both equipment's proper performance and plant status. *Planta* **257(2)**, 29.
- Pfündel E, Bilger W** (1994) Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynth Res* **42**, 89-109.
- Ralph PJ, Gademann R** (2005) Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquatic Botany* **82(3)**, 222-237.
- Rascher U, Liebig M, Lüttge U** (2000) Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. *Plant, Cell and Environment* **23**, 1397-1405.
- Ritchie RJ, Bunthawin S** (2010) The use of pulse amplitude modulation (PAM) fluorometry to measure photosynthesis in a CAM orchid, dendrobium SPP. (D. CV. Viravuth pink). *Int J Plant Sci* **171**, 575-585.

- Ritchie RJ** (2008) Fitting light saturation curves measured using modulated fluorometry. *Photosynth Res* **96**, 201-215.
- Sakshaug E, Bricaud A, Dandonneau Y, Falkowski PG, Kiefer DA, Legendre L, Morel A, Parslow J, Takahshi M** (1997) Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. *J Plankton Res* **19**, 1637-1670
- Schansker G, Yuan Y, Strasser RJ** (2008) Chl a fluorescence and 820 nm transmission changes occurring during a dark-to-light transition in pine needles and pea leaves: a comparison. In: *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis*. Springer Netherlands, pp. 945-949.
- Smith EL** (1936) Photosynthesis in relation to light and carbon dioxide. *PNAS* **22**, 504-511.
- Terashima I, Evans JR** (1988) Effects of light and nitrogen nutrition on the organization of the photosynthetic apparatus in spinach. *Plant and Cell Physiology* **29(1)**, 143-155.
- Valladares F, Skillman J, Pearcy RW** (2002) Convergence in light capture efficiencies among tropical forest understory plants with contrasting crown architectures: a case of morphological compensation. *Am J Bot* **89**, 1275-1284.
- Walker D** (1987) The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. Robert Hill Institute, Sheffield, S10 2TN, U.K.
- Walters RG, Horton P** (1991) Resolution of components of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. *Photosynth Res* **27**, 121-133.
- White AJ, Critchley C** (1999) Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynth Res* **59**, 63-72.