

CARACTERIZACIÓN DE LA DEFICIENCIA DE CALCIO EN PLANTAS DE TOMATE UTILIZANDO PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

M.A. Sanz, A. Blanco, E. Monge, J. Val

Estación Experimental de Aula Dei (CSIC),
Apdo. 202, 50080 Zaragoza, España
e-mail: jval@eead.csic.es

RESUMEN

El análisis de pigmentos fotosintéticos reveló que su concentración no se modifica significativamente en función de la deficiencia de calcio, pero sí según la edad fisiológica de las hojas. De las relaciones clorofila *a/b* y *Carotenoides/Clorofila* total se deduce que no existen variaciones significativas en la estequiometría de los pigmentos en función de la concentración de calcio utilizada para el cultivo o de la edad fisiológica, excepto en el caso de las hojas jóvenes de plantas deficientes.

Por medio de la fluorescencia de clorofila se ha podido deducir que la eficacia potencial del fotosistema II de las plantas deficientes en calcio es menor conforme disminuye la concentración de calcio en la solución nutritiva. Este ligero descenso sólo puede detectarse entre las plantas control y las más deficientes. Sin embargo, este descenso de la eficiencia intrínseca del fotosistema II no es concomitante ni con el de calcio foliar, ni con el de clorofilas.

Palabras clave: Carotenoides, Clorofila, Fluorescencia de clorofila, *Lycopersicon esculentum* Mill, Nutrición vegetal.

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF CALCIUM DEFICIENCY IN TOMATO PLANTS BY USING PHYSIOLOGICAL PARAMETERS

The analysis of photosynthetic pigments showed that their concentrations were significantly modified according to the physiological age of the leaves, but not by calcium deficiency. The values of the ratios chlorophyll *a/b* and *Carotenoids/Total Chlorophyll* indicated that the pigments stoichiometry, except for the youngest leaves from calcium deficient plants: do not vary as a function of calcium treatment or leaf physiological age.

By means of chlorophyll fluorescence, it has been deduced that the potential efficiency of photosystem II in calcium deficient plants was lower as calcium concentration in the nutritive solution decreases. This slight decrease can only be detected between control and severely deficient plants. However, this inhibition of the intrinsic efficiency of photosystem II is not concomitant either with the decrease of calcium in the leaves or with the diminution of chlorophylls.

Key words: Carotenoids, Chlorophyll, Chlorophyll fluorescence, *Lycopersicon esculentum* Mill, Plant nutrition.

Introducción

El calcio tiene un papel importante en el metabolismo vegetal. Su presencia es esencial para el crecimiento en densidad y longitud de los pelos radiculares, los cuales son de vital importancia para la absorción de nutrientes (JAUNIN y HOFER, 1988). Además, el calcio forma parte de las estructuras celulares como estabilizador de la pared celular y de la membrana plasmática. Es necesario en los procesos de división y elongación celulares, en la polimerización de proteínas, y como regulador enzimático. Un buen número de evidencias demuestran que el calcio actúa como transductor de señales (ROBERTS y HARMON, 1992), tanto en la expresión de genes específicos, como en la síntesis de nuevas proteínas (FUNKHOUSER *et al.*, 1993). En este sentido, el papel del calcio en las células vegetales está adquiriendo gran relevancia puesto que es el único elemento conocido que actúa como mensajero en los tejidos vegetales. Durante los últimos años, se han descubierto cambios en las rutas de proteínas, como calmodulina y similares, a causa de señales externas y se han caracterizado, a escala bioquímica y molecular, canales de Ca^{2+} y quinasas dependientes de Ca^{2+} . Estos estudios han permitido la elucidación de las acciones clave de Ca^{2+} que cubren desde el control del transporte iónico hasta la expresión génica de proteínas. El desarrollo del sistema homeostático de Ca^{2+} es antiguo en términos evolutivos y probablemente refleja una necesidad biológica para mantener baja la concentración de este elemento en un entorno citosólico rico en fosfato (GILROY *et al.*, 1993). Sin embargo, este homeostato es un sistema complejo capaz de regular la función celular a través de fluctuaciones controladas por Ca^{2+} en el interior de la célula vegetal (POOVAIAH, 1993). Ciertos

estímulos externos son capaces de inducir cambios en la concentración celular de Ca^{2+} , modificando las propiedades espaciales y temporales de la célula vegetal. La regulación localizada de Ca^{2+} , junto con las modificaciones sobre la actividad de otros intermediarios celulares, puede explicar las amplias y específicas respuestas moleculares promovidas por cambios sutiles en la concentración de Ca^{2+} (BUSH, 1995).

La deficiencia de calcio modifica el proceso fotosintético disminuyendo la eficacia de la carboxilación, y, por tanto, de la capacidad fotosintética global, lo que provoca reducciones en la producción de biomasa de las plantas afectadas (ATKINSON *et al.*, 1989). El fotosistema II (PSII) es un complejo de varias subunidades (pigmentos y proteínas) que está embebido en la membrana tilacoidal de plantas superiores, algas y cianobacterias que usa la energía solar para catalizar una serie de reacciones de transferencia de electrones dando como resultado la división del agua en oxígeno molecular, protones y electrones (HANKAMER *et al.*, 1997). Por tanto, la función del PS II consiste en oxidar el agua y reducir la plastoquinona (PQ) y, además, el PS II genera un gradiente de pH a través de la membrana tilacoidal produciendo y consumiendo protones en lados opuestos de la membrana. El Ca^{2+} , al formar parte del complejo de oxidación del agua del PS II, es fundamental para el normal funcionamiento de los centros de reacción y, por lo tanto, para que el rendimiento de desprendimiento de oxígeno sea alto (GHANOTAKIS y YOCUM, 1990). Algunos estudios sugieren que la proteína de 33 kDa del PS II puede estar involucrada en la unión de manganeso y calcio al sitio activo de este fotosistema. En este sentido, mutantes carentes de la proteína de 33 kDa no pueden crecer a bajas concentraciones de calcio (PHILBRICK *et al.*, 1991) y esto, unido

a la observación de que la secuencia de aminoácidos de esta proteína contiene dominios que unen calcio (COLEMAN y GOVINDJEE, 1987; WALES *et al.*, 1989) y que, tras la separación por electroforesis, la proteína de 33 kDa puede unir ^{45}Ca (WEBBER y GRAY, 1989), ha conducido a la hipótesis de que la proteína extrínseca de 33 kDa estabiliza el complejo de Mn, Ca^{2+} y Cl^- del centro activo del fotosistema II (HANKAMER *et al.*, 1997).

Algunos autores (RAMALHO *et al.*, 1995) encuentran, en tejido foliar, buenas correlaciones entre la concentración de Ca^{2+} y algunos parámetros fotosintéticos como la clorofila y la eficiencia del PS II medida por el parámetro de fluorescencia F_v/F_m . Las hojas cuando reciben más energía de la que pueden usar en el proceso fotosintético, forman un gradiente protónico intratilacoidal que excede las necesidades de uso de la síntesis de ATP (KRAUSE y WEIS, 1991). En estas circunstancias se observa un descenso en la producción de oxígeno acompañado de la liberación de iones Ca^{2+} (KRIEGER y WEIS, 1993). Estos autores postulan que esta liberación de Ca^{2+} está ligada a la formación de zeaxantina para disminuir la captación de luz por la antena del fotosistema II y controlar el flujo de electrones a través del mismo (KRIEGER y WEIS, 1993).

Las alteraciones fisiológicas asociadas con la nutrición cálcica son factores importantes para los cultivos que causan cuantiosas pérdidas económicas a los productores de frutas y hortalizas. De hecho, al aumentar la concentración de calcio en tejidos vegetales disminuye la incidencia de las patologías y, por tanto, mejora la calidad del producto. En el presente trabajo se estudian algunos aspectos fisiológicos de las plantas de tomate sometidas a deficiencia inducida de calcio con el fin de recoger información que permita incrementar el suministro de

calcio a los órganos destinados al consumo. Para ello, se estudian el comportamiento de los pigmentos fotosintéticos y parámetros de fluorescencia en función de la edad fisiológica de las hojas, el tiempo de exposición a las condiciones de deficiencia de calcio y la concentración foliar de Ca^{2+} .

Material y métodos

El estudio sobre deficiencia de calcio en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Tres Cantos) se realizó mediante cultivo hidropónico (solución nutritiva $1/2$ de Hoagland), en una cámara climatizada situada en la Estación Experimental de Aula Dei (Zaragoza), bajo condiciones controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa ($80 \pm 5\%$), radiación fotosintéticamente activa $242 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas y aireación forzada. La solución nutritiva se renovaba semanalmente para evitar el agotamiento de los nutrientes. Se realizaron 5 repeticiones de los experimentos entre el 24 de junio de 1998 y el 22 de abril de 1999.

El proceso de desarrollo de las plantas puede encontrarse descrito en detalle en un artículo precedente (SANZ *et al.*, 2000).

Cada uno de los experimentos se realizó en tres cubos de 20 litros conteniendo cada uno dos plantas. La única diferencia entre ellos era la concentración inicial de calcio en la solución nutritiva: un grupo de plantas, que actuaron como Control (Tratamiento 1), se cultivó en solución hidropónica estándar ($2,5 \text{ mM Ca}^{2+}$), otro creció en solución de $125 \mu\text{M Ca}^{2+}$ (Tratamiento 2), y un tercer grupo en $62,5 \mu\text{M Ca}^{2+}$ (Tratamiento 3). Al final del ciclo de cultivo, cada una de las plantas de los Tratamientos 1 y 2 se dividió

en tres partes, mientras que las del Tratamiento 3 solamente en dos debido a que su crecimiento fue notablemente menor. De esta forma se diferenciaron las hojas en: viejas, adultas y jóvenes o en pleno desarrollo (las hojas jóvenes sólo llegan a desarrollarse en los Tratamientos 1 y 2).

Fluorescencia de clorofila medida con PEA (Plant Efficiency Analyzer)

Transcurridos uno o dos días desde el inicio de los tratamientos, se procedió a determinar, *in situ*, los parámetros de fluorescencia de clorofila mediante el "Plant Efficiency Analyser" (PEA, Hansatech, Reino Unido). Estas medidas se realizaron cada 2-3 días durante un periodo de tiempo de unos 35 días.

Previamente a la medida se colocaron unas pinzas especiales, que permiten la adaptación a la oscuridad (20 minutos) de la zona de medida de la hoja, para obtener el máximo grado de oxidación de la quinona A (Q_A). Posteriormente, se hizo incidir la luz y se calcularon los parámetros de fluorescencia (F_0 , F_m y F_v/F_m).

Análisis de pigmentos fotosintéticos

Con una parte alícuota de las muestras de hojas se procedió a la extracción de pigmentos fotosintéticos para su posterior cuantificación por HPLC.

Extracción de pigmentos

El procedimiento de extracción consiste en la homogeneización en mortero de discos de hoja de superficie conocida. En nuestro

caso, para cada muestra, se homogeneizaron 5 discos de 0,33 cm² cada uno (aproximadamente 7,4 mg/disco) con 10 mL de acetona 100% como agente extractante, en presencia de una pequeña cantidad de ascorbato sódico para prevenir la formación de feofitinas. La suspensión resultante se filtró a través de un sistema Millipore, con una membrana Durapore de 0,22 µm utilizando presión. Los extractos se guardaron en recipientes de vidrio bien cerrados, forrados con papel de aluminio, y en frío (a -20°C) hasta el momento de su análisis.

Separación y cuantificación de pigmentos por HPLC

El sistema cromatográfico modular utilizado consta en una bomba *Waters* (Mod. M-51), inyector *Rheodyne 7010* con loop de 20 µL (Cotati), columna de compresión radial C_{18} (8 x 10 cm) de fase reversa *Nova-Pack* (*Waters*) de 4 µm de diámetro de partícula, un detector visible/ultravioleta *Shimadzu* (SPD-6AV) y un sistema de registro/integración informatizado *PC-Integration Pack ver. 3.00, Softtron* (Kontron). El método utilizado fue el descrito por VAL *et al.* (1994) y consiste en 2 etapas isocráticas en las que las fases móviles son: (i) 1,75% metanol, 1,75% diclorometano y 96,5% acetonitrilo, y (ii) 50% acetonitrilo, y 50% acetato de etilo, con un flujo de 2 mL·min⁻¹. Los pigmentos fueron detectados a 440 nm. La cuantificación de pigmentos se llevó a cabo según VAL *et al.* (1986).

Análisis de calcio en hoja

Con una alícuota de las muestras recolectadas, se procedió a su lavado y posterior secado en estufa de aire a 60°C durante una

semana. Se tomaron unas 40 hojas por tratamiento con vistas a la obtención de al menos 1-1,5 g de materia seca. Se calcinó 1g de hojas en mufla a 600°C durante 24 h, y las cenizas se disolvieron en ácido nítrico (1:1). La solución obtenida se evaporó hasta sequedad total y el residuo se introdujo de nuevo en la mufla durante 1 hora a 600°C. Las cenizas se disolvieron calentando con HCl diluido.

Los análisis se realizaron por absorción atómica siguiendo los métodos propuestos por PINTA *et al.* (1973) expresando los resultados en porcentaje de materia seca.

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente, por separado, para cada edad fisiológica de hoja, y para cada tratamiento aplicado. Cuando los análisis de varianza, mostraron diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%, se aplicó el test de Duncan para la separación de medias.

Resultados y discusión

Los análisis de pigmentos fotosintéticos mostraron un hecho singular: en todos los casos se observa la ausencia de anteraxantina y zeaxantina, independientemente del tratamiento al que se sometieron las plantas y de la edad fisiológica de las hojas. Sólo en el caso de las hojas jóvenes del Tratamiento 2, tampoco aparece violaxantina (cuadro 2). Este hecho es interesante si se tiene en cuenta que el calcio forma parte de una de las proteínas extrínsecas del fotosistema II (HANKAMER *et al.*, 1997) y que el desprendimiento de Ca^{2+} de este complejo provoca la inactivación de este fotosistema y la formación de zeaxantina (KRAUSE y WEIS, 1991). De hecho, la exposición de las plantas a una radiación superior a la que puede ser usada en el proceso de la fotosíntesis induce cambios en el ciclo de las xantofilas, caracterizados por la conversión de violaxantina en

Cuadro 1. Concentración de violaxantina ($\mu\text{g cm}^{-2}$) en hojas de tomate de distinta edad fisiológica, en función del medio de cultivo

Table 1. Concentration of violaxanthin ($\mu\text{g cm}^{-2}$) in tomato leaves as a function of their physiological age and plant growth media

Edad hojas Tratamiento	Violaxantina		
	Viejas	Adultas	Jóvenes
1 (Control)	0,795aA	1,025aA	1,225aA
2 (125 $\mu\text{M Ca}^{2+}$)	1,035aA	0,730aA	0,000bB
3 (62,5 $\mu\text{M Ca}^{2+}$)	0,970aA	1,010aA	—

Los valores en la misma columna seguidos de la misma letra en minúsculas, y los de la misma fila seguidos de la misma letra en mayúsculas no son significativamente distintos a $p \leq 0,05$ según la prueba de separación de medias de Duncan.

Values within the same column followed by the same letter in lower case, and in the same row followed by the same capital letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $p \leq 0,05$.

anteraxantina y posteriormente en zeaxantina, mediante una serie de desepoxidaciones inducidas por la luz. Se han encontrado buenas correlaciones entre el contenido de zeaxantina y la disipación del exceso de energía mediante mecanismos no fotoquímicos que protegen a los centros de reacción del PSII de una excitación dañina (DEMMIG-ADAMS y ADAMS, 1992; GILMORE, 1997). Por tanto, en las condiciones utilizadas en este trabajo, puede afirmarse que la falta de producción de zeaxantina por parte de las plantas sometidas a deficiencia de calcio, indica la escasa repercusión de esta deficiencia a escala fotosintética en las hojas adultas y viejas. Sin embargo, la falta de formación de violaxantina en las hojas jóvenes deficientes, indica la ausencia del mecanismo protector del ciclo VAZ en este material, que resulta ser muy fotolábil, con alta tendencia a necrosarse.

En otros casos de deficiencias nutricionales, como las de hierro y manganeso, se reduce la actividad fotosintética de las plantas debido a alteraciones del aparato fotosintético. La deficiencia de hierro produce una disminución en el número de lamelas por cloroplasto (SPILLER y TERRY, 1980); que está asociada con una disminución en todos los componentes de la membrana, incluyendo los transportadores de electrones de la cadena fotosintética (TERRY, 1980) y los pigmentos captadores de luz. Así, diferentes autores (SHETTY y MILLER, 1966; TERRY, 1980; PÉREZ *et al.*, 1995) han encontrado que en condiciones de deficiencia de hierro se observa una disminución en la relación *Clorofila/Carotenoides* debido a un incremento relativo de la concentración de xantofilas frente a la de clorofilas y b-caroteno. La deficiencia de manganeso afecta el rendimiento fotosintético de las plantas, especialmente en hojas jóvenes, ya que impide el primer paso de la cadena

transportadora de electrones (VAL *et al.*, 1997). La de la clorosis asociada a la deficiencia de Mn es el resultado de una disminución en la concentración de ambas clorofilas (NEENA *et al.*, 1999).

El Ca^{2+} juega un importante papel en el metabolismo vegetal y en particular en el proceso fotosintético. En este contexto, se ha sugerido que el Ca^{2+} tiene una doble función: por una parte, como ión ligado al fotosistema II, está relacionado con la lisis del agua, y por otra, tiene un papel estructural en el ensamblaje de la antena periférica (KATOY y HAN, 1993). En plantas superiores, los complejos captadores de luz contienen clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) y carotenoides, mientras que los centros de reacción sólo contienen clorofila *a* y β -caroteno por lo tanto las variaciones en el valor de las relaciones clorofila *a/b* pueden utilizarse para estimar los cambios de estequiometría en el aparato fotosintético (THOMPSON, 1987). Por otra parte, variaciones en el valor de la relación *Carotenoides/Clorofilas* indicarían la alteración de las relaciones entre pigmentos dentro de la antena (MONGE *et al.*, 1985). Como puede observarse en el cuadro 2, la composición pigmentaria de las plantas de tomate deficientes en calcio solamente se ha visto significativamente alterada en las hojas más jóvenes del Tratamiento 2. En ellas se produce una notable disminución de la cantidad de carotenoides y de clorofilas, pero principalmente descende la concentración de carotenoides, incluyendo la violaxantina (cuadro 1), hasta su práctica desaparición. Esto induce la falta de brillo de este tipo de hojas debido a un valor muy bajo de la relación *Carotenoides/Clorofila*. También se podría deducir que no se producen cambios significativos en la estequiometría de los pigmentos fotosintéticos en las hojas viejas y adultas de las plantas deficientes en calcio.

Cuadro 2. Concentración de pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g cm}^{-2}$) y relaciones entre ellos en hojas de tomate de distinta edad fisiológica, en función del medio de cultivo de las plantas

Table 2. Concentration of leaf photosynthetic pigments ($\mu\text{g cm}^{-2}$) and their relationships in tomato leaves as a function of their physiological age and plant growth media

Edad hojas Tratamiento	Chl total		
	Viejas	Adultas	Jóvenes
1 (Control)	30,16aA	33,50aA	27,29aA
2 (125 $\mu\text{M Ca}^{2+}$)	38,62aA	24,96aA	7,00bB
3 (62.5 $\mu\text{M Ca}^{2+}$)	29,88aA	34,27aA	–
Edad hojas Tratamiento	Carotenoides		
	Viejas	Adultas	Jóvenes
1 (Control)	7,97aA	9,99aA	9,13aA
2 (125 $\mu\text{M Ca}^{2+}$)	10,42aA	6,67aA	0,55bB
3 (62.5 $\mu\text{M Ca}^{2+}$)	9,77aA	10,51aA	–
Edad hojas Tratamiento	Chl a/b		
	Viejas	Adultas	Jóvenes
1 (Control)	2,81aA	3,04aB	3,33aB
2 (125 $\mu\text{M Ca}^{2+}$)	2,84aA	2,91aA	2,90aA
3 (62.5 $\mu\text{M Ca}^{2+}$)	3,05aA	2,88aA	–
Edad hojas Tratamiento	Carot/Chl total		
	Viejas	Adultas	Jóvenes
1 (Control)	0,27aA	0,30aAB	0,34aB
2 (125 $\mu\text{M Ca}^{2+}$)	0,27aA	0,27aA	0,08bB
3 (62.5 $\mu\text{M Ca}^{2+}$)	0,33aA	0,31aA	–

Los valores en la misma columna seguidos de la misma letra en minúsculas, y los de la misma fila seguidos de la misma letra en mayúsculas no son significativamente distintos a $p \leq 0,05$ según la prueba de separación de medias de Duncan.
Values in the same column followed by the same letter in lower case, and in the same row followed by the same capital letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.

En el caso de las hojas jóvenes del Tratamiento 2, si el calcio es esencial para la estabilización de la clorofila y de la apoproteína de la antena del fotosistema II (TANAKA *et al.*, 1992), la deficiencia de este elemento podría provocar una desorganización de estas estructuras y, por lo tanto, de los pigmentos que la integran. Sin embargo, no se aprecian cambios significativos en el valor de la relación Chl *a/b* (cuadro 1), lo que indica que se mantiene la proporción entre centros de reacción y captadores de luz.

Sin embargo, si se representan las concentraciones de clorofila total y la de carotenoides totales en función de la concentración foliar de calcio, se observa que los datos correspondientes a las hojas cultivadas en deficiencia se ajustan linealmente al valor inverso de la concentración de calcio (figura 1).

En la figura 1, se observa que para pequeñas variaciones en el valor de calcio foliar se produce una respuesta de la clorofila y carotenoides muy elevada. Por lo tanto, al realizar el análisis de varianza para los tratamientos, la variabilidad en la concentración de pigmentos

es tan alta que no aparecen diferencias significativas. Sin embargo, mediante el análisis por regresión entre el calcio en hoja y la concentración de pigmentos, pueden predecirse los cambios en clorofilas y carotenoides para una concentración de calcio determinada.

El ajuste a estas curvas permite deducir que la concentración teórica máxima o asíntota de la curva sería de 45,87 $\mu\text{g cm}^{-2}$ para la clorofila total y de 13,82 $\mu\text{g cm}^{-2}$ para el sumatorio de carotenoides. En ambos casos, la concentración de calcio correspondiente a la mitad del valor máximo de la concentración de clorofilas y carotenoides sería de 0,32 y 0,35 g 100 g⁻¹ de materia seca, respectivamente. Como puede observarse estos valores son prácticamente iguales, lo que indica que el patrón de comportamiento de estos pigmentos con respecto a la concentración foliar de calcio es idéntico. Es decir, en el caso de plantas deficientes en calcio, exceptuando las hojas deficientes más jóvenes (cuadros 1 y 2) se produce una destrucción homogénea de todos los pigmentos fotosintéticos que está relacionada con la disminución de la concentración de calcio en hojas.

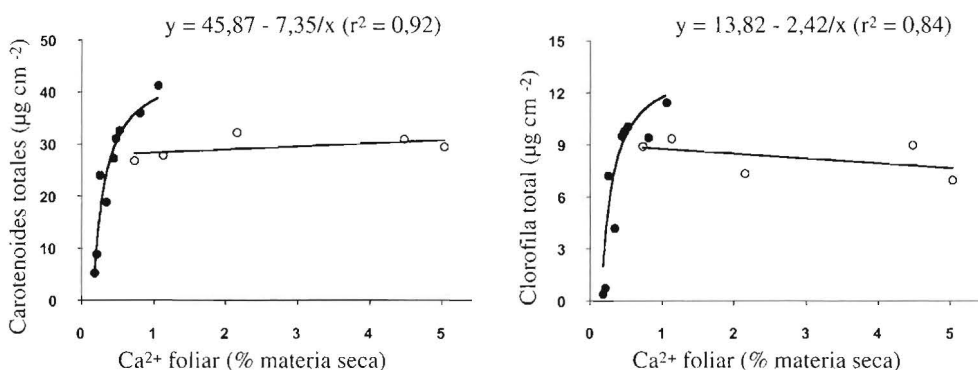


Figura 1. Concentración de clorofilas y carotenoides totales en función de la concentración foliar de calcio. Los símbolos vacíos corresponden a las plantas cultivadas en solución normal y los símbolos llenos a plantas deficientes en Ca^{2+} .

Figure 1. Concentration of total chlorophyll and carotenoids versus the leaf concentration of calcium. The open symbols belong to plants grown in normal solution and the solid symbols to calcium-deficient plants.

En el caso de las plantas cultivadas en solución completa de calcio, el comportamiento de los pigmentos es muy distinto al encontrado en plantas deficientes. Como puede observarse en la figura 1, la concentración de pigmentos foliares es prácticamente independiente de la de calcio. Este tipo de hojas puede llegar a contener incluso menos calcio que las deficientes y, sin embargo, no se aprecian disminuciones de clorofilas o carotenoides. La observación de ambos tipos de curvas (deficientes y control) permite suponer que la expresión de la deficiencia de calcio no es sólo una función dependiente de la concentración de calcio foliar, sino que la planta posee mecanismos de señales o de adaptación a este tipo de estrés que inducen una capacidad de síntesis de pigmentos mayor que la encontrada en plantas control. Estos resultados parecen estar en desacuerdo con los descritos por RAMALHO *et al.* (1995) que, básicamente encuentran, una proporcionalidad directa entre la concentración de clorofila y la de

calcio en hoja. Esta discrepancia podría atribuirse a que las plantas de café estudiadas por estos autores tenían una edad aproximada de año y medio y los tratamientos de deficiencia tuvieron una duración de 90 días. Es posible que las plantas adultas y el lapso del tratamiento indujeran una estabilización de los procesos de adaptación.

Una vez determinada la composición pigmentaria del aparato fotosintético de las plantas de tomate deficientes en calcio se procedió a verificar si se producen alteraciones en su funcionalidad. Para ello se utilizaron técnicas de fluorescencia de clorofila como herramienta útil para evaluar la capacidad fotosintética de las plantas en el estudio de deficiencias nutricionales (VAL *et al.*, 1993, 1995, 1997). En nuestro caso, se ha utilizado el parámetro F_v/F_m que proporciona una medida indirecta de la potencialidad fotosintética del fotosistema II.

En la figura 2 se muestra, como ejemplo, la evolución del parámetro F_v/F_m en plantas

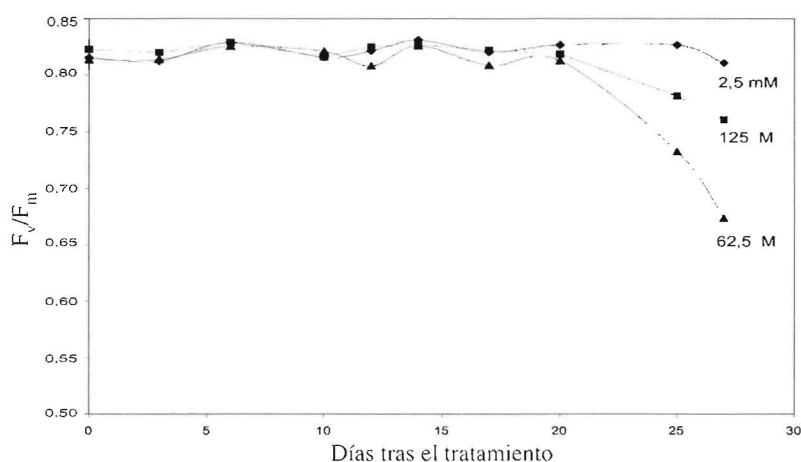


Figura 2. Evolución de la relación F_v/F_m en las plantas crecidas en tres concentraciones de calcio. En las gráficas se muestran los valores promedio de las determinaciones en 10 hojas adultas distintas por tratamiento.

Figure 2. Development of the F_v/F_m ratio in plants grown on three calcium concentrations. In this picture, the average values from 10 different adult leaves per treatment are shown.

de una de las repeticiones. No se presentan los valores promedio de varios experimentos debido a la falta de estricta coincidencia en las fechas de muestreo. Sin embargo, la tendencia de la evolución de este parámetro fue similar en todos los ciclos de cultivo. Estas determinaciones se realizaron sobre las hojas adultas de cada una de las distintas plantas crecidas en solución hidropónica.

Como puede observarse en la figura 2, apenas hay variación de F_v/F_m a lo largo del tiempo para las plantas control. Sin embargo, en el tratamiento 2, la relación F_v/F_m se mantiene constante hasta los 12 y 19 días a partir de los cuales disminuye progresivamente. También en el tratamiento 3 se observa un comportamiento similar, pero con una disminución más pronunciada alrededor del día 25.

A la vista de la figura 2, es posible concluir que la potencialidad fotosintética de las plantas deficientes en calcio está ligeramen-

te afectada y que esta disminución se agrava conforme disminuye la concentración de calcio en el medio de cultivo. Este es un dato interesante, especialmente tras haber verificado, en hojas adultas, la falta de alteración de la composición de pigmentos y la de las relaciones entre ellos. Para profundizar en esta hipótesis se construyó el cuadro 2, que recoge los valores de la concentración foliar de Ca^{2+} y los de la relación F_v/F_m en hojas adultas en el momento de la cosecha.

Las hojas adultas de los tratamientos 2 y 3, contienen una concentración foliar de calcio significativamente menor que los controles. Sin embargo, el descenso en la potencialidad fotosintética únicamente es estadísticamente distinto entre las plantas control y las del tratamiento 3. Efectivamente, se confirma que los tratamientos inductores de deficiencia de Ca^{2+} provocan descensos de la eficacia en la captura de energía de excitación por el PS II. Sin embargo, aunque se

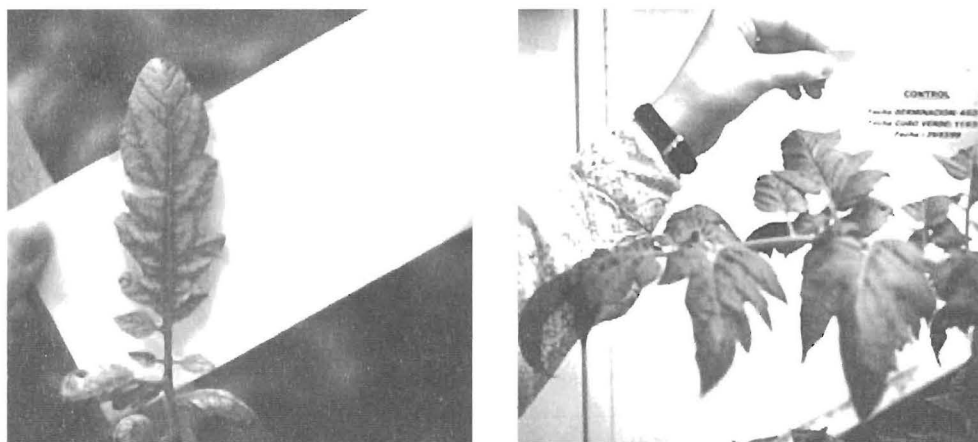


Figura 3. Efectos de la deficiencia de calcio en hojas jóvenes de tomate cultivadas en solución hidropónica con $125 \mu\text{M}$ de Ca^{+2} (fotografía izquierda). La imagen de la derecha corresponde al mismo tipo de hojas en plantas control.

Figure 3. Effects of calcium deficiency in young leaves from tomato plants cultured in hydroponics $125 \mu\text{M}$ Ca^{+2} (left plate). The image on the right corresponds to the same kind of leaves from control plants.

Cuadro 2. Concentración de calcio en hoja adulta ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ materia seca) y valor del parámetro de fluorescencia F_v/F_m , en función de la concentración de Ca^{2+} en el medio de cultivo

Table 2. Concentration of calcium in adult leaf ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ dry matter) and value of F_v/F_m fluorescence parameter, as a function of Ca^{2+} concentration in the growth medium

	Tratamiento		
	2,5 mM	125 μM	62.5 μM
Ca	$3,63 \pm 0,18$	$0,67 \pm 0,14$	$0,38 \pm 0,16$
F_v/F_m	$0,82 \pm 0,04$	$0,74 \pm 0,04$	$0,72 \pm 0,04$

Los datos son la media de 10 determinaciones $\pm$ error estándar.

The data are the average of 10 replicates $\pm$ standard error.

considere el caso más extremo (tratamiento 3), la disminución de la eficiencia potencial del PS II no es concomitante, ni con la de calcio foliar, que es solo un 9% del encontrado en los controles, ni con la de clorofilas (cuadro 1).

En resumen, podría afirmarse que ante la carencia de calcio, la planta interrumpe los procesos asociados al crecimiento (SANZ *et al.*, 2000) y trata de mantener funcionales las estructuras existentes (hojas viejas y adultas), de ahí que no se observen síntomas visuales en hojas adultas, ya que no hay disminución de pigmentos (cuadro 1) ni, apenas, de funcionalidad (cuadro 2).

Estos datos sugieren que al restringirse el crecimiento de las plantas, ya no es necesaria la producción de los fotoasimilados que se dirigen, en condiciones normales, a los sumideros de actividad fotosintética, es decir, a los órganos en crecimiento. Como hipótesis podría apuntarse que, ante la carencia de calcio, la planta interrumpe los procesos asociados al crecimiento tratando de mantener vivas el resto de las estructuras existentes, y que debido a la escasa movilidad de este elemento no desarrollan síntomas de deficiencia.

Conclusiones

1. La falta de síntesis de zeaxantina en hojas completamente desarrolladas de plantas sometidas a deficiencia de calcio indica que este estrés no incide directamente en la potencialidad máxima de su PS II. Sin embargo, la ausencia total de hojas en desarrollo, en el tratamiento que induce más deficiencia de calcio y la carencia de pigmentos del ciclo de las xantofilas en las hojas jóvenes sometidas a una deficiencia intermedia de calcio, es un exponente más de la inhibición del crecimiento debido a la deficiencia de este elemento. Esto podría deberse a la incapacidad de disipar la energía luminosa por parte de las hojas en formación.

2. Al representar la concentración de clorofilas y carotenoides totales frente a la concentración foliar de calcio, se observa que el patrón de comportamiento de estos pigmentos es distinto para las plantas cultivadas en suficiencia de calcio que para las deficientes. Esto hace suponer que la expresión de la deficiencia de calcio no es sólo una función dependiente de la concentra-

ción de calcio foliar, sino que la planta posee mecanismos de adaptación a este tipo de estrés que inducen una capacidad de síntesis de pigmentos mayor que la encontrada en plantas control.

3. La deficiencia de calcio no induce alteraciones significativas en la estequiometría pigmentaria de estructuras de antena y centros de reacción del aparato fotosintético en las hojas desarrolladas de plantas deficientes en calcio.

4. El ligero descenso en la eficiencia del PS II (F_v/F_m) de las plantas de tomate deficientes en calcio, se agudiza conforme disminuye la concentración de calcio en el medio de cultivo.

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado al amparo de los Proyectos de Investigación: CONSI+DGA (P-88/96) y AGF97-1219.

Bibliografía

- ATKINSON C.J., MANSFIELD T.A., KEAN A.M., DAVIES W.J., 1989, Control of stomatal aperture by calcium in isolated epidermal tissue and whole leaves of *Commelina communis* L., *New Phytol.*, 111: 9-17.
- BUSH D.S., 1995, Calcium regulation in plant cells and its role in signalling, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46: 95-122.
- COLEMAN W.J., GOVINDJEE, 1987, A model for the mechanism of chloride activation of oxygen evolution in Photosystem II, *Photosynth. Res.*, 13: 199-223.
- DEMMIG-ADAMS B., ADAMS W.W. III, 1992, Carotenoid composition in sun and shade leaves of plants with different life forms, *Plant Cell Environ.*, 15(4): 411-419.
- FUNKHOUSER E.A., CAIRNEY J., CHANG S., DILIP M.A., DIAS L., NEWTON R.J., ARTLIP T.S., 1993, Cellular and molecular responses to water deficit stress in woody plants, pp. 347-362, en: *Handbook of Plant and Crop Stress*, M. Pessarakli (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York.
- GHANOTAKIS D.F., YOCUM C.F., 1990, Photosystem II and the oxygen-evolving complex, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41: 255-276.
- GILMORE, A.M., 1997, Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves, *Physiologia Plantarum*, 99(1): 197-209.
- GILROY S., BETHKE P.C., JONES R.L., 1993, Calcium homeostasis in plants, *J. Cell Sci.*, 106: 453-462.
- HANKAMER B., BARBER J., BOEKEMA E.J., 1997, Structure and membrane organization of photosystem II in green plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48: 641-671.
- JAUNIN F., HOFER R.M., 1988, Calcium and rhizodermal differentiation in primary maize roots, *J. Exp. Bot.*, 39: 587-593.
- KATOH S., HAN K.C., 1993, Different localization of two Ca^{2+} in spinach oxygen-evolving photosystem II membranes, Evidence for involvement of only one Ca^{2+} in oxygen evolution, *Plant Cell Physiol.*, 34: 585-593.
- KRAUSE G.H., WEIS E., 1991, Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42: 313-349.
- KRIEGER A., WEIS E., 1993, The role of calcium in the pH-dependent control of photosystem II, *Photosynth. Res.*, 37: 117-130.
- MONGE E., VAL J., HERAS L., 1985, Estequiometría de pigmentos fotosintéticos en plantas superiores en relación con la deficiencia de hierro, *An. Aula Dei*, 17 (3-4): 239-251.
- NEENA K., CHATTERJEE C., SHARMA C.P., KHURANA N., 1999, Impact of manganese stress on physiology and quality of pea (*Pisum sativum*), *Indian J Agric. Sci.*, 69 (5): 332-335.
- PÉREZ C., VAL J., MONGE E., 1995, Effects of iron deficiency on photosynthetic structures in peach (*Prunus persica* [L.] Batsch) leaves, pp. 183-189, en: *Iron Nutrition in Soils and Plants*, J. Abadía (Ed.), Kluwer Acad. Publ. Dordrecht.

- PHILBRICK J.B., DINER B.A., ZILINSKAS B.A., 1991, Construction and characterization of cyanobacterial mutants lacking the manganese-stabilizing protein of Photosystem II, *J. Biol. Chem.*, 266: 13370-13376.
- PINTA M., COMITÉ INTER-INSTITUTOS (CII), 1973, Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux, Détermination des éléments Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, et Cu par absorption atomique, *Oléagineux*, 28: 87-93.
- POOVAIAH B.W., 1993, Biochemical and molecular aspects of calcium action, *Acta Horticulturae*, 326: 139-147.
- RAMALHO J.C., REBELO M.C., SANTOS M.E., ANTUNES M.L., NUNES M.A., 1995, Effects of calcium deficiency on *Coffea arabica*, Nutrient changes and correlation of calcium levels with some photosynthetic parameters, *Plant Soil*, 172: 87-96.
- ROBERTS D.M., HARMON A.C., 1992, Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43: 375-414.
- SANZ M.A., BLANCO A., VAL J., 2000, Inhibición del crecimiento de plantas de tomate por la deficiencia inducida de calcio, *ITEA*, 96: 207-217.
- SHETTY, A.S., MILLER G.W., 1966, Influence of iron chlorosis on pigment and protein metabolism in leaves of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol.*, 41, 415-421.
- SPILLER, S., TERRY, N., 1980, Limiting factors in photosynthesis. II. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units, *Plant Physiol.*, 65, 121-125.
- TANAKA A., TANAKA Y., TSUJI H., 1992, Calcium-induced accumulation of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex, pp. 299-302, en: *Research in Photosynthesis*, Vol. I, N. Murata (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- TERRY N., 1980, Limiting factors in photosynthesis. I. Use of iron stress to control photochemical capacity in vivo, *Plant Physiol.*, 65, 114-120.
- THOMPSON L.K., 1987, Irradiation stress, pp. 103-116, en: *The Physiology of Plants under Stress*, M.G. Hale & D. M. Orcutt (Eds.), Wiley-Interscience, New York.
- VAL J., ABADÍA J., HERAS L., MONGE E., 1986, Higher plant photosynthetic pigment analysis. Determination of carotenoids and chlorophylls, *J. Micronutr. Anal.*, 2: 305-312.
- VAL J., PÉREZ C., MADERO P., PEQUERUL A., MONGE E., 1993, Are manganese and iron deficiencies so similar? Fluorescence, a way of study, pp. 491-496, en: *Optimization of Plant Nutrition*, M.A. Fragoso & M. van Beusichem (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- VAL J., MONGE E., BAKER N.R., 1994, An improved method for rapid analysis of the xanthophyll cycle pigments, *J. Chrom. Sci.*, 32: 286-289.
- VAL J., SANZ M., MONTAÑÉS L., MONGE, E., 1995, Application of chlorophyll fluorescence to study iron and manganese deficiencies in peach tree, *Acta Horticulturae*, 383: 201-209.
- VAL J., MONGE E., MONTAÑÉS L., SANZ M., 1997, Manganese deficiency in peach trees: prognosis and fruit quality, *Acta Horticulturae*, 448: 345-350.
- WALES R., NEWMAN B.J., PAPPIN D., GRAY J.C., 1989, The extrinsic 33 kDa protein of the oxygen-evolving complex of Photosystem II is a putative calcium binding protein and is encoded by a multi-gene family in pea, *Plant Mol. Biol.*, 12: 439-451.
- Webber A.N., Gray J.C., 1989, Detection of calcium binding by Photosystem II polypeptides immobilized onto nitrocellulose membranes, *Febs Lett.*, 249: 79-82.

(Aceptado para publicación el 3 de enero de 2001)