



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

**EFFECTO DE LAS ALTAS TEMPERATURAS EN
LAS RESPUESTAS VEGETALES SOMETIDAS A
SITUACIONES DE ESTRÉS AMBIENTAL**

Marta Orero Bayo

TRABAJO FIN DE GRADO BIOTECNOLOGIA

Tutor académico: Javier Ugarte Chicote

Tarragona, 10 de julio de 2020

Yo, Marta Orero Bayo, con DNI 20916935-E, soy conoedora de la guía de prevención de plagio de la URV Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada en julio 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 10 de julio del 2020

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Marta Orero Bayo', written over a horizontal line.

Índice

Resumen	1
Abreviaciones.....	2
1. Introducción	3
1.1. Efectos del cambio climático	3
1.2. Combinación de estreses.....	4
1.3. Respuestas vegetales.....	5
1.3.1. Respuestas moleculares	5
1.3.2. Parámetros fisiológicos	8
2. Objetivo del estudio	11
3. Metodología.....	12
4. Resultados.....	14
4.1. Respuestas fisiológicas.....	14
4.1.1. Estrés térmico y lumínico	14
4.1.2. Estrés térmico e hídrico.....	22
4.2. Respuestas moleculares	28
5. Discusión.....	38
6. Conclusiones	42
7. Bibliografía.....	43
8. Autoevaluación	45

Resumen

El cambio climático es una de las grandes amenazas para la producción agrícola, al intensificar y aumentar la frecuencia de estrés abióticos como las altas temperaturas, sequía o alta radiación lumínica que afectan negativamente al crecimiento y desarrollo de los cultivos. Estos factores ocurren de manera simultánea en la naturaleza provocando que las plantas respondan con cambios fisiológicos o moleculares que les permitan su adaptación a las condiciones de estrés ambiental. Las respuestas de aclimatación son específicas a la combinación de estreses y no se pueden extrapolar de las respuestas que realizan las plantas frente estreses individuales. Por lo que comprender las respuestas vegetales a la combinación de estreses se ha convertido en una de las principales necesidades para poder desarrollar cultivos tolerantes a las nuevas condiciones climáticas.

En este trabajo se han analizado diversos estudios donde se han estudiado las respuestas fisiológicas y moleculares de *Arabidopsis thaliana* y *Solanum lycopersicum* en condiciones de estrés térmico y lumínico, y estrés térmico e hídrico aplicados individual y conjuntamente para poder comprender el efecto que tienen las altas temperaturas en combinación con otros estreses abióticos.

Tras analizar trabajos recientes sobre el estudio de respuestas vegetales, se ha visto que el principal efecto que tienen las altas temperaturas es la generación de la fotoinhibición del fotosistema II viéndose incrementado los daños en combinación de estreses, junto con la menor actividad enzimática antioxidante en proporción a la mayor producción de especies reactivas de oxígeno. Además, la combinación de estreses produce un aumento en los daños que sufren las plantas y en función del tipo de estrés con el que se combine el estrés térmico las respuestas vegetales varían, pese a tener en común las altas temperaturas.

Palabra clave: estrés térmico; estrés lumínico; estrés hídrico; combinación de estreses; respuestas vegetales; actividad fotosintética.

Abreviaciones

ABA	Ácido abscísico	HT+HL	Combinación de estrés térmico y lumínico
ACO ₂	Concentración CO ₂ ambiental	HSF	Factor de transcripción de choque térmico
Aos	<i>Arabidopsis thaliana</i> deficiente en síntesis de ácido jasmónico.	HSP	Proteínas de choque térmico
APX	Ascorbato peroxidasa	JA	Ácido jasmónico o jasmonato
AsA	Ascorbato, ácido ascórbico	MDA	Malondialdehído
C _i	Concentración intracelular de CO ₂	MDHAR	Monodehidroascorbato reductasa
CAT	Catalasa	NPQ	Coefficiente de enfriamiento no fotoquímico
CT	Control	P _N	Fotosíntesis neta
CV1	Cultivo de tomate "Sufren NO.14"	PSI	Fotosistema I
CV2	Cultivo de tomate "Jinlingmeiyu"	PSII	Fotosistema II
DHAR	Monodehidroascorbato reductasa	Q _A	Quinona A
E	Tasa de transpiración	qP o qL	Enfriamiento fotoquímico
ECO ₂	Elevada concentración de CO ₂	ROS	Especies reactivas de oxígeno
FT	Factor de transcripción	RuBisCO	ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa
Fv/Fm	Eficiencia cuántica máxima de los procesos fotoquímicos del PSII	RWC	Contenido relativo de agua
GPX	Glutación peroxidasa	SA	Ácido salicílico
GR	Glutación reductasa	Sid2-1	<i>Arabidopsis thaliana</i> deficiente en ICS1
g _s	Conductancia estomática	SOD	Superóxido dismutasa
GSH	Glutación	φPSII	Rendimiento cuántico de la fluorescencia (F _q /F _m)
HL	Estrés lumínico		
HT o HS	Estrés térmico		

1. Introducción

Las plantas al ser organismos sésiles se ven sometidas a condiciones ambientales y factores externos que pueden alterar su crecimiento y desarrollo negativamente, produciendo daños e incluso la muerte. Esto ha llevado a las plantas al desarrollo de diversas estrategias de adaptación a las condiciones de estrés cambiantes a las que se ven sometidas, mediante cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares. (Guo et al. 2016)

Las condiciones medioambientales desfavorables se pueden clasificar en estrés biótico si es originado por la acción de otros seres vivos que rodean a la planta; como infecciones por patógenos o ataques de herbívoros, o en estrés abiótico, si es originado por cambios en el medio externo de la planta; como sequía, calor, carencia de nutrientes, salinidad o metales tóxicos en el medio (Gull, Ahmad Lone, and Ul Islam Wani 2019).

1.1. Efectos del cambio climático

El cambio climático ha causado un incremento de la temperatura media del planeta, cuya consecuencia son temperaturas más cálidas que producen cambios en los patrones de lluvias, aumento de sequias y contaminación de los suelos de cultivo, potenciando el daño en los cultivos (Nadeem et al. 2018). Durante el último siglo se estima que la temperatura ha aumentado aproximadamente 1,5°C en la mayoría de las áreas de cultivo, y se espera que siga incrementando en los próximos años haciendo que la producción agrícola y la seguridad alimentaria global se vean directamente afectadas por el calentamiento global (“IPCC — Intergovernmental Panel on Climate Change” n.dc).

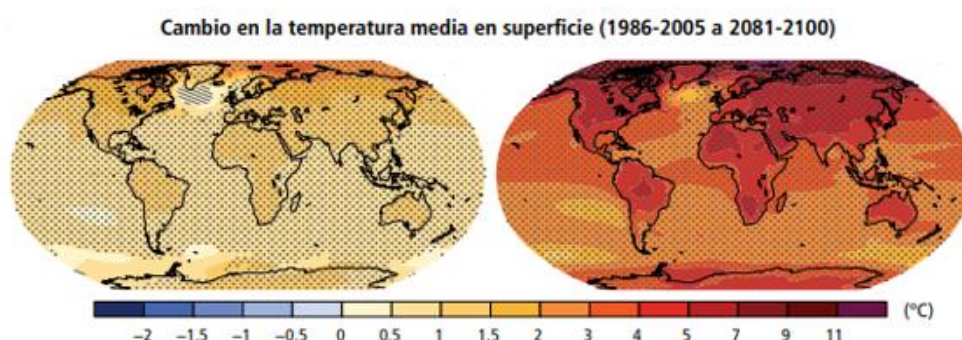


Figura 1. Predicción de cambios en la temperatura media en la superficie para el 2100. La escala de colores indica el aumento o disminución de los grados Celsius. (“IPCC — Intergovernmental Panel on Climate Change” n.dc).

La intensificación y aumento en la frecuencia de las situaciones de sequía, toxicidad de los suelos, y elevadas temperaturas han hecho que el estrés abiótico sea considerado como la principal causa de pérdida de los cultivos en el mundo, se estima que reduce la producción en un 50% (Guo et al. 2016, Zhu. 2016). Se ha de tener en cuenta que la gravedad de la pérdida de

las cosechas depende de la intensidad, duración y etapa de desarrollo de la planta (Singh, Dhanapal, and Yadav 2020).

1.2. Combinación de estreses

Pese a la existencia de una gran variedad de estudios basados en como un único estrés abiótico afecta a las plantas, en la naturaleza o zonas de cultivo, generalmente las plantas no se encuentran únicamente bajo un sola condición de estrés sino suelen ser varios factores los que producen estrés a las plantas, lo que se conoce como estrés combinado (Rizhsky et al. 2004).

A lo largo de los años se ha obtenido gran información sobre como responden las plantas cuando se encuentran en presencia de estrese abióticos aplicados de manera individual, pero los resultados que se han ido obteniendo no se pueden usar para comprender los efectos que tienen en las plantas la combinación de dos o más estreses (Zandalinas et al. 2018). La finalidad de estudiar la combinación de estreses es conseguir reproducir al máximo las condiciones a las que serán sometidas las plantas en un cultivo en el campo, de otra manera no se podría obtener una visión aproximada de cómo realmente las plantas se comportan bajo un conjunto de estreses y así poder obtener cultivos mejor adaptados a las situaciones de estrés ambiental (Mittler 2006).

Estudios como los de Zandalinas et al. 2016, Mittler 2006 y Rizhsky et al. 2004 donde se estudia la combinación de sequía y calor, evidencian que la combinación de estreses tiene efectos específicos y diferentes en las plantas a los que se obtienen cuando son aplicados de manera individual. Por lo que sugieren la importancia de desarrollar estudios basados en la combinación de estreses, debido al poco conocimiento que se tiene de cómo los mecanismos moleculares de respuesta a la combinación de dos estreses diferentes actúan para la aclimatación de la planta.

Entre los estreses abióticos de mayor repercusión en las plantas se debe destacar las elevadas temperaturas, cada vez más comunes debido al cambio climático (Guan et al. 2019). Junto a las elevadas temperaturas es habitual tener condiciones de sequía o elevada intensidad lumínica, tendiendo a manifestarse de manera conjunta en las áreas de cultivo, especialmente en los periodos de verano (Sun et al. 2018, Duan et al. 2017). Realizar estudios para conocer las respuesta vegetales y mecanismos de resistencia que presentan las plantas ante la combinación de estrés térmico con elevada intensidad lumínica o déficit hídrico ayudaran a revelar las estrategias de adaptación de las plantas a las condiciones de medioambiente cambiantes (Sun et al. 2018, Duan et al. 2017).

1.3. Respuestas vegetales

Las condiciones cambiantes del medio ambiente que afectan negativamente al crecimiento de las plantas y su producción generan una amplia gama de respuestas en las plantas. Entre las respuestas principales además de las respuestas morfológicas y bioquímicas de las plantas a los estreses, estas también dan una respuesta fisiológica y producen cambios moleculares (Baillio et al. 2019, Zandalinas et al. 2018).

1.3.1. Respuestas moleculares

Las células vegetales perciben los estímulos de estrés a través de varios sensores que a su vez activan la señalización de diversas vías que implican mensajeros secundarios, fitohormonas, transductores de señales y reguladores de la transcripción. Por tanto, múltiples señales convergen en la regulación de genes inducibles que codifican para proteínas y enzimas, que contribuyen a la generación de una respuesta de aclimatación para un determinado estímulo (Choudhury et al. 2017).

Estrés oxidativo

La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es un fenómeno habitual en las plantas, tanto en condiciones normales como estresadas. Sin embargo, en condiciones desfavorables de estrés se produce una acumulación excesiva de ROS excediendo la capacidad del sistema antioxidante produciendo el daño oxidativo (Hasanuzzaman et al. 2019).

En condiciones normales las especies reactivas de oxígeno reaccionan con una gran variedad de moléculas biológicas en las células vegetales actuando como moléculas de transducción de señales e incluso una pequeña cantidad de ROS actúan como señal para inducir respuestas hacia el proceso de adaptación (Choudhury et al. 2017). Cuando se produce su acumulación y se rompe el equilibrio entre su generación y eliminación pueden provocar graves daños como inactivación de enzimas fotosintéticas, peroxidación de la membrana, oxidación de ácidos grasos y proteínas, alteración de la conductancia estomática y del aparato fotosintético (Hasanuzzaman et al. 2017).

El sistema de defensa antioxidante de las plantas encargado de eliminar el exceso de ROS está compuesto por elementos no enzimáticos y enzimáticos. Los componentes no enzimáticos incluyen tampones redox celulares como el ascorbato (AsA) y glutatión (GSH), además de carotenoides, flavonoides, alcaloides y tocofenoles. Los componentes enzimáticos del sistema de defensa antioxidante consisten en una serie de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y las enzimas del ciclo de ascorbato-

glutación (AsA-GSH), ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutación reductasa (GR) (Hasanuzzaman et al. 2019).

La SOD es considerada la primera línea de defensa antioxidante al realizar la conversión del anión superóxido (O_2^-) en O_2 y H_2O_2 . El H_2O_2 sigue siendo un compuesto tóxico para la planta, por ello la CAT junto con el ciclo Asa-GSH llevan a cabo la eliminación del exceso de H_2O_2 . El ciclo Asa-GSH está compuesto por cuatro elementos enzimáticos APX, MDHAR, DHAR y GR y dos elementos antioxidantes, AsA y GSH. APX mediante la peroxidación de AsA y generando el radical monodehidroascorbato (MDHA) reduce el H_2O_2 a H_2O , realizando así el proceso de desintoxicación. Posteriormente MDHA se reduce directamente a AsA por MDHAR o genera dehidroascorbato (DHA). El DHA generado es usado por DHAR para reducir DHA a AsA usando como reductor a GSH, por lo que DHAR ayuda a la regeneración de AsA y juega un papel importante en su mantenimiento. La regeneración de GSH también es importante para el proceso de desintoxicación, por eso se regenera a partir de los dímeros de glutación oxidación (GSSG) a través de la GR dependiente de NADPH (Fig. 2) (Pandey et al. 2015).

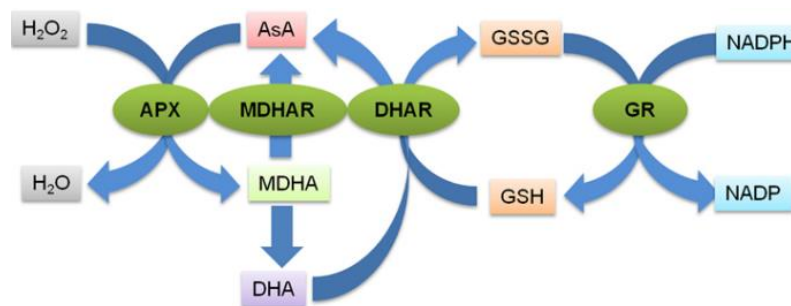


Figura 2. Ciclo del ascorbato-glutación (Pandey et al. 2015).

Factores de transcripción

Las plantas responden a las tensiones abióticas mediante cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales requieren la expresión de genes sensibles al estrés. Estos genes están regulados por una serie de factores de transcripción (FT) (Guo et al. 2016). Los FT son reguladores esenciales de la expresión génica, y se encargan de modular aspectos esenciales de la plantas, entre las que se incluyen la respuesta a factores medioambientales, diferenciación celular, desarrollo de órganos y hormonas. Realizan un importante papel en la adaptación de las plantas al tener la capacidad de interactuar con secuencias de DNA específicas y con diversas proteínas en complejos transcripcionales que regulan la expresión de varios genes (Baillo et al. 2019).

Entre los FT destacan los factores de transcripción de choque térmico (HSF), que desempeñan un papel crucial en la respuesta de las plantas ante varios estreses abióticos al regular la expresión de genes sensibles al estrés, como las proteínas de choque térmico (HSP).

Muchos estudios han informado sobre los roles centrales de los HSF en diversos estreses abióticos, sin embargo, la mayoría de los estudios se realizan bajo un único estrés por lo que su función en estreses combinados todavía no es muy conocida (Guo et al. 2016).

Las HSP comparten una estructura modular bien conservada que consiste en un dominio de unión al DNA N-terminal caracterizado por un motivo central de hélice-giro-hélice. El dominio se une específicamente a los promotores de elementos de estrés por calor para la posterior activación de genes inducibles por estrés (Guo et al. 2016) . Según el peso molecular y la homología de su secuencia, las HSP de la planta se pueden dividir en cinco familias diferentes: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y HSP20 (Huang et al. 2019).

Las HSP actúan como chaperonas moleculares en las plantas para prevenir la agregación de proteínas y volver a solubilizar las proteínas desnaturalizadas, manteniendo la homeostasis del plegamiento de proteínas (Guo et al. 2016). La desnaturalización de las proteínas es una consecuencia directa o indirecta de cualquier estrés, por lo que cualquier factor de estrés que afecte al plegamiento de las proteínas induce la activación de las HSP, que actúan como amortiguadores contra el estrés ambiental. Inicialmente se creía que únicamente estaban involucradas en la respuesta de las plantas contra el estrés térmico; sin embargo, se ha descubierto que están implicadas en respuesta frente una gran variedad de estreses, como el frío, la sequía, salinidad, luz intensa y radiación UV (Jacob, Hirt, and Bendahmane 2017).

Fitohormonas

Además de ROS y los FT, las respuestas de las plantas al estrés abiótico son mediadas por fitohormonas. Son compuestos derivados de las vías biosintéticas de la planta que pueden actuar en el lugar de síntesis o en otra región de la planta, y se encargan de coordinar complejas cascadas de señalización para la adaptación (Peleg and Blumwald 2011, Zandalinas et al. 2018).

El ácido abscísico (ABA) es considerada la hormona principal en la respuesta de las plantas a un estrés abiótico y tiene un papel importante en el proceso de aclimatación de las plantas ante diferentes estreses, incluyendo elevadas temperaturas (Zandalinas et al. 2016). La síntesis de ABA es una de las respuestas más rápidas de las plantas ante un estrés abiótico. Se ha visto involucrada en el cierre estomático reduciendo la pérdida de agua por transpiración y restringiendo el crecimiento celular (Peleg and Blumwald 2011). Estudios recientes sugieren que ABA podría estar involucrado en respuestas de adaptación de la planta ante sequía y calor, tanto de manera individual como combinada (Suzuki 2016).

Sin embargo, ABA no es la única fitohormona implicada en la aclimatación contra condiciones adversas. El ácido salicílico (SA) se ha visto que en respuesta a elevadas temperaturas tiene la capacidad de proteger el fotosistema II de la fotoinhibición consecuente al estrés térmico (Wang et al. 2014). Por otro lado, pese a que el ácido jasmónico (JA) ha sido tradicionalmente asociado en las respuesta de defensa contra estreses bióticos, se ha visto que cuando está en sus formas conjugadas, está implicado en la respuesta contra estrés osmótico, calor, frío, sequía, intensidad lumínica y metales pesados (Balfagón et al. 2019).

1.3.2. Parámetros fisiológicos

La fotosíntesis es considerada uno de los motores de la productividad de la planta, por lo que es necesario comprender como las situaciones de estrés ambiental afectan a la capacidad fotosintética. El fotosistema II (PSII) es la parte más vulnerable del aparato fotosintético, y a menudo el daño en el PSII es la primera manifestación de estrés. La fotosíntesis es el proceso por el cual la planta convierte el dióxido de carbono (CO_2) en azúcares necesarios para el metabolismo vegetal. La energía necesaria para completar este proceso proviene de la luz, la cual es absorbida por los pigmentos fotosintéticos (clorofilas primarias y carotenoides) y puede ser dividida en tres procesos generales:

- i) Transporte de electrones y las reacciones de fotofosforilación. Las reacciones de transporte de electrones tiene lugar en las membranas de los tilacoides del cloroplasto, y las principales reacciones son debidas a la presencia de complejos de proteínas y pigmentos llamados centros de reacción, que actúan como antenas de absorción de la energía procedente de la luz. En plantas superiores los centros de reacción son el PSII y el fotosistema I (PSI).
- ii) Reacciones de fijación de CO_2 en el ciclo de Calvin. Proceso por el cual el CO_2 , absorbido de la atmósfera por los estomas, es convertido en azúcares.
- iii) Control de la concentración de CO_2 intercelular mediante la mayor o menor apertura de los estomas. El cierre y la apertura de los estomas regula la cantidad de CO_2 disponible, limitando la fotosíntesis en caso de condiciones de estrés ambiental. Los estomas además de controlar el suministro de CO_2 , controlan la pérdida de agua durante la transpiración.

Existen dos sistemas principales que permiten la medición de la capacidad fotosintética de las hojas y que han sido principalmente aplicadas en el estudio de los efectos de estreses abióticos sobre las plantas: sistemas de intercambio gaseoso, miden los flujos de CO_2 y H_2O , y fluorómetros, que estiman la fotosíntesis a través de mediciones de la fluorescencia de la clorofila (Maxwell and Johnson 2000).

Intercambio de gases

Los estomas son estructuras epidérmicas esenciales para la supervivencia de las plantas. Se encuentran principalmente en la superficie de las hojas y consisten en un poro u ostiolo rodeado por dos células parenquimáticas especializadas, conocidas como células oclusivas o guarda, encargadas de regular la apertura mediante la integración de diferentes señales, tanto ambientales como intracelulares (Fig. 3). La importancia de los estomas radica en sus dos funciones principales, que consisten en regular el intercambio de gases permitiendo la entrada de CO_2 atmosférico y la pérdida de agua a través de la transpiración. La habilidad de las plantas para regular la apertura estomática les permite responder de forma rápida ante los cambios medioambientales. Entre los principales factores que afectan a la apertura y cierre estomático destacan, el estrés hídrico que provoca el cierre de los estomas para evitar la pérdida excesiva de agua y las elevadas temperaturas que provocan la apertura de los estomas para tener una mayor transpiración y favorecer el enfriamiento de las hojas (Daszkowska-Golec and Szarejko 2013).

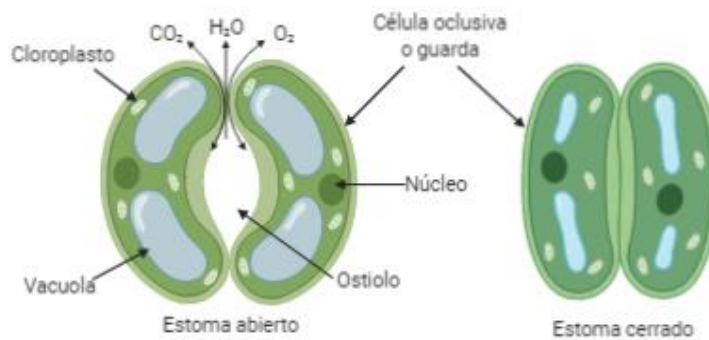


Figura 3. Diagrama de la estructura estomática.

La variación en la apertura y cierre de los estomas ocasiona cambios en el intercambio de gases que pueden tener graves consecuencias en la fotosíntesis, por lo que es importante estudiar cómo se ven afectados los parámetros de intercambio de gases. Las medidas más directas y rápidas que un sistema de intercambio gaseoso puede realizar son la fotosíntesis neta (P_N) y la tasa de transpiración (E). De estas mediciones se pueden derivar otros parámetros que permiten calcular la conductancia estomática de la hoja (g_s) y la concentración intracelular de CO_2 (C_i), entre otros.

La conductancia estomática, es la medida de la velocidad de paso del CO_2 que entra en las plantas o el vapor de agua que sale a través de los estomas de la hoja. Los cambios en sus valores se deben principalmente a cambios en la turgencia de las células guarda de los estomas, cuyos cambios puede ser inducidos por factores ambientales como la luz, CO_2 , humedad o temperatura, y por factores internos como el nivel de ciertos reguladores como el ABA y las citoquininas.

Tanto g_s como C_i son dos medidas muy relacionadas entre ellas, ya que una reducción en la C_i indica que una de las principales causas de la disminución de P_N , es la reducción de la conductancia estomática. Por el contrario, si se aprecia aumento en el C_i sugiere que una disminución de la actividad fotosintética se debe a otros factores no relacionados con el estoma (Reynolds et al., n.d.).

Fluorescencia de la clorofila

El principio subyacente en el análisis de fluorescencia de clorofila se basa que en una hoja la energía absorbida procedente de la luz puede tener tres destinos posibles: ser utilizada para llevar a cabo las reacciones fotoquímicas del PSII, pérdida en forma de calor en los complejos del PSII o bien en procesos de fluorescencia (Fig. 4). A esto último es lo que se conoce como la fluorescencia de la clorofila. Estos tres procesos ocurren en competencia, de modo que cualquier aumento en la eficiencia de uno resultaría en una disminución en el rendimiento de los otros dos. Por lo tanto, al medir el rendimiento de la fluorescencia de clorofila, se puede obtener información sobre los cambios en la eficiencia de la fotoquímica y la disipación de calor (Maxwell and Johnson 2000).



Figura 4. Esquema de la distribución de la energía luminosa absorbida por el PSII. Imagen adaptada de Baker 2008.

Una vez que PSII absorbe luz y la quinona A (Q_A) ha aceptado un electrón, no puede aceptar otro hasta que haya pasado el primero a un portador de electrones posterior. Durante este período, se dice que el centro de reacción está "cerrado". En cualquier momento, la presencia de una proporción de centros de reacción cerrados conduce a una reducción general en la eficiencia fotoquímica y, por lo tanto, a un aumento correspondiente en el rendimiento de fluorescencia.

Después del cierre del centro de reacción, la fluorescencia disminuye debido al aumento en la velocidad a la que los electrones se transportan lejos de PSII, lo que se denomina enfriamiento fotoquímico y al aumento en la eficiencia con la cual la energía se convierte en calor, a este proceso se le denomina enfriamiento no fotoquímico (Maxwell and Johnson 2000).

Existen varios parámetros de la fluorescencia, pero los más comúnmente utilizados en estudios de fisiología vegetal son:

- Rendimiento cuántico de la fluorescencia (Φ_{PSII} o F_q/F_m'), mide la proporción de luz que es absorbida por la clorofila asociada al PSII y que se utiliza en los procesos fotoquímicos. Con este parámetro se puede estimar la tasa de transporte de los electrones y proporcionar una indicación fotosintética general.
- Enfriamiento fotoquímico (qP o qL), indica la proporción de centros de reacción del PSII abiertos.
- Eficiencia cuántica máxima de los procesos fotoquímicos del PSII (F_v/F_m), corresponde a la eficiencia máxima a la cual la luz absorbida por el PSII se usa para la reducción de la Q_A . Tiene un valor óptimo de 0.83 independientemente de la especie vegetal, si se obtiene un valor inferior puede indicar que una proporción de centro de reacción del PSII están dañados, lo que se conoce como fotoinhibición.
- Coeficiente de enfriamiento no fotoquímico (NPQ), está linealmente relacionado con la disipación de calor. Monitorea la tasa aparentemente constante para la pérdida de calor del PSII (Reynolds et al., n.d.).

2. Objetivo del estudio

El cambio climático acentúa las condiciones climáticas extremas que provocan pérdidas de los cultivos, especialmente el aumento de las temperaturas que tiende a ir acompañado por situaciones de sequía o exceso de radiación lumínica. Las plantas responden a estas situaciones de estrés ambiental mediante cambios moleculares y fisiológicos para minimizar los daños. Por lo que es necesario tener una mejor comprensión de las respuestas que llevan a cabo las plantas en situaciones de estrés ambiental, para poder conseguir cultivos tolerantes a las nuevas condiciones.

En este trabajo se analizarán los últimos avances en el conocimiento de las respuestas fisiológica y moleculares de las plantas sometidas a condiciones, por un lado, de estrés térmico y lumínico y, por otro lado, de estrés térmico e hídrico. Con el objetivo de estudiar el efecto que tienen las altas temperaturas en combinación con otros estreses, analizar el efecto de la combinación de estreses y evaluar estrategias que podrían favorecer a una mayor tolerancia.

Para ello, las plantas que se usarán como objeto de estudio serán *Arabidopsis thaliana* al ser un organismo modelo y plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), que además de ser uno de los cultivos más valioso a nivel mundial, es usado como modelo de cultivo para las investigaciones vegetales, siendo interesante conocer como *S. lycopersicum* responde ante situaciones de estrés ambiental (Duan et al. 2017).

3. Metodología

Las búsquedas bibliográficas se realizaron durante los meses de abril y mayo del 2020 en la base de datos *Pubmed*. La finalidad de las búsqueda era encontrar estudios actuales donde se hubieran estudiado las respuestas fisiológicas y moleculares de las plantas al ser sometidas a condiciones de estrés ambiental. En particular se buscaron estudios que usaran *A. thaliana* o *S. lycopersicum* en condiciones, por un lado, de estrés lumínico y térmico y, por otro lado, en condiciones de estrés hídrico y térmico, para ello se hicieron dos búsquedas independientes. Los términos empleados fueron: “Heat stress” “High temperaturas”, “High light”, “drought”, “responses” “Arabidopsis” y “tomato”.

Las búsqueda completas fueron: [(heat stress OR temperature [Title]) AND (high light [Title]) AND responses AND (arabidopsis OR tomato)], a la cual nos referiremos como primera búsqueda y [(heat [title] stress or temperature [title]) and (drought [title]) and (responses) AND (Arabidopsis OR tomato)], a la cual nos referiremos como segunda búsqueda. Ambas limitando los resultados a los últimos 5 años

Para la selección de los estudios se aplicaron los siguientes criterios: en las condiciones de estudio tenían que estar implicadas elevadas temperaturas, las respuestas vegetales debían estudiarse en combinación de estreses, ya fueran lumínico y térmico o hídrico y térmico, no tenía que haber presencia de estreses bióticos, y que se estudiaran la respuestas vegetales en *A. thaliana* o en *S.lycopersicum*. Por tanto, todos aquellos artículos que no cumplieran con los criterios de selección fueron excluidos.

La figura 5 muestra los resultados de las búsquedas bibliográficas y selección de los estudios. Se obtuvieron 35 artículos como posibles candidatos, de los cuales 11 fueron de la primera búsqueda y 24 de la segunda. Tras aplicar los criterios de selección se descartaron un total de 21 artículos, quedando 14 como relevantes para el trabajo de revisión. Después de evaluar los 14 estudios se excluyeron 5 más debido a que los resultados que se obtienen en sus estudios no mostraban datos suficientes para comprender el efecto de las altas temperaturas en las respuestas vegetales. En total en este trabajo se estudian 9 artículos (Balfagón et al. 2019, Gerganova et al. 2016, Zhou et al. 2020, Zhou et al. 2019, Zhou et al. 2017, Abo Gamar et al. 2019, Kumazaki and Suzuki 2019, Raja et al. 2020 y Huang et al. 2019) que se centran en conocer las respuestas fisiológicas y moleculares de *A. thaliana* o *S. lycopersicum* en condiciones de estrés individual y combinado.

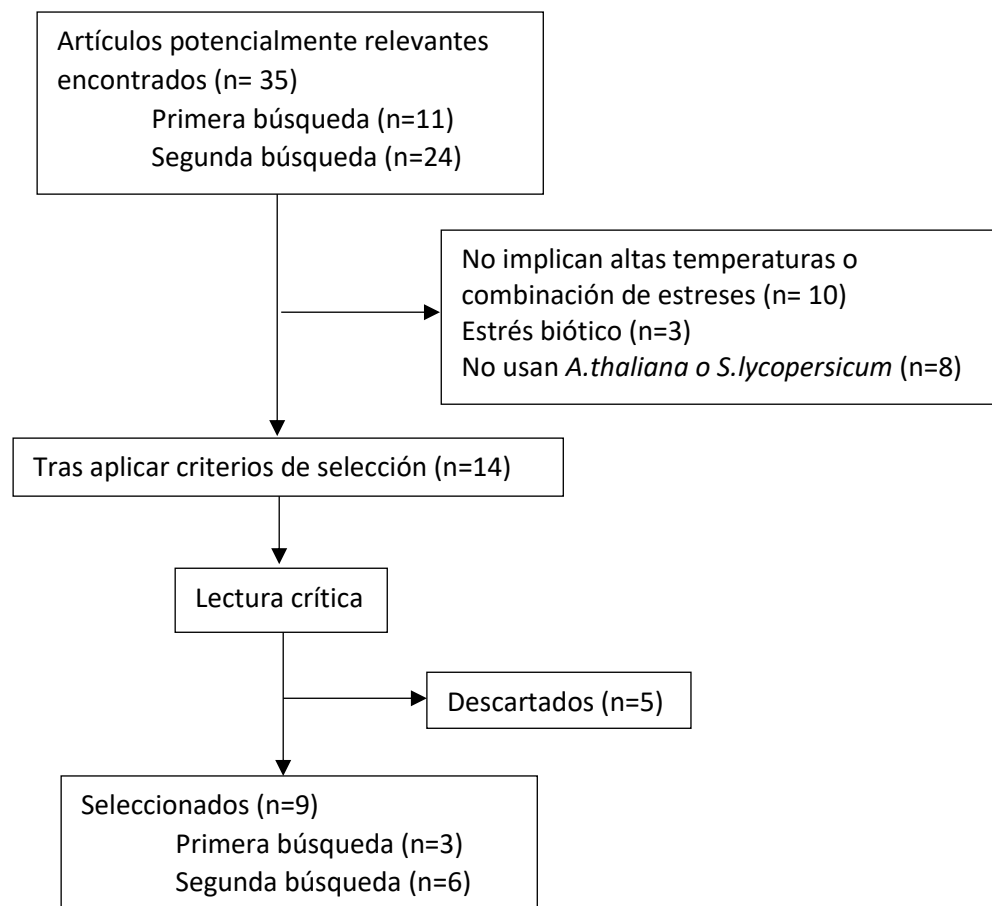


Figura 5. Diagrama de flujo que muestra las búsqueda bibliográficas y selección de estudios.

4. Resultados

4.1. Respuestas fisiológicas

4.1.1. Estrés térmico y lumínico

La mayoría de las plantas que crecen bajo la luz solar de manera directa rutinariamente se encuentran expuestas a elevadas intensidades lumínicas que exceden su capacidad fotosintética. Habitualmente la elevada intensidad lumínica suele ir acompañada por las altas temperaturas. Ambas son condiciones que pueden afectar gravemente a la maquinaria fotosintética y limitar el desarrollo y crecimiento de las plantas (Balfagón et al. 2019).

Para comprender el efecto que tiene el calor en las plantas en presencia de estrés lumínico se han analizado 3 estudios (Balfagón et al. 2019, Gerganova et al. 2016 y Zhou et al. 2020). La estrategia general para comprender las respuestas fisiológicas de las plantas a estrés individual y combinado es crear cuatro condiciones ambientales, condiciones control (CT), estrés térmico (HT o HS), alta intensidad lumínica (HL) y la combinación de ambos estreses (HT+HL).

Gerganova et al. 2016 estudiaron las respuestas de plantas de tomate en condiciones de HT, HL y HL+HT sometiendo las plantas a estrés durante 6 días. También estudiaron si el daño causado por el estrés era permanente o una vez cesa, las plantas tienen la capacidad de recuperar su actividad, para ello volvieron a analizar varios valores tras 5 días de recuperación. Las condiciones usadas para CT fueron 22°C de día y 20°C de noche (22/20°C) y una intensidad lumínica de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, HT (38/29°C y 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) HL (22/20°C y 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y HT+HL (38/29°C y 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Zhou et al. 2020 estudiaron las respuestas de cultivos de tomate denominado "Qianxi" en las cuatro condiciones ambientales, y si tras una primera ronda de estrés las plantas tenían mayor tolerancia al estrés térmico. El ensayo consistió en someter a las plantas a estrés durante 5 días, dejar un periodo de recuperación de 2 días y a todas las plantas, a excepción de la mitad de las plantas control, someterlas a estrés térmico durante 2 días. Las condiciones usadas fueron, CT (25°C/20°C y 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), HT (38/33°C 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), HL (25/20°C y 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y HT+HL (38/33°C y 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). En la segunda exposición la intensidad lumínica fue de 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 38/33°C para todas las plantas, a excepción de la mitad de las plantas control que siguieron a 25°C/20°C y 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Balfagón et al. 2019 estudiaron el efecto sobre *A. thaliana* aplicando las condiciones de estrés durante 7h y estudiando su capacidad de recuperación tras 24h de la aplicación del estrés. Las condiciones usadas fueron: CT (23°C y 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), HT (42°C y 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), HL (23°C y 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y en HT+HL (42°C y 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Fluorescencia de la clorofila

En los trabajos de Balfagón et al. 2019, Gerganova et al. 2016 y Zhou et al. 2020 se estudió el efecto que tienen las condiciones de HL, HT y HT+HL en las plantas para evaluar como se ve afectada la actividad fotosintética en condiciones de estrés. Los resultados de Balfagón et al. 2019 mostraron que las plantas sometidas a HL y HT+HL presentaban una eficiencia cuántica máxima de los procesos fotoquímico del PSII más disminuida que las sometidas a HT. En cambio, en los resultados tanto de Gerganova et al. 2016 como de Zhou et al. 2020 se obtuvo que el principal factor que afecta al PSII son las altas temperaturas y el valor de F_v/F_m en condiciones de estrés lumínico apenas se vio afectado. La contradicción en los resultados de los tres estudios podría ser debido a la diferencia en la duración de los tratamientos, ya que el estudio realizado por Balfagón et al. 2019 tuvo una duración de 7h y por el contrario, los estudios de Gerganova et al. 2016 y Zhou et al. 2020 tuvieron duraciones de 6 y 5 días.

Al analizar como varían los valores de F_v/F_m a lo largo del tiempo en el trabajo de Zhou et al. 2020 se pudo apreciar que al inicio de los tratamientos las plantas que se vieron más afectadas fueron las sometidas a HL, pero con el transcurso de los días se observó como en condiciones de HL los valores de F_v/F_m acabaron siendo similares a los de control. Por el contrario, las plantas tratadas bajo HT inicialmente no presentaron cambios con respecto al control, pero tras 3 días de tratamiento sus valores disminuyeron (Fig. 6).

Por tanto, lo que muestran estos resultados es que la elevada intensidad lumínica tuvo una mayor afectación en la actividad fotosintética en estreses puntuales, pero en condiciones de estrés prolongado las plantas logran adaptarse, en cambio, las altas temperaturas tuvieron el efecto inverso. En condiciones de estrés combinado independientemente de la duración del tratamiento los valores de F_v/F_m se vieron gravemente afectados, reduciendo la eficiencia fotosintética de las plantas.

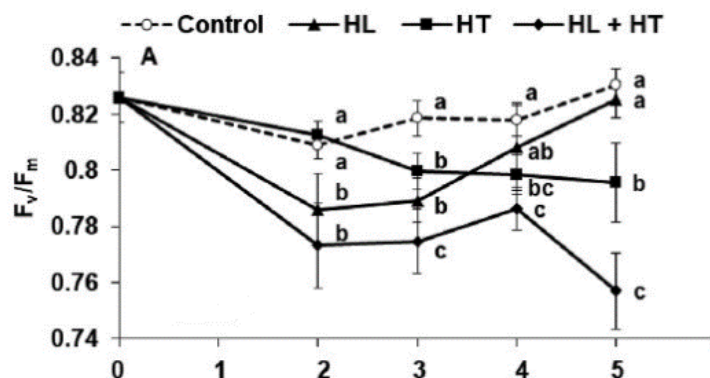


Figura 6. Eficiencia cuántica máxima de los procesos fotoquímicos del PSII (F_v/F_m) representada durante 5 días, de plantas sometidas a condiciones control, alta intensidad lumínica (HL), altas temperaturas (HT) y combinación de estrés. Imagen obtenida de Zhou et al. 2020

Gerganova et al. 2016 además estudiaron los valores de q_P y NPQ. Los datos que obtuvieron también mostraron como inicialmente a los 2 días de tratamiento q_P se vio más afectado en las plantas sometidas a HL, en cambio, en condiciones de HT no hubo diferencias significativas con respecto al control. Mientras que a los 6 días de tratamiento las plantas tratadas a elevadas temperaturas tuvieron valores inferiores y las tratadas con elevada intensidad lumínica presentaron valores control (Fig. 7A). En el caso de NPQ, se observó que las plantas bajo estrés térmico aplicado tanto de manera individual como combinada eran más sensibles que las sometidas a HL. Por lo que estos mecanismos se vieron más afectados por las altas temperaturas.

Además, Balfagón et al. 2019 y Zhou et al. 2020 analizaron la cantidad de luz absorbida que fue usada para llevar a cabo los procesos fotoquímico midiendo F_v/F_m (Fig. 7B). Se volvió a apreciar al inicio de los tratamiento las plantas que fueron tratadas bajo HL tuvieron una actividad fotosintética más afectada que las tratadas en condiciones de estrés térmico, pero en tratamientos más prolongados las plantas en HL tuvieron la capacidad de recuperar su actividad obteniendo valores control y las sometidas a HT acabaron teniendo valores inferiores. En combinación de estreses desde el inicio el aparato fotosintético se vio gravemente dañado.

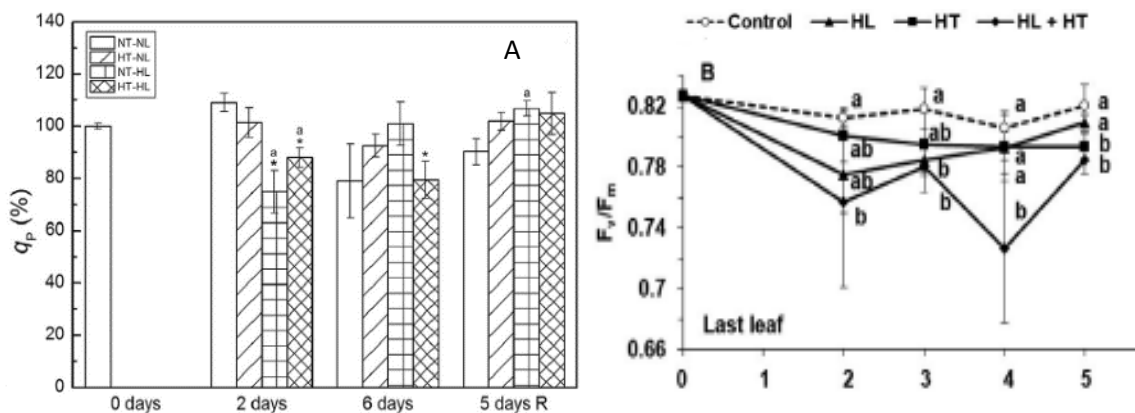


Figura 7. (A) Proporción de centros abiertos del fotosistema II (q_P), evaluados tras 2 y 6 días de tratamientos de estrés y después de 5 días de recuperación. (B) Rendimiento cuántico máximo del fotosistema evaluados durante 5 días de estrés. Se miden los valores de plantas sometidas a condiciones control (NT-NL), estrés térmico (HT-NL), estrés lumínico (NT-HL) y combinación de estrés (HT-HL). (A) Imagen obtenida de Gerganova et al. 2016. (B) Imagen obtenida de Zhou et al. 2020

Por tanto, estos resultados sugieren que las elevadas temperaturas tuvieron efecto negativo sobre la actividad fotosintética y que las plantas en condiciones de estrés lumínico prolongado tuvieron la capacidad de aclimatarse disminuyendo el número de centros abiertos del PSII y la cantidad de energía usada para la actividad fotoquímica. Es decir, se muestra que uno de los mecanismos que tienen las plantas para evitar la fotoinhibición del PSII por exceso de radiación, es limitar el uso de la energía de excitación al aumentar el número de centros de reacción

cerrados. También se mostró que la combinación de estreses provocó daños más graves sobre la actividad fotosintética que la aplicación individual de estreses. Además, los resultados de Gerganova et al. 2016 mostraron que las plantas tratadas bajo combinación de estreses no tuvieron la capacidad de recuperar su actividad fotosintética, seguramente debido a un deterioro de los centro de reacción.

Características estomáticas e intercambio de gases

Balfagón et al. 2019 al analizar la apertura estomática observaron el cierre de estomas en condiciones de estrés lumínico, y la apertura estomática en los tratamientos de estrés térmico y combinado (Fig. 8A). También se midió la temperatura de las hojas la cual en condiciones de estrés térmico y combinado fue superior a la de las plantas control y tratadas a elevada intensidad lumínica (Fig. 8B). El hecho de observar apertura estomática en las plantas tratadas bajo combinación de estreses podría sugerir que el efecto de las altas temperaturas predominaron sobre la radiación lumínica. Además, el aumento de la temperatura en la superficie de las hojas explicaría porque las plantas en condiciones de estrés térmico y combinado promovieron la apertura estomática, ya que al aumentar la apertura de los estomas se favorece la transpiración y enfriamiento de las hojas.

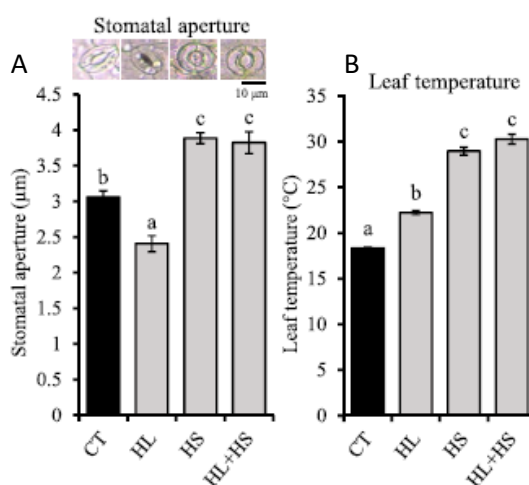


Figura 8. (A) Apertura estomática y (B) Temperatura en la superficie de las hojas, de cultivos de *Arabidopsis* sometidos a condiciones control (CT), estrés lumínico (HL), estrés térmico (HS) y combinación de estrés (HL+HS). Imagen obtenida de Balfagón et al. 2019

Los estomas al regular el intercambio de gases su apertura o cierre está estrechamente relacionada con la actividad fotosintética de la plantas. Zhou et al. 2020 en su trabajo midieron los parámetros del intercambio de gases y obtuvieron que los valores de P_N en las plantas sometidas a estrés lumínico fueron superiores a las plantas control, y que bajo condiciones de elevadas temperaturas disminuía. Lo interesante de estos resultados fue que bajo condiciones de estrés combinado P_N no se vio afectada (Fig. 9A). La conductancia estomática disminuyó en

combinación de estreses, pero en los tratamiento de estrés individual aumentó (Fig. 9B) y la transpiración aumentó en todos los tratamientos, siendo mayor en HT y HT+HL (Fig. 9C). En cuanto a los valores de C_i se apreció que a excepción de las plantas sometidas a HT la cantidad de CO_2 se redujo (Fig. 9D). La disminución de P_N que se apreció en condiciones de estrés térmico probablemente fuese debido a los daños en el PSII y no a una limitación estomática, ya que los estomas en estas condiciones aumentaron su apertura y no se apreció ningún cambio significativo en g_s e incluso C_i aumentó en comparación al control. Por otro lado, en el caso de las plantas tratadas bajo combinación la reducción que se apreció en g_s y de C_i podría contribuir a la reducción de la actividad fotosintética.

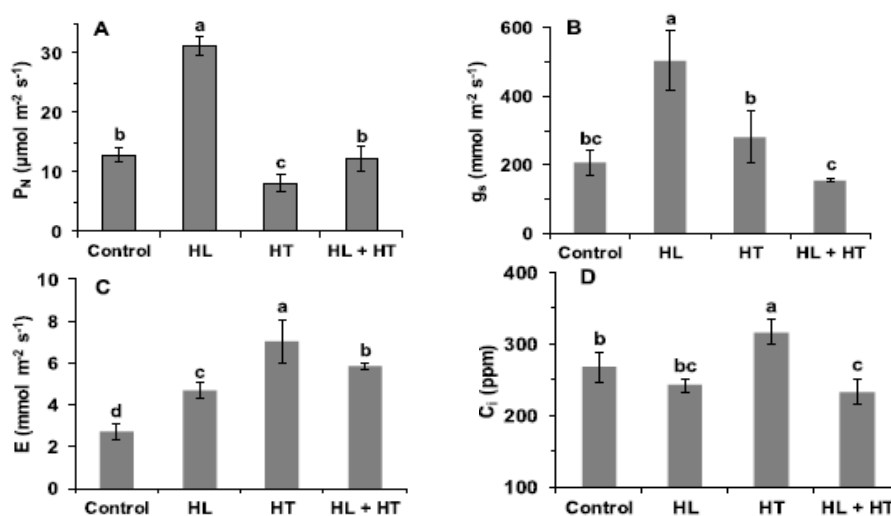


Figura 9. Parámetros de intercambio de gases. (A) Tasa fotosintética neta (P_N), (B) Conductancia estomática (g_s), (C) Transpiración (E), y (D) Concentración de CO_2 intracelular de cultivos sometidos a condiciones control, estrés lumínico (HL), estrés térmico (HT) y combinación de estrés (HL+HT). Imagen obtenida de Zhou et al. 2020

Pigmentos fotosintéticos

Zhou et al. 2020 y Gerganova et al. 2016 estudiaron el contenido de los pigmentos fotosintético y ambos estudios obtuvieron que el contenido de clorofila a y b disminuía en las plantas sometidas a estrés combinado, en cambio en los tratamientos de estrés individual no se apreciaron cambios significativos o su contenido aumentaba en condiciones de estrés térmico (Fig. 10A, B). Estos resultados implicarían la reducción de los pigmentos antena de los fotosistemas hecho relacionado con la reducción del crecimiento de las plantas y daño en los centros de reacción de los fotosistemas.

También se evaluó el contenido de carotenoides, el cual aumentó en todas las condiciones de estrés (Fig. 10C). Los carotenoides tienen actividad antioxidante, por tanto, el aumento de su contenido ayuda a prevenir la fotooxidación de los pigmentos causado por el exceso de producción de ROS. Es esperable que las plantas ante estreses ambientales reaccionen con un aumento de su producción para protegerse de los daños causados por el estrés lumínico y

térmico. El hecho de que las plantas bajo combinación de estreses presentasen reducción en el contenido de las clorofila implicaría que el daño generado es superior que los estreses individuales.

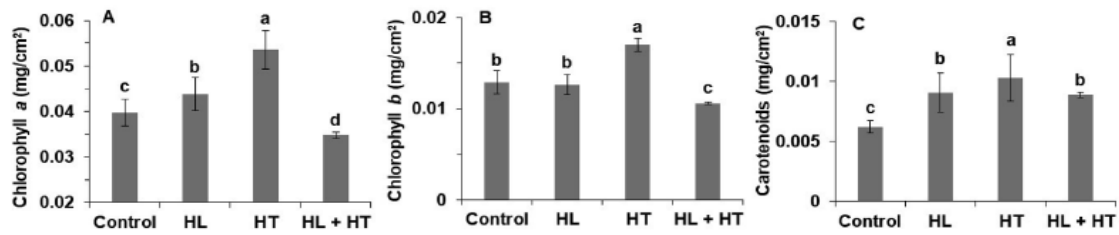


Figura 10. (A) Contenido de clorofila a, (B) contenido de clorofila b y (C) contenido de carotenoides en cultivos control, estrés lumínico (HL), estrés térmico (HT) y combinación de estreses (HL+HT). Imagen obtenida de Zhou et al. 2020.

Crecimiento de las plantas

Los cambios en el crecimiento de las plantas son los efectos más evidentes que provocan las condiciones ambientales estresantes. En *Arabidopsis* se observó que el mayor daño en las plantas fue causado por la combinación de estreses y que en presencia de estreses individuales no hubo cambios significativos en la morfología de las plantas con respecto al control. Además, en el tratamiento de estrés combinado la supervivencia de las plantas dejó de ser del 100% (Fig. 11A)(Balfagón et al. 2019). En *S.lycopersicum* si se observó disminución del tamaño y del área de las hojas en todas las condiciones de estrés. Las condiciones que mayor efecto tuvieron sobre las plantas fueron las elevadas temperaturas, especialmente en combinación con estrés lumínico que fue donde más variación con respecto al control se apreció (Fig. 11B) (Zhou et al. 2020). La reducción del crecimiento de ambos tipos de plantas en combinación de estreses se correlaciona con la actividad fotosintética más afectada que se obtuvo en los parámetros de fluorescencia de la clorofila. Y el hecho de que en *Arabidopsis* los tratamientos de estrés individual no afectaran aparentemente al crecimiento de las plantas podría estar de nuevo relacionado con la corta duración de los tratamientos.

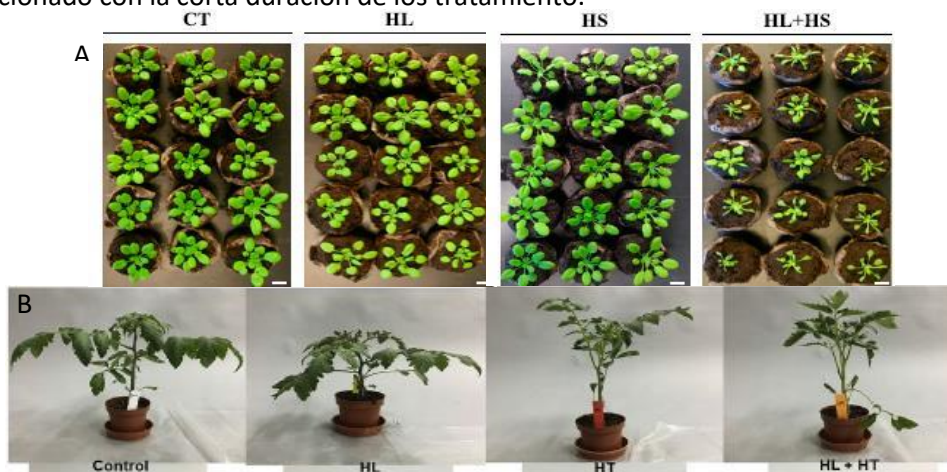


Figura 11. (A) *Arabidopsis thaliana* y (B) Plantas de tomate Qianxi sometidas a condiciones control, estrés lumínico, estrés térmico y combinación de estreses. (A) Imagen obtenida de Balfagón et al. 2019. (B) Imagen obtenida de Zhou et al. 2020

Cambios estructurales

Para determinar si la membrana lipídica de las células vegetales sufrió alguna lesión durante la exposición a condiciones de estrés, Gerganova et al. 2016 midieron el contenido de malondialdehído (MDA) usado como parámetro para la medición de la peroxidación lipídica de la membrana. Se obtuvo que el contenido de MDA aumentaba significativamente en las plantas tratadas en estrés lumínico desde el inicio del estudio. Además, se observó como el daño en las membranas se incrementaba a mayor duración del tratamiento, una vez se dejó de aplicar las plantas recuperaron niveles control de MDA, por tanto, el daño en las membranas no fue permanente. En cambio, en situaciones de estrés combinado el contenido es MDA aumentó significativamente con respecto al control a los 6 días de tratamiento y tras el periodo de recuperación no disminuyeron los niveles de MDA (Fig. 12). El hecho de que en combinación de estreses el contenido de MDA fuese inferior al obtenido en HL sugiere que la presencia de altas temperaturas mitiga los daños oxidativos a nivel de las membranas, pero los daños generados son permanentes.

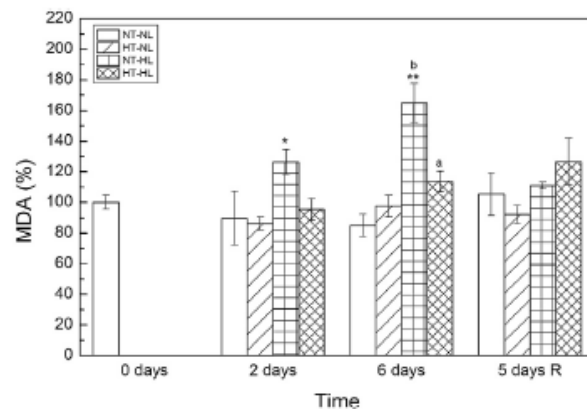


Figura 12. Porcentaje de malondialdehído (MDA) en las membranas lipídicas de plantas estudiadas en condiciones control (NT-NL), estrés térmico (HT-NL), estrés lumínico (NT-HL) y estrés combinado (HT-HL) durante 2 y 6 días de tratamiento y tras 5 días de recuperación. Imagen obtenida de Gerganova et al. 2016.

Balfagón et al. 2019 estudiaron si la estructura de los cloroplastos se vio alterada por el estrés ambiental por lo que analizaron muestras de hojas tratadas por microscopía electrónica de transmisión. Los cloroplastos se vieron alterados en los tres tratamientos de estrés, las imágenes que se obtuvieron mostraron como en HL el contenido de gránulos de almidón disminuyó y hubo un mayor apilamiento de los tilacoides. Por el contrario, en HT el número de gránulos de almidón aumentó y el número de tilacoides disminuyó, obteniéndose los mismos resultados en combinación de estreses, aunque en este caso se apreció la distorsión de los gránulos de almidón (Fig. 13).

Los gránulos de almidón son estructuras importantes para las plantas, ya que actúan como las principales reservas de energía de las plantas. La disminución que se observó en las plantas en

condiciones de HL podría estar relacionado con el cierre estomático que se vio en la figura 8, puesto que al producirse el cierre de los estomas se limitó la absorción de CO₂ y, por tanto, la generación de azúcares se redujo y su almacenamiento también. De la misma manera la apertura estomática que experimentan las plantas bajo condiciones de estrés térmico y combinado explicaría el aumento de los gránulos de almidón al haber una mayor fijación de CO₂. Además, el hecho de observarse los gránulos de almidón distorsionados muestra que la combinación de estreses generó respuestas únicas y que no se pueden extrapolar de las respuestas a estrés individual. La razón por la que los gránulos de almidón estaban distorsionados se desconoce, los autores sugirieron que pudo ser consecuencia de una alteración en la proporción de amilosa/amilopectina o a una ruptura de la envoltura que permite el acceso a enzimas de degradación del almidón, pero para concluir las causa serían necesarios más estudios.

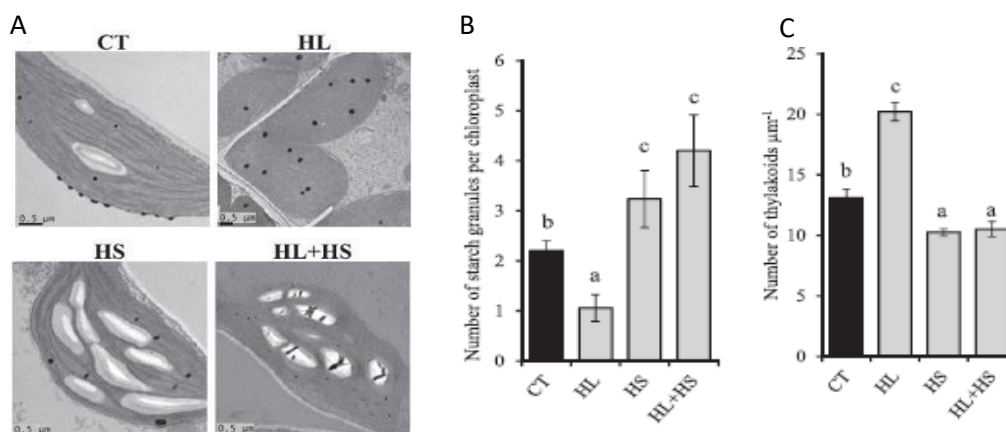


Figura 13. (A) Cambios estructurales de los cloroplastos, (B) Número de gránulos de almidón por cloroplasto y (C) Número de tilacoides por μm⁻² en cultivos estudiados en condiciones control (CT), estrés lumínico (HL), estrés térmico (HS) y combinación de estrés (HL+HS). Imagen obtenida de Balfagón et al. 2019.

Mejora de la tolerancia

Zhou et al. 2020 analizaron de nuevo los parámetros de intercambio de gases y fluorescencia de la clorofila de las plantas tratadas sometiendo de nuevo a estrés ambiental. Se basaron en premisa de que una previa exposición activa al calor activa los sistema de defensa de las plantas pudiéndoles proporcionar mayor tolerancia a estreses posteriores. Estudios previos demostraron que la previa exposición a estrés térmico favorecía la activación de procesos antioxidantes, de HSP y mejora de la fotoquímica del PSII hechos que sugirieron que la previa exposición favorece a la tolerancia.

El estrés al que fueron sometidas de nuevo las plantas fue estrés térmico. La tasa fotosintética neta de las plantas sometidas al segundo estrés disminuyó independientemente de la condición de estrés de la primera ronda, pero los valores de Fv/Fm aumentaron durante la segunda

exposición en las plantas sometidas a estrés térmico en la primera ronda de tratamientos, comparado con los resultados obtenidos en la primera ronda de estrés. Además, se observó que las tomateras expuestas inicialmente a HT tuvieron una mejor aclimatación al calor durante la segunda ronda de estrés, mediante una elevada conductancia estomática y alta transpiración, por consiguiente, un mayor enfriamiento de las hojas. Por tanto, estos resultados apoyaron que la activación del sistema de defensa mediante una previa exposición al calor mejora la aclimatación de las plantas de tomate a las elevadas temperaturas recurrentes a través del enfriamiento de sus hojas.

4.1.2. Estrés térmico e hídrico

Para comprender las respuestas fisiológicas de las plantas en condiciones de estrés ambiental basadas en la combinación de elevadas temperaturas y sequía, se analizaron dos estudios Zhou et al. 2017 y Zhou et al. 2019 (Abo Gamar et al. 2019). Los tratamientos a los que fueron sometidas las plantas se aplicaron durante varios días, ya que la sequía a diferencia de otros estreses ambientales que tienen un efecto inmediato, se desarrolla gradualmente.

Se usaron 4 condiciones; control, las plantas se encuentran a temperatura ambiente y con riego, condiciones de sequía que implicaron temperatura ambiente y ausencia de riego (estrés hídrico), elevadas temperaturas con riego (estrés térmico) y estrés combinado que supone elevadas temperaturas y ausencia de riego.

Zhou et al. 2019 centraron su estudio en dos cultivos de tomate “Sufren NO.14” (CV1) y “Jinlingmeiyu” (CV2), que fueron sometidos durante 6 días a estrés ambiental. Las condiciones empleadas fueron 26/18°C para aquellos tratamientos a temperatura ambiente y 38/30°C para los tratamientos que implaran estrés térmico.

Zhou et al. 2017 estudiaron las respuestas fisiológicas comparando tres cultivos de tomate “Arvento” “LA1994” y “LA2093”, siendo los dos últimos considerados tolerantes a altas temperaturas. Los tratamientos tuvieron una duración de 5 días y las condiciones que emplearon fueron 26/20°C en los tratamientos a temperatura ambiente y las condiciones de estrés térmico las plantas se sometieron a 32/26°C.

Fluorescencia de la clorofila

En ambos estudios (Zhou et al. 2019 y Zhou et al. 2017) al medirse los valores de F_q/F_m y ETR se obtuvieron valores disminuidos con respecto al control en los tratamientos de sequía y estrés combinado, en cambio, en estrés térmico los valores se mantuvieron próximos al control (Fig. 14 A,B). También se observó que los valores de NPQ en cultivos en ausencia de riego

aumentaban especialmente en estrés combinado; en cambio, en las plantas tratadas únicamente bajo estrés térmico disminuyeron (Fig.14C).

La reducción observada en los valores de F_q/F_m' y ETR sugiere un desequilibrio en la actividad fotoquímica del PSII y en el transporte de electrones, y que se viera aumentada la cantidad de energía disipada en forma de calor sería la consecuencia de disminuir el transporte de electrones para tratar de proteger el PSII. Además, se observó que la combinación de estreses generó daños irreversibles en la actividad fotoquímica del PSII, ya que tras el periodo de recuperación no se obtuvieron valores control y, en cambio, las plantas que fueron sometidas a estrés hídrico si, pese a tener valores similares durante el estrés de F_q/F_m' y NPQ.

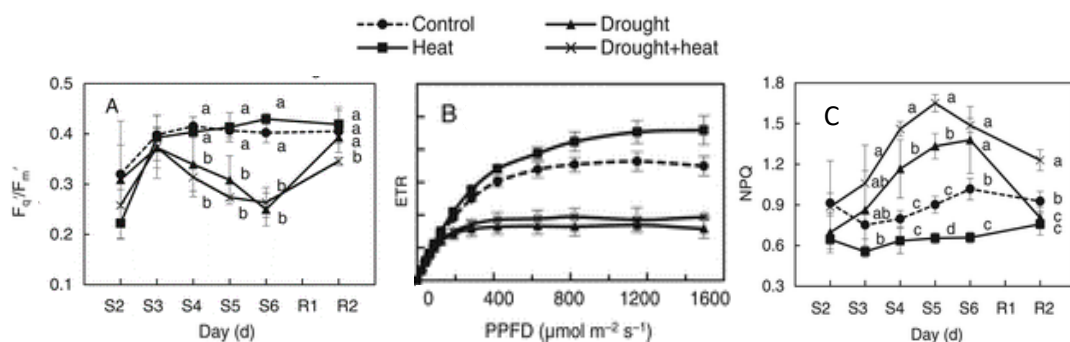


Figura 14. (A) Rendimiento cuántico del fotosistema II (F_q/F_m') medido durante 6 días de estrés y 2 días de periodo de recuperación, (B) Velocidad de transporte de electrones (ETR) en diferentes intensidad lumínicas y (C) Enfriamiento no fotoquímico (NPQ) medido durante 6 días de estrés y 2 días de periodo de recuperación, de los cultivos sometidos a condiciones control, sequía, calor y estrés combinado. Imaagen obtenida de Zhou et al.

En los valores de q_L se observan discrepancias entre los resultados obtenidos por Zhou et al. 2019 y Zhou et al. 2017. Por un lado, Zhou et al. 2019 obtuvo que en condiciones de estrés térmico tanto en CV1 como CV2 disminuían la proporción de centros de reacción abiertos, ya que en comparación con el control se obtuvieron valores inferiores de q_L incluso tras la recuperación. Además, las condiciones de sequía apenas afectaron a los valores de q_L al únicamente apreciarse una disminución en los últimos días de estrés y que CV2 tuviera la capacidad de recuperar valores control tras los dos días de recuperación (Fig. 15A, B). Por otro lado, Zhou et al. 2017 observaron que en “Arvento” en condiciones de estrés térmico aplicado individualmente las plantas aumentaban la proporción de centros de reacción abiertos y “LA1993” y “LA2093” mantuvieron la misma proporción que control. Por el contrario, el estrés hídrico provocó la reducción de los centros de reacción abiertos en los tres cultivos al presentar valores de q_L disminuidos (Fig. 15C). En lo que sí coinciden los dos estudios es que la combinación de estreses tuvo un efecto más severo sobre la fotosíntesis al aumentarse el número de centros de reacción cerrados en todos los cultivos, por tanto, una mayor fotoinhibición.

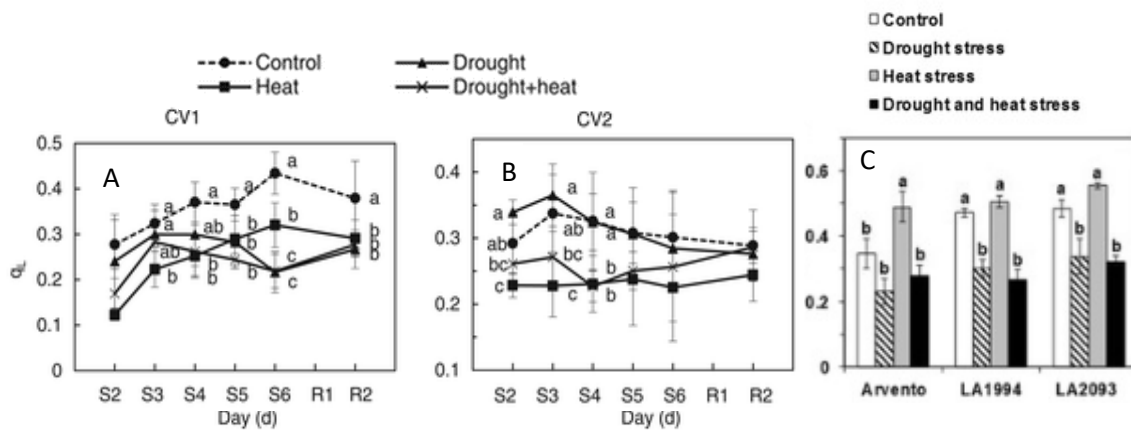


Figura 15. Fracción de centros abiertos del fotosistema II (q_L) evaluado durante 6 días de estrés y 2 de recuperación de los cultivos (A) Sufen NO. 14 (CV1) y (B) Jinlingmeiyu (CV2), en condiciones control, de sequía, calor y combinación de estrés. Imagen obtenida de 1. (C) Fracción de centros abiertos del fotosistema II, tras 5 días de estrés en los cultivos Arvento, LA1994 y LA2093, en condiciones control, estrés hídrico, estrés térmico y combinación de estrés. Imagen obtenida de Zhou et al. 2017

Zhou et al. 2017 también evaluaron la F_v/F_m , cuyos valores únicamente se redujeron en los cultivos de “LA1994” y “LA2093” en combinación de sequía y calor, este descenso implica que el PSII está dañado.

Tras analizar los resultados de los distintos parámetros, se mostró que las condiciones de estrés hídrico generaron un mayor desequilibrio de la actividad fotoquímica del PSII y fotoinhibición; en cambio, a elevadas temperaturas la mayoría de los parámetros no presentaron diferencias significativas con respecto al control. Además, en los tratamientos de estrés combinado, se vio que existe una predominancia de la sequía sobre el calor, ya que los resultados generalmente fueron similares a los tratamientos de sequía.

Características estomáticas e intercambio de gases

Zhou et al. 2017 obtuvieron que el ancho de los poros de los estomas aumentaba en condiciones de estrés térmico en los tres cultivos, provocando la apertura de los estomas; sin embargo, las condiciones de estrés hídrico y combinado provocaron una reducción del tamaño de los poros, es decir, cierre estomático para prevenir la pérdida de agua. Que se observara el cierre de los estomas en combinación de estreses implica que la sequía tuvo un efecto predominante en las respuestas de los cultivos.

La alteración en la estructura de los estomas tuvo repercusión en los parámetros de intercambio de gases. La P_N en cultivos que fueron sometidos únicamente a condiciones de estrés térmico no varió, pero en ausencia de riego los valores obtenidos fueron muy próximos a 0 (Fig. 16a). En los valores que se obtuvieron de la conductancia estomática y transpiración también se observó como el estrés hídrico provocaba que se alcanzarán valores próximos a 0, en cambio, el estrés térmico provocó su aumento (Fig. 16b,c). La concentración intracelular de CO_2 se vio menos

afectada en las tres condiciones, ya que los valores de los 3 tratamientos de estrés fueron similares al control (Fig. 16d).

Los resultados mostraron que la sequía tuvo un efecto predominante sobre las altas temperaturas, al haberse obtenido valores equivalentes en las plantas sometidas a la combinación de estrés hídrico y térmico y las sometidas a estrés hídrico. Además, la inhibición de la fotosíntesis que sufrieron las plantas en ausencia de riego sugirieron los autores que principalmente fue causa de la limitación estomática que experimentaron los cultivos, puesto que se redujeron los valores de g_s y E . En cambio, las elevadas temperaturas al no haber provocado la reducción de los parámetros de intercambio de gases se sugirió de nuevo que la inhibición de la fotosíntesis pueda ser debido a limitaciones a nivel molecular.

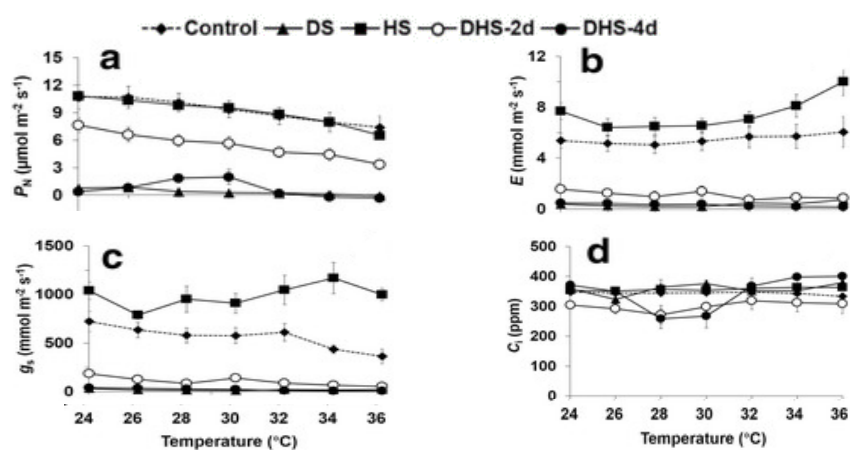


Figura 16. (a) Tasa fotosintética neta (P_n) (b) Transpiración (E), (c) Conductancia estomática (g_s) (d) Concentración de CO_2 intracelular (C_i) medidas en diferentes rangos de temperatura. Los valores se tomaron el cuarto día en las condiciones control, sequía (DS), estrés térmico (HS) y combinación de estrés (DHS), en el caso de estrés combinado también el día segundo día de tratamiento. Imagen obtenida de Zhou et al. 2017

Pigmentos fotosintéticos

Los resultados que obtuvieron Zhou et al. 2017 evaluando el contenido de los pigmentos por unidad de área el cuarto día de tratamiento, mostraron que la cantidad de pigmentos fotosintéticos seguía patrones similares en los tres cultivos independientemente de su tolerancia al calor (Fig. 17). En los cultivos de “Arvento”, se apreció un mayor contenido de clorofila a, b y de carotenoides en condiciones de sequía, ya fuese aplicada de manera individual como combinada y en estrés térmico no varió el contenido de pigmentos. En los cultivos tolerantes al calor se mostró como a pesar de ser ambos considerados tolerantes tuvieron respuestas diferentes. “LA1994” sufrió una reducción de la cantidad de los tres pigmentos cuando fue estudiado bajo combinación de estreses y un aumento en condiciones de estrés térmico. En cambio, los cultivos de “LA2093” no presentaron ninguna variación significativa con respecto a control. Lo que destacó de los resultados fue la reducción en cuanto al contenido de

clorofilas en combinación de estreses en los cultivos “LA1994” y “LA2093”, ya que no se apreció esta disminución en las situaciones de estrés individual, pero al aplicarse conjuntamente si, por lo que la combinación de ambos intensificó los daños en las plantas y generó respuestas únicas.

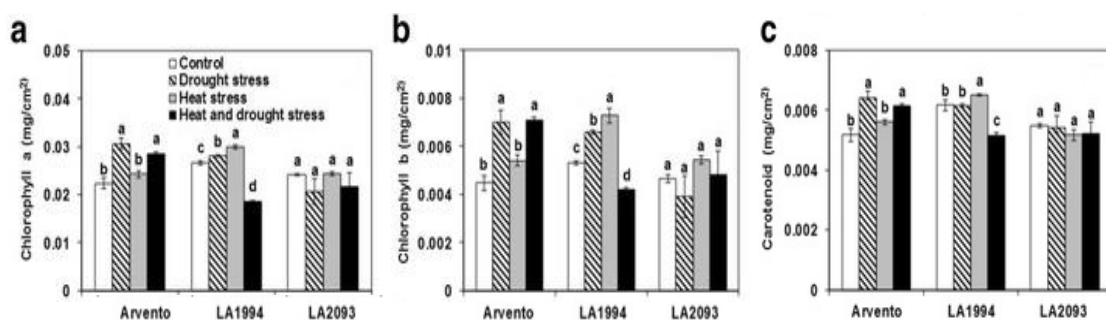


Figura 17. Contenido de pigmentos fotosintéticos por unidad de área presente en los cultivos Arvento, LA1994 y LA2093 cuando son sometidos a condiciones control, estrés por sequía, estrés térmico y combinación estrés. (a) Clorofila a, (b) Clorofila b y (c) Carotenoides. Imagen obtenida de Zhou et al. 2017

Crecimiento de las plantas

Las plantas de tomate tuvieron un crecimiento reducido en las condiciones de estrés en los estudios de Zhou et al. 2019 y Zhou et al. 2017. Tanto el tamaño de las plantas como el de las hojas se vieron afectadas por condiciones de sequía; sin embargo, el tratamiento de estrés térmico no afectó significativamente ni a la altura de la planta ni área de la hojas (Fig. 18). También observaron una pérdida de peso al analizar el peso fresco y seco tanto de los tallos como de las raíces de los cultivos de tomate. Los resultados indicaron que bajo el tratamiento de estrés hídrico y estrés combinado la biomasa de la planta disminuía con respecto al control en los últimos días de tratamiento, especialmente en tratamiento combinado, mientras en condiciones de calor la biomasa no se vio significativamente afectada. Lo que sugirieron estos datos fue que la ausencia de riego tiene un efecto directo en la acumulación de biomasa.



Figura 18. (A) Plantas “Arvento”, (B) Plantas “LA1994” y (C) Plantas “LA2093” tras 5 días en condiciones de estrés. Imagen obtenida de Zhou et al. 2017

Contenido relativo de agua

El contenido relativo de agua (RWC) se usó para medir el nivel de agua en los tejidos, fue expresado en porcentaje y representa la cantidad de agua presente en la planta con respecto a la cantidad total que puede almacenar. Los resultados de Zhou et al. 2019 ofrecieron información sobre cómo varía el RWC a lo largo de los días cuando las plantas son sometidas a

estrés ambiental. Tanto los cultivos de CV1 como CV2 (Fig. 19) experimentaron un descenso del RWC el tercer día al estar expuestas a elevadas temperaturas, pero tras varios días acabaron recuperando valores próximos al control, hasta que finalmente tras un periodo de recuperación de dos días el contenido de agua en las plantas se restableció. Las plantas que fueron sometidas a tratamientos de sequía mantuvieron valores próximos a control. En cambio, la pérdida del RWC se vio incrementada gradualmente bajo la combinación de estreses, y pese a experimentar una recuperación siguió manteniendo valores menores que control.

Estos resultados no se correlacionan con los de Zhou et al. 2017 porque obtuvieron el quinto día de estrés, que las condiciones que provocaron mayor pérdida de agua fue la sequía, y la combinación de estreses, en cambio, en su estudio el calor apenas afectó a RWC independientemente del tipo de cultivo. La gran diferencia entre los resultados de los dos estudios fue el efecto que tuvieron las condiciones de sequía sobre las plantas, ya que la temperatura al final de ambos estudios no producía pérdida del RWC. En lo que si coincidieron ambos estudios es que la combinación de estreses provocó la pérdida de agua en las plantas, lo cual se puede correlacionar con el menor crecimiento de las plantas en estas condiciones.

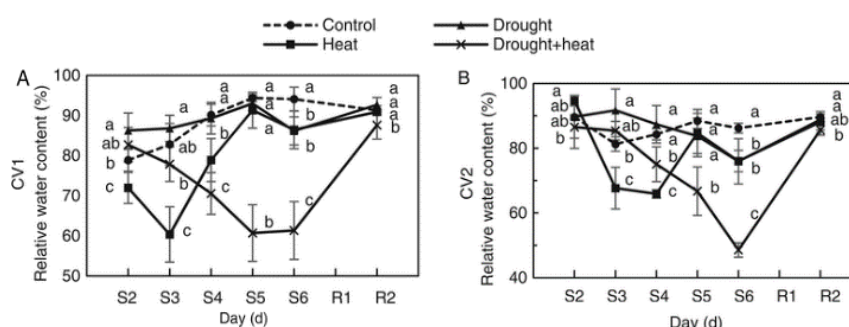


Figura 19. Contenido relativo de agua expresado en porcentaje durante 6 días de estrés y 2 de recuperación de (A) Sufen No.14 (CV1) y (B) Jinlingmeiyu (CV2), en condiciones de control, sequía, calor y estrés combinado. Imagen obtenida de Zhou et al. 2019

Mejora de la tolerancia

A diferencia de los dos estudios anteriores, Abo Gamar et al. 2019 centraron su estudio en evaluar como la presencia de elevada concentración de CO_2 (ECO_2) afectaba a las respuesta de *A. thaliana* cuando eran sometidas a condiciones de estrés hídrico y térmico. El estudio se basó en 8 tratamientos al combinar los tres factores (temperatura, CO_2 y riego) durante 5 días: (i) control, baja temperatura (22/18°C), concentración de CO_2 ambiental (ACO_2 , $400\mu mol mol^{-1}$) y riego; (ii) baja temperatura, ACO_2 y sin riego; (iii) baja temperatura, ECO_2 ($700\mu mol mol^{-1}$) y riego; (iv) baja temperatura, ECO_2 y sin riego; (v) elevada temperatura (28/24°C), ACO_2 y riego; (vi) elevada temperatura, ECO_2 y riego; (vii) elevada temperatura, ECO_2 y riego, y (viii) elevada temperatura, ECO_2 y sin riego.

Se observó que la presencia de ECO_2 antagonizaba los efectos de estrés hídrico y térmico favoreciendo una mejor aclimatación de las plantas. Se apreció la mayor tolerancia al observarse que dos de los indicadores del crecimiento como son el área foliar y la biomasa de las hojas y raíces se vieron incrementadas en presencia de ECO_2 en comparación a las situaciones de ACO_2 . También se apreció que los tratamientos con ECO_2 redujeron el daño oxidativo que sufren las células vegetales al evaluar la estructura de las membranas lipídica midiendo el contenido de MAD. Se observó que el contenido de MDA disminuía en presencia de ECO_2 por lo que las membranas estaban menos afectadas. Los autores sugirieron que el menor daño oxidativo podía ser porque ECO_2 favoreció a una menor producción de ROS, ya que el contenido de carotenoides se vio disminuido. Por lo que sería interesante comprender que permite que la mayor concentración de CO_2 permitiese reducir los daños provocados por la combinación de estreses.

4.2. Respuestas moleculares

Los cambios que sufren las plantas a nivel molecular como respuesta a situaciones de estrés ambiental proporcionan un mayor entendimiento de la adaptación de las plantas al estrés ambiental y permiten identificar nuevas vías para desarrollar plantas con mayor tolerancia al estrés abiótico. Se han analizado varios estudios (Raja et al. 2020, Balfagón et al. 2019, Huang et al. 2019, Kumazaki and Suzuki 2019, Zhou et al. 2020 y Zhou et al. 2017) que aportan un mayor conocimiento sobre las respuestas moleculares de *A.thaliana* y *S.lycopersicum* en condiciones tanto de estrés térmico y lumínico como de estrés térmico e hídrico.

Acumulación de azúcares

Zhou et al. 2020 y Zhou et al. 2017 además de estudiar las respuestas a nivel fisiológico de las plantas de tomate analizaron el contenido de carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa y almidón) en las plantas, permitiendo conocer los cambios que se producían en el metabolismo primario de las plantas como consecuencia del estrés ambiental.

Por un lado, Zhou et al. 2017 que estudiaron las respuestas bajo estrés hídrico y térmico, observaron como en los cultivos “Arvento” el contenido de glucosa, fructosa y sacarosa aumentó en las tres condiciones de estrés. La mayor acumulación tuvo lugar en condiciones de estrés hídrico, aunque en el caso de la sacarosa el aumento fue proporcional en las tres condiciones. En los cultivos tolerantes al calor, “LA1994” y “LA2093”, los resultados variaron respecto “Arvento”, obteniéndose que el contenido de los tres azúcares disminuía o se mantenía similar al control en combinación de estreses, aunque hubo una reducción significativa en el contenido de sacarosa bajo condiciones de estrés hídrico y estrés combinado (Fig. 20 a, b ,c). El almidón se vio reducido en los tres cultivos en las tres condiciones de estrés especialmente en combinación de estreses, a excepción de “LA2093” en estrés térmico (Fig. 20 d).

Por otro lado, Zhou et al. 2020 en su estudio sobre el efecto del estrés lumínico y térmico sobre *S.lycopersicum* obtuvieron que el contenido de glucosa, fructosa y sacarosa fue mayor en combinación de luz y calor, en cambio, en los tratamientos de estrés individual no varió la cantidad de azúcares en comparación al control. El contenido de almidón también aumentó en combinación de estreses, pero en menor medida que en las plantas sometidas a elevada intensidad lumínica de manera individual. El aumento de los gránulos de almidón en combinación de estreses también lo observan Balfagón et al. 2019 al estudiar la estructura de los cloroplastos, aunque en este estudio la mayor acumulación fue en las condiciones de combinación de estreses, esta diferencia seguramente se daba al tipo de planta utilizada para el estudio.

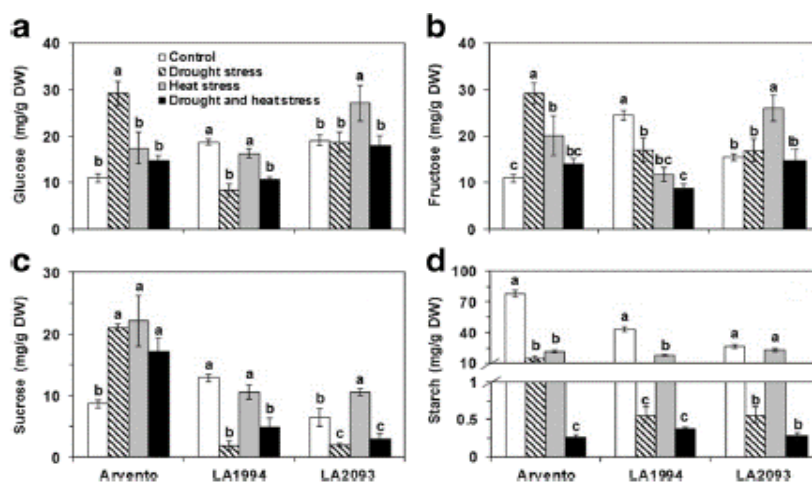


Figura 20. Contenido de carbohidratos en las hojas de tres cultivos de tomate bajo condiciones control, estrés hídrico, térmico y combinación de estreses. (A) Contenido de glucosa, (B) Contenido de fructosa, (C) Contenido de sacarosa y (D) Contenido de almidón. Imagen obtenida de Zhou et al. 2017

La variación del contenido de azúcares en las plantas puede darse por una gran variedad de causas. En estos resultados se propuso que el aumento de glucosa, fructosa y sacarosa pudo ser el resultado del menor crecimiento y fotosíntesis de las plantas, provocando menor demanda de metabolitos primarios y por tanto mayor acumulación de estos. Otra de las causas que pudo provocar la alteración del contenido de azúcares es la menor fijación de CO₂ y en consecuencia menor producción de azúcares

Sistema de defensa antioxidante

Raja et al. 2020 estudiaron los niveles de expresión y actividad de los mecanismos antioxidantes, para ello tomaron como objeto de estudio plantas de tomate que fueron sometidas a condiciones de sequía, estrés térmico y combinación de ambos. La temperatura a la que fueron sometidas las plantas en tratamiento de estrés térmico y combinado fue de 45°C.

Analizaron el contenido de H₂O₂ acumulado en las plantas tras la aplicación de los tratamientos de estrés, y se observó una mayor acumulación en las plantas sometidas a combinación de estreses. En estrés hídrico y térmico pese a tener mayor contenido que el control la cantidad fue

menor que en combinación, siendo las plantas con menor acumulación de H₂O₂ las tratada en estrés hídrico. Estudiaron los niveles de actividad de las enzimas SOD, CAT y las correspondientes a la ruta del glutati6n ascorbato (APX, MDHAR, DHAR y GR), en condiciones de estrés individual y combinado para comprender si la mayor acumulaci6n fue debido a una inactivaci6n enzimática o silenciamiento g6nico generada por el estrés ambiental.

Se obtuvo que tanto la actividad de SOD como de CAT aumentaban bajo condiciones de estrés combinado, por el contrario, en los tratamientos de estrés térmico e hídrico SOD si experimentó un aumento de su actividad, pero CAT en condiciones de estrés térmico mantuvo su actividad al mismo nivel que el control (Fig. 21a, b). En el caso de las enzimas de la ruta AsA-GSH, tanto MDHAR como DHAR mostraron una tendencia de reducci6n de su actividad en todas las condiciones de estrés, siendo menor en el tratamiento de estrés combinado (Fig. 21c, d). Sin embargo, la actividad de GR y APX aumentó en los tres tratamientos, pero la combinaci6n de estreses provocó que en comparaci6n con la actividad observada en estrés hídrico la actividad de las enzimas fuese menor, por lo que las elevadas temperaturas en APX y GR tuvieron un efecto negativo al disminuir actividad enzimática (Fig. 21 e, f).

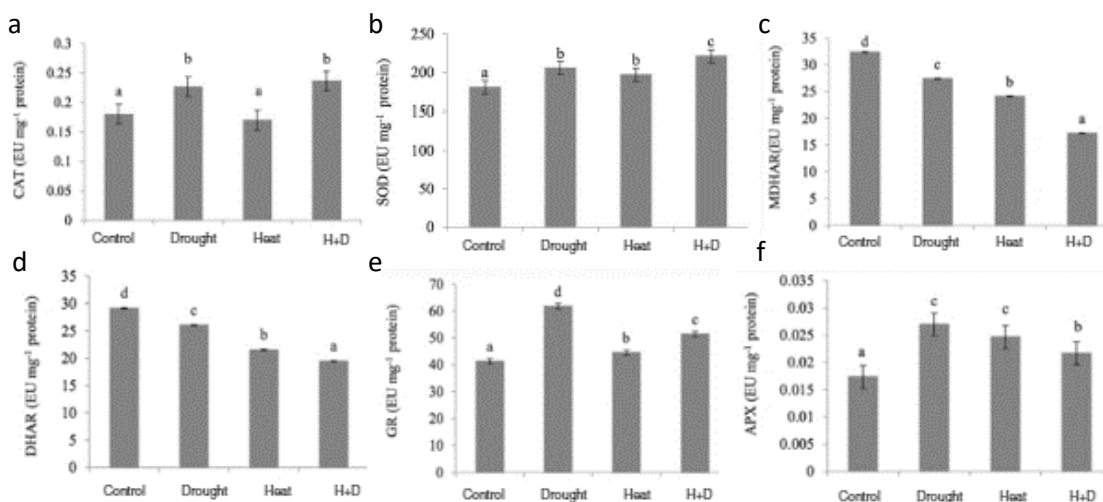


Figura 21. Efecto de la sequía, calor y combinaci6n de estreses (H+D) en la actividad en enzimas antioxidantes. (a) CAT, (b) SOD, (c) MDHAR, (d) DHAR, (e) GR y (f) APX. Imagen obtenida de Raja et al. 2020

Tambi6n evaluaron el contenido de los elementos antioxidantes (AsA y GSH) y los intermediarios del ciclo (DHA y GSSG). De los resultados que obtuvieron destac6 que el ratio de GSH/GSSG disminuyera en todas las condiciones de estrés, siendo menor en el tratamiento de combinaci6n de estreses (Fig. 22). Destacaron estos resultados porque la reducci6n del ratio GSH/GSSG implica un deterioro del reciclaje de GSH, proceso esencial para la correcta desintoxicaci6n de ROS, pudiendo ser una de las causas de la mayor acumulaci6n de ROS en las c6lulas vegetales. Adem6s, la reducci6n del ratio podría estar relacionada con la disminuci6n de la actividad de DHAR y que la activaci6n de GR fuese insuficiente.

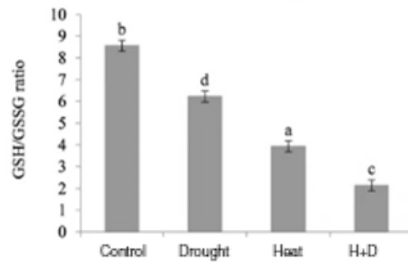


Figura 22. Efecto de la sequía, calor y combinación de estreses en los ratios de los elementos antioxidantes no enzimático de la vía Asa-GSH. GSH/GSSG. Imagen obtenida de Raja et al. 2020

Aparte de medir la actividad de las enzimas antioxidantes también se evaluó el nivel de expresión génica de SOD y de las enzimas del ciclo AsA-GSH. Tanto los transcritos de SOD como los de APX, GR, DHAR y MDHAR fueron regulados positivamente, aumentando su nivel de expresión en los tres tratamientos de estrés.

Por tanto, estos resultados sugirieron que el principal motivo por el cual se produce un exceso de acumulación de H_2O_2 en condiciones de estrés combinado, fuera debido a una actividad enzimática insuficiente y no por una regulación negativa de la expresión génica. Además, se vio que las altas temperaturas tuvieron un mayor efecto negativo que el déficit hídrico, ya que en combinación de estreses la actividad de las enzimas de la ruta Asa-GSH redujeron su actividad en comparación con la que presentaron en condiciones de sequía.

Regulación de genes implicados en el aparato fotosintético

Balfagón et al. 2019 además de estudiar las respuestas fisiológicas de *A.thaliana* bajo estrés lumínico, térmico y combinación de ambos, debido a la falta de conocimiento a nivel molecular de los cambios que experimentan las plantas al ser sometidas a esta combinación de estreses, analizaron a nivel transcripcional la maquinaria fotosintética. Estudiaron las proteínas del centro de reacción del PSII (PsbC, PsbA, PsbB, PsbE, PsbF, PsbH y PsbZ) y del PSI (PsaA, PsaK, PsaC y PsaH). Entre las proteínas del PSII se prestó especial atención a la expresión de D1, codificada por el gen PsbA. La D1 junto la D2 forman parte del núcleo del centro de reacción del PSII y es la principal proteína susceptible al daño por estrés ambiental. Cuando la D1 está dañada se produce la fotoinhibición, por ello las plantas han desarrollado un sistema de protección para asegurar la actividad del PSII que implica la reparación de la proteína D1. El proceso de reparación consiste en la degradación de la D1 dañada, síntesis de *ново* de la proteína y reensamblaje del PSII. Por lo cual, además de medir el nivel de expresión de PsbA se evaluó la acumulación de D1 en *A.thaliana* y expresión de las proteínas del ciclo de reparación.

Se observó mayor expresión en los transcritos de las proteínas involucradas tanto en el PSI como PSII en respuestas a combinación de estreses y de las proteínas implicadas en el ciclo de

reparación de la proteína D1 en respuesta a la combinación de estreses. En cambio, pese a obtenerse un aumento en la expresión de PsbA bajo condiciones de estrés combinado, la acumulación de D1 en las plantas disminuyó significativamente. Por el contrario, en condiciones de estrés individual PsbA no aumentó su expresión, pero si su acumulación especialmente en estrés lumínico (Fig. 23A).

Estos resultados sugieren que bajo la combinación de elevada intensidad lumínica y altas temperaturas se produjo un aumento en la expresión de la proteína de reparación de la D1, pero el daño que sufre la D1 y por tanto la fotoinhibición del PSII fueron superiores a la capacidad de reparación, provocando la disminución en la actividad fotosintética del PSII. La menor cantidad de D1 observada en combinación de estreses pudo ser una de las causas por la cual la actividad fotoquímica del PSII en las plantas sometidas a estrés combinado no tuvo la capacidad de recuperarse como las plantas sometidas a estrés individual.

Raja et al. 2020 además de analizar la expresión y actividad enzimática antioxidante, estudiaron la expresión de los transcritos de genes fotosintéticos, la proteína D2 del PSII, clorofila P680 del PSI, genes que codifican para la cadena larga y cadena corta de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) (*rbcL* y *rbcS*), proteína del centro de reacción del PSI (*PsaH*) y la expresión del gen *RCA* que codifica para la proteína responsable de la activación de la RuBisCO. A excepción de la proteína D2 que aumentó su expresión en condiciones sequía y calor, el resto de transcritos fueron significativamente menores en combinación de estreses, teniendo la máxima expresión en condiciones de sequía, lo que sugiere que la presencia de las elevadas temperaturas exacerba los daños, provocando una menor expresión de estos elementos (Fig. 23B). Por tanto, las plantas expuestas a estrés combinado mostraron la supresión de genes fotosintéticos, disminuyendo principalmente la actividad de la RuBisCO, lo que podría considerarse una posible causa de la disminución del C_i y en consecuencia del crecimiento de la planta.

Por lo que, tanto la combinación de luz y calor como sequía y calor, tuvieron un efecto negativo en los elementos fotosintético provocando la reducción la actividad fotosintética. Parece ser que el principal factor que provocó la inhibición de la actividad fotosintética fueron las elevadas temperaturas y que en combinación con otros estreses abióticos los daños se vieron acentuados.

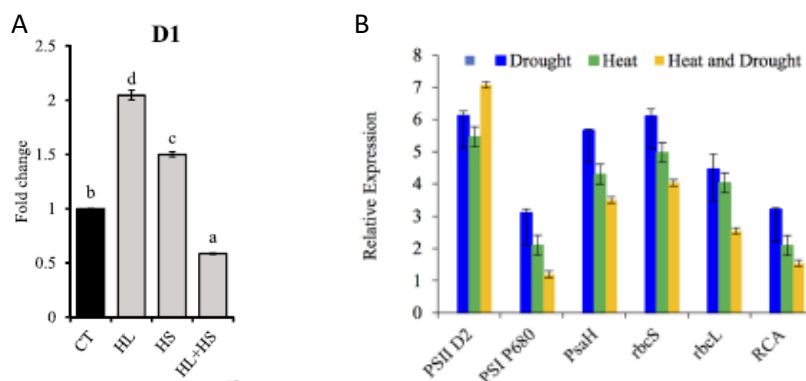


Ilustración 23. (A) Acumulación de la proteína D1 en condiciones de estrés lumínico (HL), térmico (HS) y combinación de estreses (HL+HS). Imagen obtenida de 5. (B) Expresión relativa de genes fotosintéticos en condiciones de sequía, calor y combinación de ambos. Imagen (A) obtenida de Balfagón et al. 2019. Imagen (B) obtenida de Raja et al. 2020

Mejora de la tolerancia

Huang et al. 2019 en estudios previos identificaron en *Capsicum annuum* que CaHSP16.4, miembro de la familia de las HSP20, tenía un nivel de expresión mayor bajo condiciones de estrés por calor pudiendo favorecer a una mayor tolerancia. Tras este descubrimiento estudiaron su papel en la tolerancia tanto a estrés térmico, hídrico y combinación de ambos, realizando la sobreexpresión de CaHSP16.4 en *A. thaliana*. Se generaron dos líneas transgénicas CaHSP16.4-OE1 y OE2 las cuales fueron sometidas a temperaturas de 42°C durante 24h simulando las condiciones de estrés térmico, las sometidas a estrés hídrico se les retuvo el riego durante un periodo de 10 días y para simular condiciones de estrés combinado en el 7 día de estrés hídrico se les aumentó la temperatura a 42°C durante 24h. Analizaron en las plantas OE1 y OE2 la actividad y expresión de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX y GPX para comprobar si la expresión de CaHSP16.4 favorecía a una mayor actividad enzimática evitando daños oxidativos y favoreciendo la tolerancia.

Se observó que la actividad de SOD, APX y GPX estaba aumentada en ambas líneas transgénicas, en las tres condiciones de estrés y con valores similares, en cambio CAT mientras que en condiciones de estrés térmico su actividad enzimática fue similar a las plantas silvestres, y bajo estrés hídrico y combinado aumentó. Los niveles de expresión de AtSOD, AtCAT, AtAPX y AtGPX también aumentaron en las tres condiciones de estrés en las líneas transgénicas de *Arabidopsis* en comparación a las plantas silvestres. Tal y como mostraron Raja et al. 2020 su trabajo una mayor actividad enzimática y expresión génica puede no ser suficiente para hacer frente a la acumulación de ROS generada por el estrés ambiental. Huang et al. 2019 midieron la eficiencia de la desintoxicación de ROS analizando el contenido de MAD en las membranas celulares (Fig. 24). En las tres condiciones de estrés se apreció una disminución de MAD en las plantas transgénicas, lo que implicó una menor oxidación de la membrana, seguramente por el menor

contenido de ROS. Por lo que la expresión CaHSP16.4 está involucrada en la tolerancia al calor y sequía mediante el sistema de eliminación de ROS.

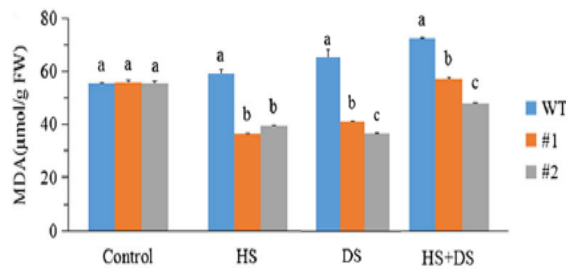


Figura 24. Contenido de malondialdehído en *Arabidopsis silvestre* (W) y en las líneas transgénicas con sobreexpresión de CaHSP16.4 (#1 y #2) en condiciones de estrés térmico (HS), sequía (DH) y combinación de estreses (HS+DS). Imagen obtenida de Huang et al. 2019

A parte de estudiar la implicación de CaHSP16.4 con el sistema antioxidante, se evaluó si CaHSP16.4 estaba implicado en la regulación de genes sensibles a estrés. Se midió, por un lado, el nivel de expresión de genes relacionados con la tolerancia a elevadas temperaturas en condiciones de estrés térmico (*AtHSA32*, *AtHSA7a*, *AtHSFB2b* y *AtHSP101*) y, por otro lado, genes involucrados en la tolerancia al estrés hídrico en condiciones de estrés hídrico (*AtRD29a*, *AtRAB18*, *AtP5CS*, *AtNCED3*, *AtHSP70*, y *AtMYB44*). En ambas situaciones, se observó que la expresión en las líneas transgénicas CaHSP16.4-OE1 y OE2 era mayor que en las plantas silvestres. Al evaluar si en condiciones de estrés combinado se mantendría el aumento en la expresión génica de los 10 genes, se apreció como siguió siendo superior su expresión en comparación con las plantas silvestres. Además, se vio un claro aumento en la supervivencia de las plantas transgénicas en comparación a las silvestres en las tres condiciones de estrés (Fig. 25). Por tanto, la expresión de CaHSP16.4 podría ayudar a la generación de cultivos con una mayor resistencia al estrés térmico e hídrico aplicado de manera individual y combinada.

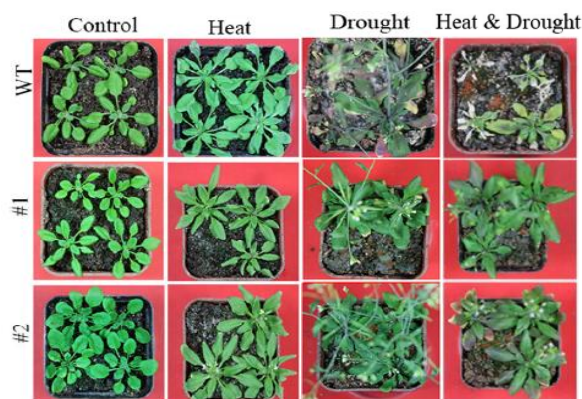


Figura 25. Sobreexpresión de CaHSP16.4 mejora la supervivencia de *Arabidopsis* en condiciones de estrés térmico, sequía y estrés combinado. Imagen obtenida de Huang et al. 2019

Balfagón et al. 2019 en su estudio realizaron un análisis transcripcional de las plantas *A. thaliana* en condiciones de estrés lumínico, térmico y combinación de ambos estreses. Se vio 3.942, 5.304 y 6.314 transcritos en condiciones de estrés lumínico, térmico y combinación de ambos estreses respectivamente aumentaron su expresión. De los 6.314 transcritos que aumentaron su expresión en condiciones de estrés combinado, 2.125 eran comunes a los inducidos en las respuestas a estrés lumínico y 3.166 eran comunes a los inducidos por estrés térmico. Por tanto, 2.239 transcritos tuvieron un aumento de su expresión únicamente bajo combinación de elevada intensidad lumínica y elevadas temperaturas. Estos resultados implicaron la existencia de una proporción considerable de cambios a nivel transcriptómico específicos de la combinación de estreses, los cuales están mayoritariamente implicados en el proceso de desintoxicación de ROS.

Se analizó el contenido de H₂O₂, ABA, SA, JA y JA-Ile, y destacó el hecho de que la cantidad de JA y JA-Ile aumentaba considerablemente en el tratamiento de combinación de estreses, en comparación con el control y las situaciones de estrés térmico y lumínico aplicados individualmente (Fig. 26D). Además, se apreció un aumento en la cantidad de H₂O₂ y ABA en condiciones de estrés térmico y combinación de estreses, y disminución de SA en todos los tratamientos de estrés (Fig. 26A, B, C). El aumento en el nivel de JA y de su conjugado Ile-JA bajo condiciones de estrés combinado, sugirió que los jasmonatos podrían estar implicados en la aclimatación de las plantas a la combinación de estreses.

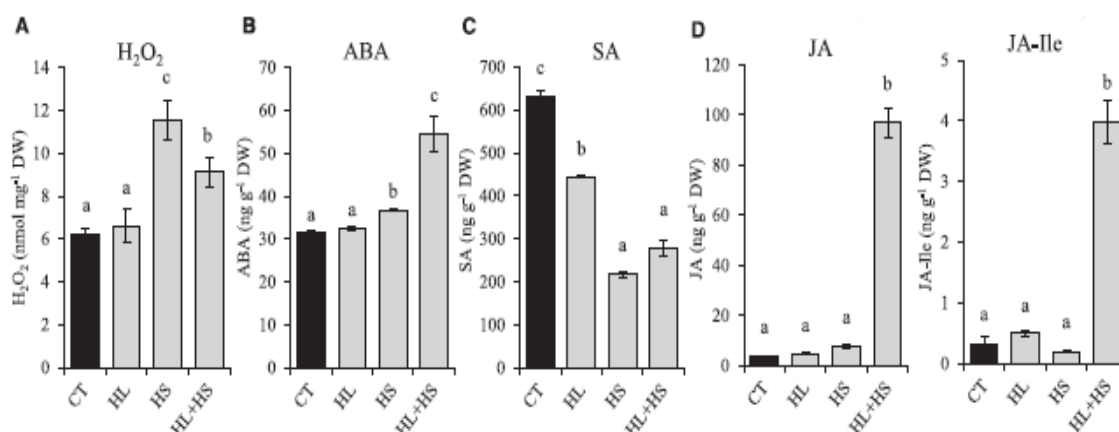


Figura 26. Nivel de (A) H₂O₂, (B) ABA, (C) SA, (D) JA y JA-Ile en plantas *Arabidopsis* sometidas a condiciones de estrés lumínico (HL), estrés térmico (HS) y estrés combinado (HL+HS). Imagen obtenida de Balfagón et al. 2019.

Basándose en lo obtenido de los niveles de JA compararon los transcritos que presentaron una expresión aumentada en su trabajo, con genes que habían sido previamente identificados en otros estudios cuya expresión era dependiente de JA. Se obtuvo que de los 6.314 transcritos regulados positivamente en condiciones de estrés cambiando, 822 eran comunes a los dependientes de la cantidad de jasmonatos y algunos de ellos eran específicos de la respuesta

a estrés combinado, lo cual reforzó la idea de que JA estaba implicado en la aclimatación de las plantas (Fig. 27A). Para evaluar si JA era esencial para la aclimatación, estudiaron las respuestas de un mutante *Arabidopsis* deficiente de JA (*aos*) en combinación de estreses. Se observó que la tasa de supervivencia y el daño foliar eran menores en *aos* que en *Arabidopsis* silvestre (*Col*) (Fig. 27B). Por lo que, los mutantes deficientes de JA fueron más sensibles a las condiciones de estrés combinado de luz y calor.

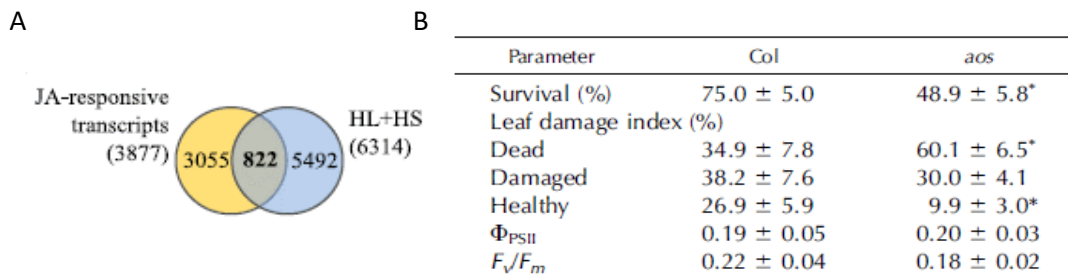


Figura 27. (A) Diagrama Veen que muestra el solapamiento entre transcritos dependiente de JA y transcritos que presentan una expresión aumentada en respuesta a combinación de estrés lumínico y térmico. (B) Parámetros de supervivencia y daño foliar en plantas *Arabidopsis* (*Col*) y mutantes deficientes de *Ja* (*aos*) sometidos a combinación de estrés lumínico y térmico. Imágenes obtenidas de Balfagón et al. 2019.

Tras estos hallazgos se demostró que el ácido jasmónico tiene un papel crucial en la tolerancia de las plantas en combinación, por lo que serían necesarios nuevos estudios que se centraran en el papel de JA y de los genes dependientes de JA en la aclimatación de las plantas ante la combinación de estrés térmico y lumínico.

La isocorismato sintasa (ICS) es una enzima clave para la síntesis del SA y para la síntesis de la filoquinona, componente del PSI importante en el transporte de electrones hasta la plastoquinona, que esta codificada por dos genes ICS1 e ICS2 en *Arabidopsis*. En estudios previos se vio que mutantes de *Arabidopsis* deficientes de ICS presentaban una mayor aclimatación a las condiciones ambientales, por ello Kumazaki and Suzuki 2019 analizaron a las respuestas moleculares de mutantes de *Arabidopsis* deficientes ICS1 (*sid2-1*) sometidos a condiciones de estrés térmico, hídrico y combinación de ambos para tratar de comprender que mecanismos favorecían la tolerancia. Las temperaturas que usaron para generar el estrés térmico fueron 40°C durante el periodo de luz (6:00-22:00) y 21°C en el periodo nocturno, y la ausencia de riego se aplicó en plantas de 10 días de edad durante 15-17 días.

Evaluaron el ratio de supervivencia de las plantas sometidas a condiciones de estrés, y se observó que las plantas *sid2-1* bajo la combinación de sequía y calor tuvieron una mayor supervivencia que a las plantas silvestres, lo cual hace que sea interesante el estudio de plantas deficientes de ICS1 para el aumento de la tolerancia. Se midió la acumulación de las proteínas del centro de reacción del PSI (PSAA y PSAB) y del PSII (D1 y D2), y de los fragmentos de 23kDA

que se generan cuando la proteína D1 está dañada y es tratada por la proteasa DEG2 para iniciar el ciclo de reparación del centro de reacción. Tanto la acumulación de D1, D2 y del fragmento de 23kDa fue mayor en las plantas *sid2-1*; en cambio, las proteínas del centro de reacción del PSI presentaron una menor acumulación en condiciones de sequía y combinación de sequía y elevadas temperaturas en comparación a los resultados obtenidos en plantas *Arabidopsis* silvestres (Fig. 28).

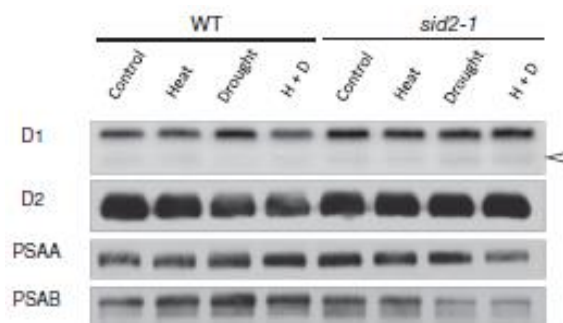


Figura 28. Acumulación de las proteínas del centro de reacción del PSI (PSAA y PSAB) y del PSII (D1 y D2) en *Arabidopsis* silvestre (WT) y deficiente de ICS1 (*sid2-1*) en condiciones de estrés térmico, hídrico y combinación de estreses. La flecha indica el fragmento de 23kDa generado en la fragmentación de D1. Imagen obtenida de Kumazaki and Suzuki 2019.

Además, se midió el nivel de expresión de los genes que codifican tanto para la D1 (PSAB) como para la D2 (SIG5 y PSBD), de los transcritos de las proteasas FTSH implicadas en la degradación de la D1 dañada y de PSAA y PSAB. A excepción de D1, el resto de transcritos aumentaron su expresión en las plantas *sid2-1* principalmente en combinación de estreses.

Por tanto, obtuvieron que la ausencia de ICS1 potenció la acción de las enzimas encargadas de la degradación de D1 dañada, y provocó una mayor acumulación y expresión de D2. Ante estos resultados los autores propusieron que los mecanismos de reparación de las proteínas del centro de reacción del PSII pudieron contribuir a la mayor tolerancia de *sid2-1* en condiciones de estrés combinado. Por otro lado, la menor acumulación de los componentes del centro de reacción del PSI pudo ser debido a que ICS es necesaria para la síntesis de la filoquinona, por lo que la ausencia de ICS1 pudo provocar la disminución del transporte de electrones en el PSI lo que pudo acelerar la degradación de las proteínas del centro de reacción del PSI bajo combinación de estrés térmico e hídrico. No se conoce como el daño en el PSI de las plantas *sid2-1* no afectó negativamente a la tolerancia de las plantas a combinación de estreses, una posibilidad que propusieron los investigadores es que el mantenimiento del PSII podría ser más relevante para las respuestas de las plantas a combinación de estreses. Ante estos hallazgos sería interesante realizar más líneas de investigación basadas en la ausencia de ICS1 para comprender la mejora de la tolerancia de las plantas, especialmente midiendo la fluorescencia de la clorofila para comprender como se ve afecta la actividad fotosintética.

5. Discusión

Al analizar los diversos resultados que han obtenido los investigadores en sus trabajos, se ha visto como el efecto que tienen las altas temperaturas varía en función del tipo de estrés con el que se combine. Se han analizado tanto las respuestas fisiológicas como las moleculares de plantas sometidas a estrés lumínico y térmico, y a estrés hídrico y térmico. Es importante el estudio de ambos tipos de respuestas, ya que la fisiología vegetal se centra en la comprensión del funcionamiento de las plantas y de los procesos vitales que regulan su crecimiento y desarrollo, pero en última instancia los cambios fisiológicos dependen de la regulación o cambios que se producen a nivel molecular.

La actividad del aparato fotosintético es de los principales factores que se vio afectado por las altas temperaturas. En los estudios centrados en las respuestas fisiológicas de las plantas en condiciones de estrés térmico y lumínico se apreció una correlación entre los resultados. Se obtuvo que inicialmente el estrés térmico no afectaba significativamente al aparato fotosintético, pero que en estreses prolongados la eficiencia de los procesos fotoquímicos del PSII y el rendimiento de la fotosíntesis disminuían significativamente. Además, en combinación con elevada intensidad lumínica había predominancia de las altas temperaturas y se acentuaban los daños en el aparato fotosintético provocando que las plantas no fueran capaces de recuperar su actividad fotoquímica.

En cambio, los estudios sobre el efecto del estrés hídrico y térmico mostraron que la sequía tuvo un efecto superior que las altas temperaturas, provocando un desequilibrio superior en la actividad fotosintética. Se observó que las plantas sometidas a combinación de ambos estreses tenían valores equivalentes a los de las sometidas únicamente a estrés hídrico, pero que la combinación de estreses producía daños más severos debido a la incapacidad de recuperar su actividad fotoquímica una vez se dejasen de aplicar los tratamientos de estrés.

Por tanto, las altas temperaturas en los estudios de estrés térmico y lumínico tuvieron un efecto predominante sobre las plantas siendo las responsables de los cambios en la actividad fotoquímica, pero en los estudios de estrés térmico e hídrico el efecto de las altas temperaturas es mínimo en comparación a los daños generados por la sequía, aunque en ambos casos la combinación de estreses potenció los daños del PSII.

En las características estomáticas también se puede apreciar que el efecto de las altas temperaturas varía en función del estrés con el que se combine. Por un lado, la combinación de luz y calor provocó la apertura de los estomas al igual que el estrés térmico aplicado individualmente y, por otro lado, la combinación de sequía y calor provocó el cierre de los

estomas como en las plantas sometidas a estrés hídrico. Estos resultados sugieren que las plantas en combinación de elevada intensidad lumínica y térmica predomina la necesidad de aumentar la transpiración para reducir la temperatura de las hojas; en cambio, la falta de agua provoca que las plantas tiendan a evitar la pérdida del contenido relativo de agua cerrando los estomas. Además, el trabajo de Zhou et al. 2020 al someter las plantas previamente tratadas a una segunda ronda de estrés térmico, observaron que las plantas que mostraron una mejora de la tolerancia fueron las que aumentaron la apertura de estomas y conductancia estomática favoreciendo el enfriamiento de las hojas, por lo que, en combinación de luz y calor podría ser interesante mecanismos que promovieran el enfriamiento de las hojas.

Los resultados obtenidos de los parámetros de intercambio de gases tanto de los estudios de estrés lumínico y térmico como los de estrés hídrico y térmico sugirieron que la reducción de la actividad fotoquímica del PSII como consecuencia de las elevadas temperaturas no fue debido a una limitación estomática, sino por daños producidos a nivel molecular en el fotosistema, ya que ni g_s ni C_i se vieron disminuidos por las altas temperaturas aplicadas de manera individual. Sin embargo, en combinación con elevada intensidad lumínica, pese a predominar los efectos de las altas temperaturas provocando la apertura estomática disminuyeron los valores de g_s y C_i , lo que implica que la combinación produjo un incremento de la reducción de la actividad fotoquímica de las plantas al combinar daños a nivel molecular y limitaciones estomáticas.

En los estudios de combinación de sequía y calor se apreciaron resultados similares, a excepción de que los efectos de la sequía superaron a las altas temperaturas. Se obtuvo que tanto los valores de P_N , g_s como C_i de las plantas sometidas a estrés hídrico como de las sometidas a combinación de estrés hídrico y térmico eran próximos a 0, por lo que la reducción de la tasa fotosintética fue debido en el caso de las plantas sometidas a estrés combinado por limitaciones estomáticas como consecuencia del cierre de estomas. Esto supone que la combinación de estreses aumentó la reducción de la actividad fotosintética al generar además de los daños producidos a nivel molecular por las altas temperaturas, la reducción de la incorporación de CO_2 que se produjo como resultados de la combinación de estreses.

El daño del aparato fotosintético a nivel molecular como consecuencia del estrés térmico que sugirieron los autores al analizar las respuestas fisiológicas de las plantas se corresponde con los resultados que obtuvieron Balfagón et al 2019 y Kumazaki and Suzuki 2019. En ambos estudios se analizó la acumulación de la proteína D1, proteína fotosensible que su daño puede provocar la fotoinhibición del PSII, y su nivel de expresión junto con otras proteínas de los fotosistemas. Balfagón et al. 2019 vieron que la acumulación de la proteína D1 disminuía especialmente en

combinación de estrés térmico y lumínico, pese a que se vieron aumentados los niveles de expresión de las proteínas implicadas en el reemplazo de D1 para evitar la fotoinhibición y los niveles de PsbA, gen que codifica para D1. Estos resultados además explicarían porque las plantas sometidas a combinación de estreses no tuvieron la capacidad de recuperar los valores de la actividad fotoquímica. En el trabajo de Kumazaki and Suzuki 2019, pese a no centrarse en estudiar el efecto de la sequía y el calor en Arabidopsis también se obtuvo que la cantidad de D1 disminuía en combinación de estrés hídrico y térmico.

En ambos estudios, observó que las plantas sometidas a estrés térmico también tenían una menor acumulación de D1 que las plantas control o las sometidas a estrés lumínico e hídrico de manera individual. Además, Raja et al. 2020 vieron que el estrés térmico produjo la inhibición de genes fotosintéticos, relacionados principalmente con la RuBisCO y su activación, cuya expresión reducida se vio aumentada en combinación con sequía.

Por lo que la combinación de estreses aumenta los daños fotosintéticos, porque además de producirse la fotoinhibición del PSII como consecuencia del daño en la proteína D1 e inhibición de genes fotosintéticos como consecuencia de las altas temperaturas se reduce la tasa fotosintética por limitaciones estomáticas generadas principalmente por la sequía o en menor medida por estrés lumínico.

Otro hecho que mostró que la combinación de estreses aumentaba los daños del aparato fotosintético fueron los valores obtenidos de los pigmentos fotosintéticos. Tanto el contenido de clorofila a como b, ya fuese en combinación de luz y calor como en combinación de sequía y calor se vieron generalmente disminuidos en todos los cultivos, cuando en los estreses aplicados de manera individual mantuvieron un nivel proporcional a control o aumentaron. La disminución del contenido de clorofilas representa el daño en los centros de reacción de los fotosistemas, y al no verse este daño a nivel de pigmentos en los estreses individuales sugiere un incremento en el daño fotosintético y que la combinación de estreses genera respuestas específicas.

La altas temperaturas se vio que también podrían estar implicadas en el hecho de que bajo estrés combinado se produzca una mayor acumulación de especies reactivas de oxígeno. Se ha visto que la actividad de las enzimas de la ruta Asa-GSH esta reducida generalmente en las plantas sometidas a estrés térmico y estrés combinado de sequía y calor, en comparación con la que presentan las plantas sometidas a estrés hídrico las cuales presentan menor acumulación de H₂O₂. Además, el ratio de GSH/GSSG disminuyó en mayor medida en estrés térmico y combinación de estreses y se sugirió que podría ser una de las principales causas de la mayor acumulación de ROS, ya que el hecho de que haya un correcto reciclaje de GSH es esencial para

la desintoxicación. Además, Huang et al. 2019 consiguieron potenciar el sistema de defensa antioxidante al sobreexpresar CaHSP16.4 lo que en parte favoreció a la mejora de la tolerancia. Lo que hace esencial la búsqueda de factores de transcripción que permitan una mayor actividad desintoxicante de ROS.

Entre las estrategias que proponen los autores para favorecer a la tolerancia de la plantas a la combinación de estreses, la más prometedora sería la de identificar factores de transcripción o proteínas que favorecieran la activación de genes implicados en la tolerancia al estrés. Ya que, la generación de transgénicos con sobreexpresión de CaHSP16.4 demostró gran eficiencia a la hora de mejorar la tolerancia a las plantas, no únicamente a estreses individuales sino también a la combinación de sequía y calor. Además, los descubrimientos de Balfagón et al. 2019 sobre el papel que desempeña el JA en la adaptación a estrés térmico y lumínico aplicados conjuntamente también resulta muy interesante. Si los futuros estudios se centran en conocer la función de los genes que presentan su expresión aumentada en combinación podría llevar a obtener nuevos factores de transcripción que mejorarían la tolerancia. Por otro lado, la propuesta realizada por Kumazaki and Suzuki 2019 necesitaría más estudios, ya que sigue sin comprenderse como la deficiencia de la enzima ICS puede favorecer a mejorar la tolerancia y no se ha visto si los daños del PSI provocan daños en la actividad fotosintética.

Una limitación que podrían tener los estudios analizados es que todos se han realizado bajo condiciones controladas en los laboratorios, y las condiciones climáticas reales a las que son sometidas los cultivos pueden ser muy variables. Por lo que, es posible que algunas de las estrategias que se consigan desarrollar para mejorar la tolerancia basadas en las respuestas obtenidas en condiciones controladas cuando se apliquen a los cultivos en el campo puedan no ser efectiva, ya que la condiciones variarían. Por ello, sería interesante que los futuros estudios también se realizaran bajo condiciones climáticas reales para respaldar los resultados que se obtienen sobre las respuestas vegetales.

6. Conclusiones

Después de comparar el efecto que tienen las altas temperaturas tanto a nivel fisiológico como molecular en combinación con elevada intensidad lumínica o déficit hídrico, se aprecia como pese a tener en común ambas combinaciones de estrés la presencia de estrés térmico las repuestas de las plantas varían en gran medida. Por un lado, se ha visto que las altas temperaturas tienen un efecto predominante sobre el estrés térmico, pero que en combinación con condiciones de sequía el déficit hídrico tiene un mayor impacto negativo sobre las plantas que las altas temperaturas teniendo un efecto predominante.

Entre las principales afectaciones que se han visto que produce el estrés térmico destaca el daño en la actividad fotosintética, al generar la reducción del contenido de proteína D1 lo que indica la fotoinhibición del PSII. No únicamente se observó la fotoinhibición por la disminución de la acumulación de D1, sino que los parámetros F_v/F_m y ϕ_{PSII} , dos de los principales indicadores de la actividad fotosintética, estuvieron disminuidos lo que sugiere que el daño que sufre el PSII es grave.

Otro de los procesos que se vieron afectados especialmente por las altas temperaturas fue la eficiencia del proceso de desintoxicación de ROS y la reducción no es debido al silenciamiento génico de las enzimas antioxidantes, sino por una actividad insuficiente aparentemente potenciada por las altas temperaturas.

La combinación de estreses produce un incremento en los daños del PSII, produciendo que además de la fotoinhibición provocada por las altas temperaturas se produzca la reducción de la tasa fotosintética por limitaciones estomáticas. Además, la combinación de estreses producen daños en los centros de reacción al reducir el contenido de la clorofila a y b.

Entre las estrategias propuestas para la mejora de la tolerancia de las plantas, destaca la búsqueda de genes que favorezcan la expresión de genes antioxidantes y de tolerancia al estrés. Por ejemplo, CaHSP16.4 demostró favorecer a la mayor actividad enzimática antioxidante y aumentar la tolerancia a la combinación de estreses. Por tanto, tras analizar los diversos artículos, para tratar de obtener cultivos tolerantes a condiciones de estrés ambiental los esfuerzos futuros se deberían centrar principalmente en evitar el daño en el PSII para que la actividad fotosintética no se viera tan afectada, estudio de factores de transcripción que favorezcan la actividad antioxidante y activación de genes sensibles al estrés, además de estudiar los genes dependiente de JA que presentaron una mayor expresión en combinación de estrés térmico y lumínico.

7. Bibliografía

- Abo Gamar, Mohammad I., Anna Kisiala, R. J. Neil Emery, Edward C. Yeung, Sophia L. Stone, and Mirwais M. Qaderi. 2019. "Elevated Carbon Dioxide Decreases the Adverse Effects of Higher Temperature and Drought Stress by Mitigating Oxidative Stress and Improving Water Status in *Arabidopsis thaliana*." *Planta* 250 (4): 1191–1214. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03213-3>.
- Baillo, Elamin Hafiz, Roy Njoroge Kimotho, Zhengbin Zhang, and Ping Xu. 2019. "Transcription Factors Associated with Abiotic and Biotic Stress Tolerance and Their Potential for Crops Improvement." *Genes* 10 (10): 1–23. <https://doi.org/10.3390/genes10100771>.
- Baker, Neil R. 2008. "Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo." *Annual Review of Plant Biology* 59 (1): 89–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>.
- Balfagón, Damián, Soham Sengupta, Aurelio Gómez-Cadenas, Felix B. Fritsch, Rajeev K. Azad, Ron Mittler, and Sara I. Zandalinas. 2019. "Jasmonic Acid Is Required for Plant Acclimation to a Combination of High Light and Heat Stress." *Plant Physiology* 181 (4): 1668–82. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00956>.
- Daszkowska-Golec, Agata, and Iwona Szarejko. 2013. "Open or Close the Gate - Stomata Action under the Control of Phytohormones in Drought Stress Conditions." *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00138>.
- Duan, Honglang, Jianping Wu, Guomin Huang, Shuangxi Zhou, Wenfei Liu, Yingchun Liao, Xue Yang, Zufe Xiao, and Houbao Fan. 2017. "Individual and Interactive Effects of Drought and Heat on Leaf Physiology of Seedlings in an Economically Important Crop." *AoB PLANTS* 9 (1). <https://doi.org/10.1093/aobpla/plw090>.
- Gerganova, Milena, Antoaneta V. Popova, Daniela Stanoeva, and Maya Velitchkova. 2016. "Tomato Plants Acclimate Better to Elevated Temperature and High Light than to Treatment with Each Factor Separately." *Plant Physiology and Biochemistry* 104: 234–41. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.03.030>.
- Gull, Audil, Ajaz Ahmad Lone, and Noor Ul Islam Wani. 2019. "Biotic and Abiotic Stresses in Plants." In *Abiotic and Biotic Stress in Plants*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85832>.
- Guo, Meng, Jin Hong Liu, Xiao Ma, De Xu Luo, Zhen Hui Gong, and Ming Hui Lu. 2016. "The Plant Heat Stress Transcription Factors (HSFs): Structure, Regulation, and Function in Response to Abiotic Stresses." *Frontiers in Plant Science* 7 (FEB2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00114>.
- Hasanuzzaman, Mirza, M. H.M. Borhannuddin Bhuyan, Taufika Islam Anee, Khursheda Parvin, Kamrun Nahar, Jubayer Al Mahmud, and Masayuki Fujita. 2019. "Regulation of Ascorbate-Glutathione Pathway in Mitigating Oxidative Damage in Plants under Abiotic Stress." *Antioxidants*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antiox8090384>.
- Hasanuzzaman, Mirza, Kamrun Nahar, Md Shahadat Hossain, Jubayer Al Mahmud, Anisur Rahman, Masashi Inafuku, Hirotsugu Oku, and Masayuki Fujita. 2017. "Coordinated Actions of Glyoxalase and Antioxidant Defense Systems in Conferring Abiotic Stress Tolerance in Plants." *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18010200>.
- Huang, Liu Jun, Guo Xin Cheng, Abid Khan, Ai Min Wei, Qing Hui Yu, Sheng Bao Yang, De Xu Luo, and Zhen Hui Gong. 2019. "CaHSP16.4, a Small Heat Shock Protein Gene in Pepper, Is Involved in Heat and Drought Tolerance." *Protoplasma* 256 (1): 39–51. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1280-7>.
- "IPCC — Intergovernmental Panel on Climate Change." n.d. Accessed May 18, 2020. <https://www.ipcc.ch/>.
- Jacob, Pierre, Heribert Hirt, and Abdelhafid Bendahmane. 2017. "The Heat-Shock Protein/Chaperone Network and Multiple Stress Resistance." *Plant Biotechnology Journal*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/pbi.12659>.
- Kumazaki, Ayana, and Nobuhiro Suzuki. 2019. "Enhanced Tolerance to a Combination of Heat Stress and Drought in *Arabidopsis* Plants Deficient in ICS1 Is Associated with Modulation of Photosynthetic Reaction Center Proteins." *Physiologia Plantarum* 165 (2): 232–46. <https://doi.org/10.1111/ppl.12809>.
- Maxwell, Kate, and Giles N. Johnson. 2000. "Chlorophyll Fluorescence—a Practical Guide." *Journal of Experimental Botany* 51 (345): 659–68. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>.
- Mittler, Ron. 2006. "Abiotic Stress, the Field Environment and Stress Combination." *Trends in Plant Science* 11 (1): 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.002>.
- Nadeem, Muhammad, Jiajia Li, Minghua Wang, Liaqat Shah, Shaoqi Lu, Xiaobo Wang, and Chuanxi Ma. 2018.

- "Unraveling Field Crops Sensitivity to Heat Stress : Mechanisms, Approaches, and Future Prospects." *Agronomy* 8 (7): 128. <https://doi.org/10.3390/agronomy8070128>.
- Pandey, Prachi, Jitender Singh, V. Mohan Murali Achary, and K. Mallireddy Reddy. 2015. "Redox Homeostasis via Gene Families of Ascorbate-Glutathione Pathway." *Frontiers in Environmental Science* 3 (MAR): 25. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00025>.
- Peleg, Zvi, and Eduardo Blumwald. 2011. "Hormone Balance and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants." *Current Opinion in Plant Biology* 14 (3): 290–95. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.02.001>.
- Raja, Vaseem, Sami Ullah Qadir, Mohammed Nasser Alyemeni, and Parvaiz Ahmad. 2020. "Impact of Drought and Heat Stress Individually and in Combination on Physio-Biochemical Parameters, Antioxidant Responses, and Gene Expression in Solanum Lycopersicum." *3 Biotech* 10 (5): 1–18. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02206-4>.
- Reynolds, Matthew, Alistair Pask, Debra Mullan, and Perla Chávez. n.d. "TRIGO Fitomejoramiento Fisiológico I: Enfoques Interdisciplinarios Para Mejorar La Adaptación Del Cultivo Federal Ministry for Economic Cooperation and Development."
- Rizhsky, Ludmila, Hongjian Liang, Joel Shuman, Vladimir Shulaev, Sholpan Davletova, and Ron Mittler. 2004. "Rizhsky et Al. 134 (4) 1683. (2004).Pdf" 134 (April): 1683–96. <https://doi.org/10.1104/pp.103.033431.1>.
- Singh, Amit Kumar, Shanmuhapreya Dhanapal, and Brijesh Singh Yadav. 2020. "The Dynamic Responses of Plant Physiology and Metabolism during Environmental Stress Progression." *Molecular Biology Reports* 47 (2): 1459–70. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05198-4>.
- Sun, Yongjiang, Yulu Gao, Hui Wang, Xinghong Yang, Heng Zhai, and Yuanpeng Du. 2018. "Stimulation of Cyclic Electron Flow around PSI as a Response to the Combined Stress of High Light and High Temperature in Grape Leaves." *Functional Plant Biology* 45 (10): 1038–45. <https://doi.org/10.1071/FP17269>.
- Suzuki, Nobuhiro. 2016. "Hormone Signaling Pathways under Stress Combinations." *Plant Signaling and Behavior* 11 (11): 1–5. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1247139>.
- Wang, Yuexia, Huanling Zhang, Pengfei Hou, Xiaoyu Su, Pengfei Zhao, Huijie Zhao, and Shuchun Liu. 2014. "Foliar-Applied Salicylic Acid Alleviates Heat and High Light Stress Induced Photoinhibition in Wheat (Triticum Aestivum) during the Grain Filling Stage by Modulating the PsbA Gene Transcription and Antioxidant Defense." *Plant Growth Regulation* 73 (3): 289–97. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-9889-9>.
- Zandalinas, Sara I., Damián Balfagón, Vicent Arbona, Aurelio Gómez-Cadenas, Madhuri A. Inupakutika, and Ron Mittler. 2016. "ABA Is Required for the Accumulation of APX1 and MBF1c during a Combination of Water Deficit and Heat Stress." *Journal of Experimental Botany* 67 (18): 5381–90. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw299>.
- Zandalinas, Sara I., Ron Mittler, Damián Balfagón, Vicent Arbona, and Aurelio Gómez-Cadenas. 2018. "Plant Adaptations to the Combination of Drought and High Temperatures." *Physiologia Plantarum* 162 (1): 2–12. <https://doi.org/10.1111/ppl.12540>.
- Zhou, Rong, Lingpeng Kong, Zhen Wu, Eva Rosenqvist, Yinlei Wang, Liping Zhao, Tongmin Zhao, and Carl Otto Ottosen. 2019. "Physiological Response of Tomatoes at Drought, Heat and Their Combination Followed by Recovery." *Physiologia Plantarum* 165 (2): 144–54. <https://doi.org/10.1111/ppl.12764>.
- Zhou, Rong, Xiaqing Yu, Xiangnan Li, Thayna Mendanha dos Santos, Eva Rosenqvist, and Carl Otto Ottosen. 2020. "Combined High Light and Heat Stress Induced Complex Response in Tomato with Better Leaf Cooling after Heat Priming." *Plant Physiology and Biochemistry* 151 (March): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.03.011>.
- Zhou, Rong, Xiaqing Yu, Carl Otto Ottosen, Eva Rosenqvist, Liping Zhao, Yinlei Wang, Wengui Yu, Tongmin Zhao, and Zhen Wu. 2017. "Drought Stress Had a Predominant Effect over Heat Stress on Three Tomato Cultivars Subjected to Combined Stress." *BMC Plant Biology* 17 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-0974-x>.
- Zhu, Jian Kang. 2016. "Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants." *Cell* 167 (2): 313–24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>.

8. Autoevaluación

Inicialmente el trabajo que iba a realizar estaba basado en mi estancia en prácticas y hubiera tratado de estudiar la función del gen WRKY48 en la tolerancia de las plantas a combinación de estrés térmico y lumínico. Estudios previos del grupo de investigación habían sugerido un posible papel del gen WRKY48 en la aclimatación de las plantas. Pero, debido a los recientes acontecimientos me fue imposible realizar dicha temática del trabajo, por lo que tuvo que hacer el cambio a un trabajo bibliográfico.

Al principio supuso un gran reto, principalmente por el nuevo enfoque que debía dar al trabajo. No esperaba encontrar tanta información sobre el tema, pero me di cuenta de que en los últimos años el interés por comprender las respuestas vegetales y buscar nuevas vías de adaptación han sufrido un aumento exponencial y me costó definir con claridad el objetivo del trabajo. Una vez conseguí establecer unos buenos criterios de búsqueda que me limitasen el número de resultados gracias a la práctica que se adquiere durante el grado, por la gran variedad de trabajos que debemos y temáticas diversas, pude desarrollar mi trabajo.

Uno de los beneficios que considero que me ha aportado poder hacer un trabajo de revisión bibliográfica es realizar una de las labores que muchas veces los alumnos no apreciamos que es la previa documentación sobre un tema para conocer sus últimos avances, parte necesaria para poder desempeñar luego un buen trabajo experimental. Además, me ha permitido ampliar mis conocimientos y profundizar en el tema de una manera que quizás un trabajo experimental no me hubiese aportado.