



Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias
Escuela de Ciencias

Profesor Patrocinante: **Dra. Susan Hess F.**
Instituto de Química
Facultad de Ciencias

Profesor Co-Patrocinante: **Prof. Magdalena Romero A.**
Instituto de Botánica
Facultad de Ciencias

**“EFECTO DEL SUPLEMENTO DE RADIACIÓN UV-B EN EL
CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE TRES ESPECIES ARBÓREAS
NATIVAS DEL SUR DE CHILE”**

**Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al Grado de
Licenciado en Ciencias Biológicas.**

RODRIGO ALEJANDRO GONZÁLEZ GUZMÁN
VALDIVIA-CHILE

2005

A Nana, Tata y Benjita...

“Cuando estés a punto de rendirte,
cuando pienses que la vida ha sido
injusta contigo, recuerda quién
eres, Recuerda tu Sueño”

(La Playa de los Sueños, Sergio
Bambarén)

Agradecimientos

Agradezco enormemente a la persona que me introdujo en el camino de la ciencia e investigación, la persona que me demostró que con pequeñas cosas uno puede hacer ciencia y que gracias a su ayuda, a su sabiduría, a sus grandes consejos, a las tardes de conversa y de trabajo me hicieron crecer y amar la ciencia... gracias por creer y confiar en mi, gracias por todo Profe Maggie.

Profe Susan, gracias por ser la patrocinante de esta tesis aunque no era lo que esperaba, se que podría haber sido mucho mejor. Gracias por su gran ayuda en la realización de este trabajo, por sus consejos que me han servido mucho, por preocuparse por mí, por tratarme casi como un hijo, por confiar y creer en mi y por tratar de que este "Biólogo" sea un "Químico".

A mi familia por ayudarme, quererme y apoyarme en todo, los quiero y amo mucho.

A MI INSTITUTO en el cual entré como una semilla y que durante todo este tiempo me vio crecer, fortalecerme y que ahora recibe uno de mis primeros frutos... "La TESIS". Profe Cristina, Profe Hetty, Profe Magaly, Jefas (Maricel y Cecilia), Profe Miren, Profe Alejandra, Griselda, Pame, Don Víctor Hugo, Don Rubén, Carola, Yessi, Alejandra, Rafael, Vivi, Yessica R. y algunos más que se me escapan en este minuto, gracias por la ayuda, los ratos de conversación y por aceptarme tal cual soy.

A Carlita, mi prima, por ayudarme en esas tardes de verano en el laboratorio donde fueron procesadas mis plantitas, gracias por ayudarme a pesarlas, contar las hojas y hacer las bolsitas de papel... ojala no te hayas aburrido.

Agradezco también al Instituto de Química, Instituto de Física, a Joel Pardo, al Dr. Ramón Formas, a Ignacio Moreno por su ayuda y uso de equipos.

A Marisol por su gran ayuda y por seguir en la senda de la fotobiología.

Gaby, Marce y Yosse gracias por apoyarme, ayudarme, kererme y por estar conmigo en las buenas y en las malas. Gracias amigas las kero mucho.

A mis amigos Vikingos y de la Huapi que siempre me han apoyado y ayudado.

A mis otros amigos Eve, Sandra, Marjo, Chokman, Dani Barría, George de la Selva, Carmen Pez, Alita de colibrí. Gracias por estar conmigo y por hacer que la U fuese más entretenida.

A mi Gorda por apoyarme en los momentos malos y buenos, por la paciencia que tenías cuando iba a Botánica y no salía más de allá, gracias por entender que la ciencia es mi pasión y por estar siempre conmigo (física o espiritualmente).

Gracias de todo, a todos y por todo.

ÍNDICE

	Pág.
Título	I
Índice	II
Índice de figuras	V
Índice de tablas	XIII
Abreviaturas	XVII
1.- RESUMEN	1
2.- SUMMARY	2
3.-INTRODUCCIÓN	3
3.1 Antecedentes generales de la radiación solar	4
3.2 Efecto de la radiación UV-B en las plantas	5
3.2.1 Pigmentos fotosintetizadores	7
3.2.2 Pigmentos absorbedores de radiación UV-B	12
3.3 Antecedentes generales sobre la emisión de fluorescencia <i>in vivo</i> de la clorofila a	17
3.4 Origen del ozono y su relación con la radiación UV-B	18
3.5 Hipótesis	23
3.6 Objetivo general	23
3.7 Objetivos específicos	23
4.- MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1 Materiales.	25
4.1.1 Lugar de desarrollo.	25
4.1.2 Material vegetal.	25

4.1.2.1 Descripción de las especies.	25
4.1.3 Clima.	27
4.1.4 Diseño experimental.	28
4.1.4.1 Tratamiento de Aclimatación.	28
4.1.4.2 Tratamiento de Desaclimatación al UV-B.	33
4.2 Determinación de parámetros de crecimiento.	33
4.2.1 Número de hojas y altura total planta	33
4.2.2 Superficie foliar	33
4.2.3. Determinación del peso fresco, peso seco y contenido hídrico	34
4.2.4. Estructura foliar	34
4.2.5 Ceniza cruda	35
4.3 Cinética de activación del aparato fotosintético	35
4.4 Análisis químicos	41
4.4.1 Determinación de pigmentos foliares	41
4.4.2 Extracción y partición de pigmentos foliares	42
4.4.3 Determinación de pigmentos foliares totales por espectrofotometría UV-visible	42
4.4.4 Determinación de pigmentos fotosintéticos	45
4.4.5 Hidrólisis	45
4.5 Determinación de Flavonoides por HPLC de fase reversa	47
4.5.1 Identificación de flavonoides	51
4.5.2 Calibración y cuantificación de flavonoides	51
4.6 Análisis estadísticos	52
5. RESULTADOS	53
5.1 Número de hojas	53

5.2	Altura	53
5.3	Superficie foliar y cuocientes de dimensión	56
5.4	Estructura foliar	56
5.5.	Peso fresco, seco y contenido hídrico	60
5.6	Redistribución de la Biomasa	60
5.7	Contenido de cenizas	64
5.8	Eficiencia fotoquímica del PSII	64
5.9	Identificación de pigmentos foliares por espectrofotometría	69
5.10	Cuantificación de pigmentos foliares totales por espectrofotometría	72
5.11	Hidrólisis	74
5.12	Identificación de estándares	74
5.13	Identificación de flavonoides	79
5.14	Calibración y cuantificación de flavonoides	84
6.	DISCUSIÓN	88
7.	CONCLUSIONES	98
8.	BIBLIOGRAFÍA	99

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	(A) Estructura molecular y (B) espectro de absorción de la molécula de clorofila.	10
Figura 2.	Estructura molecular y espectro de absorción de la molécula de carotenoide.	11
Figura 3.	Esqueleto básico de flavonoide y de algunos de los principales grupos que lo conforman. Se presentan los sistemas benzoil y cinamoil asociados a la absorción de dichos pigmentos. El anillo B o sistema cinamoil está asociado con la absorción de la Banda I, mientras que la absorción de la Banda II está relacionada con el anillo A o sistema benzoil. Flavonoles: X= OH; Ejemplos: quercetina, R ₁ =OH, R ₂ =H; kaempferol, R ₁ =H, R ₂ =H; myricetina, R ₁ =OH, R ₂ =OH. Flavonas: X= H; apigenina, R ₁ =H, R ₂ =H; luteolina, R ₁ =OH, R ₂ =H (Hertog <i>et al.</i> 1992).	14
Figura 4.	(A) Estructuras moleculares de flavonoides como Apigenina, Myricetina, Quercetina, Luteolina y Kaempferol. (B) Estructura molecular del flavonoide Rutina (quercetina glicosilada).	15
Figura 5.	Mapa del debilitamiento de la capa de ozono sobre la Antártica, obtenido del satélite EP/TOMS. Los colores grisáceos sobre la región de la Antártica y América del Sur dan cuenta de la disminución del ozono estratosférico (DU), provocado por los CFC's y permitiendo el ingreso de radiación UV-B a la superficie terrestre.	

TOMS: Total Ozone Spectrometer, sistema con el que la NASA ha equipado desde 1978 diversos satélites proporcionando un mapa global diario del contenido total de ozono. Los datos fueron tomados de la página Web del ozone Processing Team de NASA/Goddard Space Flight Center, con fecha 31 de enero de 2003 (período de estudio).

22

Figura 6. Esquema del diseño experimental donde un total de 12 plántulas de: *N. obliqua* (No), *N. alpina* (Na) y *E. cordifolia* (Ec) fueron separadas en dos grupos de seis plántulas cada uno, bajo condiciones de campo y expuesto a la radiación solar ambiental ($2.76 \text{ KJm}^{-2}\text{h}^{-1}$) (Control) y a un suplemento de radiación UV-B ambiental ($1.38 \text{ KJm}^{-2}\text{h}^{-1}$) en plantas tratadas (+UVB) durante 20 días (Aclimatación). En la Desaclimatación al exceso de radiación UV-B ambiental tres plántulas control y tres plántulas tratadas fueron mantenidas 40 días en condiciones de laboratorio. Finalizado los períodos de Aclimatación y Desaclimatación las plántulas fueron cosechadas. La dosis de radiación UV-B suplementaria, al terminó del período de Aclimatación (20 días), fue de $37.26 \text{ KJm}^{-2}\text{h}^{-1}$.

30

Figura 7. Sistema de lámparas instalado junto a la estación de monitoreo de radiación UV-B del Instituto de Física, UACH. La caseta de radiación está provista de 4 lámparas Q-Panel 313, donde fueron puestas las plántulas de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia* (Aclimatadas) (I) y junto a ellas fueron puestas las

- plántulas expuestas solamente a radiación UV-B ambiental (Control) (II). 31
- Figura 8. Espectro de emisión de la lámpara Q-panel 313 comparado con el típico espectro de irradianza de la distribución solar que alcanza Valdivia durante los periodos de invierno y verano. 32
- Figura 9. Microscopio de fluorescencia (Nikon UFX-DX OPTIPHOT-2) con filtros de extinción (330-380 μm y 380-425 μm). En su parte superior se encuentra una cámara fotográfica (NIKON FX-35DX) con la cual fueron tomadas las fotos de los cortes transversales de hojas de las tres especies estudiadas. 36
- Figura 10. (A) Fluorímetro de pulso de amplitud modulada Fluorescence Monitoring Systems FMS 1 (Hansatech, Reino Unido). (B) Pinza ad-hoc provista de una abertura en la parte superior, cubierta por una placa central móvil, sobre la cual se adapta la fibra óptica, aproximadamente, a 10 mm de distancia. En la figura C, se observa la fibra óptica puesta sobre el cabezal de la pinza, en la cual se desliza la lámina oscurecedora para permitir el paso de los diferentes pulsos de luz, emitidos por el fluorímetro. 38
- Figura 11. Cinética de emisión de fluorescencia obtenida con el fluorímetro de pulso de amplitud modulada FMS 1 (Hansatech, Reino Unido). Las flechas negras indican el encendido de la luz de medida. Las flechas negras quebradas indican los pulsos de saturación. Con las flechas rojas se indica el encendido y apagado de la luz actínica, y la flecha de color lila un pulso de rojo lejano (Figueroa & Gómez, modificado de Ulloa 2002). 40

- Figura 12. Espectrofotómetro UNICAM (serie UV500) utilizado para la medición de las absorbancias de pigmentos totales (clorofilas, carotenoides y flavonoides) presentes en el material foliar de las tres especies analizadas. Este equipo emplea dos fuentes diferentes de energía para cubrir el intervalo especificado de longitudes de onda. Una lámpara de arco Deuterio suministra la radiación ultravioleta y una de Tungsteno la radiación visible. 44
- Figura 13. (A) Sistema refrigerante de reflujo y (B) rotavapor donde se realizó el proceso de hidrólisis de los grupos hidróxidos glicosilados unidos a los flavonoides. En la figura C, se observa un matraz balón con una muestra hidrolizada de uno de los extractos alcohólicos de las especies estudiadas. 46
- Figura 14. Equipo cromatográfico HPLC Hewlett Packard 1100 Agilent de fase reversa con columna Phenomenex Luna 5 μ C₁₈ (250 x 4,60 mm; tamaño de partícula 5 μ m) de fase reversa, provista de precolumna C₁₈ 5 μ para eliminar materia en suspensión y contaminantes de los disolventes. 50
- Figura 15. Número de hojas de plántulas en estudio, cultivadas en condiciones ambientales (Control) y bajo un suplemento de radiación UV-B (+ UV-B). Las mediciones se realizaron al inicio del estudio (0 días), al finalizar el período de Aclimatación (20 días) y al término del período de Desaclimatación (60 días desde el inicio del tratamiento). n= 3. I=SE. 54
- Figura 16. Efecto del tratamiento de Aclimatación y Desaclimatación en el largo del tallo y de raíz en plántulas de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E.*

cordifolia. Las mediciones fueron realizadas al término de cada tratamiento. $n=3$. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$) entre control y + UV-B; letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre plántulas tratadas Aclimatadas y Desaclimatadas.

55

Figura 17. Autofluorescencia de ceras epicuticulares adaxial en hoja de *E. cordifolia*. **A**: material de planta control y **B**: planta tratada con un suplemento de radiación UV-B. Observaciones realizadas en corte transversal de la hoja con microscopio de fluorescencia, utilizando filtro de 340-380 nm.

59

Figura 18. Efecto de un suplemento de radiación UV-B en el peso fresco y peso seco en plántulas Aclimatadas y Desaclimatadas al exceso de radiación. Plántulas Control cultivadas bajo condiciones ambientales y las tratadas fueron mantenidas bajo un suplemento de radiación UV-B (+ UV-B). $n= 3$, $l= SE$. Letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre especies tratadas Desaclimatadas.

61

Figura 19. Parámetros de fluorescencia (F_o : fluorescencia inicial, F_m : fluorescencia máxima y F_v/F_m : rendimiento cuántico máximo) medidos en hojas nuevas y adultas de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia* (Control y + UV-B). Las determinaciones fueron realizadas al finalizar el periodo de Aclimatación (A) y después de 40 días de Desaclimatación (D). $n=8$. $l= ES$. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente

significativas ($P < 0.05$) entre control y + UV-B; letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre las plántulas tratadas Aclimatadas y Desaclimatadas.

66

Figura 20.

Parámetros de fluorescencia (ϕ PSII: rendimiento cuántico efectivo del PSII, qP: quenching fotoquímico, qNP: quenching no fotoquímico) medidos en hojas nuevas y adultas de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia* (Control y + UV-B). Las determinaciones fueron realizadas al finalizar el periodo de Aclimatación (A) y a los 40 días de Desaclimatación (D) bajo condiciones normales. $n = 8$, $l = SE$. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre control y + UV-B; letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre las plántulas tratadas (+ UV-B) Aclimatadas y Desaclimatadas.

68

Figura 21.

Espectro de absorción (200 a 500 nm) de los extractos alcohólicos en hojas de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia*, (Control y + UV-B). Determinados por un espectrofotómetro UNICAM (serie UV500) al finalizar los períodos de Aclimatación y de Desaclimatación al exceso de UV-B. Al final de la Desaclimatación *N. alpina* no desarrolló suficiente material foliar para las determinaciones.

70

Figura 22.

Espectro de absorción (300 a 700 nm) de los extractos alcohólicos en hojas de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia*, (Control y + UV-B). Determinados por un espectrofotómetro UNICAM (serie UV 500) al finalizar los períodos de Aclimatación

y de Desaclimatación al exceso de UV-B. Al final de la Desaclimatación *N. alpina* no desarrolló suficiente material foliar para las determinaciones.

71

- Figura 23. Espectro de absorción del extracto alcohólico no hidrolizado e hidrolizado de hojas de *N. obliqua*, cultivado bajo un suplemento de radiación UV-B (+ UV-B) por 20 días. Las mediciones se realizaron al finalizar del período de estudio (Desaclimatación). 77
- Figura 24. Espectro de absorción de los estándares de flavonoides empleados para la identificación de los flavonoides presentes en las muestras analizadas. Las mediciones fueron realizadas por espectrofotometría UV-visible (UV 500). 78
- Figura 25. Cromatograma de un estándar de flavonoide (Quercetina, 29.53 ppm), resuelto por HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) de fase reversa, utilizando columna Phenomenex Luna 5 μ C₁₈ (250 x 4.60 mm 5 μ), inyectando 50 μ L de muestra a un flujo de 1.0 ml min⁻¹, controlado por bomba peristáltica cuaternaria a una longitud de 350 nm con detector UV-visible, a temperatura ambiente. 81
- Figura 26. Cromatograma de Flavonoides en extracto de *Eucryphia cordifolia* (+UV-B), resuelto por HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) de fase reversa, usando columna Phenomenex Luna 5 μ C₁₈ (250 x 4.60 mm 5 μ), inyectando 50 μ L de muestra a un flujo de 1.0 ml min⁻¹, controlado por bomba peristáltica cuaternaria a una longitud de 350 nm con detector UV-visible, a temperatura ambiente. 82

Figura 27. Curvas de calibración de estándares de los flavonoides: Apigenina, Myricetina, Quercetina, Luteolina y Kaempferol obtenidos por HPLC de fase reversa a T° ambiente.

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Resumen de valores promedios de Irradianza (UV-B y Caldwell ($\text{KJm}^{-2}\text{d}^{-1}$)), Temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) y el total de las Precipitaciones (pp) de los meses de enero y febrero del año 2000 al 2003 en el lugar de trabajo (Jardín Botánico, UACH). Datos proporcionados por el Instituto de Física y Estación Meteorológica Isla Teja de la Universidad Austral de Chile.	29
Tabla 2.	Efecto del suplemento de radiación U-VB en la superficie foliar y cuocientes de dimensión en órganos foliares de <i>N. obliqua</i> , <i>N. alpina</i> y <i>E. cordifolia</i> . Las mediciones fueron realizadas al término del período de Desaclimatación (Control y + UV-B). $n=10. \pm \text{SE}$.	57
Tabla 3.	Efecto de la radiación suplementaria UV-B en la estructura foliar de <i>N. obliqua</i> , <i>N. alpina</i> y <i>E. cordifolia</i> (Control y + UV-B). Las mediciones fueron realizadas en hojas adultas al finalizar el periodo de Desaclimatación. *Existe diferencia estadística significativa $P < 0.05$. $n = 10. \pm \text{SE}$.	58
Tabla 4.	Efecto del suplemento de radiación UV-B en el contenido hídrico (%PF) en plántulas de <i>N. obliqua</i> , <i>N. alpina</i> y <i>E. cordifolia</i> , (Control y + UV-B). $n = 3. \pm \text{SE}$.	62
Tabla 5.	Efecto del suplemento de radiación UV-B en la redistribución de asimilados (%PS) en los diferentes órganos de las plantas estudiadas. Datos medidos al finalizar los períodos de Aclimatación (20 días) y Desaclimatación al suplemento de	

	radiación UV-B (40 días). Plántulas cultivadas bajo condiciones ambientales (Control) y bajo un suplemento de radiación UV-B (+ UV-B). n=3.	63
Tabla 6.	Efecto del suplemento de radiación UV-B en el contenido de cenizas (Materia Inorgánica), obtenidos de 1 g de PS y calcinado a 600°C. Los resultados fueron expresados en %PS. Las mediciones de plántulas Control y + UV-B se realizaron al finalizar los períodos de Aclimatación y de Desaclimatación al tratamiento. n= 3. \pm SE.	65
Tabla 7.	Concentración de pigmentos fotosintetizadores (mg/gPF) en hojas de plántulas de <i>N. obliqua</i> , <i>N. alpina</i> y <i>E. cordifolia</i> (Control y + UV-B). Determinados según el método de Lichtenthaler & Wellburn (1983), por medio, de espectrofotometría UV-Visible a 666 y 653 nm al finalizar los períodos de Aclimatación y Desaclimatación. n= 2. \pm SE.	73
Tabla 8.	Concentración de carotenoides (mg/gPF) en hojas de plántulas de <i>N. obliqua</i> , <i>N. alpina</i> y <i>E. cordifolia</i> (Control y + UV-B). Determinados según el método de Lichtenthaler & Wellburn (1983), por medio de espectrofotometría UV-Visible a 470 nm al finalizar los períodos de Aclimatación y Desaclimatación. n= 3. \pm SE.	75
Tabla 9.	Valores promedios de absorbancia máxima de flavonoides totales (u.a.) extraídos de hojas de tres especies cultivadas bajo condiciones ambientales (Control) y bajo un suplemento de radiación UV-B (+ UV-B). Estas absorbancias fueron	

determinadas en espectrofotómetro UNICAM UV500 a una longitud de onda entre 200 y 500 nm. $n=2. \pm SE$.

76

Tabla 10.

Tiempos de retención (min) de estándares de flavonoides analizados en HPLC de fase reversa, provisto de precolumna y columna C_{18} , se inyectó un volumen de 50 μ l de muestra del estándar (Quercetina, Apigenina, Kaempferol, Luteolina y Myricetina: 29.53, 11.80, 10.27, 2.73 y 1.00 ppm, respectivamente) a un flujo de 1.0 $mlmin^{-1}$. Los estándares fueron detectados a una longitud de onda de 350 nm con detector UV-visible, a temperatura ambiente y con solvente $H_2O/ACN + TFA$.

80

Tabla 11.

Tiempos de retención (min) de extractos de pigmentos protectores obtenidos de hojas de plántulas de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia* expuestas a UV-B ambiental (C: control) comparadas con plántulas sometidas a un incremento de radiación UV-B (+). Las mediciones fueron realizadas inmediatamente después de finalizado el tratamiento (plántulas Aclimatadas al estrés UV-B) y luego de 40 días de haber terminado el tratamiento (plántulas Desaclimatadas). Los tiempos de retención de las señales obtenidas son referidos a los tiempos de retención de los estándares en estudio determinados por HPLC. $n= 2$.

83

Tabla 12.

Concentración de flavonoides (ppm) en plántulas Control y tratadas (+ UV-B) con un suplemento de radiación UV-B. Determinaciones realizadas al finalizar los períodos de

Aclimatación y Desaclimatación. Los estándares Luteolina y Kaempferol no fueron detectados. La Quercetina detectada incluye a Rutina hidrolizada.

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Aclimatación
Abs	Absorbancia
Atm	Atmósfera
°C	Grados centígrados
Chla	Clorofila <i>a</i>
Chlb	Clorofila <i>b</i>
cm ²	Centímetro cuadrado
D	Desaclimatación
DU	Unidad Dobson
F _m	Fluorescencia máxima o potencial de una planta adaptada a oscuridad
F _m '	Fluorescencia máxima real o efectiva de una planta adaptada a la luz
F _o	Fluorescencia mínima o inicial
F _v	Fluorescencia variable
F _v /F _m	Eficiencia fotoquímica máxima del PSII
gPF	Gramos de peso fresco
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”, Cromatografía líquida de alta resolución
HR	Humedad relativa
IL	Intensidad lumínica
K	Grados Kelvin
KJ	Kilojoule
Km	Kilómetro
m ²	Metro cuadrado

μg	Microgramos
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
ND	No detectado
nm	Nanómetro
ODS	Octildecil silano
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
ΦPSII	Rendimiento efectivo del PSII
pp	Precipitación
ppm	Partes por millón
PSII	Fotosistema II
PF	Peso Fresco
PS	Peso Seco
qP	Coefficiente de “quenching” o apagamiento fotoquímico
qNP	Coefficiente de “quenching” o apagamiento no fotoquímico
rETR	Tasa relativa de transporte de electrones
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SE	Error estándar
SM	Sin muestra
T°	Temperatura
UV	Ultravioleta
u.a.	Unidad de absorbancia

1.- RESUMEN

La reducción del ozono estratosférico ha incrementado la dosis de radiación ultravioleta-B que alcanza la superficie terrestre, especialmente sobre el hemisferio sur, afectando las especies arbóreas de ecosistemas naturales del centro-sur de Chile. En este estudio se determinó el efecto provocado por un suplemento de radiación UV-B ambiental en el crecimiento y desarrollo de *Nothofagus obliqua*, *Nothofagus alpina* y *Eucryphia cordifolia*. Plántulas cultivadas en condiciones de campo fueron Aclimatadas a un suplemento de UV-B de $1.4 \text{ KJm}^{-2}\text{h}^{-1}$ por 2 hrs. durante 8 días y por 1 hr durante 11 días. Plántulas control fueron excluidas del suplemento UV-B. Para evaluar la capacidad de recuperación, la mitad de las plántulas tratadas se Desaclimataron durante 40 días. Finalizado los tratamientos se analizaron parámetros morfo-anatómicos, fisiológicos y químicos. Los patrones de respuesta al tratamiento fueron específicos y, en general, se mantuvieron después de 40 días de Desaclimatación, encontrándose que la radiación UV-B afecta positivamente la biomasa de *N. alpina* y negativamente la de *E. cordifolia*, mientras la de *N. obliqua* no fue alterada. F_o , F_m , F_v/F_m , ϕPSII , qP y qNP no fueron afectados aunque el contenido de pigmentos fotosintéticos en *N. obliqua* se redujo significativamente y en *N. alpina* y *E. cordifolia* se incrementó. La resistencia al suplemento de radiación UV-B ambiental constatada en *N. obliqua* y, especialmente, en *N. alpina* no se asoció con los contenidos de flavonoides. Sin embargo, la fluorescencia observada en los cortes transversales de hojas evaluados sugiere la presencia de otros tipos de pigmentos filtradores. La concentración de Myricetina, Apigenina y Quercetina fue reducida por acción del UV en las tres especies estudiadas, con excepción de Quercetina que aumentó en *E. cordifolia*.

2.- SUMMARY

Stratospheric ozone depletion has increased the ultraviolet-B radiation dose that reaches the terrestrial surface, specially on the southern hemisphere, affecting arboreal species of natural ecosystems of the center-south of Chile. In this study the effect caused by an environmental UV-B radiation supplement in the growth and development of *Nothofagus obliqua*, *Nothofagus alpina* and *Eucryphia cordifolia* was determined. Plants cultivated under field conditions were acclimatized to enhanced UV-B of $1.4 \text{ KJm}^{-2}\text{h}^{-1}$ by 2 hrs during 8 days and followed by 1 hr during 11 days. Control plants were excluded from the UV-B supplement. To evaluate the recovery capacity, half of the treated plants were reacclimatized during 40 days. Concluded the treatments, morpho-anatomical, physiologic, and chemical parameters were analyzed. The result patterns to the treatment were specific and, in general, they remained after 40 days. The radiation UV-B affects the biomass of *N. alpina* positively and *E. cordifolia* negatively, while *N. obliqua* was not altered. F_o , F_m , F_v/F_m , ϕPSII , qP and qNP fluorescence parameters were not affected although the photosynthetic pigment contents in *N. obliqua* decreased significantly and in *N. alpina* and *E. cordifolia* increased. The observed resistances to the environmental UV-B radiation supplement in *N. obliqua* and, specially, in *N. alpina* was not associated to flavonoid contents. Fluorescence microscopy experiments on edges of cut leaves suggest the presence of other types of UV-B absorbing pigments. The concentration of Myrecitin, Apigenin and Quercetin by UV-B action in the three species decreased, except Quercetin in *E. cordifolia* which increased.

3.- INTRODUCCIÓN

El sol, con una temperatura de 6000 K en su superficie, emite la mayor parte de la energía a través de ondas electromagnéticas, cuyas longitudes van desde los 100 a 100.000 nm. La radiación solar es la principal fuente de energía de la que dispone el planeta para el desarrollo de sus actividades vitales. Tiene efectos fisiológicos y térmicos, especialmente, sobre organismos fotoautótrofos como los vegetales, que son absolutamente dependientes de esta fuente energética, influyendo sobre la fotosíntesis y el metabolismo, y por lo tanto, en la producción de biomasa, además de la composición y estructura de la vegetación, en el espacio y el tiempo (Hopkins 1999, L'Hirondelle & Binder 2002, Steubing *et al.* 2001).

La fotosíntesis es el proceso donde los vegetales captan la energía lumínica por medio de las clorofilas transformándola en energía química. Este proceso es accionado por la región del espectro solar que se encuentra entre los 400 y 700 nm, región conocida como PAR (Photosynthetically Active Radiation) (Taiz 2002). Respecto a otros organismos, los vegetales son especialmente vulnerables a los cambios en los niveles de radiación que alcanzan la superficie terrestre, debido a que están fuertemente afectadas por la naturaleza e intensidad de la energía solar durante toda su vida (Greenberg *et al.* 1997, Moore *et al.* 1998, Hess *et al.* 2002). Es así que en algunas especies, menos resistentes a estas variaciones, se observa disminución del proceso fotosintético y un declive en la productividad tanto de algunas especies de cultivos (Teramura *et al.* 1983) como de especies arbóreas (Sullivan & Rozema 1999).

Entre las respuestas que puede presentar un vegetal expuesto a algún tipo de estrés como el luminoso, están la adaptación y la aclimatación. La adaptación se

relaciona con una respuesta evolutiva, como resultado de modificaciones genéticas heredables (cambios morfológicos y/o fisiológicos), aumentando la aptitud del organismo frente al estrés ambiental que la genera. La aclimatación al igual que la adaptación implica cambios morfológicos y/o fisiológicos a causa de una exposición gradual a una alteración ambiental. Sin embargo, tales cambios no son heredables y pueden ser reversibles. Al respecto, Lambers *et al.* (1998) y Hopkins (1999) sostienen que la capacidad de aclimatación responde a una característica genética.

3.1 Antecedentes generales de la radiación solar

Dentro de los elementos que forman parte del espectro solar se encuentra la radiación Ultravioleta (UV), que abarca longitudes de onda corta desde los rayos X (100 nm) hasta la región visible (400 nm). Esta radiación se caracteriza por su alta frecuencia y alto nivel energético (Björn 1999, Madronich *et al.* 1998). El 7% de la radiación electromagnética emitida por el sol está dentro del rango UV (100-400 nm) (Frohnmeier & Staiger 2003). Sin embargo, la atmósfera reduce fuertemente este flujo modificando así la composición de la radiación UV que llega a la superficie terrestre, la que también puede ser afectada por factores estacionales, geográficos y meteorológicos. La radiación UV según sus características espectroscópicas se subdivide en tres tipos: UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) y UV-C (100-280 nm).

La radiación UV-A, que es débilmente absorbida por el ozono estratosférico, alcanza la superficie terrestre y ocasiona en las plantas diferentes reacciones fotoquímicas (Caldwell 1978, Björn 1999). El nivel de esta radiación se mantiene relativamente constante, no siendo afectada mayormente por factores latitudinales,

altitudinales o estacionales (Greenberg *et al.* 1997).

La radiación UV-B es absorbida parcialmente por el ozono estratosférico y, por lo tanto, sólo una pequeña proporción es transmitida a la superficie terrestre variando según altitud, latitud, ángulo de incidencia del sol y reflectancia solar de la atmósfera que varía con la presencia de diferentes partículas que provocan su enturbamiento (Farman *et al.* 1985, Lissy & Sanhueza 1996, Herman & McKenzie 1998). En general, las plantas son menos sensibles a la radiación UV-A que a la UV-B (Ormrod & Hale 1995).

La radiación UV-C altamente energética y muy peligrosa para todo ser vivo, es absorbida completamente por el oxígeno molecular y parcialmente por el ozono atmosférico, no alcanzando la superficie terrestre (Madronich 1992, Unep 1998, L'Hirondelle & Binder 2002, Frohnmeyer & Staiger 2003). La relación fotónica entre la luz fotosintéticamente activa (PAR), radiación UV-A y radiación UV-B, que atraviesa la atmósfera, es aproximadamente de 100:10:1.

La llamada radiación ultravioleta biológicamente efectiva o Caldwell (300-320 nm) es capaz de provocar daños letales en los organismos vegetales, representa sólo el 5% de la radiación UV y el 0.25% de toda la radiación solar que llega a la superficie terrestre.

3.2 Efecto de la radiación UV-B en las plantas

La radiación UV-B, integrante normal del espectro solar, ha estado siempre presente sobre la superficie terrestre, por lo cual, las especies vegetales han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia. Estos mecanismos pueden ser

evasivos o de tolerancia, implican cambios morfo-anatómicos (número de hojas, engrosamiento de las hojas, formación de tricomas, etc.), fisiológicos (variación de la tasa fotosintética, etc.) hasta cambios bioquímicos (síntesis de pigmentos secundarios, formación de proteínas, etc.) con lo cual disminuyen los efectos dañinos de esta peligrosa radiación (Tevini *et al.* 1989, Rozema *et al.* 1999).

Los principales blancos del UV-B en el reino vegetal son: ADN, proteínas, lípidos, membranas, maquinaria fotosintética, pigmentos fotosintéticos y fitohormonas (Wang 1997, Jansen *et al.* 1998, Rozema *et al.* 1999, Frohnmayer & Staiger 2003). El ADN es el blanco más sensible a la radiación UV-B, ya que un único fotón que afecte a una molécula única de ADN puede dar lugar a efectos dramáticos y en ocasiones letales, sin embargo, las plantas poseen enzimas específicas con capacidad de reparar en forma efectiva muchas de estas lesiones (Greenberg *et al.* 1997).

Numerosos estudios señalan que la radiación UV-B reduce el tamaño de las hojas limitando el área de captación de la energía luminosa afectando negativamente el crecimiento en longitud del tallo. Probablemente, debido a que la síntesis de fitohormonas y metabolitos secundarios, en parte responsable de estas modificaciones se ve afectada (Tevini *et al.* 1989, Jansen *et al.* 1998, Rozema *et al.* 1999, Balkenhol 2002). Estos resultados son sustentados por los estudios realizados en *Nothofagus solandrii* y *Sophora microphylla* crecidos bajo el efecto de la radiación UV-B (Hunt & McNeil 1999, Hess *et al.* 2002). Sin embargo, Ballaré *et al.* (2001) han reportado que especies arbóreas y caducifolias del Hemisferio Sur no son afectadas mayormente por la radiación UV-B.

Cambios en la forma, volumen y número de células foliares alteran el régimen de

radiación interna (Jansen *et al.* 1998). En muchas especies crecidas bajo altos niveles de radiación UV-B se ha observado el incremento del grosor de la hoja afectando la trayectoria de los fotones (Bornman 1999). Ya que la anatomía de la hoja influye sobre la distribución de la radiación, la epidermis adaxial es claramente, responsable de la atenuación de la radiación UV-B, que alcanza la maquinaria fotosintética. Sin embargo, no existe una explicación clara para el incremento en la epidermis abaxial en *Brassica napus* (Olsson *et al.* 1998). La presencia de tricomas epidérmicos, importante en hojas inmaduras de ciertas especies, también aumentan la capacidad de absorción de la radiación UV-B (Karabourniotis *et al.* 1995, Karabourniotis *et al.* 1999b), mientras el tejido esponjoso tiende a actuar más como una capa difusoria (Bornman 1999).

Otro de los efectos provocados por el efecto de la radiación UV-B es la variación de los pigmentos foliares. En hojas de *S. microphylla* se incrementan los contenidos de pigmentos fotosintéticos y absorbedores por efecto del tratamiento UV-B aunque la biomasa se redujo (Hess *et al.* 2002); mientras, que en tres especies de *Nothofagus* (*N. pumilio*, *N. betuloides* y *N. antarctica*) sólo se observa un incremento en la concentración de pigmentos absorbedores (Ballaré *et al.* 2001).

En *Laurelia sempervirens*, especie nativa del sur de Chile, se encontró un aumento en los contenidos de pigmentos foliares por efecto del suplemento de radiación UV-B ambiental (Carvajal 2005, comunicación personal).

3.2.1 Pigmentos fotosintetizadores

Los pigmentos de mayor importancia en la absorción de luz, ubicados en las membranas tilacoidales, son las clorofilas. Su color es verde ya que absorben todas las

longitudes de onda de la luz visible excepto el verde, el cual es reflejado y percibido por nuestros ojos (Hernández 2001). Además, presentan estructuras policíclicas planas estables, formados por cuatro anillos pirrólicos cíclicos con un anillo de ciclopentanona fusionado al pirrol III, donde los cuatro átomos de nitrógeno que poseen estos cuatro anillos están coordinados con un átomo de Mg^{+2} , además, posee una cadena terpenoide constituida por el alcohol fitol, esterificado en el cuarto anillo. Este alcohol de 20 átomos de carbono con un doble enlace ($C_{20}H_{39}OH$) confiere a la molécula la característica de ser altamente hidrofóbica (Fig. 1 A). En los cloroplastos, encontramos tanto clorofila *a* como *b*. Si bien las dos son verdes, varían en el grupo unido al anillo pirrólico II, la clorofila *a* presenta un grupo metilo ($-CH_3$), mientras que la clorofila *b* presenta un grupo formilo ($-CHO$). La gran eficiencia que presentan estas moléculas como fotorreceptores se debe a la presencia alternante de enlaces simples y dobles en su estructura (Andreo 1984). Las clorofilas presentan máximos de absorción en la región visible del espectro, pero difieren en sus espectros de absorción ya que absorben la luz en dos regiones del espectro, cerca de los 400 nm y desde los 600 a 1100 nm, variando y dependiendo un poco de los diferentes estados de agregación de las moléculas de clorofila o a las proteínas a las cuales estén asociadas (Fig 1 B). Participan en una función biológica fundamental, la fotosíntesis, absorbiendo la energía que la luz solar emite como fotones y transformándola en energía química.

La alta irradiación de UV-B combinada con un bajo nivel de PAR provoca reducción significativa en los contenidos de clorofila. Ello debido, posiblemente, a la fotooxidación de la clorofila por acción de la radiación UV-B o a la inhibición de su biosíntesis. Además, se ha reportado aumento en la relación clorofila *a/b*, debido a que

la radiación UV-B afecta, preferentemente, a la clorofila *b* (Kulandaivelu *et al.* 1996).

A pesar de que las clorofilas son cuantitativamente las moléculas fotorreceptoras que predominan en las plantas, existen también pigmentos accesorios como los carotenoides (antioxidantes biológicos) que se encuentran, también, en las membranas tilacoidales en las plantas superiores (Andreo 1984, Cogdell & Frank 1987, Taiz 2002).

Los carotenoides o carotenos son terpenoides constituidos por largas cadenas poliisoprenoides, con dobles enlaces conjugados que poseen en ambos extremos anillos de ciclohexano sustituidos. Debido a éstas características son fuertes cromóforos. Cada cromóforo es responsable del espectro de absorción característico y del color de la molécula (Britton & Goodwin 1971, Andreo 1984, Stryer 2002). Además, poseen máximos de absorbancia a longitudes de onda distintas de las clorofilas y actúan como moléculas receptoras de luz suplementarias en regiones del espectro en que las clorofilas no tienen absorción, aumentando de esa manera la eficiencia con que las células fotosintetizadoras aceptan la luz (Fig. 2).

Aunque estos pigmentos intervienen en la captación de energía lumínica, su papel como pigmentos fotoprotector es importante para la mantención de la función fotosintética en hábitats expuestos a altas intensidades lumínicas (Rau 1988). Esta protección se debe a que los carotenoides pueden apagar (quenchar) directamente el estado triplete de la clorofila (^3Chl), previniendo con esto la producción de singletes de oxígenos ($^1\text{O}_2$) o bien apagándolos (Niyogi 1999, Zúñiga 2003), evitando de este modo que el $^1\text{O}_2$ estimule la formación de otras especies reactivas de oxígeno tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido (O_2^-) y radicales como hidroxilos (OH), moléculas que son altamente destructoras de lípidos de membranas, proteínas y ácidos

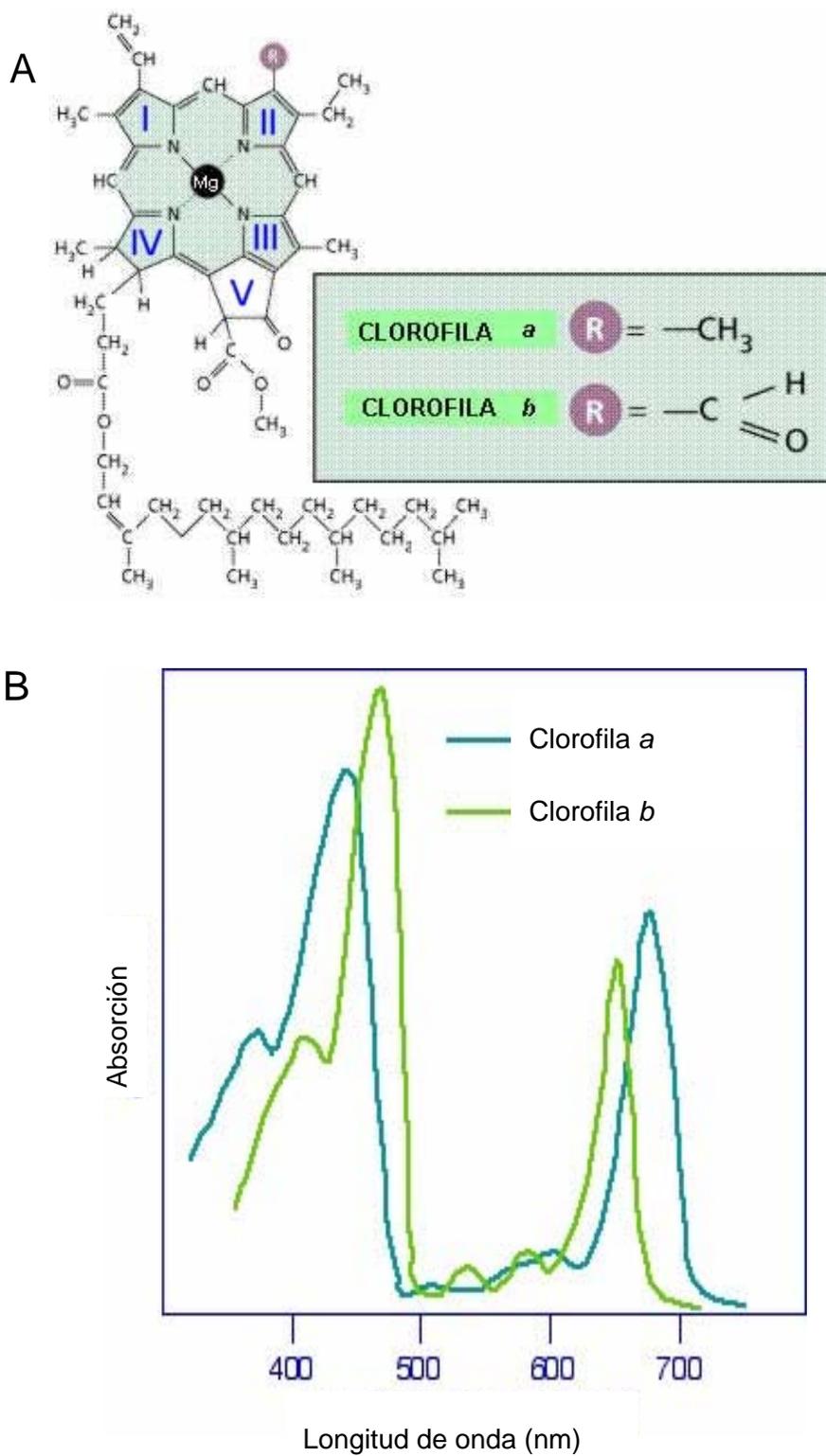


Fig. 1.- (A) Estructura molecular y (B) espectro de absorción de la molécula de clorofila.

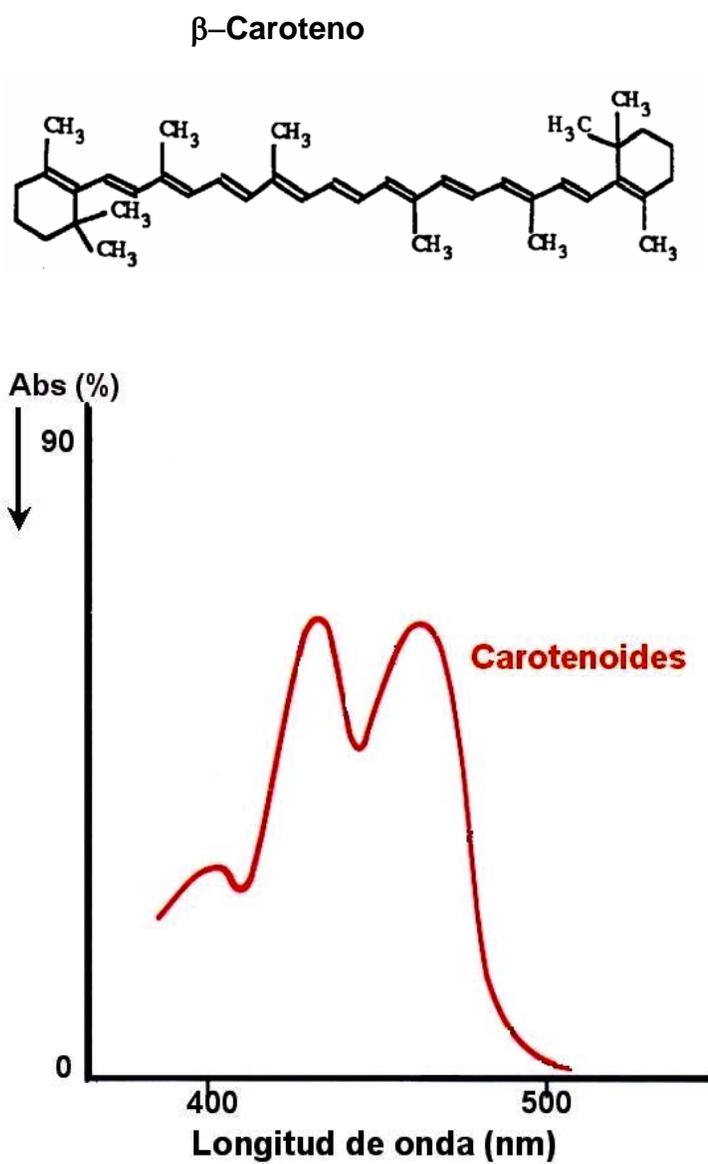


Fig. 2.- Estructura molecular y espectro de absorción de la molécula de carotenoide.

nucleicos (Olsson *et al.* 1998, Borman 1999, Martínez-Florez *et al.* 2002). La función de estos radicales libres es la de oxidar las macromoléculas absorbiendo electrones para que estos queden apareados, y así estabilizarse en un proceso oxidativo que constituye una cadena y que es, en sí mismo, dañino. El origen de estos radicales pueden ser: pesticidas, contaminación ambiental y radiación ultravioleta (Bornman 1999). Sin embargo, el peróxido de hidrógeno y el O_2^- son requeridos en los vegetales para procesos como la lignificación y como señales contra patógenos (Buchanan *et al.* 2000).

Gotz *et al.* (1999) y Greenberg *et al.* (1997) reportaron incrementos en el contenido de carotenoides de algunas especies vegetales, por efecto del aumento de radiación UV-B, donde actúan como filtro natural UV-B evitando el fotoblanqueamiento de la clorofila, y como antioxidante inactivando posibles radicales libres generados por acción del UV-B.

Los carotenoides, con respecto a las clorofilas, son menos afectados por la radiación UV-B, lo que se explicaría por su rol fotoprotector en el aparato fotosintético (Kulandaivelu *et al.* 1996). En general, por efecto de la radiación UV-B, se observa una disminución del contenido de clorofilas y carotenoides en plantas (Ormrod & Hale 1995).

3.2.2 Pigmentos absorbedores de radiación UV-B

Las plantas superiores sintetizan una amplia variedad de compuestos fenólicos durante su crecimiento y desarrollo. Una de las modificaciones a nivel bioquímico que se inducen en las plantas por acción de la radiación UV-B, es la síntesis de flavonoides. Estos compuestos son moléculas planas de bajo peso molecular que comparten un esqueleto básico de 15 carbonos ($C_6-C_3-C_6$), compuesto por dos anillos de fenilos (A y

B) unidos por un enlace de tres carbonos formando un anillo pirónico (Martínez-Florez *et al.* 2002) que absorben las longitudes de onda corta del espectro solar (Taiz 2002) (Fig. 3).

Esta estructura proviene de la ruta biosintética del ácido fenilpropanoide y resulta de dos vías biosintéticas separadas, llamadas vía del ácido shikímico y vía del ácido malónico. Los átomos de carbono en los anillos A y C se enumeran desde el número 2 al 8, sin embargo, los del anillo B van desde el 2' al 6'.

Existen diferentes grupos de flavonoides, tales como flavonas, flavonoles, flavanos, etc., los cuales difieren sólo en el estado de oxidación del puente de tres carbonos. Los compuestos que pertenecen a cada tipo de flavonoides difieren entre sí en el número y orientación de los grupos sustituyentes en los anillos bencénicos. Los grupos hidroxilos (OH) están usualmente presentes en las posiciones 4', 5' y 7, del mismo modo pueden encontrarse en otras posiciones. Los que presentan algún grupo hidroxilo en el anillo B del esqueleto de flavonoides, obtienen una actividad antioxidante potencialmente acrecentada en comparación de aquellos que no lo poseen (Olsson *et al.* 1998), además, este esqueleto básico puede tener numerosos sustituyentes (Fig. 4-A).

Los glucósidos son compuestos químicos complejos que se encuentran en los vegetales y descompuestos a azúcares por enzimas vegetales, estos azúcares se unen a la estructura del flavonoide (glicosila), contribuyendo a darle color a las flores, frutos y hojas (Montes 1992).

La ventaja de esta glicosilación de los flavonoides es la mejorada solubilidad en agua y la mayor estabilidad química de los glucósidos (Fig. 4-B). Los azúcares que más

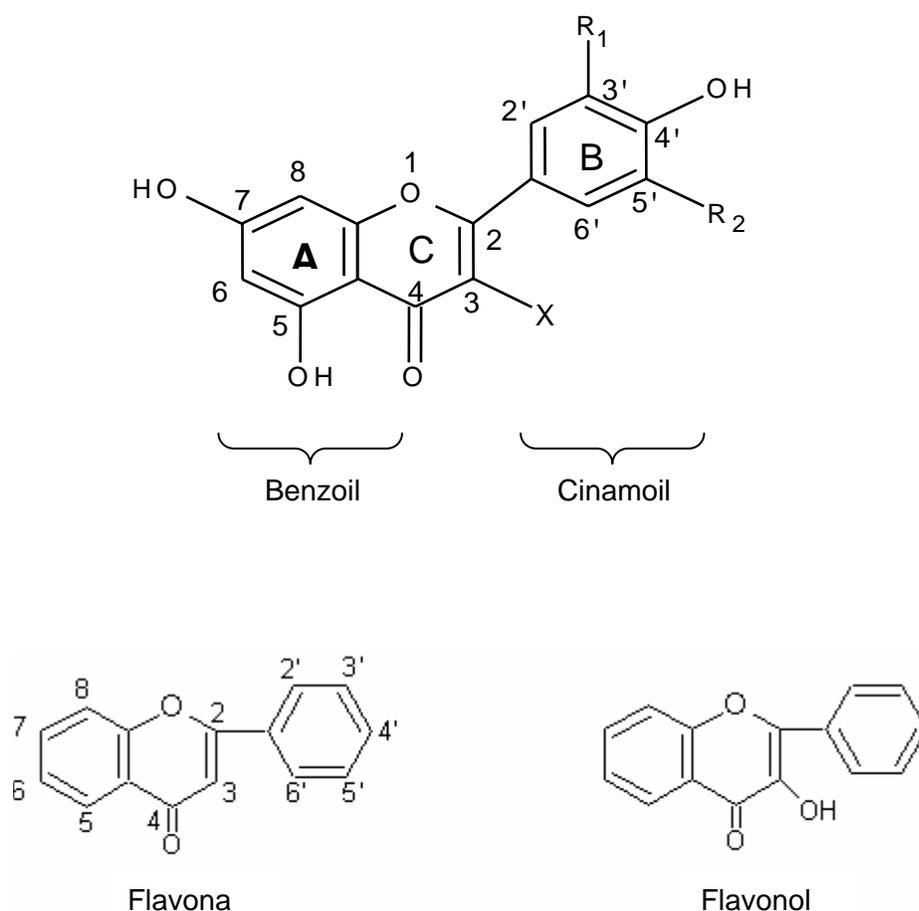


Fig. 3.- Esqueleto básico de flavonoide y de algunos de los principales grupos que lo conforman. Se presentan los sistemas benzoil y cinamoil asociados a la absorción de dichos pigmentos. El anillo B o sistema cinamoil está asociado con la absorción de la Banda I, mientras que la absorción de la Banda II está relacionada con el anillo A o sistema benzoil. Flavonoles: X= OH; Ejemplos: quercetina, R₁=OH, R₂=H; kaempferol, R₁=H, R₂=H; myricetina, R₁=OH, R₂=OH. Flavonas: X= H; apigenina, R₁=H, R₂=H; luteolina, R₁=OH, R₂=H (Hertog *et al.* 1992).

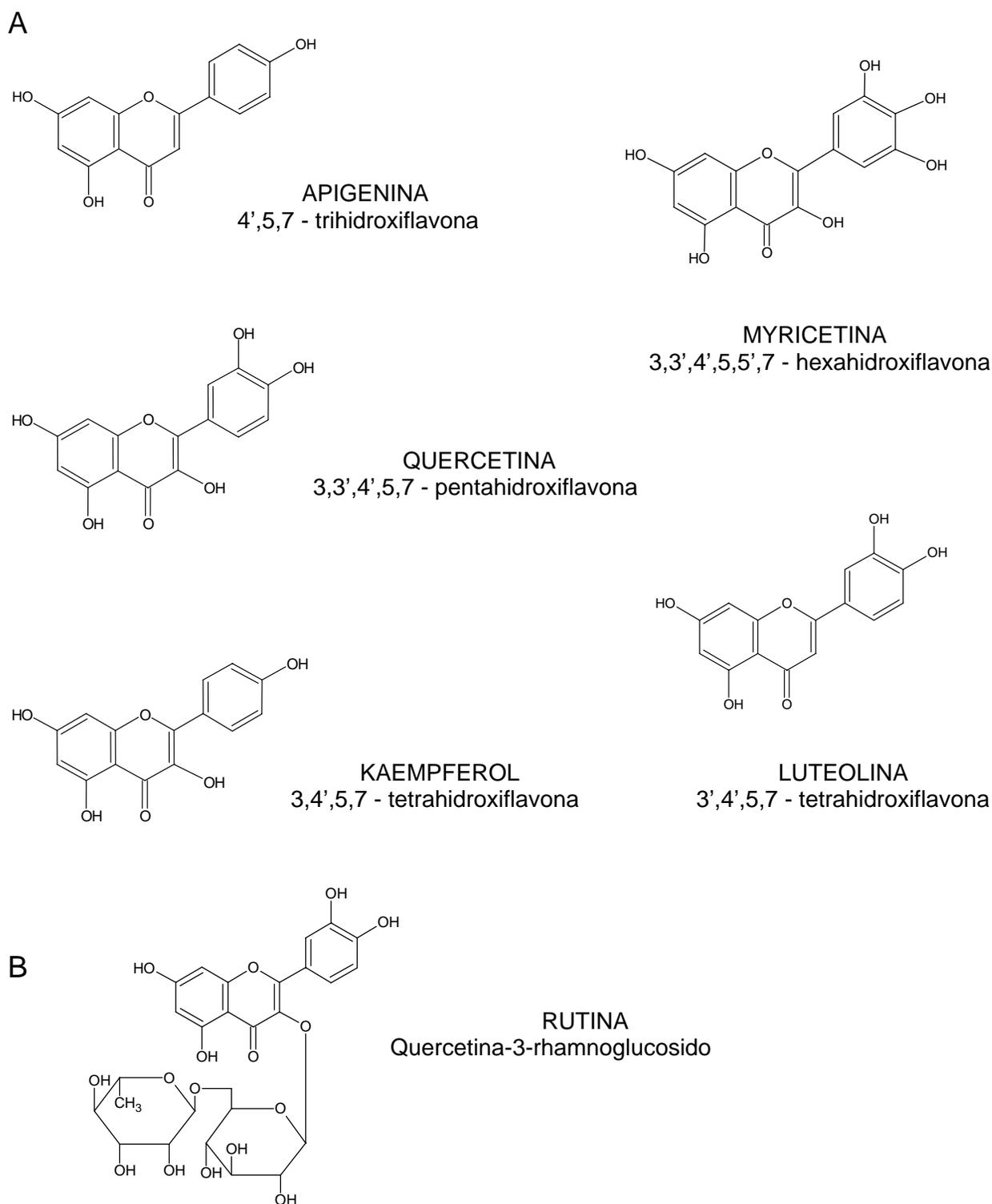


Fig. 4.- (A) Estructuras moleculares de flavonoides como Apigenina, Myricetina, Quercetina, Luteolina y Kaempferol. (B) Estructura molecular del flavonoide Rutina (quercetina glicosilada).

frecuentemente se unen a los flavonoides son D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, L-arabonosa, D-xilosa y D-glucurónido, como O-heterósido o C-heterósidos (Martínez-Florez *et al.* 2002).

Estos pigmentos, se caracterizan al igual que los carotenoides por su carácter antioxidante, es decir, apagar (quenchar) los radicales libres altamente oxidantes y tóxicos para las células (Olsson *et al.* 1998, Borman 1999, Martínez-Florez *et al.* 2002). Debido al daño que produce la oxidación, el organismo desarrolla sistemas antioxidantes que operan a través de moléculas que protegen las estructuras biológicas impidiendo que sean oxidadas. Cuando el equilibrio que existe entre antioxidantes y oxidantes se pierde a favor de los radicales libres, se cae en un estrés oxidativo.

Los flavonoides son las moléculas que entregan sus electrones a los radicales libres, poniendo fin a la cadena de oxidación (Cadena 1999). Una de sus funciones es la síntesis de pigmentos que se almacenan en la pared y vacuolas de las células epidérmicas de hojas y tallos verdes, y en las ceras epicuticulares, absorbiendo fotones de la región del UV-B y permitiendo el paso de la luz visible o de mayores longitudes de onda a las células fotosintetizadoras. Además, se ha señalado el incremento de estos pigmentos en hojas de plantas afectadas por patógenos (Taiz, 2002).

Adicionalmente, la exposición de plantas a este tipo de radiación ha demostrado un aumento en la síntesis de flavonas y flavonoles (Day *et al.* 1992, Day 1993, Middleton & Teramura 1993, Reuber *et al.* 1996b, Greenberg *et al.* 1997, Hess *et al.* 2002, Taiz 2002).

3.3 Antecedentes generales sobre la emisión de fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a*

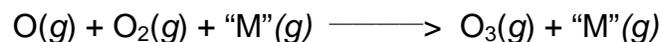
Aunque la energía lumínica es indispensable para el desarrollo normal de la fotosíntesis, un exceso de ella, como el que puede ocurrir por disminución de la capa de ozono, puede ser nocivo para este proceso (Krause 1988, Demmig-Adams & Adams III 1992, Teramura & Sullivan 1994, Krause *et al.* 1999). Ésto, trae como resultado una disminución en la eficiencia fotosintética, pues se inactiva el sistema transportador de electrones en las membranas tilacoidales alterándose los centros de reacción del PSII, lo que conduce a un descenso de la eficiencia fotoquímica primaria de la fotosíntesis, y por ende del proceso total, fenómeno conocido como fotoinhibición (Demmig *et al.* 1987, Somersalo & Krause 1989, Long *et al.* 1994, Saavedra 2004, Olivares 2005). Este fenómeno se presenta como una disminución del rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) para el intercambio de CO_2 y O_2 , un aumento de la fluorescencia de la clorofila *a* y menores tasas de fotosíntesis a saturación lumínica bajo exposición prolongada a luz excesiva (Demmig *et al.* 1987). Aunque muchos investigadores han expresado la fotoinhibición de la fotosíntesis como daño del PSII, las investigaciones actuales han demostrado que no siempre se produce daño del aparato fotosintético cuando éste se fotoinhibe y que, además, la caída en el rendimiento cuántico del PSII (F_v/F_m) estaría asociado a fenómenos de fotoprotección (Krause 1988, Huner *et al.* 1993, Horton *et al.* 1996). El exceso de absorción de energía lumínica puede provocar daño fotooxidativo del aparato fotosintético y de otros componentes celulares (Krause 1988, Demmig-Adams & Adams III 1992, Demmig-Adams & Adams III 1996).

Uno de los mecanismos que las plantas han desarrollado frente a este fenómeno fotoinhibitorio durante el estrés ambiental es la disipación de energía en forma de calor,

a través de los carotenoides oxidados, llamadas xantofilas (Niyogi 1999). La energía lumínica absorbida por la clorofila, puede seguir, básicamente, tres vías distintas: ser utilizada en la fotosíntesis (fotoquímica), ser disipada como calor o ser reemitida como luz, proceso conocido como fluorescencia. Como estos procesos son competitivos entre sí, cualquier incremento en la producción de uno provocará la disminución en el rendimiento de los otros dos. Por consiguiente, el medir la producción de fluorescencia de la clorofila, nos puede dar información sobre los cambios en la eficiencia fotoquímica y la disipación del calor (Maxwell & Jonson 2000).

3.4 Origen del ozono y su relación con la radiación UV-B

En la estratósfera, entre los 10 y 50 kilómetros por encima de la superficie terrestre, una delgada capa con una concentración aproximada de 8 ppm de moléculas de ozono (alrededor del 90% del ozono del planeta) rodea a la Tierra. El ozono es un gas producido naturalmente, a través de una serie de reacciones fotoquímicas, cuando la radiación UV disocia las moléculas de oxígeno molecular (O_2) en oxígeno atómico (O):



Los radicales de oxígeno resultantes de la reacción, se combinan rápidamente con una molécula de O_2 para formar ozono (O_3) absorbiendo casi toda la radiación UV-B y de esa forma impide que alcance la superficie terrestre. "M" es una molécula que

puede ser N₂ o O₂ cuya función es la de eliminar el exceso de energía, de no ser así, la molécula de ozono tendría mucha energía y, por lo tanto, se descompondría. Ya formada la molécula de ozono (O₃) es disociada nuevamente por acción de los rayos UV:



La unión de una molécula de ozono a un átomo de oxígeno da como resultado dos moléculas de oxígeno:



La molécula de ozono está capacitada para absorber alrededor del 99 % de todos los rayos solares con longitudes de onda menores a 310 nm. Adicionalmente, al absorber radiación UV-B, las moléculas de ozono se disocian, desprendiendo calor, ayudando así a mantener el equilibrio térmico en la atmósfera (McQuarrie & Rock 1984, Petrucci 1999, Zaller *et al.* 2003). El ozono estratosférico esta constantemente formándose y disociándose en la estratósfera, manteniendo cantidades totales relativamente estables por siglos.

En las últimas décadas, los científicos han encontrado que una mayor cantidad de radiación UV está alcanzado la superficie terrestre, ya que algunos compuestos están dañando la capa de ozono, haciendo que ésta disminuya, especialmente en las altas latitudes. Este efecto está asociado a la emanación a la atmósfera de compuestos antropogénicos desarrollados frente a la necesidad de producir sustancias no tóxicas y

no inflamables que reemplazan al dióxido de sulfuro y amonio utilizados en la refrigeración y aire acondicionado, compuestos designados comúnmente como Moléculas Destructoras de Ozono (MDO). Entre estas encontramos a los carburantes atmosféricos, principalmente los clorofluorocarbonos (CFC) como: CCl_2F_2 , CCl_3F , CHClF_2 , $\text{Cl}_2\text{FCCClF}_2$, CFCl_3 , CF_2Cl_2 , con una vida media de 100 años en la atmósfera, compuestos Halogenados, CH_3Br , etc., moviéndose por corrientes de aire entre los 25 y 40 Km. de altura, por sobre la protección de la capa de ozono.

Cuando el sol promueve la disociación de las MDO en la estratósfera, se liberan radicales libres como átomos de cloro y bromo, por ejemplo:



Estos radicales se unen fuertemente a las moléculas de ozono descomponiéndolas en grandes cantidades y en forma mucho más rápida de lo que son creadas. Cada átomo de cloro puede destruir alrededor de 100.000 moléculas de ozono (Petrucci 1999, L'Hirondelle & Binder 2002, Balkenhol 2002), de tal manera que la disminución del ozono estratosférico está relacionada directamente con el incremento de MDO y, por lo tanto, con el aumento de los niveles de radiación UV-B que alcanza la superficie terrestre (Björn 1999).

Los niveles de ozono estratosférico son expresados como columna de ozono, que es el monto de ozono que se encuentra sobre un punto determinado de la superficie terrestre. Su unidad métrica es la Unidad Dobson (DU), donde 1 DU equivale a una capa de espesor igual a 0.01 mm de ozono en condiciones de temperatura y presión normales (0° C y 1 atm.). En la zona austral de América del Sur, durante la época primaveral, se ha producido un importante aumento de la radiación UV-B (Kirchhoff *et al.* 1997) debido a una masa de aire pobre en ozono que se mueve hacia latitudes más bajas (Cabrera *et al.* 1995, Rousseaux *et al.* 1999). Esta situación, también estaría afectando la zona central de Chile durante la primavera (Cabrera & Fuenzalida 1999). De acuerdo a Pinto & Lizana (2004) el grosor del estrato de ozono en la ciudad de Santiago está disminuyendo significativamente. Valdivia (39° 48' S y 73° 14' W), lugar donde se realizó esta investigación, se encuentra fuera del área donde se produce la debilitación del ozono estratosférico. Sin embargo, masas de aire pobres en ozono, alcanza esta área hacia fines de la primavera, provocando una mayor penetración de radiación UV-B hacia la superficie terrestre, mostrando una tendencia decreciente de 5.6% por década (Lovengreen *et al.* 2000, Lovengreen *et al.* 2002). Este debilitamiento de ozono estratosférico ha permitido que mayores niveles de radiación UV-B ingresen a la superficie terrestre afectando a los seres vivos (Fig. 5).

Basándose en lo expuesto, en este estudio se plantea la siguiente interrogante: ¿Qué efecto tiene el suplemento de radiación UV-B ambiental en el crecimiento y desarrollo de árboles nativos del sur de Chile y cuáles serían los mecanismos de defensa que desarrollan?

EP/TOMS Version 8 Total Ozone for Jan 31, 2003

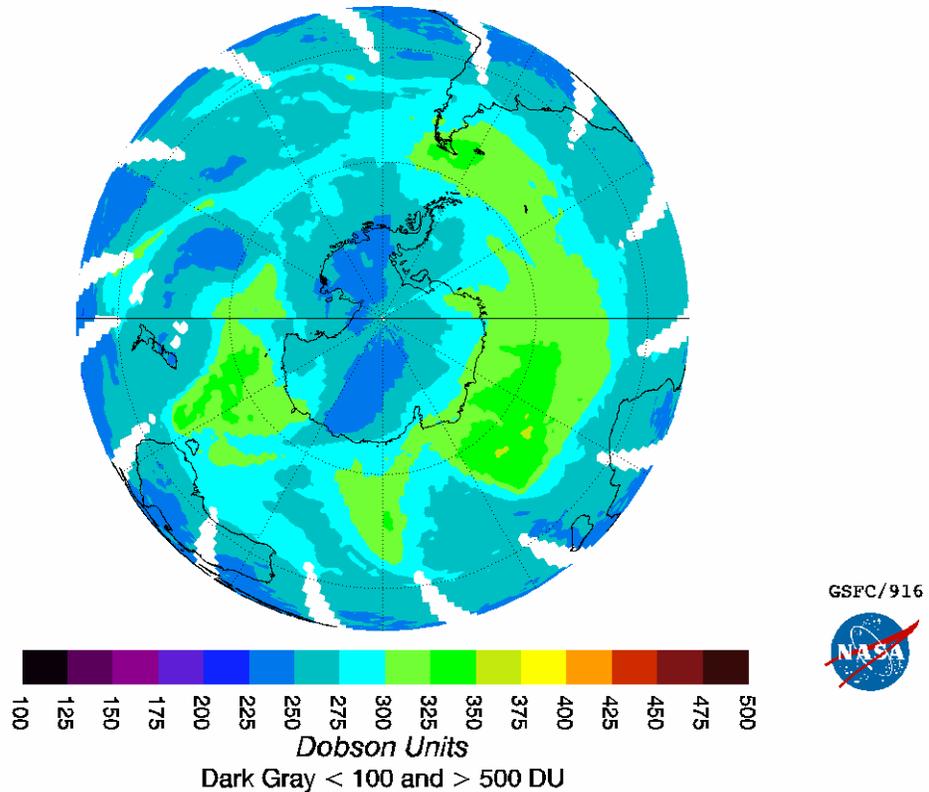


Fig. 5.- Mapa del debilitamiento de la capa de ozono sobre la antártica, obtenido del satélite EP/TOMS. Los colores grisáceos sobre la región de la Antártica y América del Sur dan cuenta de la disminución del ozono estratosférico (DU), provocado por los CFC's y permitiendo el ingreso de radiación UV-B a la superficie terrestre.

TOMS: Total Ozone Spectrometer, sistema con el que la NASA ha equipado desde 1978 diversos satélites proporcionando un mapa global diario del contenido total de ozono. Los datos fueron tomados de la página Web del ozone Processing Team de NASA/Goddard Space Flight Center, con fecha 31 de enero de 2003 (período de estudio).

3.5 Hipótesis

En este trabajo se postula que, el incremento de radiación UV-B ambiental (que podría ser ocasionado por efecto de la disminución de la capa de ozono) reduciría, levemente, el crecimiento en altura y biomasa de árboles nativos del sur de Chile (*Nothofagus obliqua*, *Nothofagus alpina* y *Eucryphia cordifolia*), lo que se asociaría con el desarrollo de mecanismos de resistencia.

3.6 Objetivo General

Estudiar los efectos morfo-anatómicos, fisiológicos y químicos que ocurren al aclimatar a un suplemento de radiación UV-B ambiental, plántulas de *Nothofagus obliqua*, *Nothofagus alpina* y *Eucryphia cordifolia*, y su capacidad de sobrevivencia después de un período de Desaclimatación a este factor.

3.7 Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento (altura y biomasa) y desarrollo (número de hojas, superficie foliar) de plántulas Aclimatadas y Desaclimatadas al suplemento de radiación UV-B ambiental.
- Evaluar el efecto del tratamiento en la estructura foliar.
- Establecer la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (PSII) y su relación con pigmentos fotoprotectores.
- Determinar la concentración de pigmentos fotosintéticos (Clorofilas *a* y *b*, y Carotenoides).

- Identificar y cuantificar la concentración de pigmentos Absorbedores de radiación UV-B (Flavonoides).

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Lugar de desarrollo

El desarrollo del experimento se realizó en condiciones de terreno en la Facultad de Ciencias, Campus Isla Teja, Universidad Austral de Chile, Valdivia-Chile (39°48'S y 73°14'W), durante la época estival (Enero y Febrero) del año 2003.

4.1.2 Material Vegetal

Treinta plántulas de *Nothofagus obliqua*, *Nothofagus alpina* y *Eucryphia cordifolia* obtenidas de semillas sembradas en octubre de 2001, en suelo orgánico mezclado con vermiculita, fueron regadas dos veces por semana a su capacidad de campo y mantenidas en invernadero. Posteriormente, 30 días antes del tratamiento fueron trasladadas al exterior para su aclimatación a condiciones ambientales.

4.1.2.1 Descripción de las especies

Nothofagus obliqua (Mirbel) Oersted var. *Obliqua*. (Roble, Pellín, Hualle).

Pertenece a la familia Fagaceae del orden Fagales (Hutchinson 1959). Esta especie puede alcanzar una altura de 30 a 40 m y un diámetro del tronco de 1 a 2 m. Posee hojas caducas de 2 a 5 cm de largo por 1.5 a 3 cm de ancho (Muñoz 1980). Se distribuye, principalmente, desde el río Aconcagua hasta Llanquihue y Chiloé. Como hábitat prefiere los suelos fértiles, profundos y húmedos, en las zonas bajas, y hasta 700 m sobre el nivel del mar. Hacia la parte norte de su área de distribución llega a

mayor altitud, como en el cerro El Roble, de la provincia de Valparaíso, donde alcanza cerca de los 1800 m sobre el nivel del mar. Hacia el sur forma comúnmente bosques puros, pero también se mezcla con Lingue, Laurel o Raulí (Hoffmann 1997, Cárdenas 1994, Donoso *et al.* 1992). En el área septentrional de su distribución el clima es mediterráneo y al sur se desarrolla un clima templado húmedo (Di Castri & Hajek 1976, Donoso *et al.* 1990).

En general, es una especie semitolerante a la luz solar, alcanzando un mejor desarrollo en condiciones de semisombra de 60 a 80% de luminosidad relativa (Donoso *et al.* 1992).

Nothofagus alpina (Poepp. et Endl.) Oerst. (Raulí, Ruilí, Ruil).

Pertenece a la familia Fagaceae. Puede alcanzar 40 m de altura y 2 m de diámetro del tronco, con hojas caedizas, que miden hasta 15 cm de largo por 8 de ancho y son las más grandes de las fagáceas chilenas. Se distribuye por la Cordillera de los Andes, desde el sur del río Teno, provincia de Curicó (35°S) a más de 500 m sobre el nivel del mar y en la Cordillera de la Costa, desde el río Itata. Su límite austral es la zona de Valdivia. Su hábitat es el de zonas cordilleranas en que no se producen bajas temperaturas y, principalmente, en un clima templado húmedo (Di Castri & Hajek 1976, Donoso *et al.* 1990). Requiere de suelos bien drenados y suele formar bosques puros, pero se mezcla también con otras especies de *Nothofagus*, como Roble y Coigüe (Donoso 1979, Hoffmann 1997).

Esta especie presenta una semitolerancia a la luz solar alcanzando un mejor desarrollo en condiciones de semisombra de 40 a 60% de luminosidad relativa (Donoso

et al. 1991).

Eucryphia cordifolia Cav. (Ulmo, Muermo, Toz, Voyencum).

Pertenece a la familia Eucrifiáceae. El Ulmo es un árbol siempreverde de crecimiento relativamente rápido, que puede alcanzar hasta 40 m de altura. La corteza tiene un gran contenido de taninos. Presenta hojas perennes que miden de 2 a 6 cm de largo por 2 a 3.5 cm de ancho. Presenta flores hermafroditas. Su distribución comprende la zona entre Arauco y Chiloé, especialmente en la Cordillera de la Costa y hasta los 700 m de altura. Su hábitat comprende los terrenos húmedos y ricos en humus. No forma bosques puros y frecuentemente se lo encuentra asociado con Roble, Tapa, Tineo o Coigüe (Rodríguez *et al.* 1983, Donoso *et al.* 1993, Hoffmann 1997).

Su óptimo desarrollo y supervivencia lo obtiene con una intensidad luminosa correspondiente al 50% de la luz a pleno sol, por esta razón crece generalmente bajo protección en claros en el bosque, sin embargo, es capaz de crecer a plena luz solar, cuando hay suficiente humedad en el suelo (Donoso *et al.* 1991).

4.1.3 Clima

El clima de la zona centro-sur de Chile, corresponde a un clima templado con tendencia oceánica, muy húmedo, ya que también en la época estival abundan los días lluviosos (Di Castri & Hajek 1976). Valdivia se caracteriza por su alta pluviosidad a lo largo de todo el año (Huber 1970). La precipitación anual para el año 2003 alcanzó a 2306 mm. Durante el período de estudio las precipitaciones fueron de 188.6 mm mientras el promedio térmico fue de 16.2°C. Los datos de temperatura fueron obtenidos

de la estación climática Isla Teja, mientras que la radiación solar y radiación fotosintéticamente activa (PAR) fueron proporcionados por el radiómetro del Instituto de Física de la Universidad Austral de Chile (Tabla 1).

4.1.4 Diseño experimental

Para analizar el efecto del suplemento de radiación UV-B ambiental en *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia* en condiciones de campo (Jardín Botánico) se consideraron un total de 12 plántulas de cada especie, de 15 meses de edad, las que fueron separadas en dos grupos: tratadas (Aclimatadas y Desaclimatadas) y Control (Fig. 6), y colocadas en la caseta de radiación (Fig. 7). Una vez por semana, las plántulas fueron cambiadas de posición para evitar el efecto de borde.

4.1.4.1 Tratamiento de Aclimatación

Para Aclimatar a un suplemento de radiación UV-B, seis plántulas de cada especie fueron expuestas a un suplemento de radiación UV-B ambiental por dos horas diarias, durante ocho días y una hora diaria por 11 días (plantas Aclimatadas), mientras las plantas Control sólo recibieron la radiación solar del ambiente ($2.37 \text{ KJm}^{-2}\text{h}^{-1}$). El suplemento de radiación UV-B se logró utilizando cuatro lámparas Q-panel 313, con una emisión máxima a 313 nm (Fig. 8) que aportaron un pulso adicional de radiación UV-B (280-320 nm) de $1.38 \text{ KJm}^{-2}\text{h}^{-1}$. Durante los meses de tratamiento (enero y febrero de 2003) la máxima radiación fotosintéticamente activa (PAR) medida a medio día y en condiciones de campo, fue de $2200 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Li-Cor Mod Li-189).

Tabla 1.- Resumen de valores promedios de Irradianza (UV-B y Caldwell ($\text{KJm}^{-2}\text{d}^{-1}$)), Temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) y el total de las Precipitaciones (pp) de los meses de enero y febrero del año 2000 al 2003 en el lugar de trabajo (Jardín Botánico, UACH). Datos proporcionados por el Instituto de Física y Estación Meteorológica Isla Teja de la Universidad Austral de Chile.

Período	UV-B $\text{KJm}^{-2}\text{d}^{-1}$	Caldwell $\text{KJm}^{-2}\text{d}^{-1}$	Temperatura			pp mm
			media	máx	min	
2000	34.4	1.38	16.4	22.4	7.0	250.7
2001	37.3	1.50	16.6	22.7	8.5	182.6
2002	38.0	1.54	17.8	24.6	9.1	126.9
2003	35.6	1.44	16.4	22.5	8.2	77.0

UV-B: radiación ultravioleta B; PAR: radiación fotosintéticamente activa, pp: precipitaciones; máx: máximo; min: mínimo; mm: milímetros.

El PAR máximo medido durante el estudio fue de $2200 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$

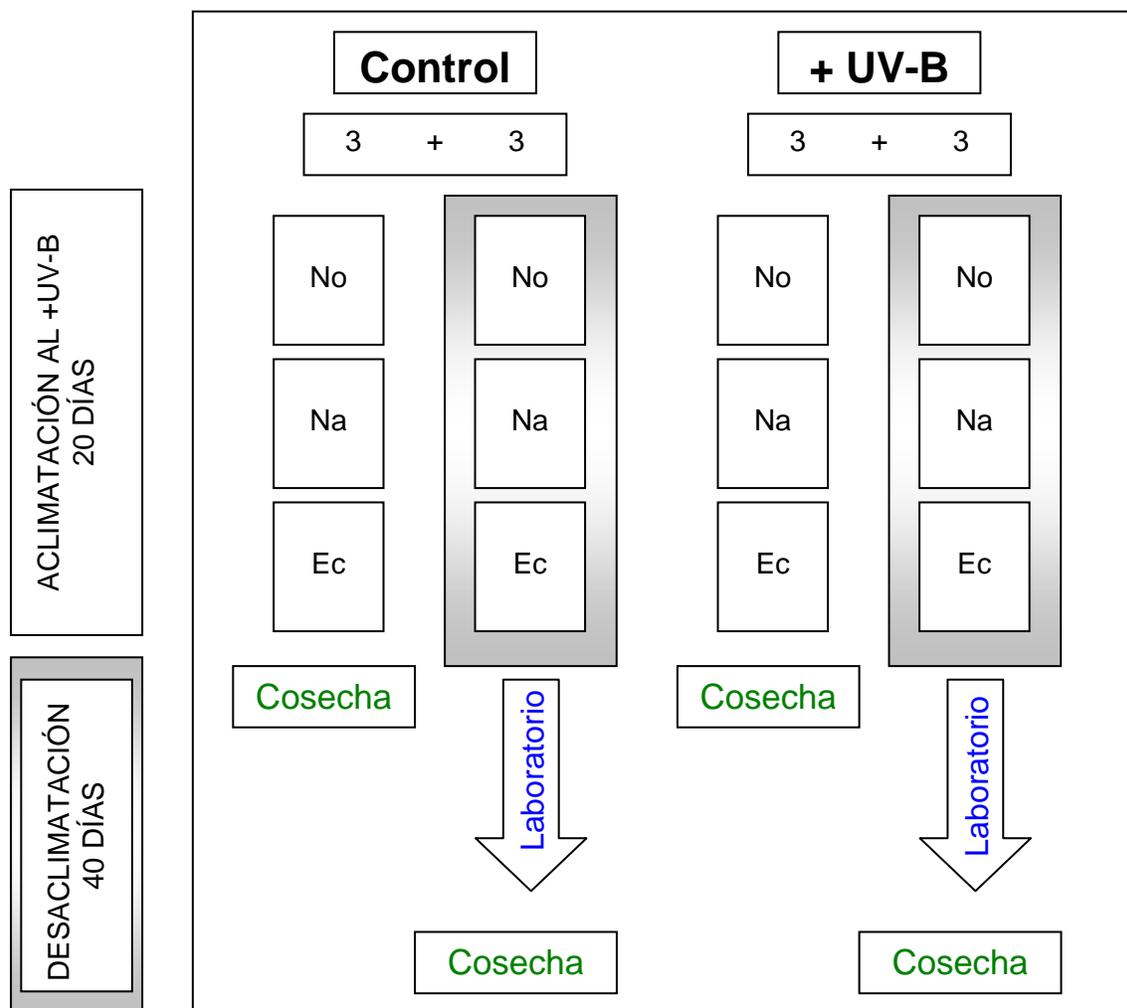


Fig. 6.- Esquema del diseño experimental donde un total de 12 plántulas de: *N. obliqua* (No), *N. alpina* (Na) y *E. cordifolia* (Ec) fueron separadas en dos grupos de seis plántulas cada uno, bajo condiciones de campo y expuesto a la radiación solar ambiental ($2.76 \text{ KJm}^{-2}\text{h}^{-1}$) (Control) y a un suplemento de radiación UV-B ambiental ($1.38 \text{ KJm}^{-2}\text{h}^{-1}$) en plantas tratadas (+ UVB) durante 20 días (Aclimatación). En la Desaclimatación al exceso de radiación UV-B ambiental tres plántulas control y tres plántulas tratadas fueron mantenidas 40 días en condiciones de laboratorio. Finalizado los períodos de Aclimatación y Desaclimatación las plántulas fueron cosechadas. La dosis de radiación UV-B suplementaria, al terminó del período de Aclimatación (20 días), fue de $37.26 \text{ KJm}^{-2}\text{h}^{-1}$.



Fig. 7.- Sistema de lámparas instalado junto a la estación de monitoreo de radiación UV-B del Instituto de Física, UACH. La caseta de radiación está provista de cuatro lámparas Q-Panel 313, donde fueron puestas las plántulas de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia* para Aclimatarlas al suplemento de radiación UV-B ambiental (I) y junto a ellas fueron puestas las plántulas expuestas solamente a radiación UV-B ambiental (Control) (II).

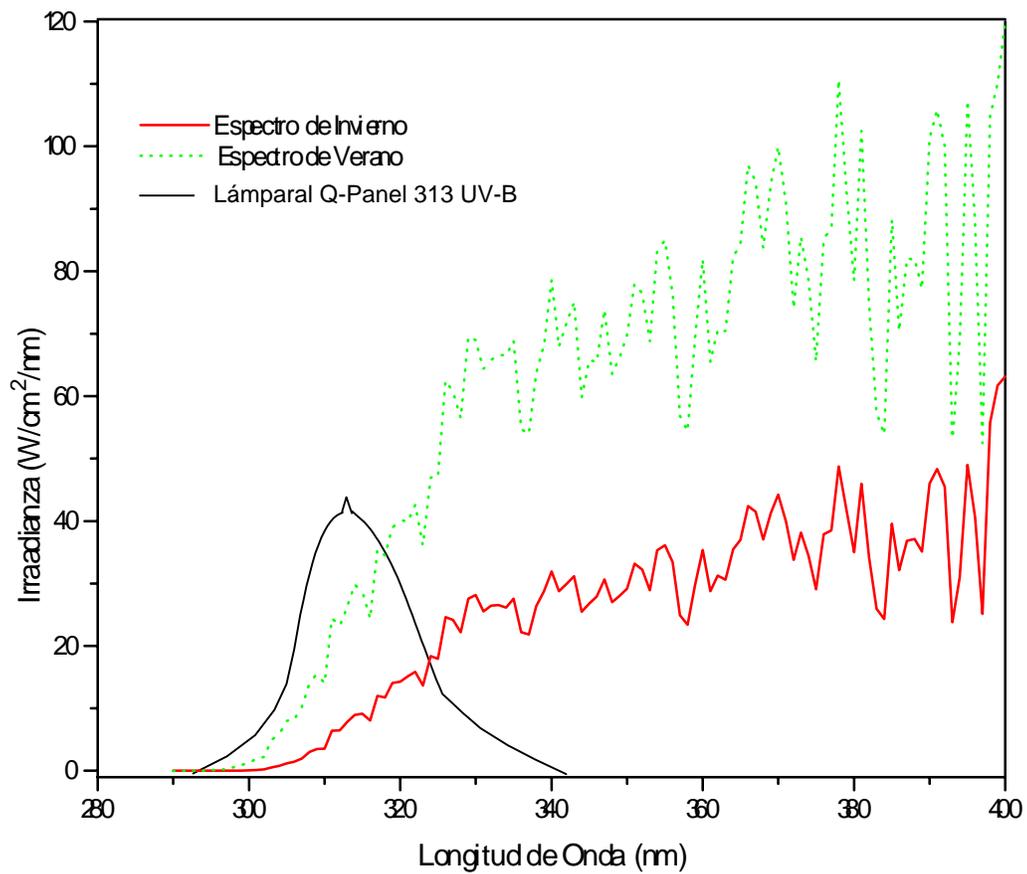


Fig. 8.- Espectro de emisión de la lámpara Q-panel 313 comparado con el típico espectro de irradianza de la distribución solar que alcanza Valdivia durante los períodos de invierno y verano.

4.1.4.2 Tratamiento de Desaclimatación al UV-B

Finalizado el período de 20 días de Aclimatación al UV-B, y para evaluar la capacidad de recuperación, tres plántulas tratadas y tres Control, de cada especie, fueron llevadas a condiciones ambientales moderadas (T° 16°C, PAR 1040 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ y HR del 60%) durante 40 días (Desaclimatación). Diferentes parámetros fisiológicos y químicos fueron analizados tanto en plántulas Aclimatadas como en las Desaclimatadas, una vez finalizados los respectivos tratamientos.

4.2 Determinación de parámetros de crecimiento

4.2.1 Número de hojas y altura total de la planta

Al inicio del tratamiento de Aclimatación (cero días) y al finalizar los períodos de Aclimatación (20 días) y Desaclimatación (60 días desde el inicio del estudio) se controló el número de hojas. Las cosechas se realizaron al final de ambos tratamientos controlándose los siguientes parámetros: número de hojas, largo del tallo y raíz, peso fresco y peso seco de todos los órganos.

4.2.2 Superficie foliar

La superficie foliar se determinó sólo al finalizar el período de Desaclimatación utilizando el método gravimétrico (Steubing *et al.* 2001), para lo cual 10 hojas de la planta fueron retiradas al azar, para luego ser pesadas (Peso Fresco) y fotocopiadas (HF). A continuación, las imágenes fotocopiadas fueron recortadas, pesadas y comparadas con el peso de una superficie conocida (1 cm^2) del mismo papel (P) con lo que se obtuvo la superficie de todas las hojas cuyos resultados se expresaron en cm^2 .

Para conocer la superficie foliar de la especie, el valor obtenido se dividió por el número de hojas fotocopiadas y se multiplicó por dos para obtener la superficie foliar por ambos lados de la hoja; posteriormente, la superficie foliar de la hoja se multiplica por el número total de hojas de la plántula.

$$\text{Superficie Foliar} = \frac{HF}{P} \text{ (g)} \times 2$$

HF_(g): peso del recorte de hojas fotocopiadas
P_(g): peso del cm² de papel

4.2.3 Determinación del peso fresco, peso seco y contenido hídrico

En las plántulas cosechadas al finalizar cada tratamiento se cuantificó el peso fresco (PF) de los diferentes órganos y el peso seco (PS) que se obtuvo colocando el material vegetal a 80°C hasta peso constante. El contenido hídrico fue determinado estableciendo la diferencia entre PF y PS (Steubing *et al.* 2001) y expresado en porcentaje de peso fresco.

$$\text{Contenido Hídrico (\%PF)} = \frac{PF - PS}{PF} \times 100$$

La diferencia corresponderá al porcentaje de peso seco.

4.2.4 Estructura foliar

Finalizado el período de Desaclimatación al exceso de radiación UV-B se recolectaron hojas emergidas durante dicho período y fueron depositados en viales que contenían fijador FAA (50% Alcohol Etilico Absoluto, 35% agua destilada, 10% Formalina y 5% Ácido Acético Glacial). Estas hojas fueron utilizadas para realizar mediciones. Para ello, se efectuaron cortes transversales a mano alzada (20 μm) en la

zona media de la lámina foliar y montando preparaciones con los mejores cortes. Las mediciones se realizaron con ocular graduado en microscopio óptico (Zeiss).

El grosor de cutícula y de los diferentes tejidos foliares se midieron en tres zonas de cada corte y se realizaron diez repeticiones. Para evidenciar la autofluorescencia de pigmentos foliares los cortes se realizaron en hojas frescas (no fijadas) y se observaron en microscopio de fluorescencia (Nikon UFX-DX OPTIPHOT-2) (Fig. 9). Para fotografiar se utilizó cámara NIKON FX-35DX con dos filtros de extinción (330-380 μm y 380-425 μm).

4.2.5 Ceniza cruda

El contenido de ceniza (materia orgánica e inorgánica) en los órganos foliares se determinó calcinando a 600°C durante 5 hrs 0.6 g de material vegetal seco (Steubing *et al.* 2001). La diferencia de peso seco entre el material vegetal inicial (Pmuestra) y la ceniza, proporciona el peso de materia orgánica liberado como CO₂. El resultado se expresó como porcentaje de un gramo de peso seco.

$$\text{Ceniza cruda (\%PS)} = \frac{\text{Peso ceniza}}{\text{Peso muestra}} \times 100$$

4.3 Cinética de activación del aparato fotosintético

El fotosistema II (PSII), constituyente del aparato fotosintético es muy sensible a diferentes tipos de estrés, en especial a los daños provocados por la radiación UV-B (Teramura & Sullivan 1994, Krause *et al.* 1999). El efecto que tiene esta radiación sobre las plantas, puede conocerse evaluando la eficiencia fotoquímica del PSII (Maxwell &



Fig. 9.- Microscopio de fluorescencia (Nikon UFX-DX OPTIPHOT-2) con filtros de extinción (330-380 μm y 380-425 μm). En su parte superior se encuentra una cámara fotográfica (NIKON FX-35DX) con la cual fueron tomadas las fotos de los cortes transversales de hojas de las tres especies estudiadas.

Jonson 2000, Steubing et al. 2001). El método que se basa en la emisión de fluorescencia in vivo de la clorofila a del PSII utiliza el fluorímetro de pulso de amplitud modulada Fluorescence Monitoring Systems (FMS, Hansatech, Reino Unido) (Fig. 10-A). Para cuantificar la fluorescencia se utilizaron hojas nuevas crecidas bajo el período de aclimatación y hojas adultas bien desarrolladas y sin daño visible, de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia*. Las mediciones se realizaron al término del período de Aclimatación y de Desaclimatación al UV-B. Las hojas utilizadas, que permanecen en las plantas, fueron oscurecidas con pinzas ad-hoc (Fig. 10-B) (provistas de una abertura, en la parte superior, cubierta por una placa central móvil, sobre la cual se adapta la fibra óptica aproximadamente a 10 mm de distancia) por 30 minutos. De esta manera se logra que todos los componentes de la cadena transportadora de electrones (Q_A) se encuentren completamente oxidados (preparados para recibir electrones) y que los mecanismos disipadores de energía descendan a niveles basales. Sobre la pinza se instaló el cabezal con fibra óptica (Fig. 10-C) que transmite las señales luminosas del equipo. Previo al envío de los diferentes pulsos de luz se deslizó la lámina de la pinza, para permitir el paso de estos.

La clorofila a es excitada por medio de una luz modulada de débil intensidad ($0.3 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), encendida durante toda la medición (luz de medida). Con esta activación la fluorescencia emitida corresponde a F_o , que es definida como la fluorescencia de hojas adaptadas a la oscuridad, cuando todos los centros de reacción del PSII y las moléculasceptoras de electrones (Q_A) se encuentran totalmente oxidados (abiertos). Mediante la aplicación de un pulso corto de luz saturante de alta intensidad ($10800 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), se obtuvo la fluorescencia máxima (F_m), que corresponde al punto en que todos los



Fig. 10.- (A) Fluorímetro de pulso de amplitud modulada Fluorescence Monitoring Systems FMS 1 (Hansatech, Reino Unido). (B) Pinza ad-hoc provista de una abertura en la parte superior, cubierta por una placa central móvil, sobre la cual se adapta la fibra óptica, aproximadamente, a 10 mm de distancia. En la figura C, se observa la fibra óptica puesta sobre el cabezal de la pinza, en la cual se desliza la lámina oscurecedora para permitir el paso de los diferentes pulsos de luz, emitidos por el fluorímetro.

aceptores de electrones del PSII se reducen (cerrados). La diferencia entre F_m y F_o es la máxima capacidad de energía fotoquímica de la muestra y es definida como fluorescencia variable (F_v). Cuando las hojas han estado previamente oscurecidas, el parámetro F_v/F_m corresponde al rendimiento cuántico máximo del PSII, el cual es un buen indicador de la eficiencia fotoquímica. Luego, las hojas se iluminaron continuamente con luz actínica ($180 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) hasta llegar a un estado de equilibrio (F_s). Posteriormente, las hojas fueron iluminadas desde el exterior, donde el equipo emite un nuevo pulso de luz saturante ($9000 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), con el cual se obtiene la fluorescencia máxima de hojas adaptadas a la luz (F_m'). Apagada la luz actínica se encendió una luz débil que emite en longitudes de rojo lejano con lo que se obtuvo la fluorescencia mínima de las hojas adaptadas a la luz (F_o').

Cuando las hojas se encuentran adaptadas a la luz se obtienen los siguientes parámetros: 1- rendimiento cuántico efectivo del PSII (ΦPSII) parámetro que proporciona información sobre la proporción de luz utilizada en el transporte de electrones con respecto a la luz absorbida; 2- coeficiente de “quenching fotoquímico” (qP) que indica la proporción de centros abiertos del PSII y 3- coeficiente de “quenching no fotoquímico” (qNP) que representa los procesos que disipan energía como calor.

El equipo registra las señales de los diferentes tipos de fluorescencia y calcula en forma automática los parámetros de fluorescencia (Fig. 11). Los parámetros y las formulas entregadas por el software FMS 1.05 (Hansatech, Reino Unido) se indican a continuación (Schreiber *et al.* 1986):

F_o : Fluorescencia inicial.

F_m : Fluorescencia máxima.

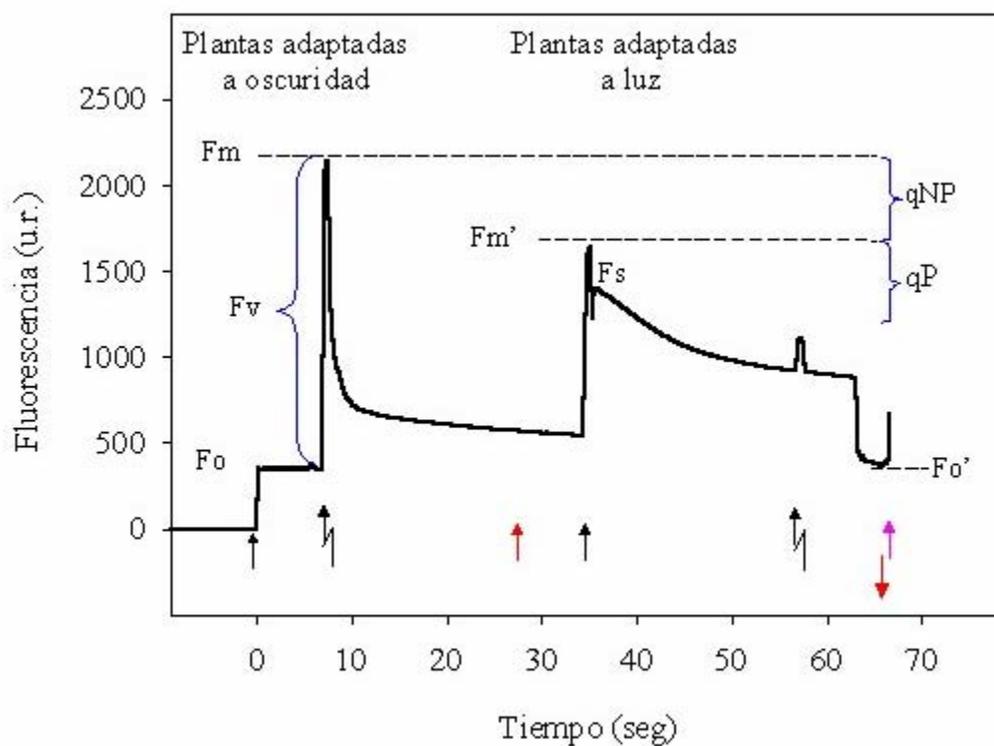


Fig. 11.- Cinética de emisión de fluorescencia obtenida con el fluorímetro de pulso de amplitud modulada FMS 1 (Hansatech, Reino Unido). Las flechas negras indican el encendido de la luz de medida. Las flechas negras quebradas indican los pulsos de saturación. Con las flechas rojas se indica el encendido y apagado de la luz actínica, y la flecha de color lila un pulso de rojo lejano (Figuroa & Gómez, modificado de Ulloa 2002).

F_v : Fluorescencia variable:

$$F_v = (F_m - F_o)$$

F_v/F_m : Rendimiento cuántico máximo del PSII de plantas previamente oscurecidas.

F_m' : Fluorescencia máxima de plantas previamente iluminadas.

F_s : Fluorescencia en estado estacionario.

Φ PSII: Rendimiento cuántico efectivo del PSII, de plantas previamente iluminadas,

(Genty *et al.* 1989):

$$\Phi\text{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$$

qP: Coeficiente de “quenching” fotoquímico o amortiguamiento fotoquímico:

$$qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_o)$$

qNP: Coeficiente de “quenching” no fotoquímico o amortiguamiento no fotoquímico:

$$qNP = (F_m - F_m') / (F_m - F_o)$$

4.4 Análisis químicos

4.4.1 Determinación de pigmentos foliares

Para comprobar el efecto del suplemento de radiación UV-B sobre la síntesis de pigmentos foliares fotosintéticos y absorbedores de radiación UV-B se analizó la concentración de Clorofila *a* y *b*, carotenos y flavonoides. Para lo cual se trabajó con hojas de plantas tratadas y control de los dos tratamientos (Aclimatación y Desaclimatación), almacenadas a - 40°C.

4.4.2 Extracción y partición de pigmentos foliares

Para extraer los pigmentos foliares presentes en las muestras a analizar (clorofilas, carotenoides y flavonoides) se utilizó el protocolo propuesto por Lichtenthaler & Wellburn (1983), modificado. Al finalizar los períodos de Aclimatación y Desaclimatación se pesaron 0.4 g de material foliar fresco tomado al azar, los que se maceraron en mortero de vidrio con 3 ml de metanol 100% grado HPLC, solvente orgánico polar miscible en agua, por tres veces. El extracto obtenido de las tres extracciones fue recolectado y centrifugado a 5000g durante cinco minutos, para separar los restos de membranas que pudieran existir. El sobrenadante obtenido, libre de partículas insolubles, fue recolectado y depositado en embudo de decantación al que se le agregaron 10 ml de éter de petróleo y 10 ml de metanol acuoso 40%. Después de agitar esta mezcla, se dejó reposar por 24 hrs. para que ocurra la separación de las dos fases en función de la polaridad de los pigmentos. Los compuestos no polares, carotenos y clorofilas, quedaron en la fase superior o etérea con el éter de petróleo y los flavonoides quedaron en la fase inferior o alcohólica con el metanol (Law & Rilling 1985). Las dos fracciones fueron guardadas en viales protegidos de la luz para su posterior caracterización. Para evitar la fotooxidación de los pigmentos por efecto de la luz se trabajó bajo luz roja y con tubos de centrifuga y embudos de decantación recubiertos con papel aluminio.

4.4.3 Determinación de pigmentos foliares totales por espectrofotometría UV-visible

Para analizar el contenido de pigmentos fotosintéticos totales presentes en las muestras se midió la absorbancia de cada fase, para obtener el espectro de absorción

de los pigmentos fotosintéticos (700-400 nm), utilizando éter de petróleo como línea de base, y de los flavonoides (240-400 nm), utilizando metanol acuoso 40% como línea de base. La determinación de los pigmentos se efectuó en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico, midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro de doble haz UNICAM (Serie UV 500), el cual emplea dos fuentes diferentes de energía para cubrir el intervalo especificado de longitudes de onda. Una lámpara de arco deuterio suministra la radiación ultravioleta y otra de tungsteno, la radiación visible (Fig. 12).

Los flavonoides presentan valores relativos máximos de absorbancia a 240 y 400 nm aproximadamente, éste máximo varía de acuerdo al estado de oxidación del anillo central y según el número y posición de los grupos O y/o OH. Los peacks máximos se designan como banda I (300-380 nm) y como banda II (240-280 nm). La banda I está asociada con la absorción causada por el anillo B o sistema cinamoil y la banda II con el anillo A o sistema benzoil (Fig. 3). La posición de estas bandas permite distinguir los diversos tipos de flavonoides tal como flavonas, isoflavonas y flavonoles que presentan grupos OH tanto en el anillo A como en el B (Fig. 3). Por ejemplo, flavonas presentan grupos OH en el anillo A, pero no así en el B, de tal manera que en el espectro de absorción en metanol tienden a dar una pronunciada banda II y una débil banda I, pero en moléculas similares que también poseen grupos OH en el anillo B, la banda I es más pronunciada que la II y aparece a mayor longitud de onda. El espectro de absorción en metanol, particularmente la posición de la Banda I (entre 300 y 380 nm), proporciona información sobre el tipo de flavonoide (Mabry 1970).

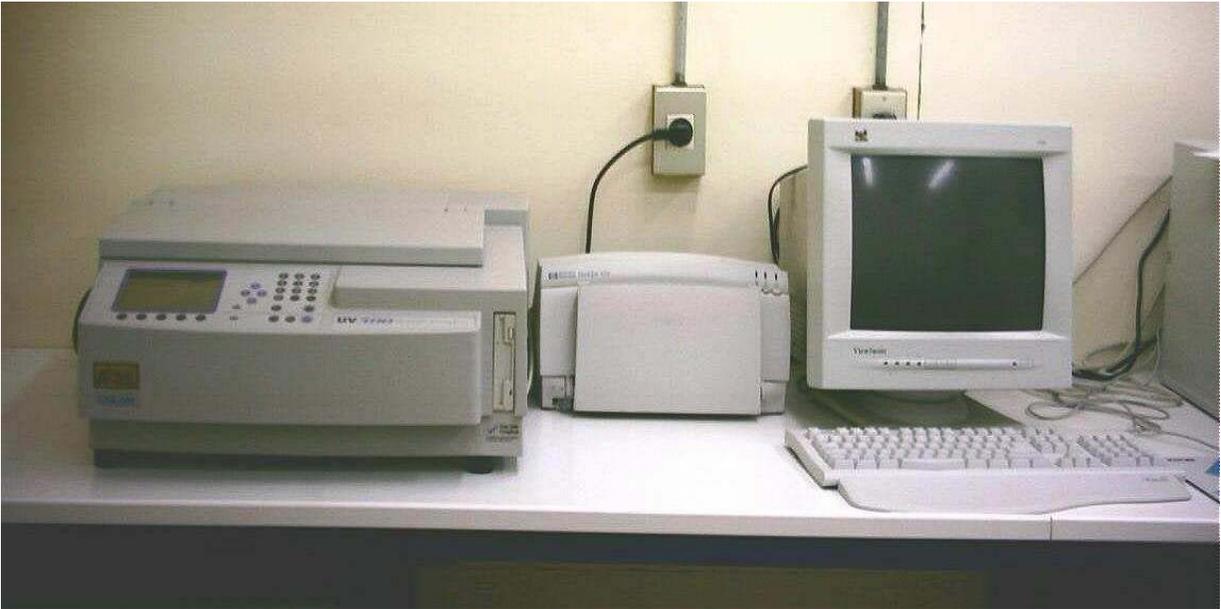


Fig. 12.- Espectrofotómetro UNICAM (serie UV 500) utilizado para la identificación de pigmentos totales (clorofilas, carotenoides y flavonoides) presentes en el material foliar de las tres especies analizadas. Este equipo emplea dos fuentes diferentes de energía para cubrir el intervalo especificado de longitudes de onda. Una lámpara de arco deuterio suministra la radiación ultravioleta y una de tungsteno la radiación visible.

A las especies en estudio que presentaron valores altos de absorbancia de la banda I, fue necesario hacerles diluciones para evitar desviaciones de la ley de Lambert-Beer.

4.4.4 Determinación de pigmentos fotosintéticos

La determinación de clorofilas y carotenoides se realizó en base a las absorbancias obtenidas en la fase etérea en espectrofotómetro a longitudes de onda de 666, 653 y 470 nm, utilizando éter de petróleo como blanco.

Para el cálculo de las concentraciones de clorofilas y carotenoides se utilizaron las siguientes fórmulas (Lichtenthaler & Wellburn 1983):

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g/ml extracto)} = 15.65 * A_{666} - 7.34 * A_{653}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (}\mu\text{g/ml extracto)} = 27.05 * A_{653} - 11.21 * A_{666}$$

$$\text{Carotenoides (}\mu\text{g/ml extracto)} = \frac{1000 * A_{470} - 2.86 * \text{Chl } a - 129.2 * \text{Chl } b}{245}$$

Siendo A la absorbancia leída a la longitud de onda señalada.

4.4.5 Hidrólisis

Dado a que en la naturaleza la gran mayoría de los flavonoides se encuentran como glicosilos, se procedió a realizar una hidrólisis con el fin de tener la estructura del flavonoide separada del azúcar, y así poder comparar con los estándares obtenidos.

La fracción metanólica, correspondiente a los extractos crudos de flavonoides, se evaporó en rotavapor a una temperatura de 40°C (Fig. 13-A), luego se retiró el matraz,

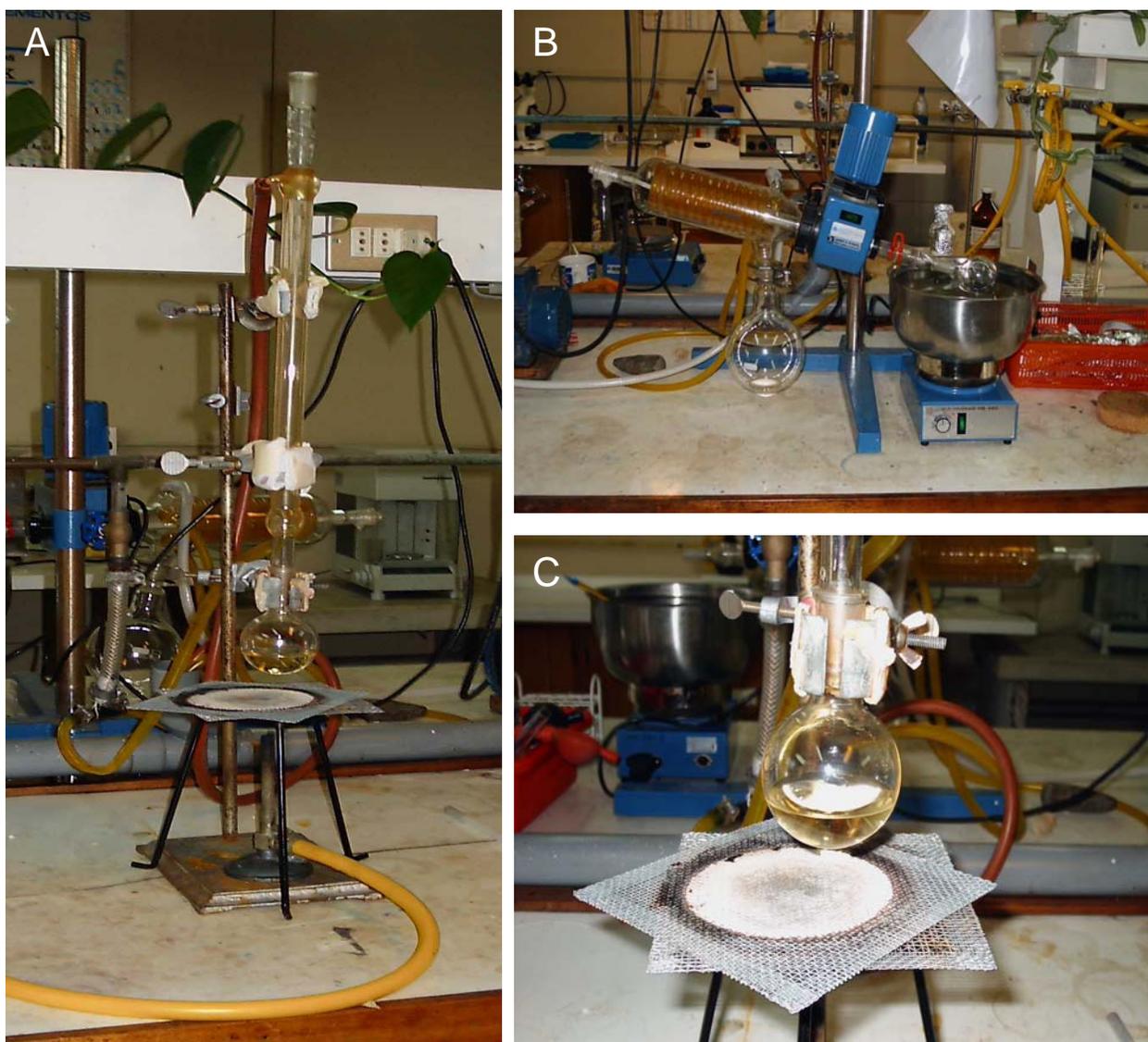


Fig. 13.- (A) Sistema refrigerante de reflujo y (B) rotavapor donde se realizó el proceso de hidrólisis de los grupos hidróxidos glicosilados unidos a los flavonoides. En la figura C, se observa un matraz balón con una muestra hidrolizada de uno de los extractos alcohólicos de las especies estudiadas.

se le agregó 6 ml de solución acuosa de HCl 1M y 4 ml de metanol 100%, esta mezcla se sometió a sistema de calentamiento a reflujo durante dos horas (Fig. 13-B). Se deja enfriar el contenido del matraz (Fig. 13-C) y se somete a extracción líquido-líquido en embudo de decantación con acetato de etilo, agitando y luego dejando en reposo por 24 hrs. Obteniéndose dos fases. La fase orgánica o superior contiene los flavonoides, y la fase acuosa o inferior los azúcares. La fase con flavonoides se llevó a sequedad en rotavapor para posteriormente agregar 10 ml de metanol 100%.

Antes de leer el espectro de estos flavonoides se midió el pH con un peachímetro y se disminuyó la acidez, aproximadamente, a 4.8, agregando Na_2CO_3 , para tener la muestra a las mismas condiciones iniciada la hidrólisis. Las muestras de flavonoides hidrolizadas fueron leídas en espectrofotómetro UV-visible (UV-500) entre los 200 y 500 nm para observar el desplazamiento de bandas que ocurre producto de la hidrólisis.

4.5 Determinación de flavonoides por HPLC de fase reversa

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una de las técnicas más usadas en los últimos años debido a su sensibilidad, a su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, a su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y por su gran aplicabilidad a sustancias que son de interés en la industria e investigación, ya que es aplicada a un sin número de compuestos, entre los cuales se encuentran: azúcares, hidrocarburos, lípidos, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos, pigmentos, antocianos, antihistamínicos, analgésicos, drogas, vitaminas, polímeros, insecticidas, etc. (Skoog 1996).

La cromatografía en fase reversa se caracteriza por presentar una columna

cromatográfica con una fase estacionaria no polar (con frecuencia se trata de un hidrocarburo como octilo C₈ y octadecilo C₁₈), en conjunto con una fase móvil polar (agua, metanol, acetonitrilo). En la fase reversa los componentes más polares aparecen primero, y un aumento de la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elusión, por lo tanto, acorta el tiempo de retención (Skoog 1996). La interacción que se produce es según la polaridad de los componentes de la muestra; el componente más polar o que se une débilmente a la fase estacionaria eluye primero con la fase móvil polar y, por ende, el componente menos polar o que es retenido fuertemente por la fase estacionaria apolar eluye al final.

La elusión de los componentes de una muestra puede realizarse de dos maneras: isocráticamente, es decir, una separación que utiliza un solvente o una mezcla de solventes de composición constante, o bien, usando una elusión en gradiente que utiliza dos o más disolventes con polaridad significativamente distinta, variando la relación de los disolventes en forma programada durante el tiempo de elusión.

La columna más utilizada para la separación de flavonoides es octildecilsilano (C₁₈ u ODS) (Huck *et al.* 2001). Las razones para la popularidad de las columnas C₁₈ incluyen compatibilidad con la mayoría de solventes y una amplia disponibilidad comercial.

Aunque la gran mayoría de métodos de HPLC de fase reversa usan columnas C₁₈, no todas son iguales. Factores tales como tamaño y forma de la partícula, diámetro el poro, superficie protegida (carbón cargado), y síntesis monomérica versus polimérica influyen la separación resultante (Parker 1992).

Basándose en lo anterior, la separación y determinación de flavonoides presentes en los extractos hidrolizados de las tres especies estudiadas, fueron determinados cualitativa y cuantitativamente por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa (Varas 2004). Para esto se utilizó un equipo cromatográfico Hewlett-Packard modelo 1100 Agilent de fase reversa (Fig. 14) en una columna Phenomenex Luna de 5μ C₁₈ (250 x 4.60 mm, tamaño de partícula 5μ m) provista de una precolumna C₁₈ de 5μ que elimina la materia en suspensión y contaminantes de los disolventes. Un volumen de 50μ L de las muestras en metanol, previamente filtradas con un filtro de teflón Advantec MFS de 0.2μ m con el objeto de eliminar las impurezas solubles en metanol y/o partículas sólidas suspendidas que pudiesen dañar la columna, fueron inyectadas a un flujo de 1.0 ml min^{-1} controlado por una bomba peristáltica cuaternaria, a temperatura ambiente y con una longitud de onda de detección de 350 nm utilizando un detector UV-visible. La longitud de onda se eligió de acuerdo a los espectros de absorción de las muestras y estándares medidos en un espectrofotómetro UV-visible de doble haz (UNICAM UV 500), y a la comparación de las alturas, separaciones y resoluciones de los peaks que permitieran la identificación y cuantificación de los flavonoides presentes en los extractos.

Para una separación eficiente de los flavonoides presentes en el extracto alcohólico se utilizó la fase isocrática, la cual corresponde a una fase móvil de composición constante, por ser un método barato y simple. Se utilizó como fase móvil una mezcla de agua y acetonitrilo (65:35) pH 2.3 (72%) y metanol 100% (28%). Para el ajuste de pH se utilizó ácido Trifluoroacético (TFA), un modificador volátil, ya que la literatura indica que este compuesto es un ácido eficiente en la separación de



Fig. 14.- Equipo cromatográfico HPLC Hewlett Packard 1100 Agilent de fase reversa con columna Phenomenex Luna 5μ C₁₈ (250 x 4.60 mm; tamaño de partícula 5 μ m) provista de precolumna C₁₈ 5μ para eliminar materia en suspensión y contaminantes de los disolventes.

flavonoides, comparado con ácido fosfórico o acético (Manis & Wilcox 2001).

Entre cada inyección de muestras la columna fue re-equilibrada, con el solvente durante 10 minutos, para eliminar los residuos que pudiesen haber quedado en dicha columna.

4.5.1 Identificación de flavonoides

Con el objeto de identificar los distintos tipos de flavonoides que se encuentran en las muestras hidrolizadas se procedió a la separación de estos pigmentos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), utilizando cinco estándares de flavonoides: Apigenina, Myricetina, Luteolina, Quercetina y Kaempferol. Estos estándares fueron corridos en HPLC para obtener los tiempos de retención (tiempo que transcurre entre el momento de inyección de la muestra y su aparición como señal en el cromatograma). Una vez obtenidos los tiempos de retención de los estándares, se procedió a la identificación de los flavonoides presentes en las muestras hidrolizadas, realizando una comparación de los estándares con las muestras Control y tratadas (+ UV-B) para los tratamientos de Aclimatación y de Desaclimatación.

Los cromatogramas, de los estándares y muestras, fueron obtenidos con las condiciones de temperatura, gradiente y flujo ya mencionadas.

4.5.2 Calibración y cuantificación de flavonoides

Para cuantificar los peaks de los flavonoides identificados se realizó una curva de calibración con cada uno de los estándares a diferentes concentraciones conocidas, usando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase reversa. Para

Quercetina, Apigenina, Kaempferol, Luteolina y Myricetina se utilizaron las siguientes concentraciones: 29.53, 11.80, 10.27, 2.73 y 1.00 ppm, respectivamente.

Con las ecuaciones de la recta obtenidas de las curvas de calibración de los cinco estándares fue posible obtener la concentración de estos pigmentos identificados en cada una de las muestras estudiadas.

A partir de estos datos fue posible identificar y calcular cuantitativamente la concentración de flavonoides presentes en las muestras estudiadas.

4.6 Análisis estadísticos

Con los resultados obtenidos de los siguientes parámetros: largo tallo y raíz, peso fresco y seco, estructura foliar y fluorescencia, se realizaron análisis estadísticos utilizando el programa computacional Sigma Stat 3.0. Con el fin de determinar si las diferencias entre los resultados eran significativas se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una y de dos factores. El nivel de significancia se realizó aplicando el test de Tukey, con un valor de $P < 0.05$.

5.- RESULTADOS

5.1 Número de hojas

En la Figura 15 se aprecia el efecto de los tratamientos sobre el número de hojas durante el periodo de estudio. En las plántulas Control de *N. obliqua* el número de hojas se incrementa a los 20 días, disminuyendo al finalizar la Desaclimatación (40 días). La misma tendencia se observa en las plántulas tratadas.

En *N. alpina* se observa que el número de hojas de plántulas Control disminuye significativamente a los 20 días, manteniéndose hasta finalizar el período de Desaclimatación. Semejantes resultados se encontraron en las plántulas + UV-B después de 20 días de tratamiento UV-B. Sin embargo, el número de hojas, de tamaño pequeño, aumentó al finalizar la Desaclimatación. En ambos *Nothofagus*, se observa incremento del número de yemas axilares en las ramas.

E. cordifolia (Control), especie siempreverde, presenta una tendencia similar a lo observado en *N. obliqua* (Control), incrementándose el número de hojas a los 20 días y disminuyendo a los 60 días iniciado el tratamiento. En plantas tratadas se observa la disminución del número de hojas por efecto del UV-B (20 días) y la no renovación de estas durante el período de Desaclimatación.

5.2 Altura

En la Figura 16 se presenta el crecimiento en altura del tallo y largo de raíz de las tres especies vegetales en estudio. Se aprecia que, en general, en la Aclimatación por efecto del exceso de radiación UV-B, el largo del tallo aumenta levemente a expensas del largo de la raíz. Por el contrario, durante el período de Desaclimatación, la longitud

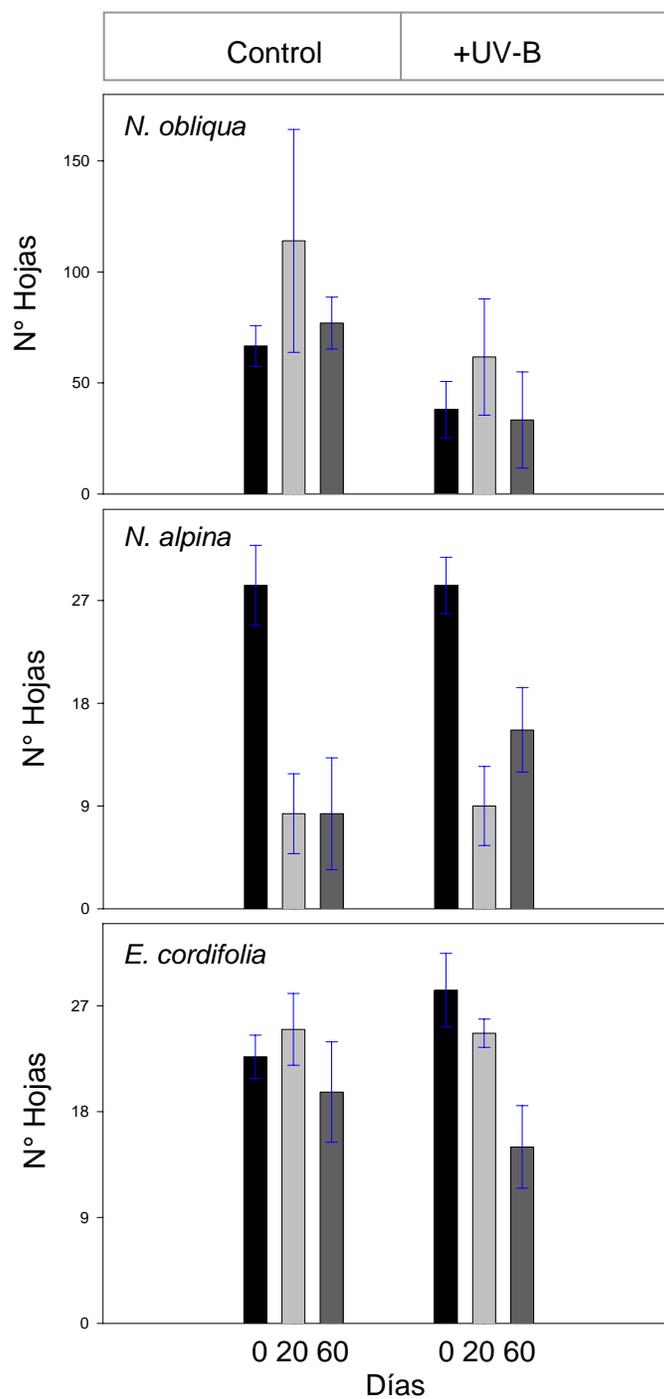


Fig. 15.- Número de hojas de plántulas en estudio, cultivadas en condiciones ambientales (Control) y bajo un suplemento de radiación UV-B (+ UV-B). Las mediciones se realizaron al inicio del estudio (0 días), al finalizar el período de Aclimatación (20 días) y al término del período de Desaclimatación (60 días desde el inicio del tratamiento). n= 3. I=SE.

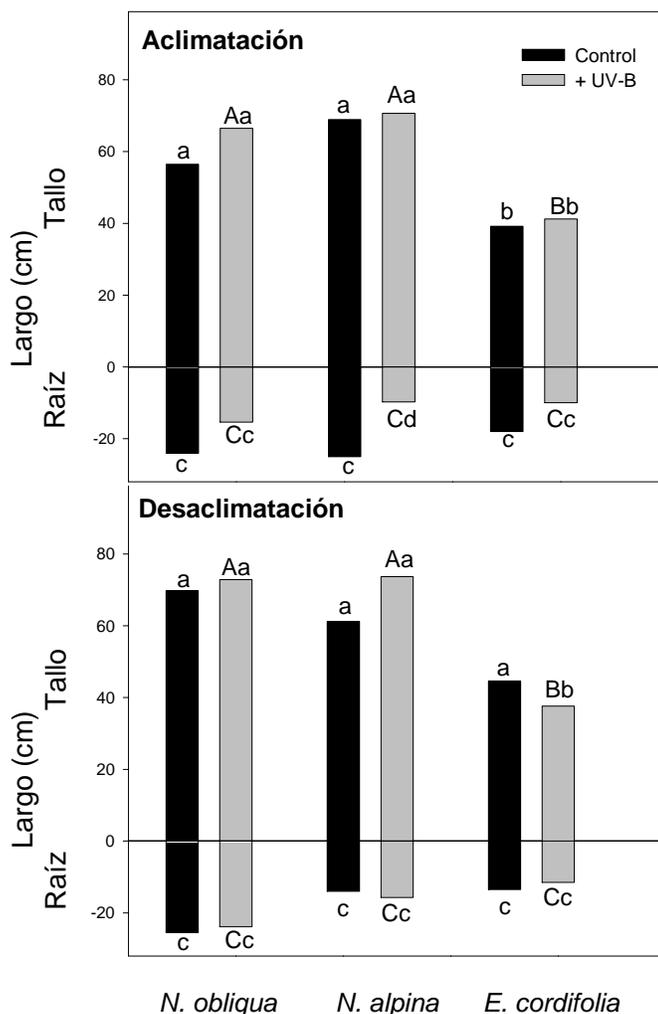


Fig. 16.- Efecto del tratamiento de Aclimatación y Desaclimatación en el largo del tallo y de raíz en plántulas de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia*. Las mediciones fueron realizadas al término de cada tratamiento. n=3. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre control y + UV-B; letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre plántulas tratadas Aclimatadas y Desaclimatadas.

del tallo en las Fagáceas tratadas aumenta, destacándose *N. obliqua* que disminuye significativamente.

5.3 Superficie foliar y cuocientes de dimensión

Al término de la Desaclimatación se observa que el suplemento de radiación UV-B provocó reducción de la superficie foliar, desarrollo de superficie y carácter esclerófilo en *N. obliqua* y *E. cordifolia* (Tabla 2). Sin embargo, en *N. alpina* la superficie foliar y desarrollo de superficie se incrementaron. Las diferencias observadas no fueron significativas.

5.4 Estructura foliar

En la Tabla 3 se puede apreciar el efecto del tratamiento UV-B en la estructura de la hoja, al finalizar el período de Desaclimatación.

Se encontró que en las Fagáceas el grosor de las hojas incrementó significativamente en respuesta al suplemento de radiación UV-B, siendo responsable en *N. alpina* el engrosamiento de ambos parénquimas. En el caso de *E. cordifolia* la reducción del grosor total de la lámina foliar puede asociarse, especialmente, con la reducción del parénquima esponjoso.

La autofluorescencia de ceras epicuticulares, que se observó en todos los casos, muestra un incremento en las plántulas expuestas al suplemento de radiación UV-B ambiental respecto al control (Fig. 17). Se sugiere la presencia de otros tipos de pigmentos filtradores, no identificados en este estudio, que podrían ser sintetizados frente a este suplemento de radiación UV-B.

Tabla 2.- Efecto del suplemento de radiación U-VB en la superficie foliar y cuocientes de dimensión en órganos foliares de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia*. Las mediciones fueron realizadas al término del período de Desaclimatación. Plántulas crecidas en condiciones ambientales (Control) y con un suplemento de radiación UV-B (+ UV-B). n=10. ± SE.

Descriptores	<i>N. obliqua</i>		<i>N. alpina</i>		<i>E. cordifolia</i>	
	Control	+ UV-B	Control	+ UV-B	Control	+ UV-B
Superficie Foliar [cm ²]	192.5 ± 104.2	91.3 ± 34.5	46.3 ± 27.3	90.9 ± 21.5	140.6 ± 30.4	85.5 ± 20.0
Desarrollo de Superficie [cm ² /gPF]	447.7 ± 242.3	179.0 ± 67.4	39.6 ± 23.3	109.5 ± 25.9	39.9 ± 8.6	31.8 ± 7.4
Carácter Esclerófilo [gPF/cm ²]	8.9 ± 4.8	2.7 ± 0.4	4.8 ± 2.8	3.1 ± 0.7	11.8 ± 2.6	6.9 ± 1.6

Tabla 3.- Efecto de la radiación suplementaria UV-B en la estructura foliar de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia* (Control y + UV-B). Las mediciones fueron realizadas en hojas adultas al finalizar el periodo de Desaclimatación.

*Existe diferencia estadística significativa $P < 0.05$. $n = 10 \pm SE$.

Grosor (μm)	<i>N. obliqua</i>		<i>N. alpina</i>		<i>E. cordifolia</i>	
	Control	+ UV-B	Control	+ UV-B	Control	+ UV-B
Cut. Superior	3.5 \pm 0.4	3.7 \pm 0.2	3.5 \pm 0.0	5.1 \pm 0.5*	6.3 \pm 0.7	8.4 \pm 0.5*
Ep. Superior	11.9 \pm 0.5	11.9 \pm 0.6	8.1 \pm 0.5	7.4 \pm 0.6	20.1 \pm 1.8	21.0 \pm 0.9
Hipodermis	-	-	-	-	15.4 \pm 0.5	15.1 \pm 1.4
P. Empalizada	19.6 \pm 1.6	16.2 \pm 1.4*	19.6 \pm 0.9	32.6 \pm 1.4*	54.6 \pm 3.3	58.8 \pm 2.2
P. Esponjoso	24.9 \pm 1.7	32.9 \pm 0.9*	25.9 \pm 1.1	32.2 \pm 1.4*	83.3 \pm 4.8	74.6 \pm 2.8
Ep. Inferior	8.4 \pm 0.5	9.1 \pm 0.9	9.1 \pm 0.5	6.7 \pm 0.6*	10.2 \pm 1.6	8.1 \pm 0.7
Cut. Inferior	3.0 \pm 0.3	3.3 \pm 0.2	3.5 \pm 0.0	3.7 \pm 0.2	12.6 \pm 0.7	15.4 \pm 0.7*
Total	70.4 \pm 1.5	78.4 \pm 1.7*	66.7 \pm 1.3	87.5 \pm 2.3*	215.5 \pm 3.4	205.5 \pm 6.2

Cut.: cutícula, Ep.: epidermis, P.: parénquima. -: No observado.

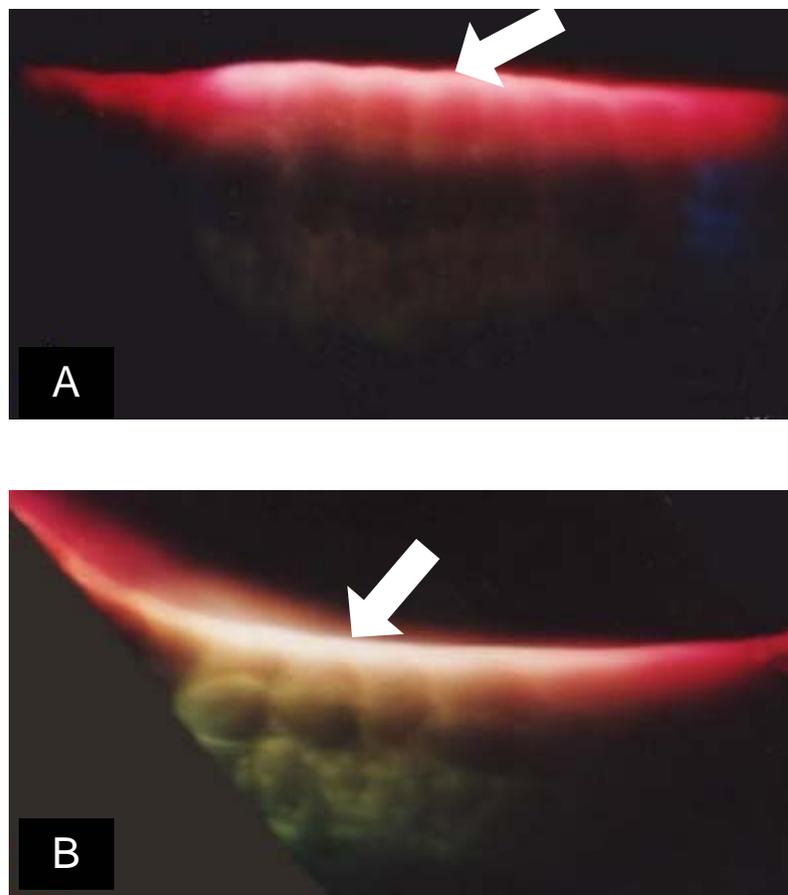


Fig. 17.- Autofluorescencia de ceras epicuticulares adaxial en hoja de *E. cordifolia*. **A**: material de planta control y **B**: planta tratada con un suplemento de radiación UV-B. Observaciones realizadas en corte transversal de la hoja con microscopio de fluorescencia, utilizando filtro de 340-380 nm.

5.5 Peso fresco, seco y contenido hídrico

Al finalizar el período de Aclimatación (20 días) se aprecia que el peso fresco varía levemente por efecto del tratamiento (Fig. 18), aumentando en *N. obliqua* y disminuyendo en *N. alpina* y *E. cordifolia*. Después del período de Desaclimatación se observó la recuperación del PF en *N. alpina*, y una mayor reducción en *E. cordifolia*.

La capacidad de resistencia de las plantas al suplemento de UV-B se puede evaluar en la magnitud de variación de biomasa. En este estudio (Fig. 18) se encontró leves variaciones, por efecto del tratamiento respecto al Control, en los Nothofagus, incrementando un + 11.2% en *N. obliqua* y disminuyendo - 23.8% en *N. alpina*. En *E. cordifolia* el PS no fue afectado por el tratamiento durante la Aclimatación. Sin embargo, al término de la Desaclimatación (40 días) *N. obliqua* mantuvo el PS y en *N. alpina* se incrementó. La especie más afectada fue *E. cordifolia* en la que se encontró reducción de la biomasa - 31.3%.

Respecto al contenido hídrico (Tabla 4) se observaron diferencias no significativas en las diferentes especies reflejando un buen manejo de la economía hídrica.

5.6 Redistribución de la biomasa

La radiación UV-B puede afectar el transporte de carbohidratos fotosintetizados, por lo que la distribución de ellos en los distintos órganos varía. Durante el período de estudio la movilización de asimilados en las plantas estudiadas fue escasa, siendo las

hojas las más beneficiadas a expensas de la biomasa radical (Tabla 5). Al analizar el efecto del UV-B, después de un período de Desaclimatación, se encontró que los

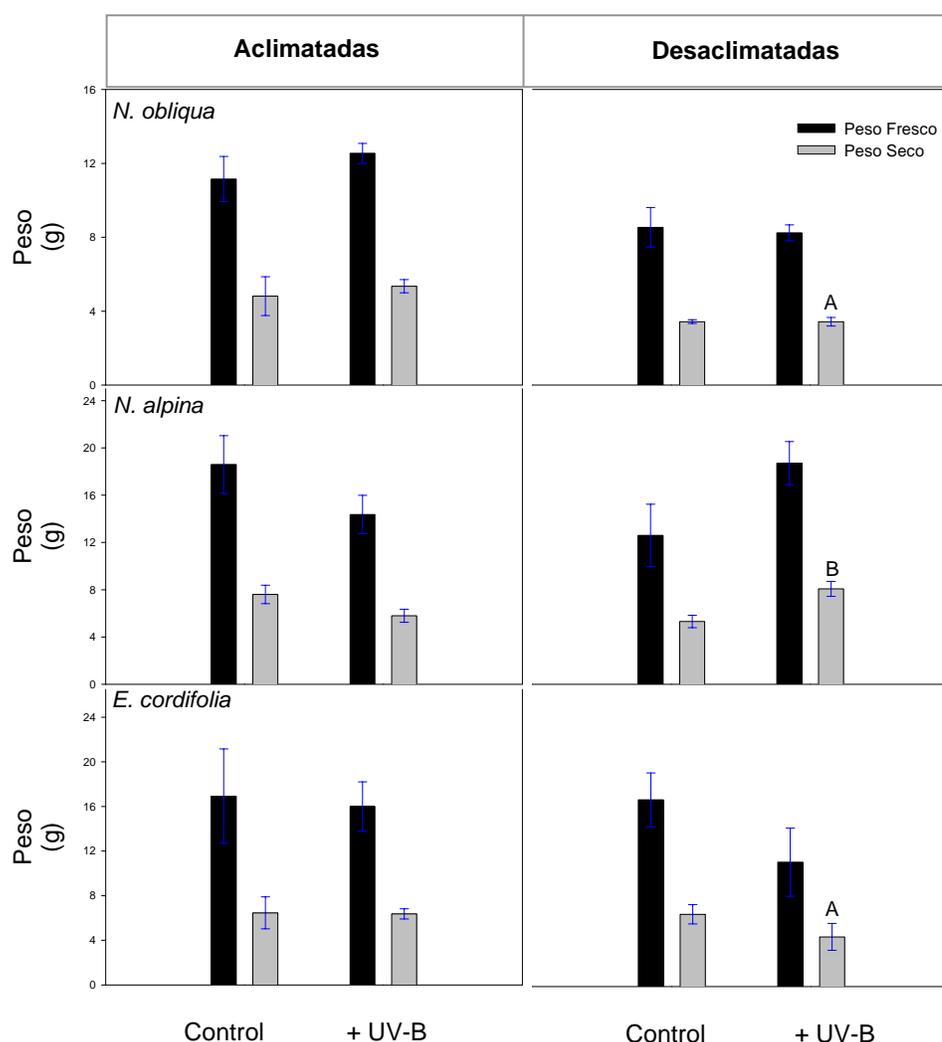


Fig. 18.- Efecto de un suplemento de radiación UV-B en el peso fresco y peso seco en plántulas Aclimatadas y Desaclimatadas al exceso de radiación. Plántulas Control cultivadas bajo condiciones ambientales y las tratadas fueron mantenidas bajo un suplemento de radiación UV-B (+ UV-B). $n = 3$, $l = SE$. Letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre especies tratadas Desaclimatadas.

Tabla 4.- Efecto del suplemento de radiación UV-B en el contenido hídrico (%PF) en plántulas de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia*, cultivadas en condiciones ambientales (Control) y bajo un suplemento de radiación UV-B (+ UV-B). n= 3. ± SE.

Especies	Contenido hídrico (%PF)	
	Control	+ UV-B
Aclimatadas		
<i>N. obliqua</i>	57.78 ± 4.3	57.43 ± 1.2
<i>N. alpina</i>	58.75 ± 1.5	59.39 ± 2.3
<i>E. cordifolia</i>	60.87 ± 2.2	59.52 ± 2.5
Desaclimatadas		
<i>N. obliqua</i>	58.47 ± 5.4	58.60 ± 1.1
<i>N. alpina</i>	54.89 ± 7.0	56.74 ± 0.9
<i>E. cordifolia</i>	61.17 ± 0.5	59.85 ± 0.6

Tabla 5.- Efecto del suplemento de radiación UV-B en la redistribución de asimilados (%PS) en los diferentes órganos de las plantas estudiadas. Datos medidos al finalizar los períodos de Aclimatación (20 días) y Desaclimatación al suplemento de radiación UV-B (40 días). Plántulas cultivadas bajo condiciones ambientales (Control) y bajo un suplemento de radiación UV-B (+ UV-B). n=3.

Tratamiento	<i>N. obliqua</i>		<i>N. alpina</i>		<i>E. cordifolia</i>	
	Control	+UV-B	Control	+UV-B	Control	+UV-B
Aclimatación						
Hojas (%PS)	35	37	34	38	24	37
Tallos (%PS)	39	39	39	43	51	39
Raíces (%PS)	26	24	27	19	25	24
Desaclimatación						
Hojas (%PS)	36	38	39	38	25	27
Tallos (%PS)	41	39	41	44	51	47
Raíces (%PS)	23	23	20	18	24	26

asimilados no se movilizaron sólo en dirección a las hojas como en la Aclimatación, sino que también hacia el tallo (*N. alpina*) y raíz (*E. cordifolia*).

5.7 Contenido de Cenizas

El contenido de Cenizas permite inferir el estado nutritivo de la planta. En nuestro estudio el porcentaje de cenizas fue afectado por el suplemento de UV-B (Tabla 6), especialmente durante el período de tratamiento disminuyendo en *N. obliqua* (- 11.3%) y *E. cordifolia* (- 31.5%) y aumentando en *N. alpina* (+ 15.3%).

Al término de la Desaclimatación los contenidos de cenizas respecto a las Aclimatadas, se recuperan sólo en *N. obliqua* y decrecen fuertemente en *E. cordifolia* (- 59.5%).

5.8 Eficiencia fotoquímica del PSII

N. obliqua y *alpina* disminuyeron su Fluorescencia inicial (F_0) - definida como la fluorescencia de hojas adaptadas a la oscuridad - por efecto de la radiación UV-B, aumentando en *E. cordifolia*. Durante el período de Desaclimatación se observó, nuevamente, una disminución del F_0 en las Fagáceas, respecto a su Control, siendo esta diferencia significativa en *N. alpina*. Respecto a las plántulas Aclimatadas las plántulas tratadas de *N. obliqua* y *E. cordifolia* incrementaron significativamente su F_0 al finalizar la Desaclimatación (Fig. 19).

La fluorescencia máxima (F_m) - que corresponde al punto en que todos los aceptores de electrones del PSII se reducen - disminuyó no significativamente en *N. obliqua* y *N. alpina*, durante el período de Aclimatación. Sin embargo, finalizado el

Tabla 6.- Efecto del suplemento de radiación UV-B en el contenido de cenizas (Materia Inorgánica), obtenidos de 1g de PS y calcinado a 600°C. Los resultados fueron expresados en %PS. Las mediciones de plántulas Control y + UV-B se realizaron al finalizar los períodos de Aclimatación y de Desaclimatación al tratamiento. n= 3. ± SE.

Cenizas (%PS)	<i>N. obliqua</i>			<i>N. alpina</i>			<i>E. cordifolia</i>		
	Control	+UV-B	% Var	Control	+UV-B	% Var	Control	+UV-B	% Var
Aclimatación									
Hojas	3.57 ± 0.5	3.47 ± 0.2	-2.80	4.05 ± 0.2	4.92 ± 0.7	21.48	4.37 ± 0.2	4.19 ± 0.2	-4.12
Tallos	3.08 ± 0.3	2.52 ± 0.1	-18.18	2.00 ± 0.0	2.74 ± 0.5	37.00	11.09 ± 7.2	3.73 ± 0.3	-66.37
Raíces	4.06 ± 0.6	3.51 ± 0.6	-13.55	5.33 ± 1.3	5.46 ± 1.3	2.44	4.43 ± 0.5	5.70 ± 0.4	28.67
Total	10.71	9.5	-11.30	11.38	13.12	15.29	19.89	13.62	-31.52
Desaclimatación									
Hojas	4.93 ± 0.1	5.99 ± 0.0	21.50	5.63 ± 0.7	5.28 ± 0.4	-6.22	4.80 ± 0.3	4.16 ± 0.07	-13.33
Tallos	2.50 ± 0.1	2.02 ± 0.2	-19.20	2.44 ± 0.5	2.44 ± 0.3	0.00	3.03 ± 0.2	3.33 ± 0.8	9.90
Raíces	4.96 ± 0.3	4.07 ± 0.3	-17.94	4.93 ± 0.6	4.72 ± 0.6	-4.26	25.76 ± 20.4	6.13 ± 1.3	-76.20
Total	12.39	12.08	-2.50	13.00	12.44	-4.31	33.59	13.62	-59.45

var: variación

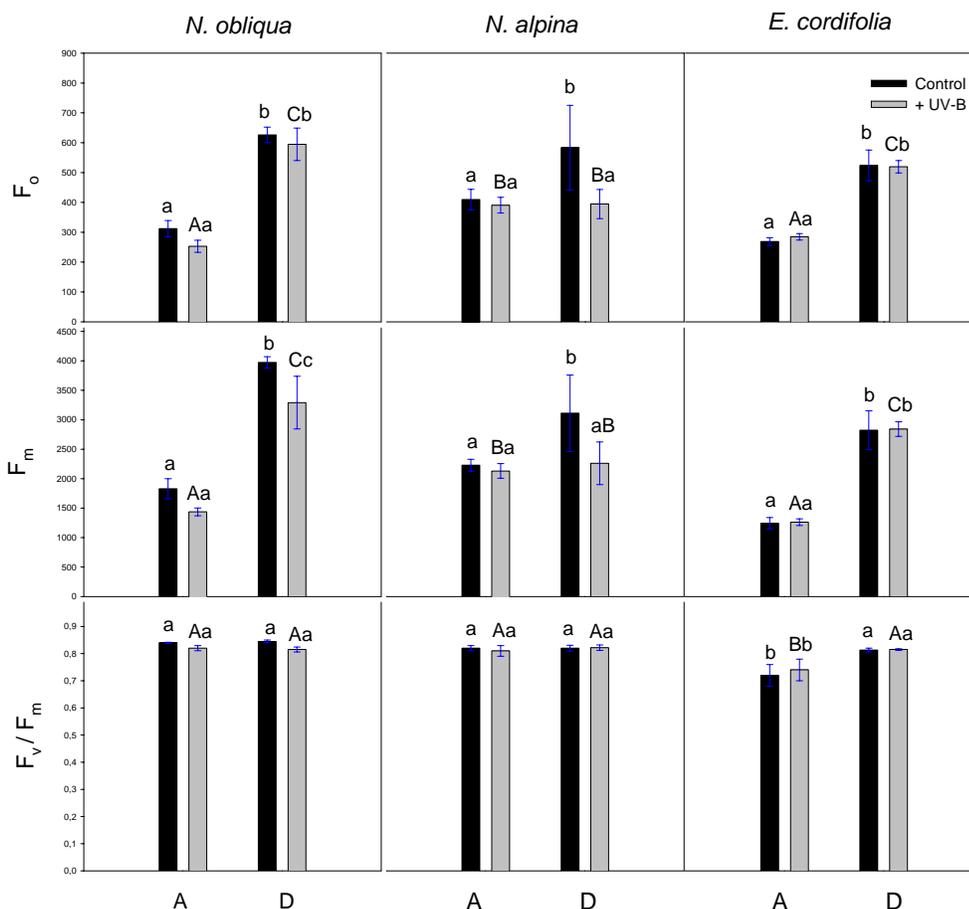


Fig.19.- Parámetros de fluorescencia (F_0 : fluorescencia inicial, F_m : fluorescencia máxima y F_v/F_m : rendimiento cuántico máximo) medidos en hojas nuevas y adultas de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia* (Control y + UV-B). Las determinaciones fueron realizadas al finalizar el periodo de Aclimatación (A) y después de 40 días de Desaclimatación (D). $n=8$. $I=$ ES. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$) entre control y + UV-B; letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre las plántulas tratadas Aclimatadas y Desaclimatadas.

período de Desaclimatación el F_m disminuyó significativamente en las tres especies, respecto a su Control. Los valores de este parámetro aumentaron significativamente en plántulas tratadas de *N. obliqua* y en *E. cordifolia*, comparado con el período de Aclimatación (Fig. 19).

En general, el suplemento de radiación UV-B no afectó el rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) del PIS - que da información sobre la eficiencia fotoquímica - medidos en hojas nuevas y adultas en las especies en estudio, al finalizar los períodos de Aclimatación y de Desaclimatación (Fig. 19).

El rendimiento cuántico efectivo del PSII (Φ PSII), - que proporciona información sobre la proporción de luz utilizada en el transporte de electrones con respecto a la luz absorbida - en el período de Aclimatación, aumentó significativamente en las especies tratadas de *Nothofagus*, mientras que en *E. cordifolia* disminuyó significativamente. En la Desaclimatación, respecto al Control, no se observaron diferencias significativas en las tres especies tratadas. Comparando la Desaclimatación con el período de Aclimatación, se observa un aumento significativo de este parámetro en *E. cordifolia* y *N. alpina* (Fig. 20).

El quenching fotoquímico (qP), -que da cuenta de la transformación de la energía en el PSII y la cadena transportadora de electrones en el proceso fotoquímico-, presentó un aumento significativo en plántulas de *N. obliqua* y *N. alpina* tratadas (+ UV-B) y una disminución significativa en *E. cordifolia*, mientras que en la Desaclimatación las Fagáceas incrementaron significativamente el qP (Fig. 20).

El quenching no fotoquímico (qNP), -que indica la disipación de energía como calor o energía de transferencia-, presentó valores más altos durante la Aclimatación al

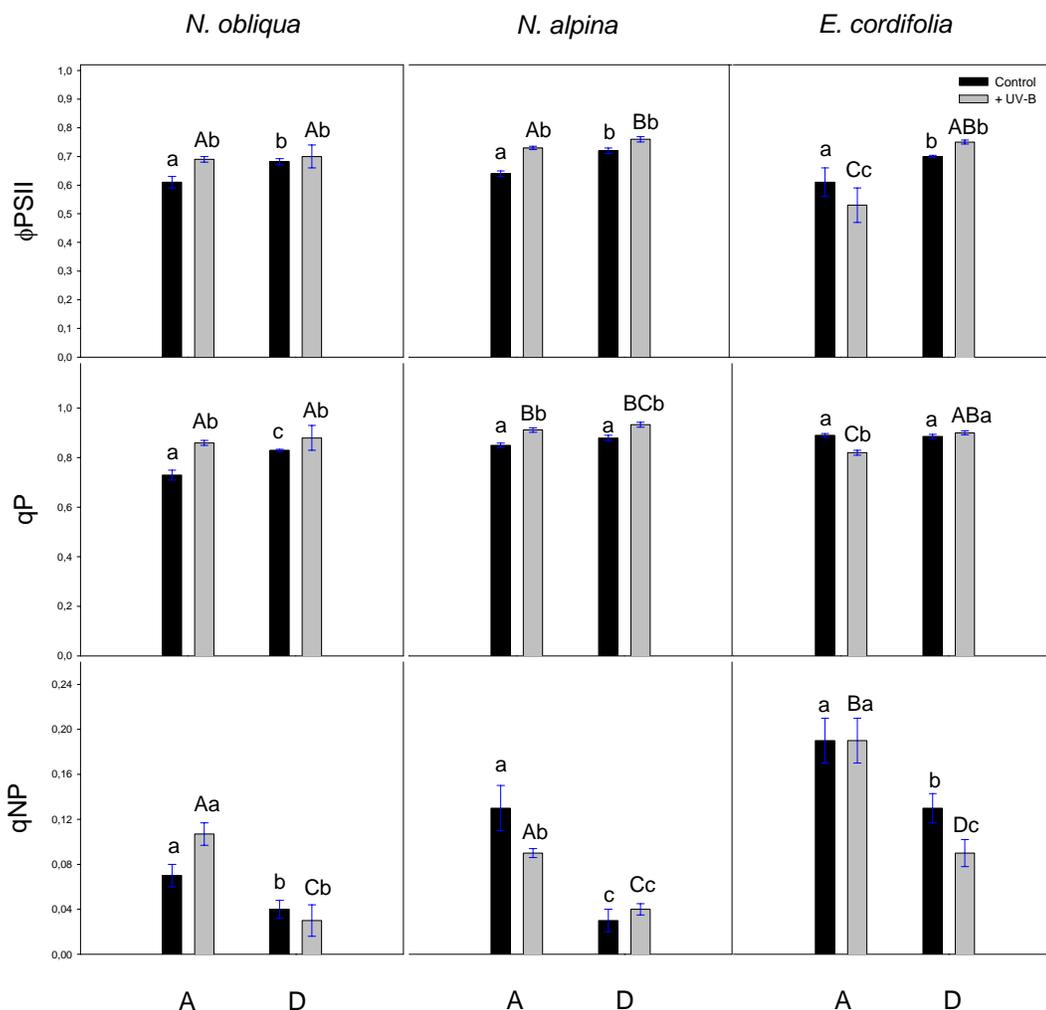


Fig. 20.- Parámetros de fluorescencia (ϕ_{PSII} : rendimiento cuántico efectivo del PSII, qP: quenching fotoquímico, qNP: quenching no fotoquímico) medidos en hojas nuevas y adultas de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia* (Control y + UV-B). Las determinaciones fueron realizadas al finalizar el periodo de Aclimatación (A) y a los 40 días de Desaclimatación (D) bajo condiciones normales. $n = 8$, $I = SE$. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre control y + UV-B; letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre las plántulas tratadas Aclimatadas y Desaclimatadas.

UV-B, en *E. cordifolia* respecto a las otras especies. *N. obliqua* aumentó el qNP mientras que *N. alpina* disminuyó significativamente respecto a su Control. Al término del período de Desaclimatación, se observó que el qNP disminuyó en las especies tratadas de *N. obliqua* y *E. cordifolia* pero aumentó en *N. alpina* comparado con la Desaclimatación (Fig. 20). Finalmente, se observó una disminución significativa del qNP en todos los casos.

5.9 Identificación de pigmentos foliares por espectrofotometría

La concentración relativa de clorofilas, carotenos y flavonoides totales presentes en los extractos y, las características espectroscópicas propias para cada grupo de moléculas, se obtuvieron a través de un espectro de barrido del extracto crudo entre 200 y 500 nm en metanol, obteniéndose información preliminar sobre el tipo de flavonoide y su estado de oxidación, y entre los 300 y 700 nm para las clorofilas y carotenos (Fig. 21 y 22).

Terminado el período de tratamiento, *N. obliqua* y *E. cordifolia* incrementaron la banda II por efecto de la radiación UV-B, disminuyendo ambas bandas en *N. alpina*, respecto al Control. En plántulas Desaclimatadas de *N. obliqua* se observó un incremento de la banda II (240-280 nm) y disminución de la banda I (300-380 nm), disminuyendo la Banda II en *E. cordifolia* (Fig. 21).

En la Figura 22 se pueden observar los espectros típicos para clorofilas, con peaks máximos en la región de los 400-460 nm y otros más débiles entre los 610-690 nm, y carotenoides con un espectro a los 470 nm. Además, se puede observar en el período de Acimatación, una disminución de ambas bandas en las clorofilas en *N.*

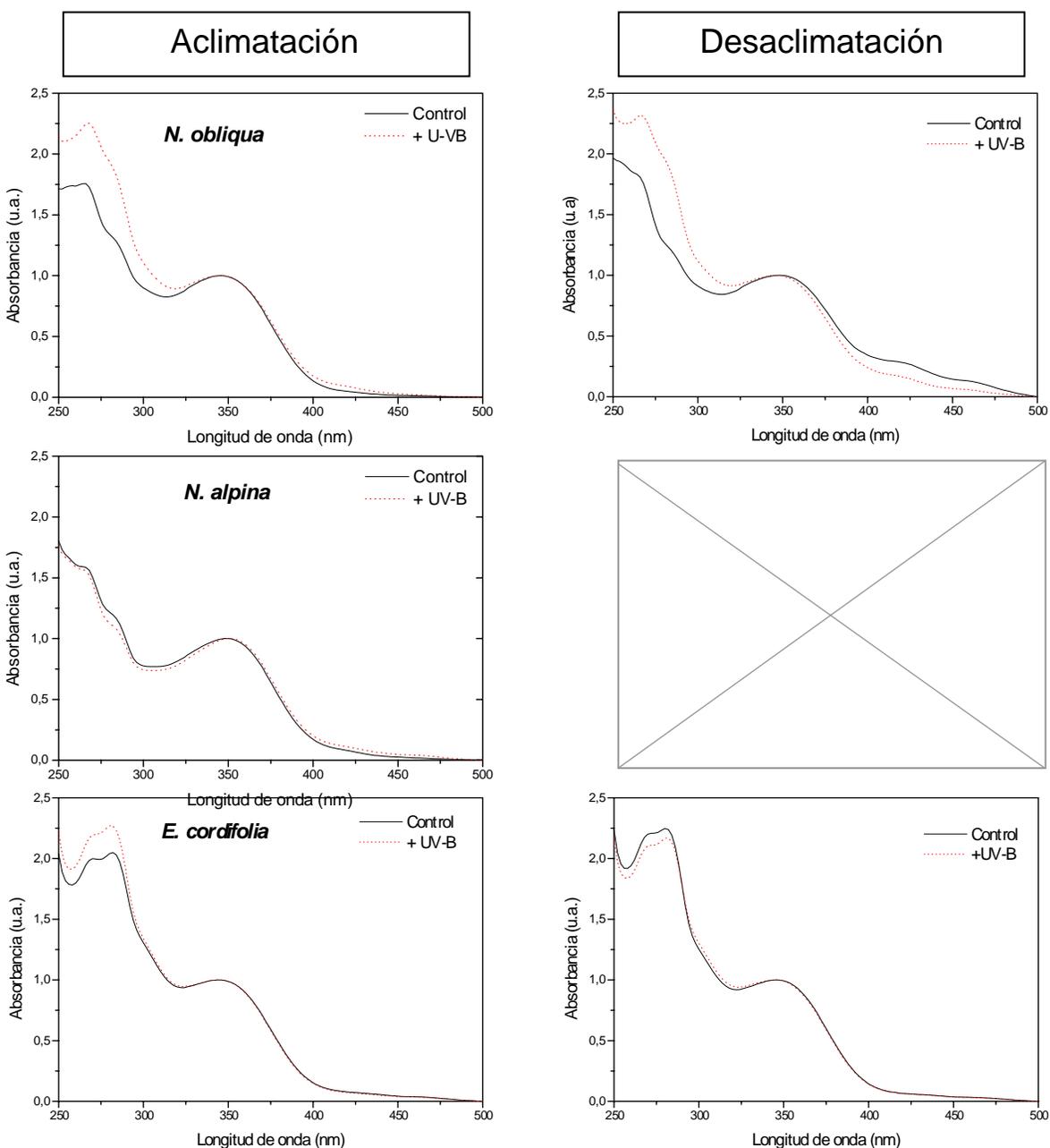


Fig. 21.- Espectro de absorción de flavonoides (200 a 500 nm) de los extractos alcohólicos en hojas de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia* (Control y + UV-B). Determinados por un espectrofotómetro UNICAM (serie UV500) al finalizar los períodos de Aclimatación y de Desaclimatación al exceso de UV-B. Al final de la Desaclimatación *N. alpina* no desarrolló suficiente material foliar para las determinaciones. Banda I: 300 a 380 nm, Banda II: 240 a 280 nm.

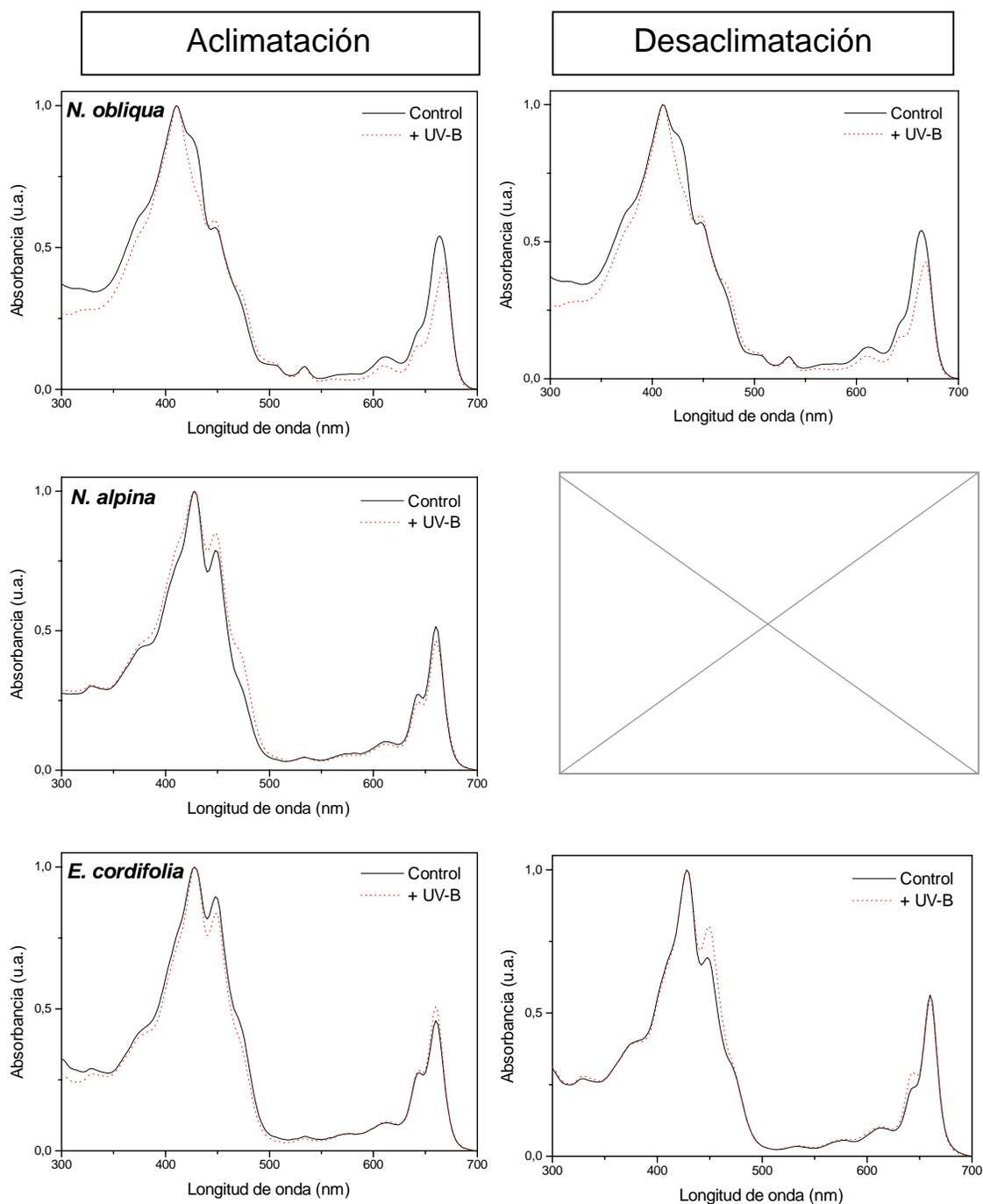


Fig. 22.- Espectro de absorción de clorofilas y carotenoides (300 a 700 nm) en los extractos alcohólicos en hojas de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia* (Control y + UV-B). Determinados por un espectrofotómetro UNICAM (serie UV500) al finalizar los períodos de Aclimatación y de Desaclimatación al exceso de UV-B. Al final de la Desaclimatación *N. alpina* no desarrolló suficiente material foliar para las determinaciones.

obliqua por efecto del tratamiento UV-B. En *N. alpina* se observó a los 450 nm, un aumento de la banda de clorofila *a* y disminución de las bandas de ambas clorofilas a los 650 nm. En *E. cordifolia* se observó una disminución de la banda a los 450 nm, mientras que la de los 650 nm aumentó.

Finalizada la Desaclimatación podemos apreciar un aumento de la banda de la clorofila *a*, a los 450 nm, en *N. obliqua* e incremento de las dos bandas de la clorofila *b*, a los 450 y 620 nm, en *E. cordifolia*, respecto a su Control.

La banda de carotenos (a 470 nm), en ambas Fagáceas Aclimatadas, aumentó respecto al Control, mientras que en *E. cordifolia* la banda de carotenos disminuyó por efecto de la radiación UV-B. Terminado el período de estudio se incrementó la banda de carotenoides a 470 nm en *N. obliqua* y *E. cordifolia*.

5.10 Cuantificación de pigmentos foliares totales por espectrofotometría

Los contenidos de clorofila *a* (Chla) y clorofila *b* (Chlb) fueron más altos en *N. alpina* y *E. cordifolia* tratados con un suplemento de radiación UV-B (Tabla 7). Sin embargo, al término del período de Desaclimatación, los contenidos de Chla y Chlb disminuyeron en plántulas tratadas de *N. obliqua* y *E. cordifolia*.

En relación con el período de Aclimatación al finalizar la Desaclimatación las concentraciones de estos pigmentos fotosintetizadores se incrementaron en *E. cordifolia*. En general, los niveles de clorofilas totales por efecto del tratamiento UV-B, disminuyeron en *N. obliqua* (- 51%), mientras que aumentaron en *N. alpina* (+ 50%) y en *E. cordifolia* (+ 48%).

Tabla 7.- Concentración de pigmentos fotosintetizadores (mg/gPF) en hojas de plántulas de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia* (Control y + UV-B). Determinados según el método de Lichtenthaler & Wellburn (1983), por medio, de espectrofotometría UV-Visible a 666 y 653 nm al finalizar los períodos de Aclimatación y Desaclimatación. n= 2. ± SE

Especies	Control			+ UV-B		
	Chla	Chlb (mg/gPF)	Chl _T	Chla	Chlb (mg/gPF)	Chl _T
Aclimatadas						
<i>N. obliqua</i>	0.38 ± 4E ⁻³	0.13 ± 2E ⁻²	0.51 ± 3E⁻²	0.19 ± 4E ⁻²	0.06 ± 4E ⁻³	0.25 ± 4E⁻²
<i>N. alpina</i>	0.11 ± 4E ⁻³	0.10 ± 4E ⁻³	0.20 ± 7E⁻³	0.16 ± 3E ⁻²	0.14 ± 2E ⁻²	0.30 ± 5E⁻²
<i>E. cordifolia</i>	0.15 ± 4E ⁻³	0.11 ± 4E ⁻³	0.25 ± 7E⁻³	0.20 ± 1E ⁻²	0.18 ± 4E ⁻³	0.37 ± 1E⁻²
Desaclimatadas						
<i>N. obliqua</i>	0.15 ± 3E ⁻²	0.09 ± 1E ⁻²	0.23 ± 4E⁻²	0.12 ± 0	0.05 ± 0	0.17 ± 0
<i>N. alpina</i>	SM	SM	SM	SM	SM	SM
<i>E. cordifolia</i>	0.25 ± 3E ⁻²	0.26 ± 2E ⁻²	0.51 ± 5E⁻²	0.23 ± 0	0.25 ± 4E ⁻³	0.48 ± 4E⁻³

SM: sin muestra. Chla: Clorofila a. Chlb: Clorofila b

En la Tabla 8 se aprecia que los contenidos de carotenoides totales se redujeron en *N. obliqua* (- 25.6%) y en *E. cordifolia* (- 8.3 %), al Aclimatarlas a un suplemento de radiación UV-B, mientras que en *N. alpina* se incrementaron un 10% respecto al Control. En la Desaclimatación se observa la recuperación en *N. obliqua* y *E. cordifolia*. La especie más afectada en la síntesis de pigmentos, finalizado el estudio, fue *N. obliqua*. En los períodos de Aclimatación y Desaclimatación se encontró que la concentración de flavonoides totales, presentaron valores más bajos de absorbancia en las especies tratadas, a excepción de *E. cordifolia* que aumentó finalizada la Desaclimatación (Tabla 9).

5.11 Hidrólisis

La sustitución del grupo glucósido, producto de la hidrólisis, y espectro de absorción del extracto alcohólico foliar de *N. obliqua* son presentados en la Figura 23. Se puede apreciar que el espectro de absorción del extracto hidrolizado sufrió un ligero desplazamiento hacia longitudes de onda mayores, respecto al no hidrolizado. El desplazamiento de la curva para plantas control se observó, también, en plantas tratadas en los dos períodos de estudio.

5.12 Identificación de estándares

En la Figura 24 se muestran los espectros de absorción de los estándares de Apigenina, Myricetina, Quercetina, Kaempferol y Luteolina, empleados para la identificación de flavonoides. Para la cuantificación de estos flavonoides por HPLC, se eligió la longitud de onda de absorción común para estas especies a 350 nm.

Tabla 8.- Concentración de carotenoides (mg/gPF) en hojas de plántulas de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia*, (Control y + UV-B). Determinados según el método de Lichtenthaler & Wellburn (1983), por medio de espectrofotometría UV-Visible a 470 nm al finalizar los períodos de Aclimatación y Desaclimatación. n= 3. \pm SE.

Especies	Carotenoides (mg/gPF)	
	Control	+ UV-B
Aclimatadas		
<i>N. obliqua</i>	0.39 \pm 0.2	0.29 \pm 0.5
<i>N. alpina</i>	0.20 \pm 0.3	0.22 \pm 0.2
<i>E. cordifolia</i>	0.24 \pm 0.2	0.22 \pm 0.1
Desaclimatadas		
<i>N. obliqua</i>	0.09 \pm 0.1	0.12 \pm 0.0
<i>N. alpina</i>	SM	SM
<i>E. cordifolia</i>	0.26 \pm 0.1	0.32 \pm 0.1

SM: sin muestra.

Tabla 9.- Valores promedios de absorbancia máxima de flavonoides totales (u.a.) extraídos de hojas de tres especies cultivadas bajo condiciones ambientales (Control) y bajo un suplemento de radiación UV-B (+ UV-B). Estas absorbancias fueron determinadas en espectrofotómetro UNICAM UV 500 a una longitud de onda entre 200 y 500 nm. n=2. \pm SE.

Especie	Aclimatación		Desaclimatación	
	Control (u.a.)	+ UV-B	Control (u.a.)	+ UV-B
<i>N. obliqua</i>	1.78 \pm 0.01	1.61 \pm 0.07	0.63 \pm 0.03	0.61 \pm 0.00
<i>N. alpina</i>	1.74 \pm 0.06	1.62 \pm 0.07	SM	SM
<i>E. cordifolia</i>	1.34 \pm 0.07	1.24 \pm 0.01	1.26 \pm 0.03	1.34 \pm 0.07

SM: sin muestra, ya que para el periodo de Desaclimatación no hubo suficiente muestra, para las determinaciones.

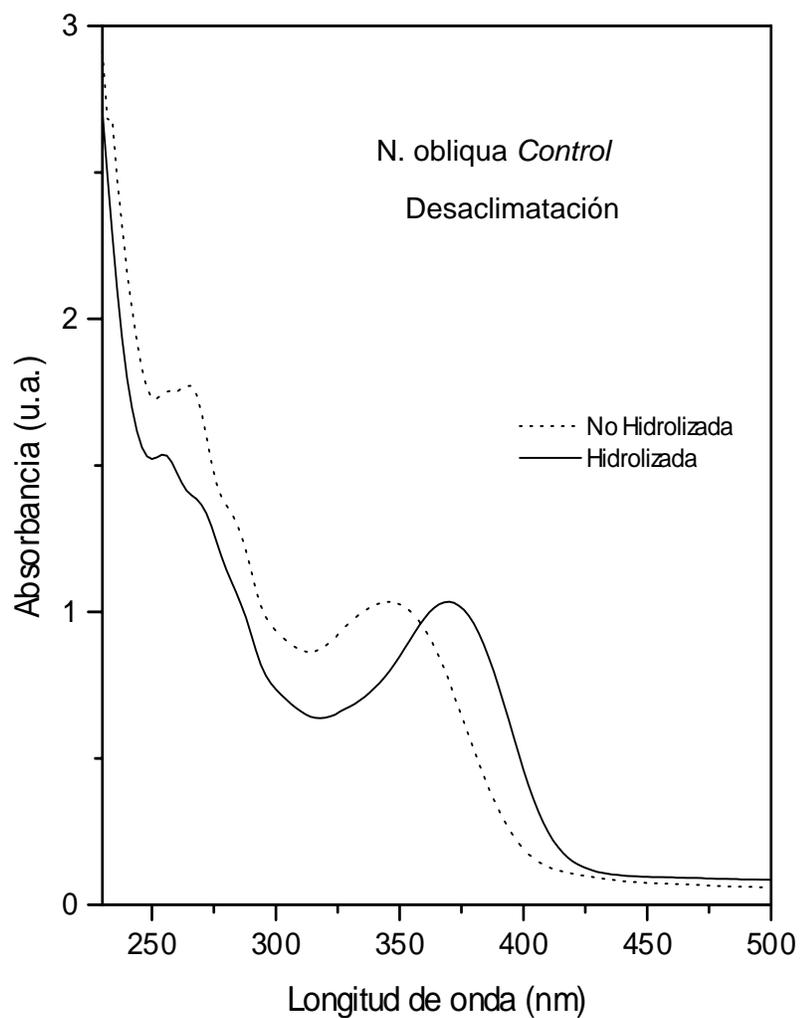


Fig. 23.- Espectro de absorción del extracto alcohólico no hidrolizado e hidrolizado de hojas de *N. obliqua*, cultivado bajo un suplemento de radiación UV-B (+ UV-B) por 20 días. Las mediciones se realizaron al finalizar el período de estudio (Desaclimatación).

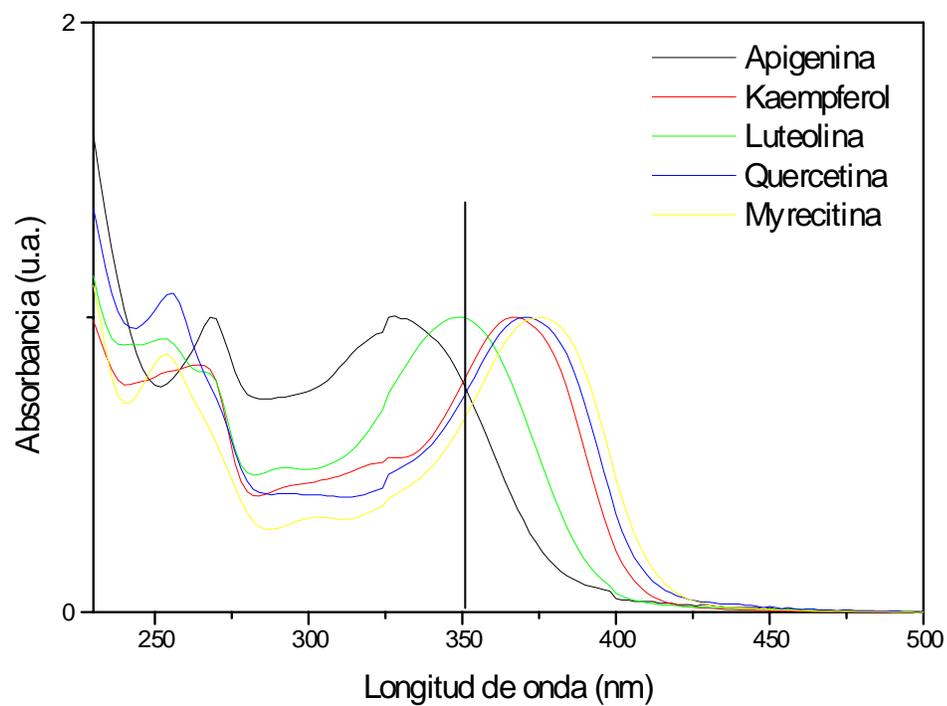


Fig. 24.- Espectro de absorción de los estándares de flavonoides empleados para la identificación de los flavonoides presentes en las muestras analizadas. Las mediciones fueron realizadas por espectrofotometría UV-visible (UV 500).

5.13 Identificación de flavonoides

Una vez obtenidos los tiempos de retención de los estándares por HPLC (Tabla 10) se procedió a la identificación de los flavonoides presentes en las muestras hidrolizadas, realizando para ello una comparación de los tiempos de retención, tanto de los estándares (Fig. 25) como de las muestras Control y tratadas, finalizado los períodos de Aclimatación y Desaclimatación. En la Figura 26 se observa un cromatograma del extracto foliar hidrolizado de *E. cordifolia*, en el cual se observan diferentes peaks; correspondiendo cada señal a un pigmento foliar diferente.

En la Tabla 11 se presentan los tiempos de retención (min) de los extractos hidrolizados de las especies en estudio. Como se puede observar los tiempos de retención difieren respecto a la Tabla 10 y Figura 25, estas pequeñas variaciones son debidas a que la temperatura influye sobre los solventes usados en HPLC, haciéndolos menos densos y, por lo tanto, la elusión de las muestras varía.

Terminado el período de Aclimatación se encontró en *N. obliqua*, Myricetina y Quercetina con tiempos de retención para Control de 5.27 min y 8.81 min, y para plántulas tratadas de 5.25 min y 8.75 min, respectivamente. En *N. alpina* se determinó Myricetina a los 5.18 min en Control y a los 5.15 min en tratadas, y Quercetina a los 8.49 min para Control y para la tratada a los 8.44 min. Además, se encontró Apigenina a los 4.33 min para plántulas Control y a los 4.32 min en tratadas.

Al igual que las especies anteriores *E. cordifolia* presentó Myricetina y Quercetina con tiempos de retención de 5.49 min para Control y 5.96 min en tratadas, y 8.50 min en Control y 8.63 para tratadas, respectivamente. Además, se detectó Apigenina en plántulas Control a los 4.34 min y a los 4.37 min en tratadas.

Tabla 10.- Tiempos de retención (min) de estándares de flavonoides analizados en HPLC de fase reversa, provisto de precolumna y columna C₁₈, se inyectó un volumen de 50 µl de muestra del estándar (Quercetina, Apigenina, Kaempferol, Luteolina y Myricetina: 29.53, 11.80, 10.27, 2.73 y 1.00 ppm, respectivamente) a un flujo de 1.0 mlmin⁻¹. Los estándares fueron detectados a una longitud de onda de 350 nm con detector UV-visible, a temperatura ambiente y con solvente H₂O/ACN + TFA.

Estándar	Tiempo de retención (min)
Apigenina	4.30
Myricetina	5.94
Quercetina	8.83
Luteolina	11.52
Kaempferol	15.51

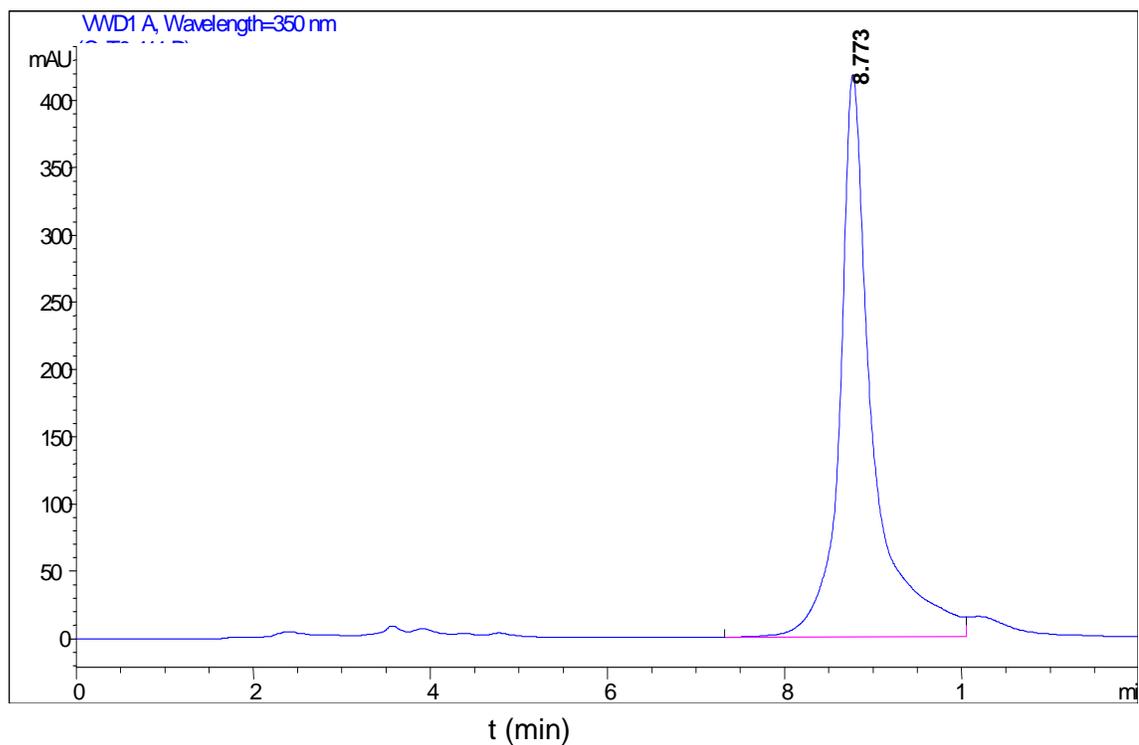


Fig. 25.- Cromatograma de un estándar de flavonoide (Quercetina, 29.53 ppm), resuelto por HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) de fase reversa, utilizando columna Phenomenex Luna 5 μ C₁₈ (250 x 4.60 mm 5 μ), inyectando 50 μ L de muestra a un flujo de 1.0 ml min⁻¹, controlado por bomba peristáltica cuaternaria a una longitud de 350 nm con detector UV-visible, a temperatura ambiente.

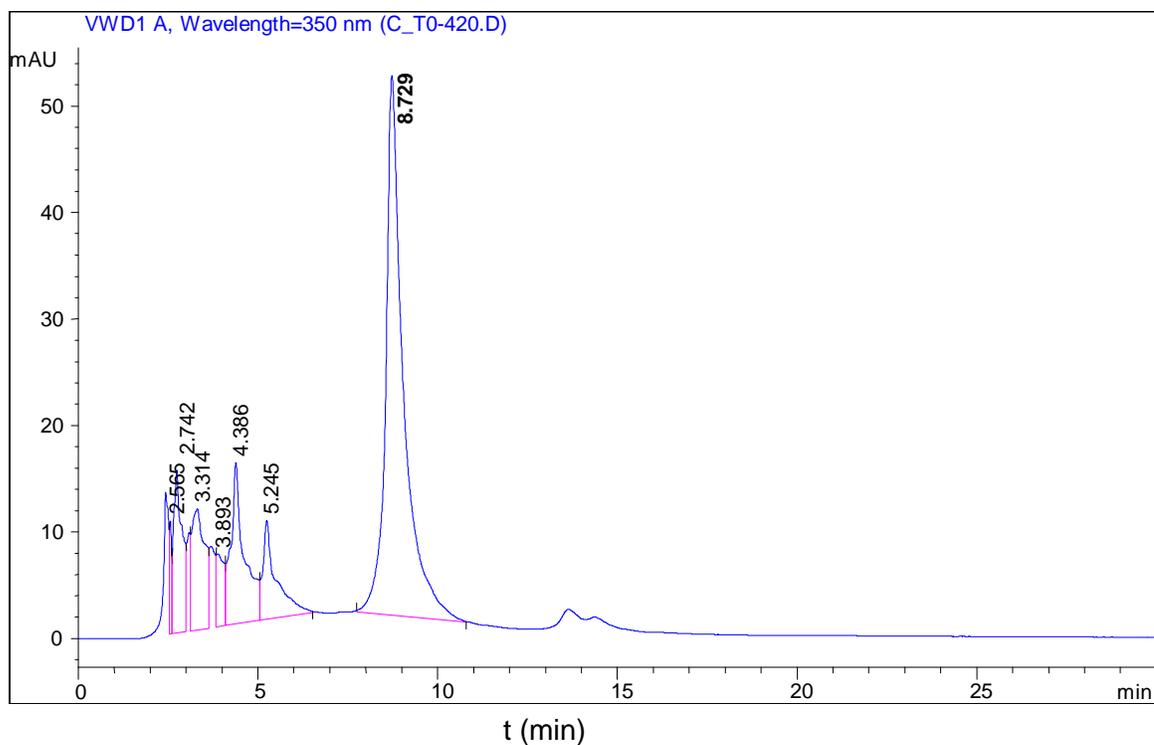


Fig 26.- Cromatograma de Flavonoides en extracto de *Eucryphia cordifolia* (+UV-B), resuelto por HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) de fase reversa, usando columna Phenomenex Luna 5 μ C₁₈ (250 x 4.60 mm 5 μ), inyectando 50 μ L de muestra a un flujo de 1.0 ml min⁻¹, controlado por bomba peristáltica cuaternaria a una longitud de 350 nm con detector UV-visible, a temperatura ambiente.

Tabla 11.- Tiempos de retención (min) de extractos de pigmentos protectores obtenidos de hojas de plántulas de *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia* expuestas a UV-B ambiental (C: control) comparadas con plántulas sometidas a un incremento de radiación UV-B (+). Las mediciones fueron realizadas inmediatamente después de finalizado el tratamiento (plántulas Aclimatadas al estrés UV-B) y luego de 40 días de haber terminado el tratamiento (plántulas Desaclimatadas). Los tiempos de retención de las señales obtenidas son referidos a los tiempos de retención de los estándares en estudio determinados por HPLC. n= 2.

Especies		Tiempos de Retención (min)				
		A	M	Q	L	K
Aclimatación						
<i>N. obliqua</i>	C	ND	5.27	8.81	ND	ND
	+	ND	5.25	8.75	ND	ND
<i>N. alpina</i>	C	4.33	5.18	8.49	ND	ND
	+	4.32	5.15	8.44	ND	ND
<i>E. cordifolia</i>	C	4.34	5.49	8.50	ND	ND
	+	4.37	5.96	8.63	ND	ND
Desaclimatación						
<i>N. obliqua</i>	C	ND	5.25	8.73	ND	ND
	+	ND	5.24	8.73	ND	ND
<i>N. alpina</i>	C	SM	SM	SM	SM	SM
	+	SM	SM	SM	SM	SM
<i>E. cordifolia</i>	C	4.37	5.23	8.66	ND	ND
	+	4.38	5.25	8.73	ND	ND

A: apigenina; M: myricetina; Q: quercetina; L: luteolina; K: kaempferol; ND: no detectado. SM: sin muestra, ya que para el periodo de Desaclimatación no hubo suficiente muestra para las determinaciones.

Finalizado el período de Desaclimatación, se observó que plántulas Control de *N. obliqua* presentaron Myricetina y Quercetina a los 5.25 min y 8.73 min, respectivamente, y a los 5.24 min y 8.73 min en plántulas tratadas. En *E. cordifolia* Control se detectó Myricetina a los 5.23 min y a los 8.66 min Quercetina, en plántulas tratadas se encontró Myricetina con tiempos de retención de 5.25 min y Quercetina a los 8.73 min. Además, se determinó Apigenina a los 4.37 min en plántulas Control y a los 4.38 min en las tratadas.

5.14 Calibración y cuantificación de flavonoides

Para cuantificar los peaks de los flavonoides detectados se realizó una curva de calibración con cada uno de los estándares a diferentes concentraciones conocidas (Quercetina, Apigenina, Kaempferol, Luteolina y Myricetina: 29.53, 11.80, 10.27, 2.73 y 1.00 ppm, respectivamente) usando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase reversa (Fig. 27).

Las ecuaciones de la recta de las curvas obtenidas para calcular la concentración de cada pigmento fueron los siguientes:

Apigenina:	$y = 37271.83x - 31.39$	$r^2: 0.9929$
Myricetina:	$y = 271037x - 19.16$	$r^2: 0.9963$
Quercetina:	$y = 90852x - 1.14$	$r^2: 0.9986$
Luteolina:	$y = 814080x - 0.104$	$r^2: 0.9978$
Kaempferol:	$y = 325649x + 62.68$	$r^2: 0.9963$

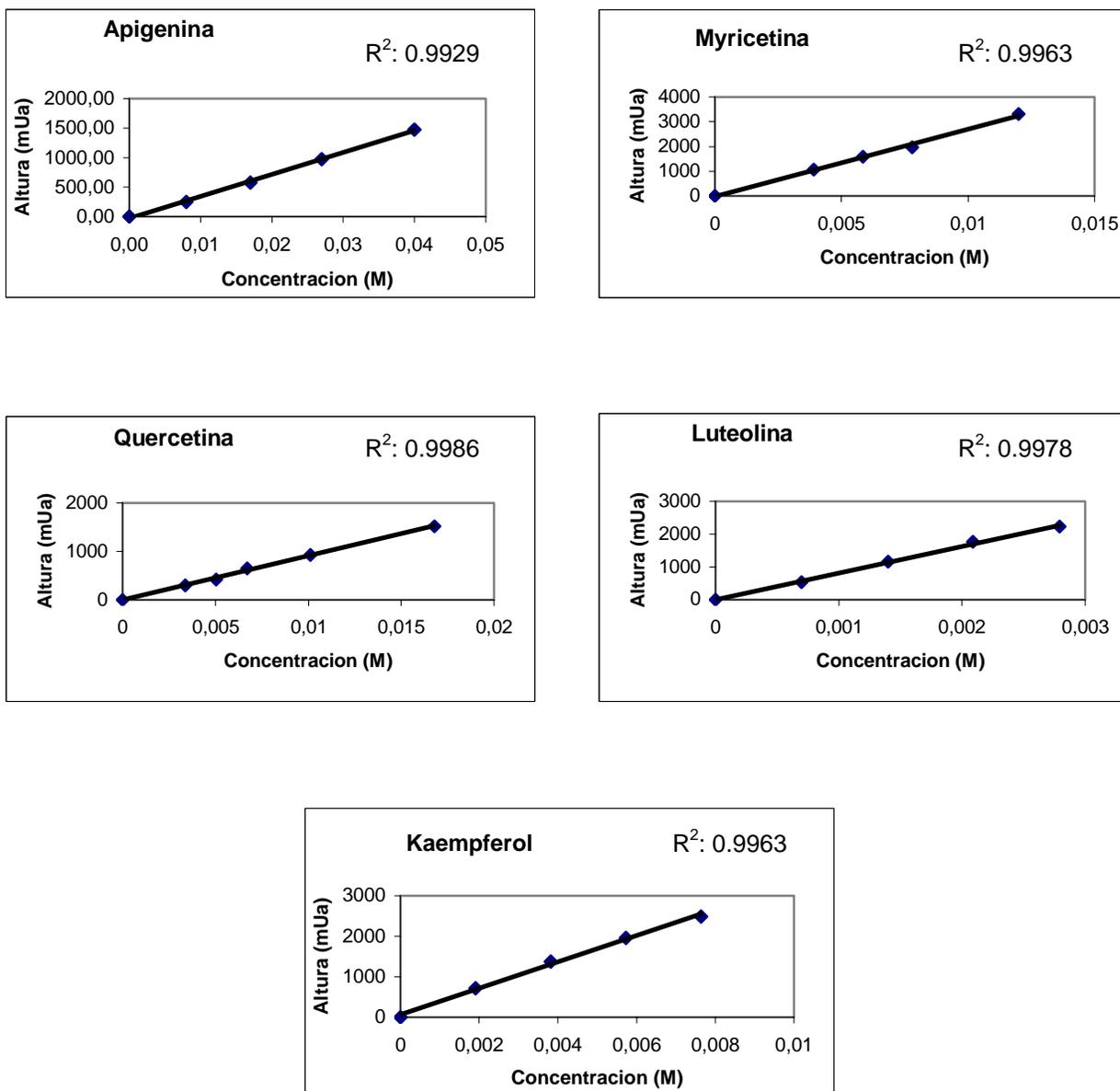


Fig 27- Curvas de calibración de estándares de los flavonoides: Apigenina, Myricetina, Quercetina, Luteolina y Kaempferol obtenidos por HPLC de fase reversa a T° ambiente.

Donde “y” corresponde a la altura de los peaks identificados en el cromatograma y “x” a la concentración (ppm).

A partir de estos datos fue posible identificar y calcular cuantitativamente la concentración de flavonoides presentes en las muestras estudiadas (Tabla 12). En plántulas tratadas de *N. obliqua*, finalizado el período de Aclimatación, se muestra una disminución en los contenidos de Myricetina y Quercetina, respecto al Control. En *N. alpina* disminuyeron los contenidos de los tres flavonoides identificados, mientras que en *E. cordifolia* tratadas los contenidos de Apigenina y Myricetina disminuyeron, aumentando Quercetina.

En la Desaclimatación se aprecia que *N. obliqua* y *E. cordifolia* aumentaron la concentración de Myricetina y Quercetina respecto al Control. Además, se observa un aumento de los contenidos de Apigenina en *E. cordifolia* tratada. Por otro lado, al finalizar el período de estudio, plántulas tratadas de *N. obliqua* aumentaron los contenidos de Myricetina y Quercetina en comparación al término de la Aclimatación.

En *E. cordifolia* se incrementó la concentración de Apigenina y Myricetina, mientras que disminuyó la Quercetina, flavonoide dependiente de la radiación UV-B.

Tabla 12.- Concentración de flavonoides (ppm) en plántulas Control y tratadas (+ UV-B) con un suplemento de radiación UV-B. Determinaciones realizadas al finalizar los períodos de Aclimatación y Desaclimatación. Los estándares Luteolina y Kaempferol no fueron detectados. La Quercetina detectada incluye a Rutina hidrolizada.

Especies		Flavonoides (ppm)		
		Apigenina	Myricetina	Quercetina
Aclimatación				
<i>N. obliqua</i>	Control	ND	8.47E ⁻⁵	1.73E ⁻⁴
	+ UV-B	ND	7.99E ⁻⁵	1.38E ⁻⁴
<i>N. alpina</i>	Control	1.14E ⁻³	9.92E ⁻⁵	2.02E ⁻⁵
	+ UV-B	1.10E ⁻³	9.65E ⁻⁵	1.42E ⁻⁵
<i>E. cordifolia</i>	Control	1.27E ⁻³	8.30E ⁻⁵	8.40E ⁻⁴
	+ UV-B	9.27E ⁻⁴	7.97E ⁻⁵	1.01E ⁻³
Desaclimatación				
<i>N. obliqua</i>	Control	ND	7.45E ⁻⁵	2.56E ⁻⁵
	+ UV-B	ND	8.96E ⁻⁵	1.73E ⁻⁴
<i>N. alpina</i>	Control	SM	SM	SM
	+ UV-B	SM	SM	SM
<i>E. cordifolia</i>	Control	1.11E ⁻³	9.22E ⁻⁵	3.10E ⁻⁴
	+ UV-B	1.28E ⁻³	1.10E ⁻⁴	5.87E ⁻⁴

ND: no determinado. SM: sin muestra, ya que para el período de Desaclimatación no hubo suficiente muestra para las determinaciones.

6.- DISCUSIÓN

Con el presente trabajo se pretendió determinar el efecto del suplemento de radiación UV-B ambiental en las respuestas morfo-anatómicas, fisiológicas y químicas, en el crecimiento y desarrollo de plántulas de *Nothofagus obliqua*, *Nothofagus alpina* y *Eucryphia cordifolia*, postulándose que este incremento de radiación UV-B ambiental (que podría ser ocasionado por efecto de la disminución de la capa de ozono) reduciría, levemente, el crecimiento en altura y biomasa de estos árboles nativos del sur de Chile, lo que se asociaría con el desarrollo de mecanismos de resistencia, tales como: caída prematura de hojas, engrosamiento de la lámina foliar, redistribución de la biomasa y variación en los contenidos de pigmentos foliares, tanto fotosintéticos como absorbedores.

Los resultados obtenidos demostraron que la caída de hojas en *N. alpina* y *E. cordifolia* y la reducción del tamaño de la hoja en *N. obliqua*, por efecto del tratamiento UV-B estaría asociado con reducción de la superficie de absorción. Carvajal (2005) también constató el desprendimiento de hojas en *L. sempervirens* (Laurel) por efecto del tratamiento de radiación UV-B suplementaria al ambiente. En las fagáceas, el brote de numerosas yemas que permanecían cerradas observado, durante el período de Desaclimatación, en las muestras tratadas (+UV-B) permiten inferir que la radiación UV-B estimuló el brote de yemas latentes, el incremento en el número de hojas y crecimiento de brotes axilares (Hunt & McNeil 1999, Barnes *et al.* 1990, Jansen *et al.* 1998). Esta respuesta indicaría capacidad de recuperación de la especie, ya que durante el siguiente período de crecimiento vegetativo, la planta desarrollaría una mayor

cantidad de ramas laterales y de esa manera incrementaría su biomasa foliar (Hunt & McNeil 1999).

Estos resultados conjuntamente con la reducción de la longitud de los entrenudos son considerados por Singh (1996) y Rozema *et al.* (1999) como uno de los mecanismos de aclimatación al UV-B. La respuesta a estos cambios fotomorfogénicos parece estar relacionada con la reducción, debido a la fotooxidación, del ácido Indol acético-3 (IAA), hormona de crecimiento (Hunt & McNeil 1999, L'Hirondelle & Binder 2002).

Diferentes investigadores han señalado que plantas tratadas con radiación UV-B, reducen el crecimiento y longitud del tallo (Bogenreider & Klein 1982, Tevini & Teramura 1989). En este estudio se encontró que la altura del tallo de las dos Fagáceas caducifolias no fue alterada por efecto del UV-B, al igual que lo encontrado por Searles *et al.* (1995) y Manetas (1999) en árboles caducos de los bosques de América Central (*Cecropia obtusifolia*, *Callophyllum longifolium* y *Tetragostris panamensis*) y en especies siempreverdes del Mediterráneo (*Olea europae*, *Ceratonia siliqua* y *Laurus nobilis*), respectivamente. En cambio, la altura del tallo en *E. cordifolia*, fue inhibida por el tratamiento junto con la reducción del número de hojas. Este tipo de respuesta también fue encontrado en *Sophora microphylla* expuesta a un suplemento de radiación UV-B (Hess *et al.* 2002).

El crecimiento en longitud de la raíz fue inhibido por el tratamiento en las tres especies. La explicación podría estar relacionada con la conversión fotoquímica de las auxinas y la liberación de productos fotooxidativos. Así, parte del contenido de auxinas es fotodestruido en el ápice caulinar disminuyendo la cantidad que puede ser

transportada hacia la raíz (Daubenmure 2001). Además, el incremento de la síntesis de flavonoides provocado por esta radiación dificulta el transporte de auxinas, ya que ocupan los mismos carrier que movilizan a estas hormonas, alterándose el radio auxinas:citoquininas (Meijkamp *et al.* 1999, Brown *et al.* 2001).

Las hojas son las estructuras más expuestas a las condiciones ambientales (Tachi 1985), por lo tanto, rápidamente pueden modificar su estructura (Greenberg *et al.* 1997). El aumento del grosor, por acción del UV-B, incrementa la distancia que tiene que recorrer el fotón para llegar a las células fotosintetizadoras (Bornman & Vogelmann 1990, Björn 1996). Dicha respuesta también se asociaría con variación de los contenidos de pigmentos y la reubicación de clorofila en la hoja (Teramura & Sullivan 1994, Jansen *et al.* 1998, L'Hirondelle & Binder 2002).

En *N. obliqua* y *N. alpina*, el grosor de la lámina foliar fue incrementado significativamente debido al aumento de la cutícula superior y parénquima empalizada aminorando el efecto de la radiación UV-B (Tevini *et al.* 1983), en cambio, en *E. cordifolia*, que tiene un engrosamiento de las capas filtradoras de luz (cutícula, epidermis e hipodermis), mantiene el grosor de la hoja.

Day *et al.* (1992), Ziska & Teramura (1992) y Greenberg *et al.* (1997) señalan que la radiación UV-B puede incrementar la síntesis de pigmentos absorbentes de UV-B como los flavonoides, flavonas, flavonoles, etc., especialmente en las ceras epicuticulares en células epidérmicas. Éstos pueden atenuar la penetración de la radiación UV-B, ya sea por reflexión o absorción (Jansen *et al.* 1998), reduciendo el daño al PSII al interceptar alrededor del 95% de las longitudes de onda entre los 280 a 340 nm (Dillenburg 1995, Beggs *et al.* 1986). Esto, sin embargo, no significa que la

concentración de compuestos absorbedores sea indicadora de la tolerancia al UV-B (Tevini 1983, DeLucia *et al.* 1992, Day & Vogelmann 1995, Phoenix *et al.* 2002).

Los altos contenidos de flavonoides epicuticulares observados en *S. microphylla* fueron asociados con las altas dosis de radiación UV-B (Hess *et al.* 2002). Esta conducta también ha sido reportada por Ballaré *et al.* (2001) en varias especies del género *Nothofagus*. El incremento en la concentración de flavonoides, aparece asociado a la síntesis de la enzima fenil alanina amonía liasa (PAL) y chalcona sintasa (CHS) (Caldwell *et al.* 1983, Ballaré *et al.* 1995, Bornman, 1999, Meijkamp *et al.* 1999).

En nuestro estudio se observó, que el suplemento de radiación UV-B redujo la concentración de Apigenina y Myricetina en las tres especies estudiadas. Quercetina, cuya síntesis esta asociada con la radiación UV-B (Greenberg *et al.* 1997), incrementó en *E. cordifolia* sólo durante el tratamiento de + UV-B ya que al finalizar la Desaclimatación los contenidos disminuyeron. La reducción de Quercetina en los *Nothofagus* durante la aplicación del suplemento de radiación UV-B podría deberse al estado fenológico de las hojas adultas que permanecieron en la planta y de las cuales se obtuvieron las muestras, ya que la época de estudio coincide con el inicio de la senescencia foliar. Contrariamente a lo expuesto, los altos contenidos de flavonoides encontrados en hojas nuevas de *L. stariciflua* no fueron modificados durante su desarrollo (Dillenburg *et al.* 1995). En general, las plantas sintetizan grandes cantidades de pigmentos sólo cuando son necesarios para su protección (Mohr & Drum-Herrel 1983, Schnitzler *et al.* 1996).

Olsson *et al.* (1998) estudiaron la respuesta diferencial de flavonoides a un aumento de radiación UV-B en *Brassica napus*, encontrando aumentos significativos en

la concentración de flavonoides del tipo tri y tetra-hidroxiflavonoles como Kaempferol y Quercetina, siendo más acentuado los de Quercetina, que tiene mejores propiedades quenchadoras de superóxidos que otros flavonoides (Tournaire *et al.* 1993). Similares respuestas se han encontrado en extractos foliares de *L. sempervirens* tratadas con un suplemento de radiación UV-B ambiental (Carvajal 2005, Comunicación Personal).

En nuestro estudio los flavonoides Luteolina y Kaempferol no fueron identificados, lo que indicaría que en las tres especies estos flavonoides no se relacionarían con la absorción de fotones de longitud de onda corta (Varas 2004).

Rozema *et al.* (1997) han señalado que la radiación UV-B modifica la producción de biomasa (%PS). Esto fue especialmente evidenciado en *E.cordifolia* donde la reducción de biomasa alcanza al 33.4%, mientras que en *N. obliqua* la producción de materia seca se mantuvo y aumentó levemente en *N. alpina* bajo el tratamiento del suplemento de radiación UV-B ($37.26 \text{ KJm}^{-2}\text{h}^{-1}$). Nuestros resultados están sustentados por lo reportado por Bassman *et al.* (2003), quienes investigaron el efecto de tres niveles de radiación UV-B sobre el crecimiento de especies arbóreas encontrando que la dosis más alta ($21.8 \text{ KJm}^{-2}\text{d}^{-1}$) aumentó la producción de biomasa en *Populus trichocarpa*, y la redujo en *Quercus rubra*, *Picea engelmannii* y *Pinus ponderosa*.

La productividad en materia seca de una planta es dependiente de la estabilidad de su contenido hídrico. El incremento de materia seca obtenido en *N. obliqua* (8.04%) y en *N. alpina* (50.6%) podría estar asociado con mantención del contenido hídrico por cierre estomático en respuesta a la radiación UV-B. Es sabido que el incremento de esta radiación disminuye la conductividad estomática lo que incrementa la resistencia al estrés hídrico en pinos de la zona mediterránea (*Pinus pinea* y *Pinus halepensis*)

(Petropoulou *et al.* 1995), probablemente este cierre estomático también está relacionado con la resistencia a la radiación UV-B ambiental encontrada en especies arbóreas de nueva Zelanda (*Nothofagus solandrii* y *Griselinia littoralis*) y de Tierra del Fuego (*N. antarctica*, *N. pumilio* y *N. betuloides*) las que no fueron afectadas mayormente por la radiación UV-B ambiental (Hunt & McNeil 1999, Ballaré *et al.* 2001).

La radiación UV-B, además, como un efecto indirecto puede afectar el transporte de carbohidratos fotosintetizados por lo que la distribución de ellos en los distintos órganos varía (Rozema *et al.* 1997, Rozema *et al.* 1999). Los mayores movimientos de asimilados fueron encontrados en *E. cordifolia*. También, en *Laurelia sempervirens* se encontró una movilización de estos asimilados por efecto del tratamiento UV-B (Carvajal 2005, Comunicación personal).

Los contenidos de cenizas dan información sobre la concentración de nutrientes inorgánicos esenciales para el crecimiento de los vegetales y representan la disponibilidad de nutrientes del suelo (Larcher 2003). La reducción de la ceniza en plantas tratadas (*N. alpina* - 11.3%; *E. cordifolia* - 31.25%) podría estar relacionado con el incremento en la síntesis de compuestos dependientes del UV-B, tales como flavonoides, ligninas y taninos (Larcher 2003). Finalizado el periodo de Desaclimatación, las plántulas tratadas de *E. cordifolia* mostraron valores más bajos (- 59.45%), lo que estaría indicando problemas en el transporte de los nutrientes. El incremento de cenizas presentes en las raíces de *E. cordifolia* tratadas (+ 28.67%) confirmaría lo propuesto (Chapin 1991, Ballaré *et al.* 1995).

La maquinaria fotosintética de algunas plantas parece estar bien protegida del daño directo de la radiación UV-B (Teramura & Sullivan 1994). Una disminución de la

Chla y Chlb ante la exposición lumínica, como ocurrió en *N. obliqua*, reduce la posibilidad de daño al presentar una menor cantidad de moléculas de clorofilas que absorben el exceso de energía (Munné-Bosch & Alegre 2000). La menor síntesis de clorofilas es uno de los síntomas más comunes frente al estrés UV-B (Musil *et al.* 2002). Por el contrario, en *N. alpina* y *E. cordifolia* la concentración de clorofilas (50% y 48%, respectivamente) aumentó. Lo que está sustentado por los resultados obtenidos por Dillenburger *et al.* (1995) y Tevini & Iwanzik (1983), quienes encontraron una mayor acumulación de pigmentos fotosintetizadores en *L. stariciflua* (árbol caduco) y en plántulas de rábano expuestas a UV-B. En general, no hay acuerdo respecto al efecto de la radiación UV-B sobre los contenidos de clorofilas aunque aparece como más sensible a la radiación UV-B los carotenos (Hunt & McNeil 1999). Esta concentración de carotenos puede ser importante para evitar la fotodestrucción oxidativa de la clorofila, permitiendo la sobrevivencia de los organismos fotosintetizadores (Codgell RJ & Frank HA 1987). En *E. cordifolia* también aumentaron los contenidos de carotenos (+ 45.5%), coincidiendo con Hess *et al.* (2002), quienes observaron aumento en la concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides) por efecto de la radiación UV-B en *S. microphylla*.

Cambios en la fluorescencia de la clorofila *a* se deben al efecto directo de la radiación UV-B sobre el PSII (Teramura & Ziska 1996). Estos investigadores reportaron que los daños pueden estar relacionados a cambios en la capacidad oxidativa de los centros de reacción o alteraciones en la proteína del PSII (Krause *et al.* 1996, Krause *et al.* 1999). El aumento de F_0 en plántulas tratadas de *N. obliqua* y *E. cordifolia* indicaría daño en los pigmentos del PSII (Demmig-Adams 1990). Sin embargo, la mayor F_0

observado en *E. cordifolia* estaría asociado al incremento de la concentración de pigmentos fotosintetizadores (clorofilas y carotenoides) y absorbedores (flavonoides). Un bajo nivel de F_o como el que se observa en plántulas tratadas de *N. obliqua* y *N. alpina*, podría deberse a la acumulación de pigmentos como fenilpropanoides o antocianos en la epidermis (Krause *et al.* 1999), los cuales reducen la transmisión de la luz de excitación de fluorescencia (Tevini & Iwanzik 1983), o a problemas metodológicos como determinaciones realizadas sólo en hojas adultas o a las escasas repeticiones posibles por falta de material.

F_v/F_m a sido un parámetro utilizado, tradicionalmente, como indicador de estrés en plantas (Larcher 2003), siendo su nivel óptimo de 0.8 (Krause & Weiss 1991, Maxwell & Johnson 2000, Rizza *et al.* 2001). En el presente estudio los valores oscilaron entre 0.75 y 0.85, es decir, dentro de los valores normales para las plantas en buen estado fisiológico. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Hunt & McNeil (1999) en tres especies de *Nothofagus* de Nueva Zelanda y con Xiong & Day (2001) en plantas vasculares de la antártica. Krause (1994) señala que la poca variación de este parámetro, puede estar asociado con altos niveles de compuestos absorbedores de UV-B presentes en las hojas o con el desarrollo de mecanismos de resistencia al UV-B (Caldwell 1983, Dillenburg *et al.* 1995, Naget *et al.* 1998). La disminución del parámetro F_v/F_m medido en cinco especies siempreverdes (*Pseudotsuga menziesii*, *Pinus ponderosa*, *Euonymus kiautschovicus*, *Mahonia repens* y *Malva neglecta*) se relacionó con incremento en el ciclo de las xantofilas (carotenos) (Verhoeven *et al.* 1996). Éstos actuarían como pigmentos fotoprotectores en los procesos de disipación de energía.

Las diferencias en el rendimiento cuántico efectivo (Φ_{PSII}) obtenido en las tres especies sugieren diferencias genotípicas entre estas plantas (Ulloa 2002). El aumento del Φ_{PSII} observado en *N. obliqua*, *N. alpina* y *E. cordifolia* indicaría la capacidad para utilizar la energía absorbida por el PSII vía fotoquímica a favor de la fotosíntesis, demostrando así que el PSII no fue fotoinhibido (por el exceso de energía recibida) (Maxwell & Johnson 2000, Ulloa 2002). Además, se sustenta con la emisión de F_m que fue mayor al final del estudio, indicando una mayor resistencia a la fotoinhibición.

El aumento del quenching fotoquímico (qP), en las tres especies en estudio, puede relacionarse con el cierre de los centros de reacción resultante de una saturación lumínica (Zuñiga 2002) y, por ende, un mejor manejo de los mecanismos de transformación de la energía fotoquímica y del transporte de electrones.

En general, el parámetro que presentó mayores variaciones respecto al control fue el quenching no fotoquímico (qNP) (Fig. 20) debido probablemente a que el tiempo de recuperación de las plantas (40 días) no fue el adecuado.

Finalmente, se aprecia que por efecto del suplemento de radiación UV-B ambiental los Nothofagus, por estar genéticamente adaptados a altas condiciones lumínicas, presentaron mecanismos de resistencia como el desprendimiento de las hojas en *N. obliqua*. La menor resistencia al tratamiento UV-B en *E. cordifolia* se puede asociar con su intolerancia a la alta luz solar, por lo que comúnmente está rodeado y protegido de otros árboles.

Además, existe una producción diferenciada de flavonoides, sintetizada sólo cuando la planta está frente a un estrés UV-B y que, además, existirían otros pigmentos filtradores o protectores de radiación UV-B no identificados en el presente estudio.

Con los antecedentes expuestos se concluye que la hipótesis propuesta es aceptada.

7.- CONCLUSIONES

El tratamiento de suplemento de radiación UV-B ambiental:

- Mostró que *E. cordifolia* fue la especie más vulnerable al suplemento de radiación UV-B ambiental asociado con la baja tolerancia a la luz del hábitat de crecimiento y la más resistente fue *N. alpina*.
- Evidenció el desarrollo de diversos mecanismos de resistencia al UV-B, tales como:
 - Caída prematura de hojas.
 - Engrosamiento de la lámina foliar.
 - Incremento en la síntesis de pigmentos fotosintetizadores (*N. alpina* y *E. cordifolia*).
 - Síntesis de pigmentos protectores (*N. alpina* y *E. cordifolia*).
- No afectó el crecimiento del tallo ni la productividad en biomasa de *N. obliqua* y *N. alpina*.
- No afectó la eficiencia fotoquímica del PSII ni los parámetros F_v/F_m y ϕ_{PSII} .
- Inhibió la síntesis de los flavonoides (con una absorción máxima a ~350 nm): Apigenina y Myricetina.
- La ausencia del tratamiento UV-B (Desaclimatación) estimuló la síntesis de Quercetina en *E. cordifolia*.
- La síntesis de pigmentos absorbedores de radiación UV-B evaluados no se asoció con la capacidad de Aclimatación.
- La síntesis de Quercetina fue dependiente del tratamiento UV-B en *E. cordifolia*.

8.- BIBLIOGRAFÍA

- Andreo CS (1984).** Fotosíntesis. Secretaría general de la organización de los estados americanos, programa regional de desarrollo científico y tecnológico.
- Balkenhol CM (2002).** Efecto de la Radiación Ultravioleta-B sobre la capacidad de germinación y desarrollo del tubo polínico en polen de *Gevuina avellana* Mol. (Proteaceae). Tesis, Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, 76p.
- Ballaré CL, Scopel AL & Sánchez RA (1995).** Plant Photomorphogenesis in Canopies, Crop Growth and Yield. *Hort Science* 30:1172-1181.
- Ballaré CL, Rousseaux MC, Searles PS, Zaller JG, Giordano CV, Robson TM, Caldwell MM, Sala OE & Scopel AL (2001).** Impacts of solar ultraviolet-B radiation on terrestrial ecosystems of Tierra del Fuego (southern Argentina). An overview of recent progress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 62:67-77.
- Barnes PW, Flint SD & Caldwell MM (1990).** Morphological responses of crop and weed species of different growth forms to ultraviolet-B radiation. *Amer J Bot* 77(10):1354-1360.
- Bassman JH, Edwards GE & Robberecht R (2003).** Photosynthesis and growth in seedlings of five forest tree species with contrasting leaf anatomy subjected to supplemental UV-B radiation. *Forest Science* 49(2):176-187.
- Beggs CJ, Schneider-Ziebert U & Wellmann E (1986).** UV-B radiation and adaptative mechanisms in plants. In: Worrest RC and Caldwell MM (eds), Stratospheric ozone

reduction, solar ultraviolet radiation and plant life. Springer-Verlag, Berlin. pp 235-250.

Björn LO (1996). Effects of Ozone depletion and increased UV-B on terrestrial ecosystems. *Intern J Environmental Studies* 51:217-243.

Björn LO (1999). Ultraviolet-B radiation, the ozone layer and ozone depletion. *Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems*. Rozema J (ed). Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. pp 21-37.

Bogenreider A & Klein R (1982). The role of solar ultraviolet radiation in Marine Ecosystems. Calkins J (ed). Plenum Press, New York. pp 670.

Bornman JF & Vogelmann TC (1990). Effects of UV-B radiation on leaf optical properties measured with fibre optics. *J Exp Botany* 42:547-554.

Bornman JF (1999). Localisation and functional significance of flavonoids and related compounds. In: *Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems*. Rozema J (ed). Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. pp 59-69.

Britton G & Goodwin TW (1971). Biosynthesis of carotenoids. *Methods in Enzymology* XIII(C): 654-701.

Brown DE, Rashott AM, Murphy AS, Normaly J, Tague BW, Peer WA, Tair L & Muday GK (2001). Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in Arabidopsis. *Plant Physiol* 126:524-535.

- Buchanan BB, Gruissenm W & Jones RL (2000).** Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologist, Rockville, Maryland. pp. 1158-1203.
- Cabrera S, Bozzo S & Fuenzalida H (1995).** Variations in UV radiation in Chile. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 28:137-142.
- Cabrera S & Fuenzalida H (1999).** Interannual variations of global UV radiation in Santiago. *Geophysical Research Letters* 19(26):2945-2948.
- Cadena E (1999).** Sustancias flavonoides en: Antioxidantes y calidad de vida Online. <<http://www.antioxidantes.com.ar/12/home2.htm>>
- Cárdenas E (1994).** Flujo de polen, reproducción y fecundidad en *Nothofagus obliqua* (mirb.) oerst. Tesis, Escuela de Educación media Científico Humanista, Facultad de Filosofía y Humanidades, Universidad Austral de Chile, 77p.
- Carvajal M (2005).** Determinación de pigmentos foliares mediante HPLC en *L. sempervirens* tratadas con suplemento de radiación UV-B y su efecto con el crecimiento. Tesis en preparación. Escuela de Química y Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.
- Caldwell M (1978).** Ultraviolet radiation and plants. In: Plant Physiology. 2^a ed. Wadsworth Publishing Company Inc. U.S.A. pp 397-399.
- Caldwell MM, Robberecht R & Flint SD (1983).** Internal filters: Prospects for UV-acclimation in higher plants. *Physiol Plant* 58:445-450.
- Cogdell RJ & Frank HA (1987).** How carotenoids function in photosynthetic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 895: 63-79.
- Chapin FS III (1991).** Integrated responses of plants to stress. *BioScience* 41:29-36.

- Daubenmure RF (2001).** Ecología vegetal: Tratado de autoecología de plantas. México, Noriega. 496p.
- Day TA, Vogelmann TC & DeLucia EH (1992).** Are some plant life forms more effective than others in screening out ultraviolet-B radiation? *Oecologia* 92:513-519.
- Day TA (1993).** Relating UV-B radiation screening effectiveness of foliage to absorbing compound concentration and anatomical characteristics in a diverse group of plants. *Oecologia* 95:542-550.
- Day TA & Vogelmann TC (1995).** Alterations in photosynthesis and pigments distributions in pea leaves following UV-B exposure. *Physiol Plant* 94:430-440
- DeLucia EH, Day TA & Vogelmann TC (1992).** Ultraviolet-B and visible light penetration into needles of two species of subalpine conifers during foliar development. *Plant, Cell and Environment* 15:921-929.
- Demmig B, Winter K, Krüger A & Czygan F (1987).** Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant Physiol* 84:218-224.
- Demmig-Adams B (1990).** Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophylls zeaxanthin. *Biochim Biophys Acta* 1020:1-24.
- Demmig-Adams B & Adams III (1992).** Photoprotection and other responses of plants to light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol* 43:599-626.
- Demmig-Adams B & Adams III (1996).** The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1:21-26
- Dillenburger LR, Sullivan JH & Teramura AH (1995).** Leaf expansion, development of photosynthetic capacity and pigments in *Liquidambar styraciflua*

(Hamamelidaceae)-effects of UV-B radiation. *American Journal of Botany* 82:878-885.

Di Castri F & Hajek E (1976). Bioclimatología de Chile. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago. 128p.

Donoso C, Morales J & Romero M (1990). Hibridación natural entre roble (*Nothofagus obliqua*) (Mirb) Oerst. y raulí (*N. alpina*) (Poepp. & Endl.) Oerst, en bosques del sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 63:49-60.

Donoso C, Escobar B & Cortes M (1991). Técnicas de vivero y plantación para Raulí (*Nothofagus alpina*). Documento técnico N°53. Chile Forestal. 8p.

Donoso C, Escobar B & Cortes M (1992). Técnicas de vivero y plantación para Roble (*Nothofagus obliqua*). Documento técnico N°62. Chile Forestal. 8p.

Donoso C, Escobar B & González M (1993). Técnicas de vivero y plantación para Ulmo (*Eucryphia cordifolia*). Documento técnico N°71. Chile Forestal. 8p.

Farman J, Gardiner B & Shanklin J (1985). Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO_x/NO_x interaction. *Nature* 315:207-210.

Frohnmeier H & Staiger D (2003). Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiology* 133:1420-1428.

Genty B, Briantais J & Baker N (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 990:87-92.

Gotz T, Windhovel P & Sandman G (1999). *Plant Physiology* 120:599-604.

Greenberg BM, Wilson MJ, Huang XD, Duxbury CL, Gerhardt KE & Gensemer RW (1997). The effects of ultraviolet-B radiation on higher plants. In: Plants for

Environmental Studies (Edited by Wang W, Gorsuch JW & Hughes JS). Lewis publishers, NY. pp 1-35.

Herman R & McKenzie R (1998). Ultraviolet radiation at the Earth's surface. Scientific Assessment of Ozone World Meteorological Organization, Global Ozone Research and Monitoring Project. UNEP Report 9:9.25-9.32.

Hernández R (2001). Libro Botánica online. <http://www.forest.ula.ve/rubenhq>

Hertog GL, Hollmna CH & Katan B (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the netherlands. *J Agric Food Chem* 40:2379-2383.

Hess SA, Álvarez JL, Iturra MG & Romero MM (2002). Evidence of UVB differential response in *Sophora microphylla* from shady and sunny places. *Bo. Soc Chil Quím* 47:501-510.

Hoffmann J (1997). Flora Silvestre de Chile. Zona araucana. Árboles, arbustos y enredaderas leñosas. Cuarta edición revisada. Ediciones fundación Claudio Gay. Santiago. 2ª edición. 273p.

Hopkins W (1999). Introduction to Plant Physiology. 2a ed. Wiley. U.S.A. 512p.

Horton P, Ruban AV & Walters RG (1996). Regulation of light harvesting in green plants. Indication by nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol* 106:415-420.

Huber A (1970). Diez años de observaciones climatológicas en la estación Teja – Valdivia. 1960-1969. Valdivia, Universidad Austral de Chile. 46p.

Huck CW, Buchmeiser MR & Bonn GK (2001). Fast analysis of flavonoids in plant extracts by liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection on poly

(carboxylic acid)-coated silica and electrospray ionization tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 943:33-38.

Huner NPA, Öquist G, Hurry VM, Krol M, Falk S & Griffith M (1993). Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. *Photosynth Res* 37:19-39.

Hunt JE & McNeil DL (1999). The influence of present-day levels of ultraviolet-B radiation on seedlings of two Southern Hemisphere temperate tree species. *Plant Ecology* 143:39-50.

Hutchinson J (1959). The Families of Flowering Plants. Oxford University press. 510p.

Jansen AK, Gaba V & Greenberg BM (1998). Higher plants and UV-b radiation; balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci* 3: 131-135.

Karabourniotis G, Kotsabassidis D & Manetas Y (1995). Trichome density and its protective potential against ultraviolet-B radiation damage during leaf development. *Can J Bot* 73:376-383.

Karabourniotis G & Bornman JF (1999). Penetration of UV-A, UV-B and blue light through leaf trichome layers of two xeromorphic plants, olive and oak, measured by optical fibre microprobes. *Physiologia Plantarum* 105:655-661.

Kirchhoff VWJH, Zamorano F & Casiccia C (1997). UV-B enhancements at Punta Arenas, Chile. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 38: 174-177.

Krause G (1988). Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanism. *Physiol Plant* 74:566-574.

Krause GH & Weis E (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42:313:349.

- Krause GH (1994).** Photoinhibition induced by low temperature. In: Baker NR, Bowyer JR (eds). Photoinhibition of photosynthesis. From molecular mechanism to the field BIOS Scientific Publ., Oxford. pp 331-348.
- Krause GH & Winter K (1996).** Photoinhibition of photosynthesis in plants growing in natural tropical forest gaps: a chlorophyll fluorescence study. *Bot Acta* 109:456-462.
- Krause GH, Schmude C, Garden H, Koroleva OY & Winter K (1999).** Effects of solar ultraviolet radiation on the potential efficiency of photosystem II in leaves of tropical plants. *Plant Physiol* 121:1349-1358.
- Kulandaivelu G, Lingakumar K & Premkumar A (1996).** UV-B Radiation. In: Plant Ecophysiology. (ed). Prasad, M. John Wiley and Sons, Inc. India. pp 41-60.
- L'Hirondelle SJ & Binder WD (2002).** Ultraviolet-B radiation impacts on tree seedlings in British Columbia (Eds.). For. Sci. Prog., B.C. Min For., Victoria, B.C. Land Mange. Handb. n° 49. 34p.
- Lambers H, Stuart F & Pons T (1998).** Plant Physiological Ecology. Springer-Verlag New York Inc. U.S.A. 540p.
- Larcher W (2003).** Physiological Plant Ecological. Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. 4^a ed. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. NY. 513p.
- Law J & Rilling H (1985).** Steroids and isoprenoids; Part B. *Methods in Enzimology* 111:113-149.
- Lichtenthaler HK & Wellburn AR (1983).** Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc T* 603:591-592.

- Lissy E & Sanhuesa E (1996).** Radiación Solar y Fotoprocesos Atmosféricos. Santiago, Chile.
- Long SP, Humphries S & Falkowski P (1994).** Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45:633:662.
- Lovengreen C, Fuenzalida H & Villanueva L (2000).** Ultraviolet Solar radiation at Valdivia, Chile (39,8°S). *Atmospheric Environment* 34:4051-4061.
- Lovengreen C, Álvarez JL, Fuenzalida H & Aritio M (2002).** Radiación ultravioleta productora de eritema en Valdivia. Comparación entre inferencias satelitales, modelo de transferencia radiativa y mediciones desde Tierra. *Rev Méd Chile* 130:17-25.
- McQuarrie D & Rock P (1984).** General Chemistry. 3^a ed. Freeman and Company. U.S.A. 1083p.
- Mabry TJ, Markham KR & Thomas MB (1970).** The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, NY. 354p.
- Madronich S (1992).** Implications of recent total atmospheric ozone measurements for biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface. *Geophysical Research Letter* 19:37-40.
- Madronich S, McKenzie R, Björn L & Caldwell M (1998).** Chapter 1: Changes in Biologically Active Radiation Reaching the Earth's Surface. In: The U.S. Global Change Research Information Office. Capítulo 1
<http://www.gcric.org/UNEP/1998/UNEPtoc.html>. (20 de diciembre de 2001).

- Manis L & Wilson M (2001).** Reverse-Phase HPLC analysis of flavonoids using evaporative light scattering detection. Alltech Associates, Inc. <http://www.alltechweb.com>
- Manetas Y (1999).** Is enhanced UV-B radiation really damaging for plants? Some case studies with European Mediterranean. In: *Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems*. Rozema J (ed). Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. pp 251-263.
- Martínez-Flórez J, González-Gallego JM & Tuñón MJ (2002).** Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp* 17:271-278.
- Maxwell K & Jonson GN (2000).** Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 345(51):659-668.
- Meijkamp B, Aerts R, Van de Staaij J, Tosserams M, Ernst W & Rozema J (1999).** Effects of UV-B on Secondary Metabolites in Plants. In: *Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems*. Rozema J (ed). Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. pp 71-99.
- Middleton EM & Teramura AH (1993).** The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. *Plant Physiol* 103:741-752.
- Mohr H and Drum-Herrel H (1983).** Coaction between phytochrome and blue/UV light in anthocyanin synthesis in seedlings. *Physiologia Plantarum* 58:408-414.
- Montes M, Wilkomirsky T & Valenzuela L (1992).** Plantas medicinales. Ediciones Universidad de Concepción. 207p.
- Moore R, Clark & Vodopich D (1998).** Botany. 2^a ed. WCB/McGraw-Hill. U.S.A. 919p.

- Munné-Bosch S & Alegre L (2000).** Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210:925-931.
- Muñoz M (1980).** Flora Parque Nacional Puyehue. Editorial Universitaria s.a. 557p.
- Musil CF, Chimphango SBM & Dakora FD (2002).** Effects of elevated ultraviolet-B radiation on native and cultivated plants of southern Africa. *Annals of Botany* 90:127-137.
- Naget LM, Bassman JH, Edwards GE, Robberecht R & Franceschi (1998).** Leaf anatomical changes in *Populus Trichocarpa*, *Quercus rubra*, *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus ponderosa* exposed to enhanced ultraviolet-B radiation. *Physiologia Plantarum* 104:385-396.
- Niyogi KK (1999).** Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:333-359.
- Olivares E (2005).** Tesis, Escuela de Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, 57p.
- Olsson LC, Veit M, Weissenböck G & Bornman JF (1998).** Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. *Phytochemistry* 49(4):1021-1028.
- Ormrod D & Hale B (1995).** Physiological Responses and crops to Ultraviolet-B radiation stress. In: Pessaraki M (ed). Handbook of plant and crop physiology. Marcel Dekker, Inc. U.S.A. pp 761-770.
- Parker L (1992).** Carotenoids. Part A: Chemistry, separation, quantitation and antioxidation. *Methods in Enzimology* 213:185-205.

- Pérez MS (1998).** Parámetros químicos en la fase de prefloración en especies del género *Nothofagus*. Tesis, Escuela de Educación media Científico Humanista, Facultad de Filosofía y Humanidades, Universidad Austral de Chile, 66p.
- Petropoulou Y, Kyparissis A, Nikolopoulos A & Manetas Y (1995).** Enhanced UV-B radiation alleviates the adverse effects of summer drought in the Mediterranean pines under field conditions. *Physiol Plant* 94:34-44.
- Petrucci RH & Hardwood WS (1999).** Química general. Principios y aplicaciones modernas.
- Phoenix GK, Gwynn-Jones D, Lee AJ, Callaghan TV (2002).** Ecological importance of ambient solar ultraviolet radiation to a sub-arctic heath community. *Plant Ecology* 165:263-273.
- Pinto M & Lizana C (2004).** Respuestas y mecanismos de protección en las plantas a la radiación ultravioleta-B: con comentarios sobre evolución. Fisiología Ecológica en Plantas. Mecanismos y respuestas a estrés en los ecosistemas. Marino H (ed). EUV, Valparaíso, Chile. pp 43-58.
- Rau W (1988).** Functions of carotenoids other than in photosynthesis. In: Goodwin TW (ed). *Plant Pigments*, San Diego, CA: Academia Press Inc. pp 231-255.
- Reuber S, Bornman JF & Weissenböck G (1996).** A flavonoid mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) exhibits increased sensitivity to UV-B radiation in the primary leaf. *Plant Cell Environ* 19:593-601.
- Rizza F, Pagani D, Stanca AM & Cattivelli L (2001).** Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats. *Plant Breeding* 120:389-396.

- Rodríguez R, Matthei O & Quezada M (1983).** Flora arbórea de Chile. Editorial Universitaria de Concepción, Chile.
- Rousseaux M, Ballaré C, Giordano C, Scopel A, Zima A, Szwarcberg-Bracchitta M, Searles P, Caldwell M & Díaz S (1999).** Ozone depletion and UVB Radiation: Impact on Plant DNA damage in Southern South America. In: PNAs Online. 96(26): 15310-15315. <http://www.pnas.org/cgi/content/full/96/26/15310> (10 de noviembre de 2001).
- Rozema J, Van de Staaij J, Björn LO & Caldwell MM (1997).** UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends Ecol and Evol* 12:22-28.
- Rozema J, Staaij J, Björn L & Nancy D (1999).** Depletion of stratospheric ozone and solar UV-B radiation: evolution of land plants, UV-screens and function of polyphenolics. *Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems*. Rozema J (ed). Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. pp 1-19.
- Saavedra IA (2004).** Respuestas fisiológicas de *Nothofagus nitida* (Phil.) Krasser ante el estrés hídrico y el estrés lumínico. Tesis, Escuela de Ingeniería Forestal, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Austral de Chile, 34p.
- Schnitzler JP, Jungblut TP, Séller W, Köfferlein M, Hutzler P, Heinzmann U, Schmelzer E, Ernst D, Langebertels C & Sandermann HJ (1996).** Tissue localization of UV-B screening pigments of chalcone synthase mRNA in needle of scots pine seedlings. *New Phytol* 132:247-258.

- Schreiber U, Schliwa U & Bilger W (1986).** Continuous recording of photochemical and nonphotochemical fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* 10: 51-62.
- Searles P, Caldwell M & Winter K (1995).** The response of five dicotyledon species to solar ultraviolet-B radiation. *Am J Bot* 82: 445-453.
- Singh A (1996).** Growth, physiological and biochemical responses of three tropical legumes to enhanced UV-B radiation. *Canadian Journal of Botany* 74:135-139.
- Skoog DA & Leary JJ (1996).** Análisis Instrumental. McGraw Hill. 4ª edición. España. 935p.
- Somersalo S & Krause G (1989).** Photoinhibition at chilling temperatura. Fluorescence characteristic of unhardened and cold acclimated spinach leaves. *Planta* 177:409-416.
- Steubing L, Godoy R & Alberdi M (2001).** Métodos de Ecología Vegetal. Editorial Universitaria. Chile. 345p.
- Stryer L, Berg J & Tymoczko J (2000).** Biochemistry. 5ª edition. Freeman. NY. 974p.
- Sullivan JH & Rozema J (1999).** UV-B effects on terrestrial plant growth and photosynthesis. Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems. Rozema J (Ed.). Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. pp 39-57.
- Taiz L & Zeiger E (2002).** Plant Physiology. 3ª edición. Sinauer Associates, Inc. Publishers. 690p.
- Teramura AH, Tevini M & Iwanzik W (1983).** Effects of UV-B radiation on plants during mild water stress. Effects on diurnal stomatal resistance. *Physiol Plant* 57:175-180.

- Teramura AH & Sullivan JH (1994).** Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynthesis Research* 39:463-473.
- Teramura AH & Ziska LH (1996).** Ultraviolet-B radiation and photosynthesis. In photosynthesis and the environment (Ed. NR Baker) Kluwer Academic publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 435-450.
- Tevini M & Iwanzik W (1983).** Inhibition of Photosynthetic activity by UV-B radiation in radish seedlings. *Physiol. Plant.* 58: 395-400.
- Tevini M, Thoma U & Iwanzik W (1983).** Effects of UV-B radiation on plants during mild water stress "Effects on growth, protein and flavonoid content. *Plant Physiol.* 109:435-448.
- Tevini M & Teramura AH (1989).** UV-B effects on terrestrial plants. *Photochem Photobiol* 50:479-487.
- Tournaire C, Croux S, Maurette MT (1993).** Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen (1-delta g) quenching. *J Photochem Photobiol B - Biol* 19:205-15.
- Ulloa NV (2002).** Efecto de la aclimatación y desaclimatación al frío en cultivares de *Hordeum vulgare* L. con diferente grado de tolerancia constitutiva a las bajas temperaturas. Tesis Magíster en Ciencias, mención Botánica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, 95p.
- UNEP (United Nations Environment Programme) (1998).** Environmental effects of ozone depletion: 1994 Update. Van der Leun J, Tevini M, Tang X & Worrest R (eds.). Unite Nations Environment Programme, Nairobi.

- Varas D (2004).** Análisis de flavonoides en plantas medicinales del sur de Chile con técnica HPLC. Tesis, Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, 59p.
- Verhoeven AS, Adamms III WW & Demmig-Adams B (1996).** Close relationship between the state of the xanthophyll cycle pigments and photosystem II efficiency during recovery from winter stress. *Physiologia Plantarum* 96:567-576.
- Wang W, Gorsuch JW & Hughes JS (1997).** Plants for environmental studies. Lewis Publishers, 35p.
- Zaller JG, Searles PS, Rousseaux MC, Flint SD, Caldwell MM, Sala O, Ballaré CL & Scopel AL (2003).** Solar ultraviolet-B radiation can affect slug feeding preference for some plant species native to a fen ecosystem in Tierra del Fuego, Argentina. *Plant Ecology* 169:43-51.
- Ziska LH & Teramura AH (1992).** CO₂ enhancement of growth and photosynthesis in rice (*Oryza sativa*). Modifications by increased ultraviolet-B radiation. *Plant physiol* 99:473-481.
- Zúñiga RE (2003).** Cambios en la eficiencia fotoquímica primaria del PSII en "Deschampsia antarctica Desv." bajo condiciones de estrés frío y lumínico. Tesis, escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, 82p.