



**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

	<b>Pág.</b>
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

		<b>Pág.</b>
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 <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> =H; kaempferol, R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =H; myricetina, R <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> =OH. Flavonas: X= H; apigenina, R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =H; luteolina, R <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> =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  $\mu\text{m}$  y 380-425 $\mu\text{m}$ ). 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 $\mu$  C<sub>18</sub> (250 x 4,60 mm; tamaño de partícula 5  $\mu$ m) de fase reversa, provista de precolumna C<sub>18</sub> 5 $\mu$  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 ( $\phi$ 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 $\mu$  C<sub>18</sub> (250 x 4.60 mm 5 $\mu$ ), inyectando 50  $\mu$ L de muestra a un flujo de 1.0 ml min<sup>-1</sup>, 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 $\mu$  C<sub>18</sub> (250 x 4.60 mm 5 $\mu$ ), inyectando 50  $\mu$ L de muestra a un flujo de 1.0 ml min<sup>-1</sup>, 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

		<b>Pág.</b>
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. ± 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. ± 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. ± 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  $\mu$ 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 <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
D	Desaclimatación
DU	Unidad Dobson
F <sub>m</sub>	Fluorescencia máxima o potencial de una planta adaptada a oscuridad
F <sub>m</sub> '	Fluorescencia máxima real o efectiva de una planta adaptada a la luz
F <sub>o</sub>	Fluorescencia mínima o inicial
F <sub>v</sub>	Fluorescencia variable
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	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 <sup>2</sup>	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.  $F_o$ ,  $F_m$ ,  $F_v/F_m$ ,  $\phi\text{PSII}$ ,  $qP$  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.  $F_o$ ,  $F_m$ ,  $F_v/F_m$ ,  $\phi\text{PSII}$ , 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

















































































































































































































































