



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. $n = 8$, $I = SE$. 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 (+ 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. ± 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 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, morfo-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,

