

Tesis de Posgrado

Efectos de la radiación ultravioleta-B solar sobre *Gunnera magellanica*, una planta nativa de Tierra del Fuego

Giordano, Carla Valeria

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Giordano, Carla Valeria. (2003). Efectos de la radiación ultravioleta- B solar sobre *Gunnera magellanica*, una planta nativa de Tierra del Fuego. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3683_Giordano.pdf

Cita tipo Chicago:

Giordano, Carla Valeria. "Efectos de la radiación ultravioleta- B solar sobre *Gunnera magellanica*, una planta nativa de Tierra del Fuego". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3683_Giordano.pdf

EXACTAS UBA

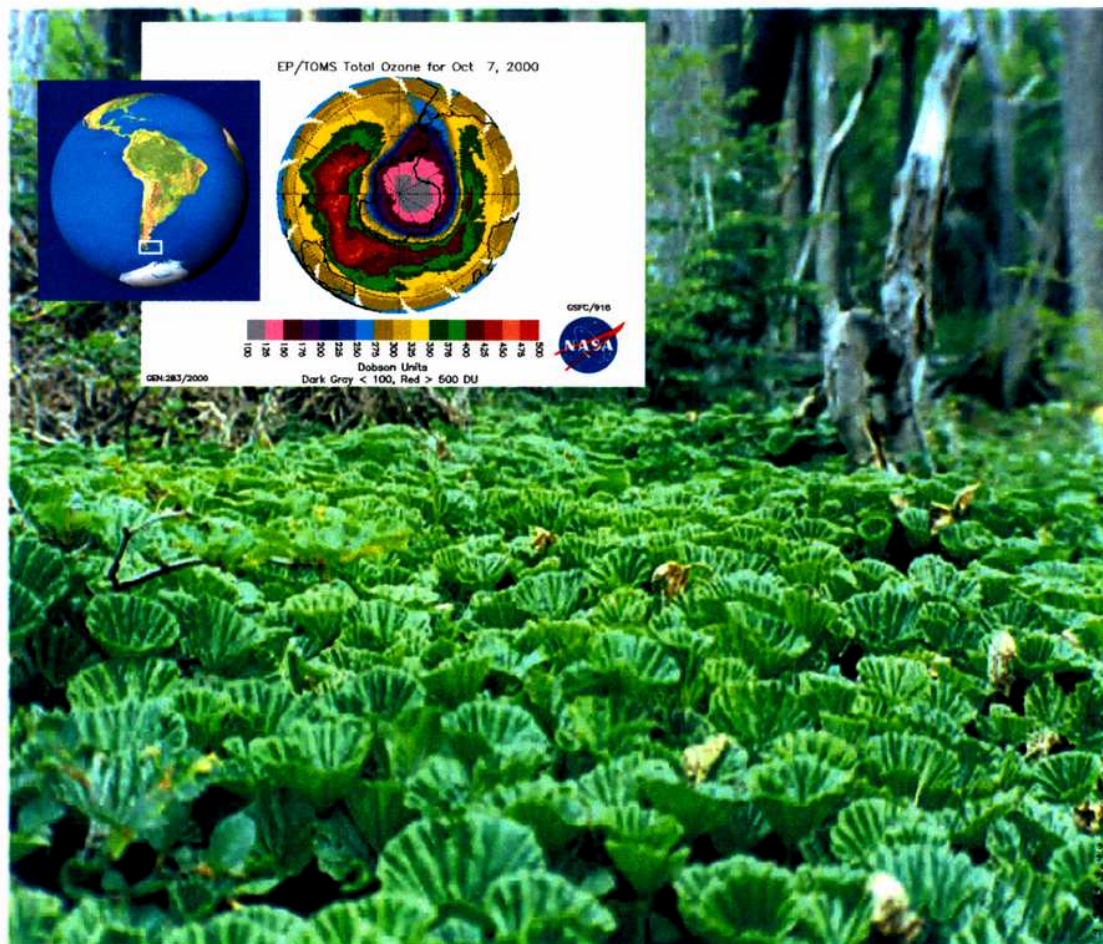
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**Efectos de la radiación ultravioleta-B solar sobre
Gunnera magellanica, una planta nativa de
Tierra del Fuego**



Carla Valeria Giordano

2003

№3683

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tesis para optar al grado de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires

**Efectos de la radiación ultravioleta-B solar
sobre *Gunnera magellanica*, una planta nativa
de Tierra del Fuego**

Licenciada Carla Valeria Giordano

Director: Dr. Carlos Luis Ballaré

Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas
Vinculadas a la Agricultura, Facultad de Agronomía,
Universidad de Buenos Aires

2003

*A Hernán,
a Luna,
a mis papás*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Ballaré, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y dirigirme durante la realización de esta Tesis.

Al Dr. Rodolfo Sánchez, por haberme aceptado en el Instituto que dirige.

A los actuales y ex integrantes del laboratorio UV: Ana Zima, Mariela Szwarcberg-Brachitta, Daniela Battista, Carlos Mazza, Cecilia Rousseaux, Verónica Herrera, Carla Caputo, Miriam Izaguirre, Mariana Conte, Silvia Desimone y Javier Moreno.

A todos los que formaron parte del grupo de trabajo en Ushuaia: Verónica Pancotto, Ricardo Samaniego, Peter Searles, Matthew Robson, Nicolás Garibaldi, Hans Zaller y Nancy Lozano.

A la gente del CADIC en Ushuaia, y muy especialmente a Susana Díaz.

A la Dra. Susana Puntarulo y a Andrea Galatro, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

A mis compañeros de oficina: Fernando Biganzoli, Karina Oliverio, Marina González Polo y Andrés Rolhauser.

A Hernán Boccalandro.

Y a todos los integrantes del IFEVA.

RESUMEN

Los ecosistemas de Tierra del Fuego se encuentran sometidos a aumentos estacionales de radiación ultravioleta-B (UV-B: 280-315 nm) durante la primavera, debido al pasaje del agujero de ozono sobre la región. En la presente Tesis estudiamos los efectos del UV-B y UV-A (315-400 nm) solares sobre el crecimiento, la generación de daño molecular (dímeros en el ADN y daño oxidativo componentes celulares), y la inducción de respuestas de aclimatación (reparación de dímeros del ADN y acumulación de compuestos fotoprotectores foliares), en la flora nativa de Tierra del Fuego. Para ello utilizamos la herbácea perenne *Gunnera magellanica* como modelo de estudio. Realizamos ensayos con dos acercamientos experimentales: exclusión de distintas porciones del UV solar en el campo mediante el uso de filtros plásticos, y utilización de dosis controladas de UV-B suministradas con lámparas en invernáculo.

En los experimentos a campo encontramos un efecto inhibitorio del UV-B en la expansión foliar de *G. magellanica*, en forma consistente durante tres estaciones de crecimiento.

En relación a las respuestas de aclimatación al UV, la fotorreparación fué el principal mecanismo de remoción de dímeros de pirimidina del tipo ciclobutano (CPDs) en esta especie. La capacidad de fotorreparación fué inducida por UV, y la velocidad varió en función de la temperatura, siendo mayor a 25 °C que 8 °C. La velocidad de reparación de CPDs en *G. magellanica* fué menor que la presentada por otras especies vegetales, particularmente al compararla con *A. thaliana* en idénticas condiciones experimentales. El UV solar no reguló los niveles de compuestos fotoprotectores foliares (flavonoides) ni la masa foliar específica en esta especie.

El principal componente de la radiación solar generador de CPDs fué el UV-B. Sin embargo, el contenido de CPDs no varió durante el día acompañando las fluctuaciones naturales de UV-B, sino que fué levemente menor al mediodía que al atardecer y al amanecer. Este perfil diario de CPDs puede explicarse al considerar la fluctuación diaria de factores ambientales que favorecen la reparación de los dímeros (radiación UV-A, visible, temperatura).

En los experimentos realizados en invernáculo, encontramos que todas las dosis de UV-B ensayadas (correspondientes a dosis de UV-B bajas, medias y altas registradas normalmente en

Ushuaia durante la primavera) redujeron la expansión foliar de *G. magellanica*. Esta reducción en el crecimiento estuvo acompañada por aumentos en el contenido de CPDs (en forma dependiente de la dosis de UV-B). La mayor dosis de UV-B ensayada produjo un estado de estrés oxidativo transitorio (evaluado mediante la relación entre el contenido de radical ascorbilo y ácido ascórbico), que fué rápidamente controlado por un aumento en los niveles de ascorbato. El daño celular que mejor explicó la inhibición en la expansión foliar fue la acumulación de CPDs en el ADN, pero no el nivel de peroxidación lipídica.

En conjunto, nuestros resultados indican que los niveles actuales de UV-B tienen un impacto principalmente negativo sobre *G. magellanica*, que se ve reflejado en la reducción del crecimiento. Las modestas velocidades de fotorreparación a temperaturas relativamente elevadas (y bajas a temperaturas menores), junto con la falta de inducción en los compuestos fotoprotectores foliares, indicarían que futuros aumentos del UV-B (debidos a la erosión de la capa de ozono) producirían mayormente efectos negativos en *G. magellanica*, sin la inducción concomitante de respuestas de protección eficientes. La reducción de la expansión foliar inducida por UV-B, estuvo acompañada por daño al ADN en la forma de CPDs, pero no por daño oxidativo a componentes celulares (por ejemplo, lípidos de membrana). Esto sugiere que el daño al ADN está implicado en los procesos que llevan a la reducción de la expansión foliar causada por el UV-B en esta especie.

ABSTRACT

The ecosystems in Tierra del Fuego are seasonally subjected to elevated ultraviolet-B radiation (UV-B: 280-315 nm) during the spring, due to the passage of the ozone hole over the region. In the present Thesis, we studied the effects of solar UV-B and UV-A (315-400 nm) on growth, production of molecular damage (dimers in DNA and oxidative damage to cellular components), and induction of acclimation responses (dimer repair in DNA and accumulation of photoprotective compounds in leaves) in native plants of Tierra del Fuego. We used the perennial herb *Gunnera magellanica* as a model organism. We carried out two different experimental approaches: exclusion of different portions of solar UV with plastic filters in the field, and exposure of plants to different UV-B doses using lamps inside a greenhouse.

In the field experiments, we found an inhibitory effect of UV-B radiation on *G. magellanica* leaf expansion, which was consistently detected throughout three growing seasons.

Regarding acclimation responses to UV, photorepair was the main pathway of cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) removal in this species. Photorepair was slightly up regulated in plants exposed to solar UV. CPD photorepair was higher at 25 °C than at 8 °C. The rates of DNA repair in *G. magellanica* were modest compared to published values for other species, and were lower than those of *Arabidopsis thaliana* plants, grown under equivalent experimental conditions. The accumulation of UV-B absorbing compounds in leaves and the specific leaf mass were not affected by solar UV.

UV-B was the main component of solar radiation that induced CPD formation in *G. magellanica* leaves. However, CPD levels did not fluctuate during the day tracking UV-B radiation, and were lower at noon than at dawn or in the morning. This daily CPD profile might be a consequence of the diurnal fluctuation of environmental factors that promote CPD removal (UV-A, visible radiation, temperature).

In the greenhouse experiments, realistic UV-B doses inhibited *G. magellanica* leaf expansion. This growth reduction was accompanied by high levels of CPDs. The higher UV-B dose induced oxidative stress (evaluated using the ascorbyl radical /ascorbate index), which was rapidly controlled by increments in ascorbate levels. The inhibition of leaf expansion correlated well with the CPD content, but not with levels of lipid peroxidation.

Taken together, our results indicate that present-day levels of solar UV-B have mainly negative impacts on *G. magellanica*, with detrimental effects on growth. Modest photorepair rates at relatively high temperatures (and even lower at low temperatures), together with the lack of induction of UV-screening compounds in leaves, suggest that future increments in UV-B levels (caused by ozone reduction) would produce mainly damaging effects in *G. magellanica*, without sufficient enhancement of protective mechanisms. Inhibition of leaf expansion was well correlated with CPD levels, but not with oxidative damage to cellular components (such as membrane lipids), which suggests that DNA damage is involved in the inhibition of leaf expansion induced by UV-B in this species.

Los resultados presentados en esta Tesis, han dado origen a los siguientes trabajos científicos:

- Ballaré C.L., Rousseaux M.C., Searles P.S., Zaller J.G., **Giordano C.V.**, Robson M.T., Caldwell M.M., Sala O.E., Scopel A.L. (2001) Impact 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
- **Giordano C.V.**, Mori T., Sala O. E., Scopel A. L., Caldwell M. M. and Ballaré C. L. (2003) Functional acclimation to solar UV-B radiation in *Gunnera magellanica*, a native plant species of southernmost Patagonia. *Plant, Cell & Environment*. On line early: noviembre 2003, doi 10.1046/j.0016-8025.2003.01121.x
- **Giordano C.V.**, Galatro A., Puntarulo S. and Ballaré C.L. The inhibitory effect of UV-B on *Gunnera magellanica* growth correlate with increased DNA damage but not with damage to membrane lipids. En preparación.
- **Giordano C.V.**, Mori T., Sala O. E., Scopel A. L., Caldwell M. M. and Ballaré. Diurnal patterns of DNA damage in *Gunnera magellanica* under natural UV-B radiation: balancing damage and repair. En preparación.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
La erosión de la capa de ozono y la radiación ultravioleta	1
El agujero de ozono sobre Tierra del Fuego	3
Efectos de la radiación ultravioleta en las plantas superiores	4
<i>Efectos del UV-B sobre el crecimiento</i>	6
<i>Efectos del UV-B sobre la generación de dímeros de pirimidina en el ADN</i>	6
<i>Efectos del UV-B sobre la generación de especies reactivas de oxígeno</i>	9
<i>Efectos del UV-B sobre la vía de los fenil-propanoides</i>	12
Efectos biológicos del UV-B solar en ecosistemas terrestres de Tierra del Fuego	13
<i>Efectos del UV-B solar sobre el crecimiento y la morfología de especies vegetales en Tierra del Fuego</i>	14
<i>Acción del UV-B solar sobre los compuestos fotoprotectores en plantas de Tierra del Fuego</i>	15
<i>Daño al ADN producido por el UV-B solar en plantas de Tierra del Fuego</i>	15
Objetivo general de la Tesis	17
Objetivos específicos	17
Hipótesis y predicciones	18
MATERIALES Y MÉTODOS	20

Descripción del sitio experimental y características de <i>Gunnera magellanica</i>	20
Diseño experimental	21
<i>Experimentos a campo en el Parque Nacional Tierra del Fuego</i>	21
<i>Experimentos en invernáculo en Buenos Aires</i>	23
Reparación de CPDs <i>in vivo</i>	25
Determinaciones moleculares y bioquímicas	27
<i>Extracción y cuantificación de ADN total</i>	27
<i>Detección y cuantificación de CPDs</i>	27
<i>Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos foliares</i>	29
<i>Medición de la transmitancia epidérmica al UV-B</i>	29
<i>Medición del contenido de ascorbato</i>	29
<i>Detección de radicales libres</i>	30
<i>Detección y cuantificación del radical ascorbilo</i>	30
<i>Detección y cuantificación de radicales lipídicos</i>	31
Medición del crecimiento y parámetros morfológicos	31
<i>Medición de la expansión foliar</i>	31
<i>Medición de la masa foliar específica</i>	32
Medición de la emisión de las lámparas	32

Datos meteorológicos de los experimentos en Tierra del Fuego	32
<i>Temperatura</i>	32
<i>UV-B</i>	33
<i>Ozono</i>	33
Datos meteorológicos de los experimentos en Buenos Aires	33
Análisis estadístico	33
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	35
I-Efecto del UV solar sobre el crecimiento de <i>Gunnera magellanica</i>	35
<i>El UV-B ambiental redujo la expansión foliar de G. magellanica</i>	36
<i>La expansión foliar varió en función de la dosis de UV-B recibida por las plantas</i>	38
II- Respuestas de aclimatación a la radiación UV solar en <i>Gunnera magellanica</i>	41
<i>Características microclimáticas del sitio de estudio</i>	42
<i>Efectos del UV-B y UV-A solares sobre los niveles de compuestos fotoprotectores foliares en G. magellanica</i>	44
<i>Regulación ambiental de la reparación de CPDs</i>	46
<i>Conclusiones</i>	49
III- Dinámica diaria del contenido de CPDs en hojas de <i>Gunnera magellanica</i>: balance entre generación y reparación del daño	50
<i>El UV-B solar tuvo mayor incidencia en la inducción de CPDs que el UV-A</i>	53

<i>Los niveles de CPDs en hojas de G. magellanica mostraron un patrón inesperado de fluctuación diaria</i>	54
<i>Conclusiones</i>	59
IV- Inhibición del crecimiento de <i>Gunnera magellanica</i> inducido por UV-B: participación del daño al ADN y del daño oxidativo a lípidos de membrana	60
<i>El UV-B redujo la expansión foliar de G. magellanica, e indujo una respuesta antioxidante temprana</i>	62
<i>El UV-B no aumentó los niveles de peroxidación lipídica, pero produjo daño al ADN</i>	67
<i>La inhibición de la expansión foliar estuvo inversamente correlacionada con el contenido de CPDs, pero no con el nivel de peroxidación lipídica</i>	69
<i>Conclusiones</i>	71
CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS	72
BIBLIOGRAFÍA	78



INTRODUCCIÓN

GENERAL

La erosión de la capa de ozono y la radiación ultravioleta

La radiación ultravioleta (UV) es la región del espectro solar que se extiende desde los rayos X hasta el visible, entre los 200 y los 400 nm. Sólo una parte de esta radiación llega a la Tierra, ya que buena parte de los fotones de UV son absorbidos por la capa de ozono (O₃) de la estratósfera (aproximadamente entre los 12 y 35 km de altura desde la superficie terrestre). Sobre la base de sus efectos biológicos, el UV se divide en tres bandas: el UV-C, el UV-B y el UV-A. El UV-C comprende longitudes de onda menores que 290 nm; no llega a la Tierra y su mayor importancia biológica reside en el mantenimiento de la capa de ozono. El UV-B, que comprende longitudes de onda desde los 290 a los 315 nm, es la banda más afectada por la concentración de ozono, y tiene múltiples efectos en los sistemas biológicos, muchos de ellos destructivos debido a su alta energía. El UV-A, que se extiende desde los 315 a los 400 nm, atraviesa la capa de ozono en forma prácticamente completa, y sus efectos biológicos pueden compararse en algunos aspectos con los de la luz visible.

El ozono se produce a bajas latitudes y debido a los patrones de circulación atmosférica se acumula en altas latitudes. Por esta razón la capa de ozono es más delgada sobre regiones cercanas al ecuador que sobre los ecosistemas polares. Esta distribución del ozono contribuye a generar un gradiente latitudinal de UV-B a nivel de la superficie terrestre, siendo las dosis de UV-B mucho mayores sobre el ecuador que sobre los polos. Los compuestos clorofluorcarbonados (CFCs) liberados a la atmósfera como consecuencia de la actividad industrial humana, han causado la destrucción del ozono estratosférico, situación que se puso en evidencia desde principios de los años '80 (WMO, 1999). Estos compuestos pueden ser disociados en la estratósfera en otros compuestos (HCl y ClONO₂) que actúan como reservorio de formas activas (como ser Cl y ClO) y que en presencia de luz solar pueden destruir el ozono. Farman *et al.* (1985) demostraron que los niveles de ozono sobre la Antártida correspondientes al mes de octubre, decayeron un 50 % desde 1960 a 1985. Las características climatológicas y de circulación atmosférica de la zona antártica, hacen que las masas de aire pobres en ozono queden aisladas durante la primavera, "atrapadas" en el vórtice polar, generando lo que se conoce como "agujero de ozono". A medida que el sol calienta la estratósfera, el vórtice polar se rompe, y el transporte horizontal de masas de aire ricas en ozono provenientes de latitudes medias hace que los niveles de ozono se recuperen hacia el verano. En el resto del planeta también se ha registrado

una disminución global del ozono, si bien menos severa que lo que ocurre en la Antártida (Stolarski *et al.*, 1992; McPeters *et al.*, 1996). McKenzie *et al.* (1999) estimaron que las irradiancias máximas estivales de UV-B solar en latitudes medias en el hemisferio sur aumentaron un 20% durante los últimos 20 años, concomitantemente con la reducción en los niveles de ozono.

Estos hechos despertaron la preocupación de la comunidad científica, reavivando el interés por estudiar los efectos de la radiación UV-B sobre los sistemas biológicos. El UV-B comprende una estrecha banda de 30 nm, que comparada cuantitativamente con el resto de la radiación solar que llega a la Tierra parece despreciable (< 1 %). El UV-B adquiere importancia si se tiene en cuenta que ciertas respuestas biológicas son particularmente sensibles a esas longitudes de onda. Para establecer esta sensibilidad se realizan los llamados espectros de acción, a través de los cuales se determina la eficiencia relativa (por fotón) de cada longitud de onda en la producción de un determinado efecto biológico. La función resultante se llama “función de ponderación”. Estas funciones son adimensionales, y se normalizan a una longitud de onda de referencia, generalmente 300 nm. De manera que para calcular la efectividad biológica de, por ejemplo, el UV-B, se realiza el siguiente cálculo:

$$UV-B_{bc} = \int_{280}^{315} F_{\lambda} E_{\lambda} d_{\lambda}$$

Donde $UV-B_{bc}$ es el UV-B biológicamente efectivo, F_{λ} es el número de fotones de una longitud de onda determinada, E_{λ} es la eficiencia relativa de esa longitud de onda en producir un efecto dado.

El uso de valores de $UV-B_{bc}$ permite comparar situaciones en donde la composición espectral de la radiación es distinta, como por ejemplo experimentos realizados con lámparas o bajo radiación solar. La similitud de los espectros de acción para una serie de respuestas de las plantas a la radiación UV-B, llevó a la elaboración de un único espectro de acción generalizado para plantas (Caldwell, 1971). Este espectro es ampliamente utilizado para el cálculo de la radiación $UV-B_{bc}$. En el mismo, la eficiencia cuántica es máxima para 280 nm, y decae acercándose a 0 para longitudes de onda mayores a 315 nm.

El agujero de ozono sobre Tierra del Fuego

Las imágenes satelitales del espectrómetro TOMS (Total Ozone Mapping Spectrometer), disponibles desde 1978, indican que el “agujero de ozono” ha aumentado en área desde 2.0×10^6 km² a principios de los ‘80, hasta 2.6×10^6 km² en nuestros días (<http://toms.gsfc.nasa.gov>). Como consecuencia, el área de influencia del agujero de ozono incluye regiones continentales de Argentina y Chile (Fig. 1). Bajo la influencia directa del agujero de ozono, a principios de la primavera, el grosor de la capa de ozono sobre Sud América frecuentemente disminuye de sus valores normales de 330 Unidades Dobson (UD, $1 \text{ UD} = 2.7 \times 10^{16}$ moléculas de ozono cm⁻²), a menos de la mitad de este valor, en un intervalo de tiempo menor a 2 días (Bojkov *et al.*, 1995; Kirchhoff *et al.*, 1997; Rousseaux *et al.*, 1999).

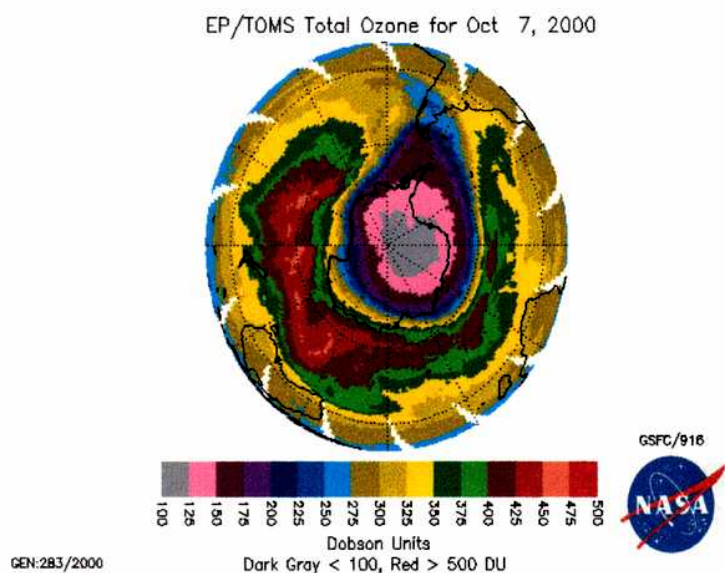


Figura 1: Niveles de ozono en (Unidades Dobson, DU), indicados por la escala de colores, registrados en el hemisferio sur por el espectrómetro TOMS en el satélite Earth Probe de la NASA. Delimitado por el color celeste, se visualiza el llamado “agujero de ozono”. Extraída de <http://toms.gsfc.nasa.gov/ozone/ozone.html>

La disminución de ozono no está limitada a estos episodios transitorios, ya que masas de aire pobres en ozono también pasan sobre la región durante el verano, en el momento de la ruptura del vórtice polar. Tierra del Fuego es el único lugar del planeta con ecosistemas terrestres bien desarrollados, que se encuentra sometido a una disminución severa de ozono. Estos ecosistemas son más productivos y diversos que los que se encuentran, por ejemplo, en la

Antártida, donde tiene lugar una mayor disminución de ozono. La combinación de riqueza biológica y atmósfera altamente perturbada hacen de este lugar un sitio ideal para estudiar los efectos del UV-B en ambientes naturales.

Efectos de la radiación ultravioleta en las plantas superiores

La luz solar es uno de los factores ambientales más importante en el control del crecimiento y desarrollo de las plantas. La luz provee la energía necesaria para la fotosíntesis, y distintas longitudes de onda proveen información ambiental que modifican procesos de desarrollo tan diversos como la desetiología, el fototropismo y la floración. El UV, como parte de la radiación solar, también ejerce efectos sobre las plantas, y a pesar de representar una pequeña fracción del espectro solar que llega a la Tierra, sus efectos biológicos son, en relación, desproporcionadamente grandes. Los efectos del UV-B sobre plantas terrestres han sido ampliamente investigados (Teramura & Sullivan, 1994; Jordan, 1996; Jansen *et al.*, 1998; A.-H.-Mackerness, 2000), y se resumen en la Tabla 1. En líneas generales, el UV-B provoca daños a nivel celular, pero también dispara respuestas fisiológicas y morfológicas que previenen y reparan los daños, por lo tanto el efecto final es el resultado del balance entre el daño, y los procesos de protección y reparación.

Una de las maneras en que el UV-B afecta procesos fisiológicos es a través del daño molecular. La absorción del UV-B por macromoléculas produce daño a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. En el ácido desoxiribonucleico (ADN), el UV-B provoca la dimerización de bases adyacentes de pirimidina.

Algunos de los cambios morfo-fisiológicos disparados por el UV-B parecen ser independientes de la generación de daño celular. Los estudios de la inhibición del alargamiento del hipocotilo en plántulas de tomate (Ballaré *et al.*, 1995), el enrollamiento de cotiledones en *Brassica napus* (Wilson & Greenberg, 1993) y la apertura de cotiledones en *A. thaliana* (Boccalandro *et al.*, 2001), sugieren la existencia de una vía de percepción del UV-B que es independiente de daño celular, y que podría estar mediada por fotorreceptores específicos de UV-B. El UV-B también modifica la expresión de una variedad de genes en forma específica e independiente del daño al ADN (Jordan, 2002). Las especies reactivas de oxígeno, los niveles de

calcio intracelular, el estado redox de membrana plasmática, y el ácido jasmónico se han propuesto como segundos mensajeros del UV-B, pero hasta el presente no se han podido identificar las moléculas fotorreceptoras.

A continuación, se tratan en mayor detalle los antecedentes disponibles sobre los efectos del UV-B en procesos estudiados en la presente Tesis.

Tabla 1: Resumen de los efectos del UV-B sobre plantas terrestres. Adaptado de Kalbin, 2001.

I. Efectos moleculares, bioquímicos y fisiológicos
A. Daño al ADN
1. Generación de daño al ADN (oxidación de bases, dímeros de pirimidina)
2. Regulación de la expresión de enzimas que fotoreparan el ADN
B. Daño al aparato fotosintético
1. Proteínas D1 y D2 del fotosistema II
2. Actividad y concentración de Rubisco y otras enzimas
3. Integridad de la membrana tilacoidal
4. Conductancia estomática
5. Pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides)
6. Inhibición de la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis
7. Daño ultraestructural a cloroplastos
C. Destrucción de fitohormonas (foto-oxidación del ácido indol-acético)
D. Peroxidación de lípidos de membrana
E. Cambios en el metabolismo secundario
F. Metabolismo de los radicales libres y especies reactivas de oxígeno
1. Generación de especies reactivas de oxígeno
2. Aumento de la concentración de antioxidantes no enzimáticos
3. Aumento de la actividad de enzimas antioxidantes
II. Cambios morfológicos y anatómicos
A. Aumento de ceras epicuticulares
B. Aumento del grosor de la hoja
C. Disminución del área foliar
D. Aumento de la ramificación o macollaje
E. Alteración del largo de entrenudos
III. Cambios a nivel de planta entera, comunidad y ecosistema
A. Cambios de la relación vastago:raíz
B. Modificación de la arquitectura del canopeo
C. Disminución de la biomasa total
D. Disiminución del rendimiento de cultivos
E. Alteración del balance competitivo
F. Promoción de la descomposición de la broza
G. Alteración del ciclo de nutrientes

Efectos del UV-B sobre el crecimiento

Los múltiples estudios de los efectos del UV-B realizados tanto bajo radiación solar, como en condiciones artificiales utilizando lámparas, han permitido establecer que el UV-B puede reducir el crecimiento de las plantas terrestres (Sullivan *et al.*, 1994; Ballaré *et al.*, 1996; Mepsted *et al.*, 1996; Krizek *et al.*, 1998; Mazza *et al.*, 1999; Kumagai *et al.*, 2001). Los orígenes de la reducción del crecimiento causado por el UV-B no se han establecido hasta el presente. Si bien el UV-B puede reducir la fotosíntesis en algunas especies (Allen *et al.*, 1998), la asimilación de CO₂ no se ve en general afectada por el UV-B en plantas aclimatadas a la radiación natural (Ballaré *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 1998; Searles *et al.*, 2001a). Por lo tanto se ha postulado que otros efectos del UV-B que no están relacionados directamente con el proceso fotosintético, participan en la reducción del crecimiento observada bajo esta radiación. Entre estos efectos se encuentran la generación de dímeros en el ADN y el daño oxidativo a macromoléculas claves del metabolismo causado por un aumento descontrolado de la abundancia de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Efectos del UV-B sobre la generación de dímeros de pirimidina en el ADN

La radiación UV genera una serie de oxidaciones en el ADN (hidratos de pirimidina), y de uniones cruzadas (tanto entre ADN-proteínas como ADN-ADN). La lesión más abundante son los dímeros entre pirimidinas adyacentes (Britt, 1999). Los dímeros de pirimidina pueden tener dos tipos de estructura química (Fig. 2). La forma más abundante (aproximadamente el 75% del total de dímeros) son los dímeros ciclobutano-pirimidina (CPDs, del inglés “cyclobutane pyrimidine dimers”), y el porcentaje restante son del tipo pirimidina (6,4) pirimidinona, conocidos como 6,4 fotoproductos. En ADN desnudo, las longitudes de onda más eficientes en la generación de dímeros son las correspondientes a los 260 nm (UV-C), y esta eficiencia decae exponencialmente hacia longitudes de onda mayores (Setlow, 1974). En las plantas superiores el ADN está protegido del UV solar en el interior de las células vegetales y por los tejidos circundantes; por lo tanto el espectro de acción para la inducción de daño al ADN en un tejido

vegetal, puede no ser exactamente igual al espectro de absorción del ADN en solución. Por ejemplo, la formación de dímeros de pirimidina en plántulas de alfalfa tiene un máximo de eficiencia alrededor de los 280 nm, y la caída en la eficiencia cuántica hacia la zona del UV-A no es tan marcada como en el espectro de acción correspondiente al ADN purificado (Quaite *et al.*, 1992).

Tanto los CPDs como los (6,4) fotoproductos bloquean la transcripción en células de mamíferos (Protic-Sabljić & Kraemer, 1986; Mitchell *et al.*, 1989), e inhiben la replicación del ADN en células procariontas y eucariontas. Los dímeros de pirimidina son lesiones pre-mutagénicas: los dímeros que contienen citocina pueden convertirse en dímeros de timina a través de un proceso conocido como “by pass” de lesiones (Britt, 1999). La existencia de este proceso no se ha establecido en plantas, y poco se sabe acerca de las mutaciones inducidas por UV en vegetales.

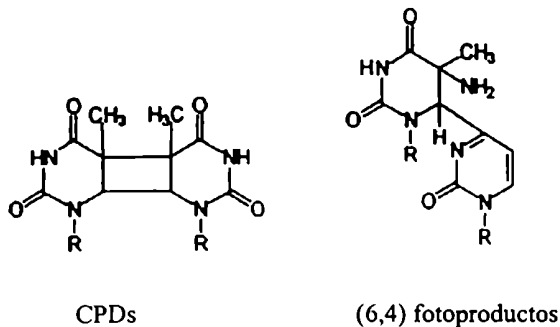


Figura 2: Estructura química de los dímeros de pirimidina producidos en el ADN por la radiación UV. Los CPDs constituyen la lesión más abundante (75 % del total de dímeros).

En plantas, tanto los CPDs como los 6,4 fotoproductos tienen efectos inhibitorios en el crecimiento (Jiang *et al.*, 1997), y la reparación de los CPDs es esencial para la supervivencia bajo radiación UV-B (Landry *et al.*, 1997). Los estudios ecofisiológicos realizados hasta el presente muestran que la reducción del crecimiento causada por UV-B está frecuentemente asociada a aumentos en la cantidad de daño al ADN en la forma de CPDs (Ballaré *et al.*, 1996; Hidema *et al.*, 1997; Mazza *et al.*, 1999).

Las plantas superiores han desarrollado al menos dos mecanismos para reparar los CPDs y los 6,4 fotoproductos. Uno de ellos se conoce como reparación en oscuridad, ya que puede llevarse a cabo en ausencia de luz visible. Este mecanismo involucra varios pasos enzimáticos que reparan los dímeros a través de la excisión de bases y nucleótidos. En estos procesos, la excisión de las bases dañadas, usualmente acompañada de zonas flanqueantes no dañadas, va

seguida de síntesis *de novo* de ADN, es decir está sujeta a la probabilidad de error de la ADN polimerasa.

El otro mecanismo se conoce como fotorreparación, es dependiente de la luz (360-420 nm), y es la vía cuantitativamente más importante de remoción de dímeros en plantas superiores. La fotorreparación (o fotoreactivación) es llevada a cabo por enzimas llamadas fotoliasas que revierten los dímeros en forma directa, de una manera libre de error. Las primeras fotoliasas de CPDs que se caracterizaron fueron las de microorganismos, y se llamaron de clase I (Sancar, 1994). Otra clase de fotoliasas muy relacionadas con las anteriores, pero específicas para 6,4 fotoproductos, se identificaron en *Drosophila melanogaster* (Todo *et al.*, 1996), *Xenopus laevis* (Todo *et al.*, 1997) y *Arabidopsis thaliana* (Nakajima *et al.*, 1998). Otra familia de fotoliasas de CPDs, que sólo comparten con las anteriores un 10-15% de identidad de secuencia, son las fotoliasas de clase II, que se identificaron en una variedad de especies, incluyendo animales (Yashuhira & Yasui, 1992), arqueobacterias (Yasui *et al.*, 1994), eubacterias (O'Conner *et al.*, 1996) y plantas superiores (Taylor *et al.*, 1996; Ahmad *et al.*, 1997). Las fotoliasas son antiguas en términos evolutivos; esto no debería ser sorprendente si se tiene en cuenta que la atmósfera terrestre primitiva era muy pobre en oxígeno y ozono, lo que permitía la llegada de altas dosis de UV a la superficie terrestre.

Todas las fotoliasas caracterizadas hasta el presente presentan un cofactor flavina-adenina-dinucleótido reducido (FAD), y en general poseen un segundo cromóforo dependiendo de las especies: la pterina 5,10-meteniltetrahidrofolato (MTHF) o 8-hidroxi-5-deaza-riboflavina (8-HDF) (Sancar, 1994). Los mecanismos de acción propuestos para los dos tipos de fotoliasas de CPDs son similares: los cromóforos MTHF u 8-HDF actúan como antena absorbiendo la luz azul, y transfieren la energía de excitación al FAD reducido. El FADH⁻ dona el electrón al CPD, que sufre un re-arreglo electrónico, de manera que el anillo ciclobutano es clivado. El electrón es luego re-transferido para regenerar FADH⁻. La fotoliasa de CPDs de *A. thaliana* contiene FADH y pterina como cofactores (Waterworth *et al.*, 2002).

La fotorreparación de dímeros inducidos por UV es uno de los mecanismos de reparación mejor caracterizados en plantas. La fotorreparación de CPDs y 6,4 fotoproductos ha sido documentada en una variedad de especies vegetales (Pang & Hays, 1991; Chen *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1996; Hada *et al.*, 1999), y las fotoliasas de CPDs y 6,4 fotoproductos fueron clonadas en *A. thaliana* (Taylor *et al.*, 1996; Ahmad *et al.*, 1997; Nakajima *et al.*, 1998). La

fotoliasa de 6,4 fotoproductos se expresa en forma constitutiva en plántulas etioladas (Chen *et al.*, 1994; Hada *et al.*, 1999). En cambio, la expresión de la fotoliasa de CPDs es regulada por luz. Estudios realizados en distintas especies han demostrado que la fotoregulación de la actividad/expresión de la fotoliasa depende de longitudes de onda de la zona del rojo (Langer & Wellmann, 1990; Buchholz *et al.*, 1995), azul /UVA (Hada *et al.*, 1999), luz visible (Ahmad *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 1998), y UV-B (Pang & Hays, 1991; Ries *et al.*, 2000).

En resumen, la luz (UV, visible) no solo provee la energía para el funcionamiento de las fotoliasas, sino que además tiene un efecto regulatorio sobre la expresión de, por lo menos, algunos tipos de fotoliasas en plantas. Hay poca información sobre el fotocontrol de la actividad fotoliasa en condiciones naturales, donde todos los fotorreceptores están siendo estimulados al mismo tiempo.

Efectos del UV-B sobre la generación de especies reactivas de oxígeno

La evolución de un metabolismo aeróbico que utiliza oxígeno molecular (O_2) confirió a los organismos la capacidad de oxidar una variedad de metabolitos. Si bien la vida con oxígeno es altamente eficiente, carga con un peligro potencial, ya que a pesar que el oxígeno molecular no es tóxico, puede producir derivados altamente reactivos que pueden generar daño celular severo. La reducción completa del oxígeno molecular requiere cuatro electrones, originando agua (H_2O) como producto final. Cuando la reducción del oxígeno se produce en pasos univalentes, se forman una serie de moléculas parcialmente reducidas inestables y ávidas de electrones, llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS). Entre ellas se encuentran el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($OH\cdot$). Las ROS, que incluyen también compuestos de oxígeno con hidrógeno, cloro y nitrógeno, pueden interconvertirse libremente, y reaccionar con otras moléculas produciendo otros radicales libres (moléculas con uno o más electrones de valencia desapareados).

El transporte de electrones fotosintético es la mayor fuente de ROS en tejidos vegetales (Asada, 1993), que ocurren como derivados normales de su funcionamiento. Diversas situaciones de estrés, como deficiencias minerales, bajas temperaturas, contaminantes gaseosos, herbicidas, acumulación de metales fitotóxicos, altos niveles de PAR y radiación UV-B producen un

aumento de ROS (Foyer *et al.*, 1994a), que resultan tóxicas, debido a que su interacción con los componentes celulares como ADN, proteínas y lípidos de membrana. El UV-B puede aumentar el contenido de ROS. Esto ha sido demostrado en varios trabajos, ya sea por la medición de especies reactivas como O_2^- , H_2O_2 , oxígeno singulete (1O_2) (Dai *et al.*, 1997), medición de otras moléculas más estables, como el radical ascorbilo (Kozak *et al.*, 1997; Galatro *et al.*, 2001), y detección de lípidos peroxidados (Kramer *et al.*, 1991; Takeuchi *et al.*, 1995; A.-H.-Mackerness *et al.*, 1998).

Las ROS también parecen actuar como segundos mensajeros en situaciones de estrés de diversos orígenes (Khan & Wilson, 1995; Surplus *et al.*, 1998), y podrían estar involucradas en la vía de transducción de señales del UV-B (A.-H.- Mackerness *et al.*, 2001).

Para contrarrestar la toxicidad de las especies reactivas de oxígeno, las células vegetales cuentan con un sistema de defensa antioxidante altamente eficiente (Foyer *et al.*, 1994b). Este sistema está compuesto tanto de mecanismos enzimáticos como de compuestos no enzimáticos. El mecanismo enzimático incluye principalmente las siguientes enzimas:

Superóxido dismutasas (SOD): son metalo-enzimas que catalizan la transformación de O_2^- en H_2O_2 . Se encuentran en cloroplastos y mitocondrias.

Catalasas (CAT): son enzimas que contienen grupo hemo, y reducen el H_2O_2 a agua y oxígeno molecular. Se encuentran en peroxisomas.

Peroxidasas: detoxifican el H_2O_2 utilizando compuestos reductores como el glutatión (GSH), o ascorbato (AH^+) como dadores de hidrógeno. Se encuentran en todos los compartimientos celulares.

El componente no enzimático de este sistema de defensa incluye moléculas como ácido ascórbico, α -tocoferol, glutatión y compuestos flavonoides. En plantas, el compuesto antioxidante más abundante es el ácido ascórbico. Este compuesto se halla en concentraciones milimolares en todos los compartimientos celulares, y juega un rol central en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno. Puede ser oxidado por una variedad de compuestos (como O_2^- , 1O_2 , H_2O_2) incluyendo radicales derivados de la oxidación del α -tocoferol y lípidos peroxidados. El ascorbato es un antioxidante extremadamente efectivo debido a que es un dador de electrones pobre en condiciones fisiológicas, y actúa principalmente transfiriendo átomos de hidrógeno en forma unitaria (Noctor & Foyer, 1998). La oxidación del ascorbato (AH^+) ocurre en dos pasos secuenciales, produciendo primero un radical libre, el ácido monodehidroascórbico (A^+ , también

llamado radical ascorbilo), y luego ácido dehidroascórbico (DHA). Ambas moléculas pueden ser reducidas nuevamente a ascorbato de manera espontánea o a través de pasos enzimáticos que incluyen enzimas que utilizan sustratos reductores como NADH y glutatión reducido. Las reacciones de oxidación y reducción de ascorbato se esquematizan en la Fig. 3.

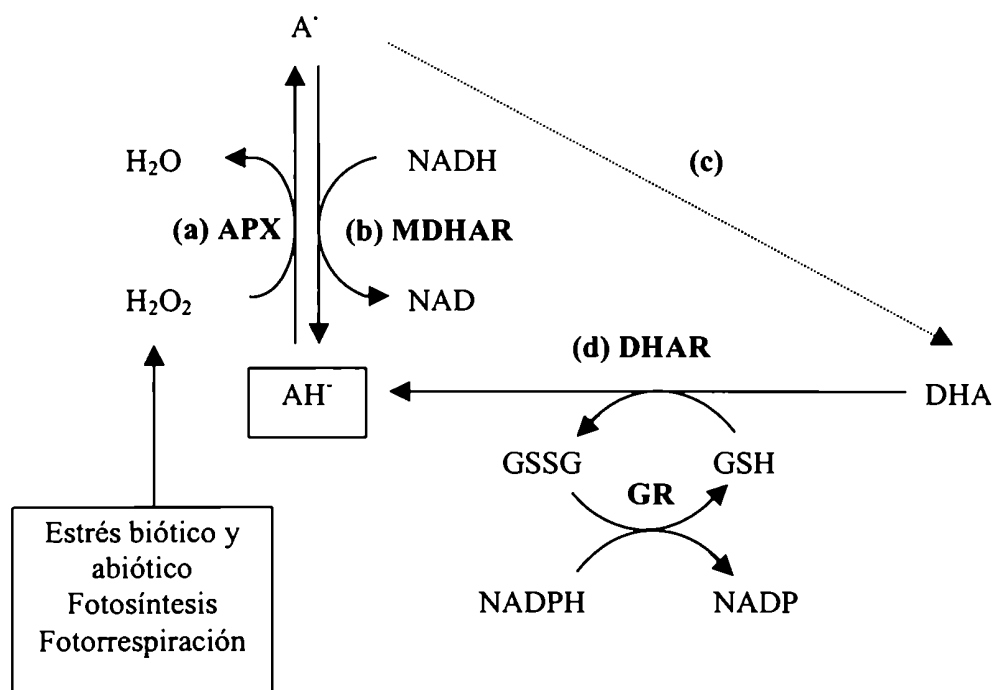


Figura 3: Reacciones de oxidación y reducción del ascorbato (AH⁻). (a) La reducción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por el ascorbato es catalizada por la enzima ascorbato peroxidasa (APX). (b) El producto de oxidación del ascorbato es el radical libre monodehidroascorbato, también llamado radical ascorbilo (A[·]), que es reducido por una reductasa específica (MDHAR) dependiente de NADH. (c) Dos moléculas de A[·] pueden convertirse espontáneamente en dehidroascorbato (DHA) y ascorbato (representado no estequiométricamente por la línea punteada). (d) El DHA es reducido a ascorbato por una reductasa específica (DHAR) dependiente de glutatión (GSH), compuesto que es luego re-reducido por la glutatión reductasa (GR). Estas reacciones ocurren en cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y en el citosol.

La exposición de plantas al UV-B provoca cambios en la concentración de los distintos componentes del sistema antioxidante. La acción del UV-B sobre la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, CAT, y las del ciclo ascorbato-glutación, es variable según la especie y las condiciones experimentales, habiéndose reportado aumento (Rao *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1996; Takeuchi *et al.*, 1996; Dai *et al.*, 1997; A.-H.-Mackerness *et al.*, 1998; Mazza *et al.*, 1999; Kubo *et al.*, 1999), disminución (Takeuchi *et al.*, 1996; Dai *et al.*, 1997), o falta de efecto (Mazza *et al.*, 1999; Kubo *et al.*, 1999) del UV-B sobre la actividad de ciertas enzimas. En lo que respecta a la acción del UV-B sobre el contenido de antioxidantes no enzimáticos (ácido ascórbico, glutación, α -tocoferol), se han reportado aumentos en la concentración de estos compuestos (Kim *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 1996; Takeuchi *et al.*, 1996; Dai *et al.*, 1997, Galatro *et al.*, 2001), y falta de efecto en algunos casos (Kozak *et al.*, 1997; Galatro *et al.*, 2001).

En resumen, el UV-B puede aumentar la concentración de especies reactivas de oxígeno, y a su vez puede modular distintos componentes del sistema antioxidante; el balance entre ambos efectos determinará el nivel celular de especies reactivas de oxígeno. Los trabajos publicados hasta el momento sobre los efectos del UV-B en la generación de ROS, se han realizado en especies cultivadas de interés agronómico (arroz, pepino, soja, cebada) y en la especie modelo *A. thaliana*. La mayoría de los estudios se han realizado con niveles elevados de UV-B (o desbalanceados espectralmente), y no hay información sobre lo que ocurre en plantas creciendo en condiciones de campo en ecosistemas naturales.

Efectos del UV-B sobre la vía de los fenil-propanoides

La epidermis foliar contiene compuestos que absorben UV, limitando así la penetración de esta radiación a tejidos internos. Estos compuestos son principalmente derivados fenólicos, que se encuentran en forma más abundante en las vacuolas de las células epidérmicas. La síntesis de los compuestos fenólicos ocurre a través de la vía del shiquimato y de los fenilpropanoides. Dos pasos clave de este proceso son regulados por enzimas que pueden inducirse en respuesta a la radiación UV-B: la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la chalcona sintasa (CHS) (Takeda *et al.*, 1994). Una característica de muchos compuestos fenólicos es que presentan gran

absorbancia en la región del ultravioleta y mínima en el visible, lo que los convierte en excelentes fotoprotectores, ya que bloquean efectivamente las longitudes de onda más dañinas del espectro solar con un mínimo de interferencia en la región de importancia fotosintética. Con la utilización de microsondas de fibra óptica (Day, 1993), y el uso de técnicas indirectas basadas en detectar la fluorescencia de la clorofila (Bilger *et al.*, 1997), se ha podido cuantificar la penetración de radiación de distinta longitud de onda hacia los tejidos internos de las hojas. Esto ha permitido documentar en forma cuantitativa el rol de la acumulación de compuestos fenólicos en la atenuación del UV-B por parte del tejido epidérmico. Además, mediante el uso de indicadores de daño molecular (como CPDs), se pudo documentar la efectividad biológica de estos compuestos como protectores frente a la radiación UV (Mazza *et al.*, 2000).

La efectividad del UV-B solar en aumentar la concentración de compuestos fotoprotectores en células epidérmicas ha sido bien documentada (Meijkamp *et al.*, 1999; Mazza *et al.*, 2000), si bien estudios recientes realizados con plantas creciendo a campo sugieren que las longitudes de onda que intervienen en la fotoregulación de la acumulación de estos compuestos pueden diferir según las especies (Mazza *et al.*, 2000; Kolb *et al.*, 2001).

Efectos biológicos del UV-B solar en ecosistemas terrestres de Tierra del Fuego

Nuestro grupo de trabajo ha estudiado los efectos del UV-B en distintos ecosistemas de Tierra del Fuego desde el año 1996, utilizando filtros plásticos que excluyen selectivamente el UV-B y no alteran significativamente el flujo de fotones de otras longitudes de onda (más detalles de la metodología se explican en el capítulo Materiales y Métodos). Los tres ecosistemas en estudio son: un arbustal dominado por *Chilotríchum duffusum* (mata negra) y rodeado por bosques de *Nothofagus sp.*, un turbal dominado por musgos del género *Sphagnum*, y un mallín dominado por gramínoideas del género *Carex*. Un resumen de los resultados obtenidos hasta el presente se encuentra en la Tabla 2.

Tabla 2: Resumen de los efectos del UV-B solar en especies vegetales de Tierra del Fuego.

Sitio	Especie	Efecto del UV-B solar	Forma de vida	Referencia
Arbustal y bosque adyacente	<i>G. magellanica</i>	Aumenta la herbivoría Aumenta el daño al ADN Reduce la expansión foliar	Herbácea perenne	Rousseaux <i>et al.</i> 1998 Rousseaux <i>et al.</i> 1999 Rousseaux <i>et al.</i> 2001
	<i>B. penna-marina</i>	Reduce el crecimiento del fronde	Herbácea perenne	Rousseaux <i>et al.</i> 2001
	<i>C. diffusum</i>	Sin efecto en el crecimiento	Arbusto	Rousseaux <i>et al.</i> 2001
	<i>N. antarctica</i>	Sin efecto en área foliar	Arbol de hojas caducas	Robson, sin publicar
	<i>N. pumilio</i>	Sin efecto en área foliar	Arbol de hojas caducas	Robson, sin publicar
	<i>N. betuloides</i>	Sin efecto en área foliar	Arbol de hojas perennes	Robson, sin publicar
Turbal	<i>S. magellanicum</i>	Reduce el crecimiento en altura Afecta microorganismos	Musgo	Searles <i>et al.</i> 2001 Robson <i>et al.</i> 2003
	<i>N. antarctica</i>	Sin efecto en el crecimiento	Arbol de hojas caducas	Robson <i>et al.</i> 2003
	<i>E. rubrum</i>	Reduce el crecimiento	Arbusto	Robson <i>et al.</i> 2003
	<i>T. magellanicum</i>	Reduce crecimiento	Gramínea perenne	Searles <i>et al.</i> 2002
Mallín	<i>C. curta</i> y <i>C. decidua</i>	Sin efecto en crecimiento del tallo Disminuye largo de raíces	Gramíneas perennes	Searles <i>et al.</i> 1999 Zaller <i>et al.</i> 2002 Zaller <i>et al.</i> 2003

Efectos del UV-B solar sobre el crecimiento y la morfología de especies vegetales en Tierra del Fuego

Se estudió el crecimiento bajo UV-B solar de una variedad de especies en los distintos ecosistemas. El UV-B solar tuvo un efecto inhibitorio en el crecimiento de las especies herbáceas (*G. magellanica*, *B. penna-marina*, *Tetroncium magellanicum*, *Empetrum rubrum*) y en el musgo *S. magellanicum* (Rousseaux *et al.*, 2001; Searles *et al.*, 2001b; Robson *et al.*, 2003). Estos resultados coinciden con la inhibición en el crecimiento observado en especies herbáceas

expuestas al UV-B solar en latitudes menores [*Datura ferox* (Ballaré *et al.*, 1996), pepino (Krizek *et al.*, 1994), lechuga (Krizek *et al.*, 1998) y cebada (Mazza *et al.*, 1999)], y en su sitio de distribución natural en la península antártica (*Colobanthus quitensis* y *Deschampsia antarctica*) (Day *et al.*, 1999; Xiong & Day, 2001; Day *et al.*, 2001).

Acción del UV-B solar sobre los compuestos fotoprotectores en plantas de Tierra del Fuego

Los niveles de compuestos fotoprotectores y el peso de las hojas por unidad de área (masa foliar específica, MFE) se midieron en varias especies, como indicadores de aclimatación al UV-B. Esta radiación no modificó los niveles de compuestos fotoprotectores en *G. magellanica*, *B. penna-marina*, *C. diffusum* y *S. magellanicum* (Rousseaux *et al.*, 1998; Searles *et al.*, 1999; Rousseaux *et al.*, 2001), pero los aumentó en las especies de *Nothofagus* (T. M. Robson, sin publicar). La MFE no fue afectada por el UV-B en *G. magellanica*, *B. penna-marina*, y *C. diffusum* (Rousseaux *et al.*, 1998; Rousseaux *et al.*, 2001) y aumentó en *Nothofagus sp.* (T. M. Robson, sin publicar) Las mediciones de transmitancia epidérmica realizadas por (Barnes *et al.*, 2000) confirmaron que *G. magellanica*, *B. penna-marina* y *C. diffusum* presentan una baja transmitancia al UV en forma constitutiva.

Daño al ADN producido por el UV-B solar en plantas de Tierra del Fuego

El análisis del contenido de CPDs en hojas de *G. magellanica* que crecieron bajo radiación solar en su ambiente natural demostró que el nivel de daño al ADN estuvo correlacionado positivamente con la dosis de UV-B recibida por las plantas antes del momento de muestreo (Rousseaux *et al.*, 1999). La utilización de filtros de exclusión selectivos para el UV-B y el UV-B + el UV-A permitió establecer que el UV-B es el principal componente de la radiación solar responsable del daño detectado. La relación entre la dosis de UV-B y el contenido de CPDs fue particularmente fuerte cuando la radiación se ponderó por el espectro de acción de (Caldwell, 1971), que asume una bajada abrupta de la eficiencia cuántica hacia longitudes de onda mayores que el UV-B (Fig. 4).

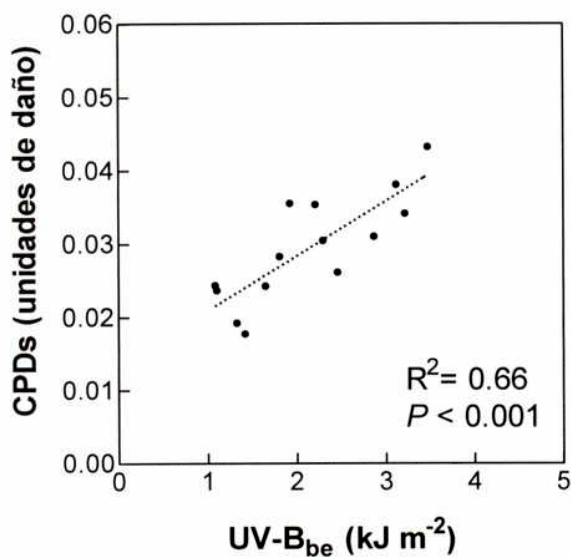


Figura 4: Contenido de CPDs por ng de ADN en hojas de *G. magellanica* que crecieron bajo filtros que transmitían la totalidad de la radiación solar, en función de la dosis de UV-B_{be} registrada antes del mediodía (horario en que se realizaron los muestreos). La dosis UV-B_{be} se calculó utilizando el espectro de acción de Caldwell (1971), normalizado a 300 nm. 1 unidad de daño al ADN= número de CPDs producidos por 1 Jm⁻² de radiación de 254 nm en 1 ng de ADN purificado. Adaptado de Rousseaux *et al.*, 1999.

Objetivo general de la Tesis

El objetivo general de la Tesis fue mejorar la comprensión de los efectos del UV solar sobre el crecimiento, la generación de daño molecular (específicamente, daño al ADN y daño oxidativo), y la inducción de respuestas de aclimatación, en especies nativas de Tierra del Fuego. Debido a los conocimientos previos acerca de algunos efectos del UV-B sobre *Gunnera magellanica*, y a sus convenientes características anatómicas y morfológicas (hojas planas expuestas horizontalmente a la radiación solar), utilizamos esta planta vascular herbácea como modelo de estudio.

Objetivos específicos

- 1) Evaluar los efectos del UV-B y UV-A solares sobre el crecimiento de *G. magellanica* en su ambiente natural, durante múltiples temporadas.
- 2) Estudiar la regulación de la reparación de CPDs por el UV-B y el UV-A solares en *G. magellanica*. Establecer las velocidades de reparación a distintas temperaturas, y correlacionar los resultados observados con las características microclimáticas del sistema de estudio. Comparar la velocidad de reparación de CPDs en *G. magellanica* con otras especies más ampliamente estudiadas.
- 3) Establecer el impacto relativo del UV-B y el UV-A en la generación del daño al ADN en *G. magellanica* bajo condiciones de radiación natural. Determinar el perfil diario del contenido de CPDs y de compuestos fotoprotectores en ambientes con distinta composición espectral en el UV, en relación con la fluctuación de factores climáticos relevantes como la radiación solar y la temperatura.

- 4) Estudiar los efectos de distintas dosis de UV-B sobre la generación de estrés oxidativo, niveles de peroxidación lipídica y contenido de CPDs en *G. magellanica*, y establecer la importancia relativa de los diferentes daños moleculares en determinar la reducción del crecimiento causado por el UV-B.

Hipótesis y predicciones

Hipótesis 1: La región del UV solar con mayor incidencia negativa en el crecimiento es la correspondiente al UV-B.

Predicción 1: Las plantas que crezcan bajo UV solar desarrollarán menor área foliar que las que crezcan en ambientes con UV-B reducido o sin UV (sin UV-B ni UV-A).

Hipótesis 2: Los mecanismos de fotorreparación de CPDs en *G. magellanica* son regulados por el UV solar.

Predicción 2: Las plantas que crezcan bajo UV solar presentarán mayores velocidades de fotorreparación de CPDs que las que crezcan en ambientes con UV-B reducido o sin UV.

Hipótesis 3: Debido a que *G. magellanica* es una especie nativa de regiones frías, presenta una eficiente reparación de CPDs (tanto de fotorreparación como de reparación en oscuridad) aún a bajas temperaturas.

Predicción 3: Se detectará reparación de CPDs a temperaturas altas y bajas.

Hipótesis 4: *G. magellanica* (adaptada a un ambiente con bajas temperaturas y bajo UV-B) presenta una velocidad de reparación de CPDs comparable a la de otras especies que evolucionaron en climas templados y latitudes medias o altas.

Predicción 4: La velocidad de reparación de CPDs de *G. magellanica* será comparable a la de *A. thaliana* (especie-modelo ampliamente estudiada, originaria de regiones templadas del norte de Europa).

Hipótesis 5: Los niveles de CPDs son mayores al mediodía que al amanecer y al atardecer, debido a los altos niveles de UV-B en ese momento del día. El contenido de compuestos fotoprotectores no varían a lo largo del día, ya que no son regulados por el UV en esta especie.

Predicción 5: Los niveles de CPDs presentarán una fluctuación diaria acompañando las fluctuaciones del UV-B solar, en hojas que crecieron bajo el ambiente con UV. Esta fluctuación será menor en el ambiente con UV-B reducido y nula en el ambiente sin UV. Los niveles de compuestos fotoprotectores no diferirán entre tratamientos y no presentarán una fluctuación diaria.

Hipótesis 6: Niveles ambientales de UV-B generan estrés oxidativo en *G. magellanica*.

Predicción 6: La relación radical ascorbilo / ascorbato (índice que indica estrés oxidativo) aumentará en hojas de *G. magellanica* que crezcan bajo dosis mayores de UV-B. Los niveles de peroxidación lipídica también aumentarán en función de la dosis de UV-B.

Hipótesis 7: Tanto el daño oxidativo a lípidos como el daño al ADN contribuyen a explicar la reducción del crecimiento inducido por UV-B en *G. magellanica*.

Predicción 7: La reducción en la expansión foliar correlacionará positivamente con los niveles de peroxidación lipídica y CPDs.



MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del sitio experimental y características de *Gunnera magellanica*

La comunidad donde se establecieron las parcelas experimentales se encuentra en el Parque Nacional Tierra del Fuego (provincia de Tierra del Fuego, Argentina, 54° 04' S, 68° 35' O), aproximadamente a 20 km hacia el oeste de la ciudad de Ushuaia (Fig. 5). El área recibe una precipitación anual de 520 mm y el cielo se encuentra frecuentemente nublado a lo largo de todo el año. La temperatura media anual es de 5.5 °C (FAO, 1985). Esta zona presenta la particularidad de estar bajo la influencia del agujero de ozono antártico durante la primavera.

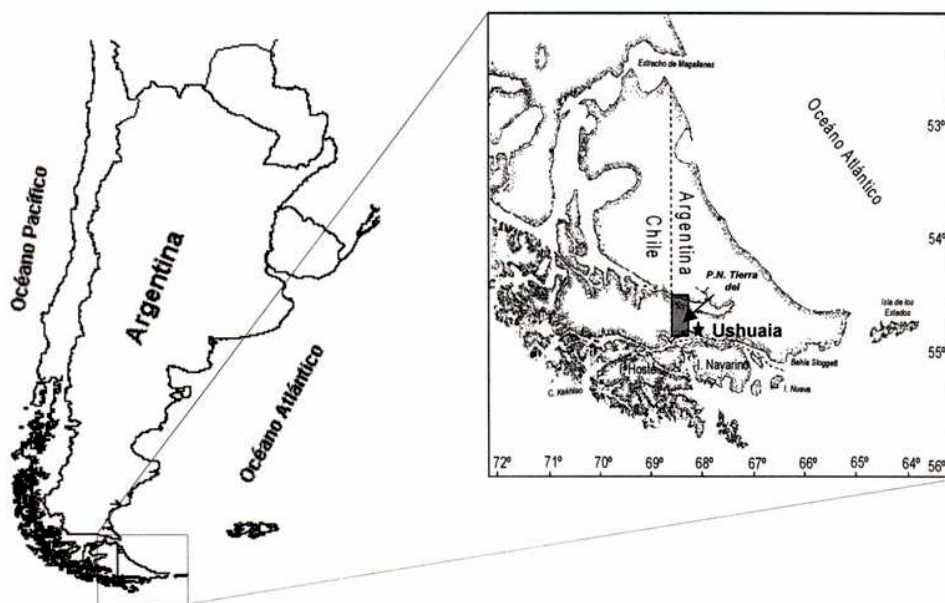


Figura 5: Ubicación geográfica del Parque Nacional Tierra del Fuego.

En el Parque Nacional hay bosques deciduos [dominados por *Nothofagus pumilio* (“lenga”) y *N. antarctica* (“ñire”)]; bosques perennes [dominados por *Nothofagus betuloides* (“guindo”)]; turbales (dominados por el musgo *Sphagnum magellanicum*), y arbustales. Las parcelas experimentales se colocaron en un arbustal dominado por *Chilietrichum diffusum* (Foster f.) O. Kuntze (“mata negra”), y rodeado por un bosque deciduo de *Nothofagus sp.* En los espacios abiertos entre los arbustos se halla un estrato herbáceo bajo (de aproximadamente 15 cm de altura

desde el suelo), dominado por *Gunnera magellanica* Lam. (“frutilla del diablo”), y el helecho *Blechnum penna-marina* (Poiret) Khun., y donde también se encuentran en menor abundancia *Pernettya pumila* (“murtilla”), *Empetrum rubrum* (“murtilla”) y varias especies de pastos.

G. magellanica se caracteriza por ser una especie herbácea perenne, que se propaga vegetativamente por medio de estolones, formando parches densos de tallos y hojas cercanos al suelo. Pierde las hojas a fines del otoño, pero los tallos y raíces persisten durante el invierno debajo la nieve. Rebrotan a principios de la primavera, entre septiembre y octubre. Sus hojas son aproximadamente circulares, y a medida que se expanden exponen su cara adaxial a la radiación solar (Fig. 6 A).

Diseño experimental

Estudiamos los efectos del UV sobre *G. magellanica* realizando experimentos **a campo** y en **invernáculo**.

Experimentos a campo en el Parque Nacional Tierra del Fuego

Durante los años 1998, 1999 y 2001 realizamos experimentos a campo en Tierra del Fuego. A principios del mes de octubre, delimitamos parcelas de 70 x 70 cm en lugares abiertos del arbustal con abundancia de *G. magellanica*. Las cubrimos con filtros de distintas propiedades ópticas para generar ambientes lumínicos con distinta composición en el UV: **UV-B ambiental**, **UV-B reducido** y **-UV** (Fig. 6 B). Los materiales utilizados fueron los siguientes:

Film polifluorino Aclar, tipo 22A, de 38 µm de espesor (Allied Signal, Pottsville, PA, USA): posee una alta transmitancia en todas las longitudes de onda del espectro solar en tierra. Este tratamiento corresponde al **UV ambiental**. Los filtros se utilizaron agujereados (para permitir el paso de la lluvia), transmitiendo aproximadamente un 90 % de la radiación solar, incluyendo el UV (Searles *et al.*, 1999).

Plástico de poliéster transparente de 100 µm de espesor (Mylar-D, Dupont, UK): absorbe las longitudes de onda < 315 nm correspondientes al UV-B, pero transmite las correspondientes al UV-A y visible. Este tratamiento lo denominamos **UV-B reducido**. Estos

filtros también se utilizaron agujereados, y el UV-B registrado debajo de ellos fué de aproximadamente el 20% del UV-B solar (Searles *et al.*, 1999).

Láminas Lexan MR5, de 3 mm de espesor (General Electric, Fairfield, CT, USA): absorbe longitudes de onda < 400 nm, eliminando de esta manera tanto el UV-B como el UV-A. Este tratamiento lo denominamos –UV, ya que excluye todo el UV solar. Estas láminas no pudieron agujerearse debido a su consistencia, de manera que las parcelas con estos filtros se regaron según la lluvia caída.

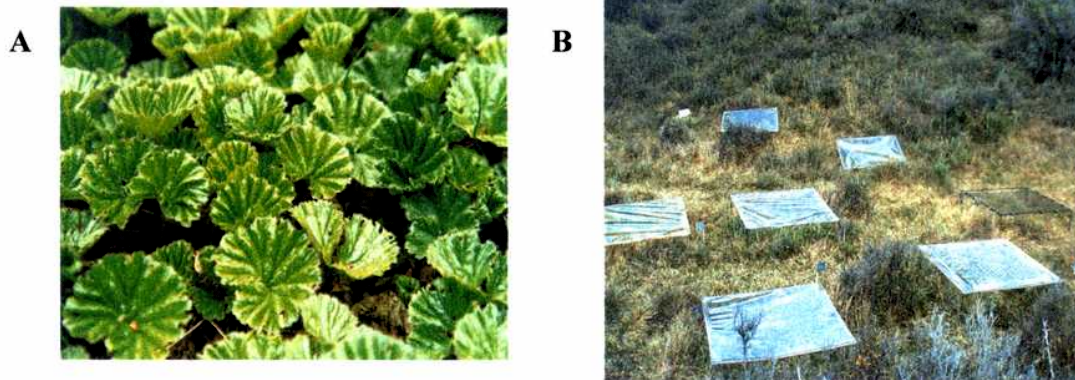


Figura 6: A, *Gunnera magellanica*. B, Filtros de exclusión en el Parque Nacional Tierra del Fuego.

Experimentos previos utilizando este diseño en el mismo sitio experimental, demostraron que el régimen de temperaturas y la humedad del suelo no difirieron entre tratamientos (Searles *et al.*, 1999; Rousseaux *et al.*, 2001; Searles *et al.*, 2002). Los espectros de transmitancia de los filtros se muestran en la Fig. 7.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado en bloques. Las parcelas (unidades experimentales) se delimitaron en áreas diferentes (bloques) en el campo, y los 3

tratamientos se asignaron al azar a las parcelas dentro de cada bloque. En el año 1998 se delimitaron 3 bloques; en el 1999, 7 bloques ; y en el 2001 5 bloques.

En las tres temporadas realizamos mediciones de crecimiento. Durante los años 1998 y 1999, paralelamente a los registros de crecimiento, recolectamos muestras de hojas de *G. magellanica* de las parcelas experimentales con el objetivo de contestar preguntas específicas. En la temporada de 1999 investigamos las respuestas de aclimatación al UV solar, mediante el estudio de la **reparación de CPDs *in vivo***, y de la medición de **compuestos fenólicos foliares, transmitancia epidérmica foliar y biomasa de hoja por unidad de área (masa foliar específica)**. En la temporada de 1998 estudiamos la **dinámica diaria del contenido de CPDs** y de **compuestos flavonoides**. Las técnicas utilizadas se detallan en las secciones correspondientes en este mismo capítulo.

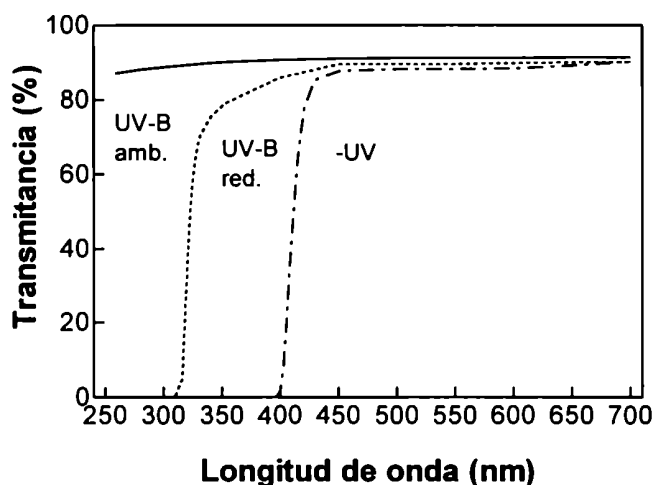


Figura 7: Espectros de transmitancia de filtros utilizados para generar los distintos ambientes lumínicos en el campo. Film polifluorino Aclar (—), film de poliéster Mylar-D (· · · ·) y láminas Lexan (— · —).

Experimentos en invernáculo en Buenos Aires

Durante el año 2002, realizamos experimentos en invernáculo en Buenos Aires. Recolectamos parches de plantas de *G. magellanica* que se encontraban naturalmente en una planicie en las inmediaciones del Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC), en

Ushuaia, y las trasladamos a Buenos Aires. Las colocamos en macetas dentro de un invernáculo durante aproximadamente 20 días. Luego de ese período, las colocamos debajo de lámparas de UV-B, cubiertas con filtros individuales de diacetato de celulosa (para filtrar el UV-C que emiten las lámparas, sin alterar el pasaje del UV-B) o poliéster transparente (para eliminar el UV-B). El arreglo de lámparas consistió en 5 tubos de UVB-313 (Q-Panel, USA) y 4 tubos FS20TS (Solarc Systems Inc., Canadá), colocados en un marco de aluminio, a 1 m de altura sobre las plantas (Fig. 8). Las luces permanecieron encendidas durante 10 h alrededor del mediodía local. Se ensayaron 4 dosis de UV-B_{be} [UV-B biológicamente efectiva, calculada según espectro de acción de (Caldwell, 1971), normalizado a 300 nm]: 0, 2, 4 y 6.5 kJ m⁻² día⁻¹. Para lograr las distintas dosis, dejamos las macetas cubiertas con diacetato de celulosa durante 3, 6 o 10 h, y el resto del tiempo las cubrimos con poliéster. Las plantas que no recibieron UV-B, permanecieron todo el tiempo cubiertas por poliéster.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado. Las macetas (3 por tratamiento) fueron consideradas las unidades experimentales, y las distintas dosis de UV-B fueron asignadas en forma aleatoria entre ellas.



Figura 8: Experimento en invernáculo en Buenos Aires

Luego de 1, 4, 10 y 29 días de comenzado el ensayo, recolectamos hojas para determinar el **contenido de CPDs, radicales lipídicos, ácido ascórbico, radical ascorbilo, niveles de compuestos fenólicos foliares y masa foliar específica**. También medimos la expansión foliar de dos cohortes de hojas a lo largo del experimento. La cohorte 1 comprendió mediciones durante los 12 primeros días del ensayo, y la cohorte 2 desde el día 16^{vo} y durante los 18 días siguientes.

Reparación de CPDs *in vivo*

Recolectamos hojas las parcelas experimentales [que crecieron bajo **UV-B ambiental, UV-B reducido y sin UV (-UV)**], las colocamos en cajas plásticas con algodón humedecido con agua corriente, y las trasladamos a los laboratorios del CADIC en Ushuaia, en frío (<4 °C) y oscuridad (tiempo de viaje 40 minutos). En el laboratorio, las colocamos durante 30 minutos bajo luz UV-A + visible (Fig. 9), a 25°C, en una cámara con control de temperatura provista de un panel de dos lámparas de luz de día LT 18W (Narva, Alemania) y dos lámparas de UV-A TDL 18 W (Philips), suspendidas aproximadamente a 15 cm sobre las hojas. Este tratamiento induce la fotorreparación de CPDs (llevada a cabo por la enzima fotoliasa), y lo suministramos para disminuir los niveles de daño al ADN que las hojas trajeran del campo. Luego las irradiamos con UV-B durante 20 minutos (dosis UV-B $_{be}$: 1.10 kJ m⁻²), con lámparas de UV-B FS20TS (Solarc Systems Inc, Ontario, Canadá) que colocamos a 20 cm sobre las hojas. La radiación emitida por las lámparas fue filtrada por una capa de diacetato de celulosa para eliminar la radiación UV-C. Este tratamiento aumentó el contenido de CPDs de las hojas provenientes de todos los tratamientos en el campo. Tanto la fotorreparación previa como este “pulso” de UV-B, se realizaron con el objetivo de igualar los niveles de CPDs en hojas de los distintos ambientes lumínicos provenientes de las parcelas experimentales. Esto es importante ya que se ha demostrado que los niveles iniciales de CPDs pueden influenciar el tipo de mecanismo de reparación del ADN, y por lo tanto afectar la cinética de reparación (Quaite *et al.*, 1994). Luego de estos tratamientos previos, realizamos los ensayos de reparación de CPDs *in vivo*, para seguir la dinámica de remoción de CPDs en el tiempo. Colocamos las hojas (embebidas en agua) dentro de la cámara provista de luz UV-A + visible, expuestas a la luz (fotorreparación de CPDs) o bien

envueltas en papel aluminio (reparación de CPDs en oscuridad), a 25 y a 8 °C. Retiramos muestras a diferentes tiempos (al comienzo y luego de 15, 45 y 120 minutos), y las congelamos inmediatamente en nitrógeno líquido para su posterior análisis. Debido a las restricciones impuestas por el tamaño de la cámara de reparación, solamente utilizamos 3 bloques del campo para estos experimentos.

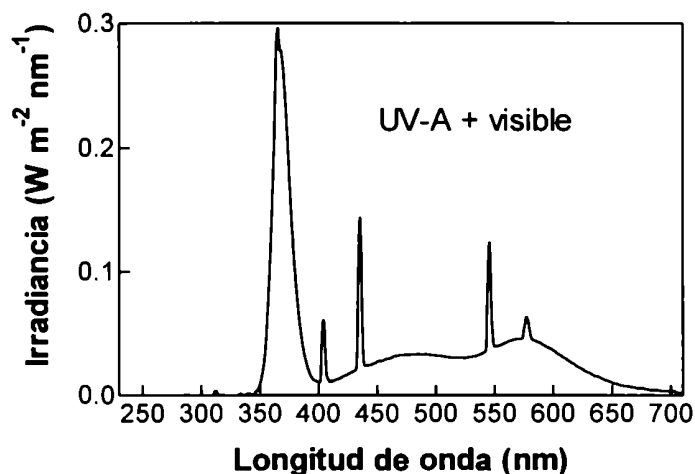


Figura 9: Espectro de emisión de energía de las lámparas utilizadas en los experimentos de fotorreparación de CPDs.

Para realizar los experimentos de comparación de las velocidades de reparación de CPDs de *G. magellanica* y *A. thaliana*, sometimos ambas plantas a iguales condiciones experimentales. Cultivamos plantas de *A. thaliana* (c.v. Landsberg erecta) en un invernáculo en Buenos Aires, trasladamos plantas de *G. magellanica* desde Tierra del Fuego y las colocamos en el mismo sitio. Para lograr iguales niveles iniciales de CPDs, irradiamos hojas recolectadas de ambas especies, con 0.6130 kJ m⁻² (*G. magellanica*) o 0.2454 kJ m⁻² (*A. thaliana*) de UV-B_{bc}. Luego de esta irradiación inicial, llevamos a cabo la reparación de CPDs *in vivo*, bajo las mismas condiciones utilizadas con las hojas provenientes de los experimentos a campo (UV-A + visible

u **oscuridad**). En estos ensayos, utilizamos 5 macetas (unidades experimentales) de cada especie para evaluar la reparación de los CPDs.

Determinaciones moleculares y bioquímicas

Extracción y cuantificación de ADN total

Molimos hojas congeladas en nitrógeno líquido en mortero de cerámica. Extrajimos el ADN total utilizando el Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Lo cuantificamos con un compuesto que se une específicamente al ADN, el Hoeschst 33258 (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Buckinghamshire, England). Medimos la fluorescencia del complejo ADN-Hoeschst en un fluorómetro Versa Fluor (Bio Rad Laboratories Inc., CA, USA), y determinamos su concentración utilizando ADN comercial de concentración conocida (Sigma, St. Louis, Missouri, USA).

Detección y cuantificación de CPDs

Desnaturalizamos el ADN [disuelto en buffer TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8)], colocándolo en una solución alcalina de NaOH 1.6 M : EDTA 40 mM (1:1) a hervor durante 10 minutos. Luego lo sembramos en una membrana de nylon cargada positivamente (Zeta Probe, Bio Rad) previamente hidratada, utilizando un dispositivo *ad hoc* [“dot blotter” (Bio Rad)]. Colocamos la membrana a 80 °C durante 30 minutos, para permitir la unión covalente del ADN a la misma. Detectamos los CPDs con el anticuerpo monoclonal específico TDM-2, (Mori et al., 1991), y con un anticuerpo secundario [goat anti-mouse, IgG (H+L)] unido a fosfatasa alcalina (Bio Rad). Los sucesivos lavados de la membrana e incubación de anticuerpos los realizamos con PBS-T leche (Na₂HPO₄ 80 mM, NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 100 mM, Tween-20 0.2 % v/v, leche descremada en polvo % p/v). El bloqueo de la membrana previo al agregado del anticuerpo primario, lo realizamos con PBS-T leche 10 % p/v. Utilizamos el reactivo CDP-Star (Tropix, Bedford, MA, USA) diluido en el buffer de reacción (dietanolamina 0.1 M, MgCl₂ 1 mM, pH

9.5) como sustrato quimioluminiscente. Detectamos la señal lumínica en un sistema digital de imágenes con cámara fotográfica refrigerada de alta sensibilidad Fluor-S MultiImager (Bio Rad) (Fig. 10 A, datos presentados en la **Sección II de Resultados**), o utilizando placas autorradiográficas (X-OMAT, Eastman Kodak Company, USA) (Fig. 10 B, datos presentados en las **Secciones III y IV de Resultados**).

La masa de ADN sembrado en cada membrana (que varió en general entre 1 a 2 μg por punto de siembra) y los tiempos de exposición se ajustaron de manera que las señales no estuviesen saturadas, y aumentarían en forma lineal con el tiempo. En cada membrana sembramos muestras de ADN de esperma de arenque (Promega Corporation, Madison, WI, USA) irradiado con distintas dosis de UV-C, a manera de control de intensidad de las membranas y para facilitar la intercomparación. La intensidad de las señales lumínicas (que indican la presencia de CPDs) obtenidas tanto por exposición de las membranas en el MultiImager, como por velado de placa autorradiográfica, las cuantificamos con la herramienta "Volume" del software Multi Analyst PC v. 1.1, y las corregimos por la señal de fondo local. En el caso de las membranas expuestas en el MultiImager, los valores de CPDs por ng de ADN están expresados en unidades arbitrarias de luminosidad (UL), que utiliza el programa Multi Analyst para cuantificar señales lumínicas. En el caso de las membranas expuestas a placas autorradiográficas, los CPDs por ng de ADN están expresados en unidades de densidad óptica (UDO). Ambas unidades no son intercomparables.

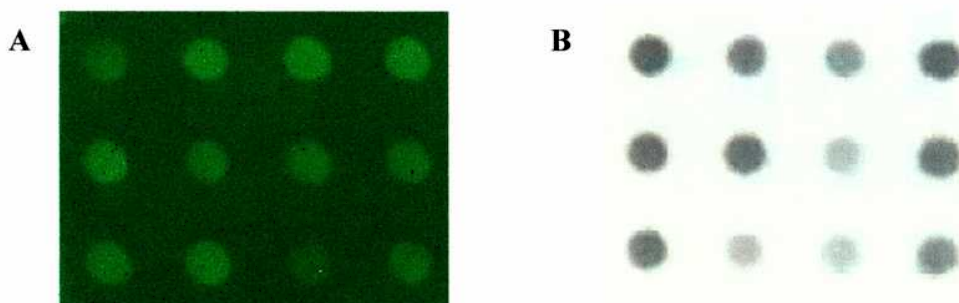


Figura 10: Emisión de quimioluminiscencia en la técnica utilizada para medir el contenido de CPDs, detectada con la cámara ultrasensible refrigerada (A) y por velado de placas autorradiográficas (B).

Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos foliares

Colocamos 3 discos de hojas de 0.65 cm de diámetro en 4 ml de metanol:ácido clorhídrico 99:1 v/v, y las colocamos en oscuridad durante 48 hs a -20 °C. Estimamos la concentración de compuestos que absorben en el UV-B por la absorbancia a 305 nm del extracto metanólico (Rousseaux *et al.*, 2001).

Medición de la transmitancia epidérmica al UV-B

La técnica utilizada se basa en irradiar hojas con UV-B, y medir la consecuente emisión de fluorescencia de la clorofila en la zona del rojo. Si las hojas tienen una alta capacidad de filtrar el UV-B en la epidermis, la cantidad de fotones que lleguen al mesófilo será baja, y por lo tanto se detectará una baja fluorescencia. Si la epidermis foliar no filtra eficazmente el UV-B, la fluorescencia detectada será mayor. Colocamos hojas recolectadas en las parcelas experimentales en el Fluor-S MultiImager, y las irradiamos con UV de banda ancha (entre 290 y los 365 nm, con un pico a los 302 nm). Para evaluar la señal inducida específicamente por el UV-B (RF_{uvb}), sustrajimos la fracción de la fluorescencia causada por la porción UV-A de la fuente de luz, que determinamos colocando un filtro de poliéster entre las hojas y las lámparas. La fluorescencia emitida por las hojas fue filtrada a través de un filtro rojo RG695, para eliminar la porción correspondiente al amarillo y verde, y fue detectada por la cámara del MultiImager en el modo alta sensibilidad. Debido a que la fluorescencia puede variar según el contenido de clorofila de las hojas o el funcionamiento del aparato fotosintético, utilizamos la señal inducida por la luz azul (RF_b) como control (Bilger *et al.*, 1997). Las lámparas utilizadas para inducir la RF_b fueron las lámparas de luz blanca del aparato, cubiertas con cajas de acrílico llenas de solución saturada de sulfato de cobre. Cuantificamos las señales fluorescentes con el software Multi-Analyst, en unidades arbitrarias de luminosidad (UL).

Medición del contenido de ascorbato

Determinamos el contenido del anión ascorbato por HPLC de fase reversa, con detección electroquímica (0.6 V potencial de oxidación) (Kutnink *et al.*, 1987). Homogeneizamos

las hojas (previamente congeladas en nitrógeno líquido) en ácido metafosfórico al 10% (p/v), las centrifugamos y filtramos a través de membranas de Nylon de 0,22 μm . Utilizamos una columna Supelcosil LC-18, estabilizada con la fase móvil [ácido metafosfórico 0,8% (p/v)], a un flujo constante de 1,0 ml min^{-1} . Utilizamos una solución de ácido ascórbico como estándar, preparada en el momento y titulada espectrofotométricamente a 265 nm ($\epsilon = 14,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Todos los solventes empleados fueron de calidad HPLC.

Detección de radicales libres

Tanto el radical ascorbilo como los radicales lipídicos se midieron por Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR). Este es el único método directo para la detección de radicales libres, ya que se basa en la absorción de energía electromagnética por los mismos en presencia de un campo magnético externo. De esta interacción se producen espectros con parámetros distintivos según la especie química que se esté detectando. Esta técnica permite establecer tanto el número total de moléculas paramagnéticas (con electrones desapareados), siendo esta una cuantificación de tipo relativo (a través de la integración de los espectros de absorción), así como la naturaleza de las mismas (a través de la estructura hiperfina del espectro).

Sólo es posible detectar por EPR en forma directa radicales libres estables, o radicales libres inestables que alcanzan altas concentraciones en el estado estacionario. El radical ascorbilo es lo suficientemente estable para ser detectado por esta técnica, pero los radicales lipídicos no lo son. Por lo tanto, para detectar los radicales lipídicos utilizamos una técnica llamada “captura de spin”, que consiste en utilizar una molécula diamagnética (sin electrones desapareados) que se conjuga con el radical libre inestable. El resultado es la formación de un aducto paramagnético estable que puede ser detectado a temperatura ambiente.

Detección y cuantificación del radical ascorbilo

Molimos las hojas en nitrógeno líquido, y las homogeneizamos en una solución de buffer fosfato de potasio 100 mM pH=7.4:dimetilsulfóxido (DMSO) (1:1). Analizamos las muestras por EPR, en un Espectrómetro Bruker ECS 106 banda X, con una cavidad ER 4102ST, a temperatura ambiente. Los espectros se corrieron utilizando los siguientes parámetros

instrumentales: poder de microondas, 10 mW; frecuencia de microondas, 9,75 GHz; campo centrado en 3487 G; constante de tiempo, 328 ms; tiempo de conversión, 82 ms; amplitud de modulación, 1 G; ancho de barrido, 15 G y frecuencia de modulación, 50 kHz; (Buettner & Jurkiewicz, 1993). Realizamos la cuantificación de los aductos de spin utilizando una solución acuosa de 2,2,5,5-tetrametil piperidina 1-oxil (TEMPO). El espectro EPR para las muestras y la solución de TEMPO se midieron exactamente bajo las mismas condiciones, y luego calculamos la concentración del aducto de spin según (Kotake *et al.*, 1996).

Detección y cuantificación de radicales lipídicos

Medimos la generación de radicales lipídicos en homogenatos de hojas, preparados en buffer fosfato 100 mM pH=7.4, en presencia de α -(4-piridil 1-oxido)-N-t-butil nitrona (POBN) como captor de spin, a una concentración 50 mM. Incubamos las muestras durante 30 minutos a 37 °C. Los parámetros para medir los aductos de spin por EPR a temperatura ambiente fueron los siguientes: frecuencia de modulación 50kHz, frecuencia de microondas 9.75 GHz, poder de microondas 20 mW, campo centrado en 3480 G, amplitud de modulación 1.2 G, constante de tiempo 81.82 ms, ancho de barrido 100 G (Jurkiewicz & Buettner, 1994). Realizamos la cuantificación del aducto de spin según (Kotake *et al.*, 1996).

Medición del crecimiento y parámetros morfológicos

Medición de la expansión foliar

Marcamos hojas jóvenes, y realizamos sucesivas mediciones del radio (con calibre) durante la expansión de las mismas. El aumento en el radio foliar lo definimos como: radio final (de la hoja expandida) - radio inicial (de la hoja joven).

Medición de la masa foliar específica

El peso de la hoja por unidad de área (masa foliar específica, MFE) la calculamos en base a los pesos de discos de hojas secas (0.65 cm de diámetro) ya deshidratados, que utilizamos para extraer los compuestos fenólicos.

Medición de la emisión de las lámparas

Las mediciones de la irradiancia emitida por los diversos tipos de lámparas utilizadas en los experimentos (de UV-B, de UV-A y de luz visible) las realizamos con un espectroradiómetro con doble monocromador IL-1700 (International Light, Newburyport, MA, USA) en el rango UV, y con un microespectroradiómetro (S2000, Ocean Optics, Dunedin, FL, USA) en la región del visible. Las dosis de UV-B_{be} las calculamos en base al espectro de acción generalizado para plantas (Caldwell, 1971) normalizado a 300 nm.

Datos meteorológicos de los experimentos en Tierra del Fuego

Temperatura

Los datos de temperatura del aire de la ciudad de Ushuaia provienen de los registros de la estación meteorológica ubicada en el CADIC.

Durante el período en que realizamos los experimentos, medimos la temperatura del aire a nivel del canopeo de *G. magellanica* en las parcelas experimentales, usando termocuplas unidas a un sistema de auto registro de datos Campbell (Campbell Scientific Inc., Logan, UT, USA).

UV-B

Los niveles de UV-B sobre la ciudad de Ushuaia fueron registrados por el espectroradiómetro de la Red de Monitoreo de UV de la National Science Foundation, ubicado en el CADIC. Las dosis diarias de UV-B_{bc} fueron provistas por la Ing. Susana Díaz o bien calculadas a partir de las bases de datos disponibles en <http://www.biospherical.com/NSF/default.asp>

Ozono

Los niveles de ozono se obtuvieron de los datos del espectrómetro TOMS ubicado en el satélite Earth Probe de la NASA, que se encuentran disponibles en Internet en <http://www.jwocky.gsfc.nasa.gov>

Datos meteorológicos de los experimentos en Buenos Aires

La radiación PAR dentro y fuera del invernáculo fue registrada por un sensor puntual Li-190SA Quantum Sensor (Li-Cor Lincoln, NE). La temperatura del aire fue sensada con un sensor específico modelo 107 (Campbell Scientific, Logan, Utah). Todos los datos fueron registrados con un sistema de auto-registro de datos Campbell 21X.

Análisis estadístico

La comparación de medias la realizamos con análisis de varianza (ANOVA), considerando los bloques y los tratamientos como fuentes de variación. La separación estadística de medias la establecimos con post-test de Duncan.

En el caso de los datos provenientes de determinaciones sucesivas en el tiempo sobre las mismas unidades experimentales, realizamos un análisis de varianza con medidas repetidas en el tiempo (ANOVA con MR), o test t pareado, según se indique.

La relación entre dos variables la analizamos utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, o por regresión lineal, según se especifique.

Consideramos un $\alpha = 5\%$.

Todos los análisis mencionados los llevamos a cabo con el programa estadístico SAS (versión 6.12, SAS Institute, Cary, NC, USA).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I

Efecto del UV solar sobre el crecimiento de *Gunnera magellanica*

Los estudios realizados a campo con plantas de ecosistemas agrícolas y otros ecosistemas modificados por el hombre, han demostrado que el UV-B puede reducir el crecimiento y el rendimiento económico de algunas especies (Sullivan *et al.*, 1994; Ballaré *et al.*, 1996; Mepsted *et al.*, 1996; Krizek *et al.*, 1998; Mazza *et al.*, 1999; Kumagai *et al.*, 2001). Sin embargo, otras especies no responden al UV-B en este sentido (Kim *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 1999; Papadopoulos *et al.*, 1999). En lo que respecta a ecosistemas naturales, se han documentado reducciones en el crecimiento de especies nativas en experimentos de atenuación de UV-B en zonas afectadas por la reducción de ozono (Rousseaux *et al.*, 1998; Day *et al.*, 1999; Rousseaux *et al.*, 2001; Day *et al.*, 2001), y en experimentos de suplementación de UV-B con lámparas (Johanson *et al.*, 1995; Musil, 1995; Gherke, 1998, 1999; Cooley *et al.*, 2000).

En Tierra del Fuego, nuestro grupo de trabajo ha estudiado los efectos del UV-B ambiental en distintos ecosistemas (mallín, turbal y arbustal), desde 1996. En cuanto a los efectos sobre el crecimiento se ha observado que el UV-B solar reduce el crecimiento de ciertas especies en condiciones naturales (Tabla 2 en la Introducción General). En términos generales, el UV-B redujo el crecimiento de las herbáceas, y no afectó a las leñosas.

Durante los años 1997, 1998 y 1999 Rousseaux *et al.* (2001) estudiaron los efectos del UV-B solar sobre la fenología, morfología, crecimiento y herbivoría de algunas especies del arbustal, en el mismo sitio donde se realizaron los experimentos descritos en esta Tesis. Las especies estudiadas fueron: el helecho *Blechnum penna-marina*, el arbusto *Chiliodrion diffusum* y la hierba perenne *Gunnera magellanica*. El UV-B redujo la expansión foliar de *B. penna-marina* y *G. magellanica* (sin efecto sobre *C. diffusum*) (Rousseaux *et al.*, 2001), e indujo una disminución en los niveles de herbivoría sobre *G. magellanica* (Rousseaux *et al.*, 1998). No se detectaron efectos significativos sobre la fenología, los niveles de compuestos fotoprotectores, la biomasa foliar por unidad de área, ni la cobertura relativa de las especies estudiadas.

En relación a los efectos sobre el crecimiento de *G. magellanica*, la inhibición en el crecimiento foliar causada por el UV-B se detectó en forma consistente durante tres años consecutivos (1997, 1998 y 1999). Los registros se tomaron durante el mes de enero, y las mediciones se realizaron sobre hojas elegidas al azar dentro de cada parcela experimental. La

magnitud de la reducción en la expansión foliar fue de aproximadamente un 12 % (Rousseaux *et al.*, 2001). En el año 1996 se realizó otra medición durante el mes de octubre, pero siguiendo el crecimiento de hojas individuales marcadas. La inhibición en la expansión foliar detectada en esa oportunidad fue de aproximadamente un 23 % (Rousseaux *et al.*, 1998).

Durante los meses en que realizamos los experimentos a campo que se describen en las secciones siguientes, continuamos registrando el crecimiento de *G. magellanica* bajo ambientes lumínicos con diferente composición en el UV. Medimos la expansión foliar de hojas marcadas y la masa foliar específica. Nuestros registros abarcaron los meses de octubre, noviembre y diciembre de los años 1998, 1999 y 2001. Los objetivos de estas mediciones fueron: (a) ampliar los registros anteriores, incorporando mediciones en otros momentos del año; (b) evaluar los efectos no sólo de la atenuación del UV-B, sino también de la eliminación del UV-B y del UV-A; (c) tener mediciones contemporáneas a nuestros experimentos relacionados con el daño al ADN y su reparación (llevados a cabo durante la primavera de los años 1998 y 1999).

El UV-B ambiental redujo la expansión foliar de G. magellanica

Al integrar los registros de las tres estaciones de crecimiento en un análisis conjunto, se encontró un efecto significativo del tratamiento ($P < 0.001$), y las hojas que crecieron bajo UV ambiental tuvieron un crecimiento significativamente menor que las que crecieron bajo UV-B reducido o sin UV (Tabla 3).

En dos de los tres años analizados (1998 y 2001) el UV-B redujo claramente la expansión foliar de *G. magellanica* en un 20 y 25 % respectivamente (Fig. 11). La magnitud de esta inhibición fue similar a la detectada por (Rousseaux *et al.*, 1998) a principios de octubre de 1996, utilizando la misma estrategia de medición (seguimiento de hojas marcadas). La dirección del efecto fue la misma en el año 1999 (si bien no fue significativo al 10 %, como en los otros años), y la magnitud fue menor (aprox. un 16 % de reducción en la expansión foliar) (Fig. 11). El efecto de eliminar todo el UV (tratamiento -UV en la Fig. 11) no fué consistente en las distintas estaciones de crecimiento.

Tabla 3: Efecto del ambiente lumínico sobre la expansión foliar de *G. magellanica*, durante todas las estaciones de crecimiento, analizadas en conjunto. Debido a que cada período de medición abarcó distinto número de días, se utilizó el aumento del radio por día para el análisis, y se consideraron bloques distintos para cada temporada. Se indican el error estándar (EE) y el $P > F$ del efecto del tratamiento derivados del ANOVA. Los valores son medias, y las letras separan medias diferentes significativamente según post-test de Duncan.

Tratamiento	Aumento del radio por día (mm día ⁻¹)	EE	$P > F$
UV ambiental	0.22 a	0.009	0.0007
UV-B reducido	0.28 b		
-UV	0.26 b		

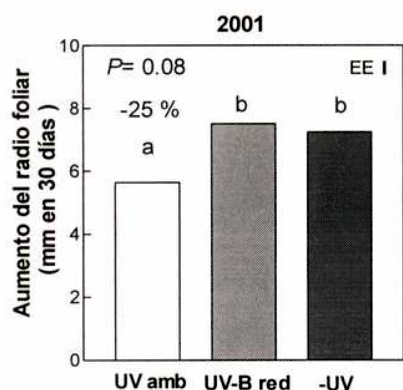
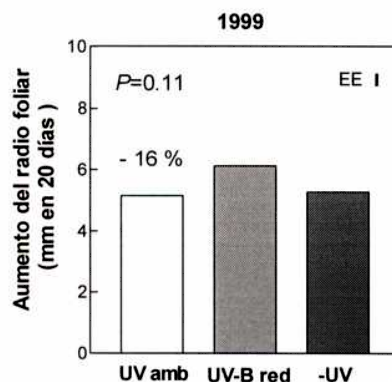
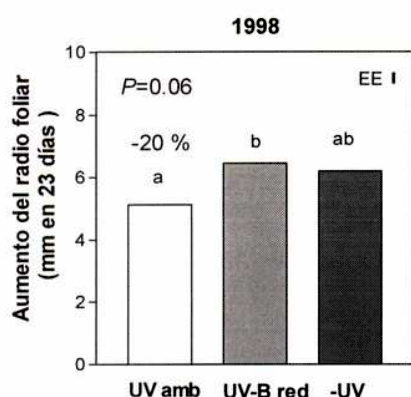


Figura 11: Expansión foliar de *G. magellanica* bajo UV ambiental (UV amb), UV-B reducido (UV-B red) y sin UV (-UV), registrada durante tres estaciones de crecimiento: 1998, 1999 y 2001. Los valores de $P > F$ del efecto del tratamiento evaluado con el ANOVA están indicados en cada gráfico, así como el error estándar (EE) derivado del análisis considerando los bloques. Los porcentajes indican la reducción en el crecimiento registrado bajo UV ambiental respecto del tratamiento de UV-B reducido. Los tamaños de las hojas marcadas al comienzo de las mediciones no difirieron entre tratamientos (1998: $P = 0.25$; 1999: $P = 0.60$; 2001: $P = 0.48$, ANOVA, datos no mostrados). Letras distintas indican medias significativamente diferentes según post-test de Duncan.

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que las longitudes de onda que más afectan la expansión foliar en *G. magellanica* son las correspondientes al UV-B.

Durante los años 1998 y 1999 registramos, además de la expansión foliar, la masa foliar específica, como estimador del grosor de la hoja. En ninguna de las fechas analizadas, se encontraron diferencias entre tratamientos (Tabla 4), lo que concuerda con resultados anteriores (Rousseaux *et al.*, 2001). El hecho que los cambios en área foliar no hayan ido acompañados de cambios en el grosor de las hojas, indica que el UV-B solar redujo efectivamente biomasa foliar.

Tabla 4: Masa foliar específica (MFE) de hojas de *G. magellanica* que crecieron bajo UV ambiental (UV amb), UV-B reducido (UV-B red) y sin UV (-UV). Los registros corresponden a los mismos períodos en que se midió la expansión foliar, en los años 1998 y 1999. Los valores en las columnas indican las medias bajo cada tratamiento. Se indican los valores de error estándar (EE) y $P > F$ utilizados para evaluar el efecto del tratamiento en los ANOVAs, que se realizaron teniendo en cuenta los bloques (n). 1998: $n = 3$; 1999: $n = 5$.

Día juliano	Año	MFE (mg cm ⁻²)			EE	P > F
		UV amb	UV-B red	-UV		
318	1998	2.69	2.57	2.71	0.093	0.56
338	1998	2.39	2.39	2.61	0.082	0.20
315	1999	3.00	2.62	2.79	0.140	0.22

La expansión foliar varió en función de la dosis de UV-B recibida por las plantas

Analizamos nuestros registros de crecimiento de *G. magellanica* durante las tres estaciones de crecimiento, junto con los datos de Rousseaux *et al.* (1998) tomados a principios de octubre de 1996 (en la Fig. 12 se muestran los niveles de UV-B y temperaturas promedio pertenecientes a los períodos de medición). Encontramos una correlación

significativa entre el crecimiento y la dosis de UV-B diaria promedio recibida por las plantas debajo de los filtros (estimado a través de la transmitancia de los mismos a esta radiación). El crecimiento decreció a mayores dosis de UV-B (Fig. 13).

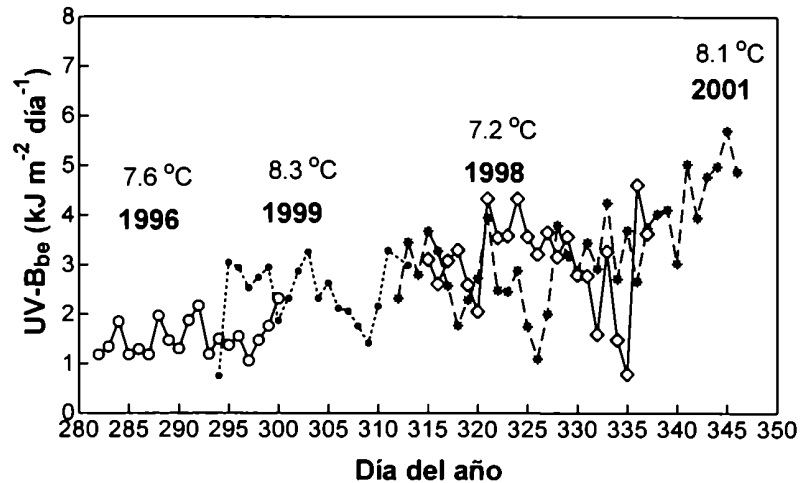


Figura 12: Dosis diarias de UV-B_{be} (datos de la Red de Monitoreo de UV de NSF) durante los distintos períodos en que se registró la expansión foliar de *G. magellanica*: 1996 (○), 1998 (◇), 1999 (●) y 2001 (•). Arriba de cada año está indicada la temperatura promedio del aire, registrada en cada período (datos de la estación meteorológica del CADIC).

Si bien se han realizado muchos estudios acerca de los efectos del UV-B sobre el crecimiento, tanto bajo radiación natural, como utilizando lámparas, existe menos información acerca de los efectos del UV-A. Cooley *et al.* (2001) estudiaron varias respuestas morfológicas de distintos ecotipos de *A. thaliana* a la suplementación del UV ambiental con UV-A y con UV-B + UV-A. Encontraron que el peso seco foliar se redujo en todos los casos por suplementación del UV-B, mientras que el aumento del UV-A indujo una reducción de biomasa foliar en algunos ecotipos, pero no en otros. El mismo resultado se observó en relación al área foliar. Los resultados obtenidos por el mismo grupo de trabajo en especies silvestres de una pradera templada (Cooley *et al.*, 2000), muestran que el efecto de suplementar la radiación solar con UV-A puede reducir el peso seco de hojas en algunas

especies, pero no en otras. Si bien estos experimentos indican una posible contribución del UV-A a la reducción del crecimiento foliar, se basan en suplementar la radiación ambiental, que ya contiene tanto UV-B como UV-A. (Krizek *et al.*, 1998) estudiaron los efectos del UV-A y el UV-B naturales sobre el crecimiento de lechuga, utilizando filtros de exclusión. Sus resultados demuestran que tanto el UV-B como el UV-A solares reducen el crecimiento en esta especie. En cambio (Tosserams *et al.*, 1996), también utilizando filtros de exclusión, no encontraron efecto ni del UV-B ni del UV-A ambientales sobre el crecimiento de cuatro especies nativas de un pastizal de Holanda.

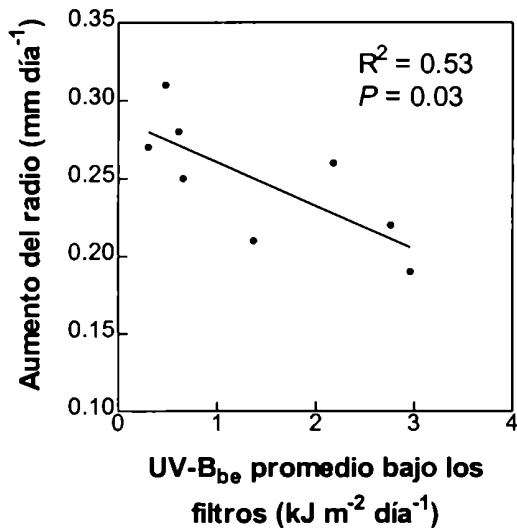


Figura 13: Crecimiento de *G. magellanica* en función de la dosis de UV-B_{b0} diaria promedio registrada durante los periodos que abarcaron las mediciones. Para estimar la radiación debajo de los filtros se modificaron los datos de UV-B_{b0} de la Red de Monitoreo de UV de NSF, por la transmitancia de los filtros agujereados. Los datos son medias, y se indican el valor de R² y la significancia de la regresión lineal.

Las causas de la inhibición del crecimiento inducido por el UV-B solar en plantas pueden ser múltiples, tal como se resumió en la Introducción General (pp. 4-6). Teniendo como base los efectos negativos del UV-B sobre el crecimiento en *G. magellanica* en condiciones naturales, en los capítulos siguientes profundizamos el estudio de los efectos de esta radiación (y del UV-A) sobre el daño al ADN, el estrés oxidativo, y la inducción de respuestas de protección, reparación y defensa frente a esta radiación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II

Respuestas de aclimatación a la radiación UV solar en

Gunnera magellanica

Uno de los antecedentes directos que motivaron los experimentos descritos en esta sección fue el descubrimiento que variaciones en el nivel de UV-B solar, asociados al pasaje del agujero de ozono sobre Tierra del Fuego, provocan variaciones concomitantes en el nivel de dímeros en el ADN de hojas *G. magellanica* (Rousseaux *et al.*, 1999 y Fig. 4 de la Introducción General). En el citado trabajo se realizaron muestreos en distintos días contrastantes en niveles de ozono (y de UV-B a nivel del terreno) durante la primavera de 1997. Los niveles de CPDs detectados en las hojas de *G. magellanica* correlacionaron positiva y linealmente con la dosis de UV-B recibida por las plantas durante las horas de la mañana, previas al muestreo.

Tal como se detalla en la Introducción General (pp. 6-9), si bien el UV-B induce la formación de CPDs en plantas, también puede modular tanto la capacidad de protección foliar (a través, por ejemplo, de la estimulación de la vía de los fenilpropanoides) como la capacidad de fotorreparar los CPDs (mediante el aumento en la transcripción y/o actividad de la fotoliasa) (Pang & Hays, 1991; Ries *et al.*, 2000). La relación lineal observada entre la dosis de UV-B y los niveles de CPDs en *G. magellanica* estaría indicando al menos dos situaciones posibles: (a) que el UV-B no interviene en la regulación de la reparación de CPDs en esta especie ó (b) que el UV-B regula positivamente este proceso en *G. magellanica*, pero que ya sea por características propias de la especie o por las condiciones ambientales (niveles de radiación, temperatura, etc) la velocidad de reparación de CPDs no es lo suficientemente rápida como para evitar la acumulación del daño.

El UV-B no es el único grupo de longitudes de onda capaces de modular la transcripción y la actividad de la fotoliasa, sino que también se ha demostrado la participación longitudes de onda del rojo (Langer & Wellmann, 1990; Buchholz *et al.*, 1995), azul /UV-A (Hada *et al.*, 1999), y luz visible (Ahmad *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 1998).

Teniendo en cuenta los efectos negativos de niveles actuales de UV-B solar sobre el crecimiento (Fig. 11 de la sección anterior), e intensidad del daño al ADN en *G. magellanica* (Fig. 4 de la Introducción General), nos preguntamos si, además de los efectos nocivos, tanto el UV-B como el UV-A modulan respuestas de protección y reparación del ADN en esta especie. Para contestar esta pregunta, analizamos los niveles de fotoprotección foliar y la capacidad de reparar los CPDs en hojas de *G. magellanica* que crecieron en su ambiente natural bajo distintos tratamientos: UV ambiental, UV-B reducido y -UV. Los niveles de compuestos fotoprotectores los medimos mediante dos técnicas diferentes: extracción metanólica y medición de la

fluorescencia de la clorofila. La capacidad de reparación del ADN la evaluamos siguiendo la cinética de desaparición de CPDs *in vivo*, a dos temperaturas contrastantes (8 y 25 °C), que se eligieron sobre la base de los rangos de temperaturas registrados en el sitio experimental durante la primavera. Finalmente, comparamos la velocidad de reparación de CPDs de *G. magellanica* en relación a las velocidades observadas en otras especies más ampliamente estudiadas. Para ello utilizamos la planta-modelo *A. thaliana*, y realizamos experimentos con ambas especies en idénticas condiciones experimentales.

Características microclimáticas del sitio de estudio

Con el propósito de generar un marco de referencia para nuestros experimentos controlados analizamos los registros de temperatura y UV-B de la zona sur de Tierra del Fuego. Los registros de temperaturas del período 1998-2000 de la estación meteorológica del CADIC (situado en la ciudad de Ushuaia, aproximadamente 20 km al este del Parque Nacional Tierra del Fuego), permiten destacar dos características importantes de la zona: (1) una alta fluctuación entre días consecutivos, que refleja la meteorología inestable de la isla, y (2) una baja estacionalidad en el patrón de temperaturas (Fig.14). La temperatura media mensual aumenta sólo 2 °C de octubre a diciembre (de 6 a 8 °C). Esto contrasta con el patrón observado en localidades ubicadas más al norte, aún en aquellas bajo la influencia moderadora del océano Atlántico. Por ejemplo, en Buenos Aires (34 °S), la temperatura media mensual es 6 °C más alta en diciembre que en octubre (FAO, 1985). Cuando las temperaturas medias diarias se combinan con los datos de UV-B, es claramente observable que condiciones de alto UV-B, asociadas a la disminución de ozono, pueden ocurrir en coincidencia con bajas temperaturas (menores de 10 °C) durante la primavera (Octubre a Diciembre) (Fig.14).

En el momento de considerar la influencia de la temperatura sobre los procesos enzimáticos de reparación de daños causados por UV-B, las temperaturas máximas diurnas podrían ser más relevantes que las temperaturas medias diarias. Por lo tanto analizamos el patrón de temperaturas máximas (registradas por la estación meteorológica) en relación a las dosis de UV-B. Encontramos que el 82 % de los días con una dosis de $UV-B_{bc} > 4kJ\ m^{-2}\ día^{-1}$ tuvieron

temperaturas máximas inferiores o iguales a 15 °C, y un 18 % de estos días con alto UV tuvieron temperaturas máximas inferiores o iguales a 8 °C. Las temperaturas máximas registradas durante este período nunca excedieron los 20 °C.

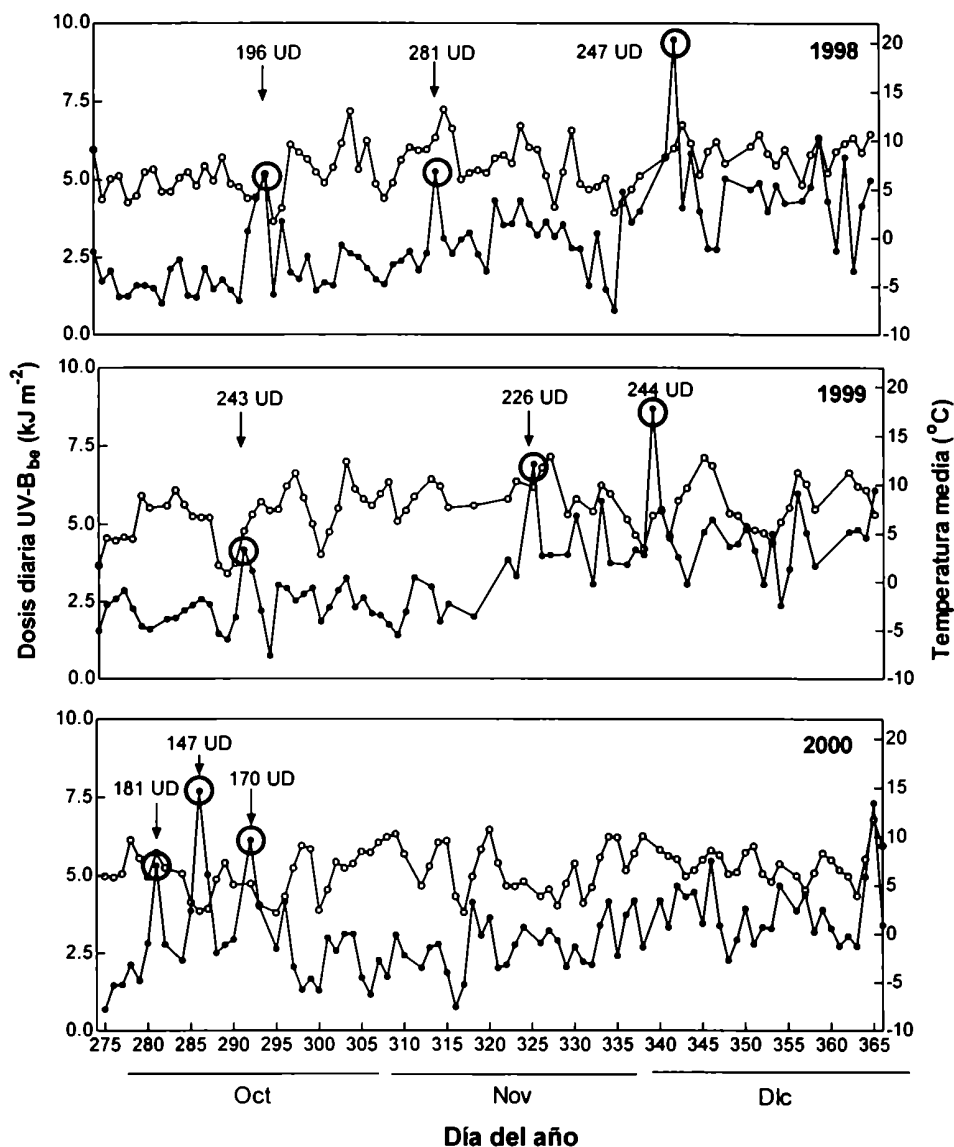


Figura 14: Temperaturas medias diarias (○) (datos de la estación meteorológica del CADIC), y dosis diarias de UV-B_{bc} sobre Ushuaia (datos de la red de monitoreo de UV de NSF) (●), registradas durante los meses de octubre a diciembre de 1998, 1999 y 2000. En cada gráfico se indican los días de alto UV-B_{bc} asociados con el pasaje del agujero de ozono, y los niveles de ozono correspondientes en UD. UD = Unidad Dobson
1 UD = 2.7 x 10¹⁶ moléculas de ozono cm⁻².

Si bien no poseemos registros de la temperatura en el sitio de estudio tan extensos como los de la estación meteorológica, realizamos mediciones a nivel del canopeo de *G. magellanica* durante un período representativo de la época del año en que realizamos nuestros experimentos (noviembre y diciembre). La temperatura a nivel del canopeo de *G. magellanica* fue normalmente mayor que en el abrigo meteorológico. Las temperaturas máximas durante días soleados fueron, en promedio, 8 °C más altas a nivel del canopeo que en la estación meteorológica. Esta diferencia fue mucho menos pronunciada en días nublados. En consecuencia, se registraron con frecuencia temperaturas mayores a 20 °C a nivel del canopeo de *G. magellanica* durante los mediodías en la primavera (aproximadamente 1 de 3 días entre noviembre y diciembre). El hecho que las temperaturas registradas en las parcelas experimentales fueran mayores a los datos meteorológicos durante días soleados puede explicarse por varios factores. Las parcelas estaban ubicadas en una ladera orientada al norte, de manera que recibían luz solar directa durante la mayor parte del fotoperíodo. Los parches con *G. magellanica* (altura del canopeo menor a 20 cm) estaban rodeados por arbustos de aproximadamente 60 cm de altura, lo que aumenta la capa límite, limitando la transferencia de calor entre el estrato herbáceo y el aire más frío por arriba del estrato arbustivo.

Efectos del UV-B y UV-A solares sobre los niveles de compuestos fotoprotectores foliares en G. magellanica

Trabajos en plantas-modelo como *A. thaliana*, y varias especies cultivadas y nativas de regiones templadas, han demostrado que uno de las respuestas más comunes al UV-B es el aumento de los niveles de compuestos derivados de los fenilpropanoides, que absorben en el UV. En nuestros experimentos con *G. magellanica*, no detectamos esta respuesta en base al área foliar ($P = 0.50$, datos no mostrados) o el peso seco ($P = 0.63$, Tabla 5). Este resultado coincide con lo encontrado por Rousseaux *et al.* (1998, 2001). Tampoco pudimos detectar ningún efecto del UV-A (Tabla 5), lo que sugiere que el UV no regula la acumulación de compuestos fotoprotectores en esta especie. Debido a que la absorbancia a 305 nm de extractos metanólicos de hojas es una estimación muy general de la protección frente al UV-B, que no tiene en cuenta la distribución

espacial de los compuestos filtrantes en la hoja, utilizamos la medición de la fluorescencia de la clorofila para obtener una información más detallada de la penetración del UV-B en el parénquima fotosintético (Mazza *et al.*, 2000). Los tratamientos de atenuación del UV no afectaron la intensidad de la fluorescencia de la clorofila inducida por luz azul (RF_b; $P = 0.16$, datos no mostrados), indicando que los niveles de clorofila o el estado de los fotosistemas, no difirieron entre tratamientos. Por lo tanto, la intensidad de la fluorescencia de la clorofila excitada por UV-B (RF_{uvb}) pudo utilizarse para estimar la transmitancia epidérmica al UV-B. No detectamos ningún efecto ni del UV-B ni del UV-A en la transmitancia epidérmica de la superficie adaxial de las hojas ($P = 0.74$, Tabla 5), que está directamente expuesta a la radiación solar. Barnes *et al.* (2000), usando el mismo análisis, encontraron que el UV-B solar parecía aumentar la transmitancia epidérmica al UV-B en *G. magellanica* (en lugar de disminuirla). Ellos concluyeron que este aumento aparente en la transmitancia epidérmica al UV era el resultado de una reducción en la intensidad de la fluorescencia de la clorofila inducida por el azul, debido a la acumulación de antocianinas en hojas del tratamiento con UV-B. Estos resultados sugieren que *G. magellanica*, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de las especies estudiadas de origen templado y tropical (Searles *et al.*, 2001a), tiene una baja transmitancia epidérmica al UV en forma constitutiva (Barnes *et al.*, 2000; Ballaré *et al.*, 2001), y no reacciona a la exposición solar acumulando compuestos fenólicos en la epidermis foliar.

Tabla 5: Niveles de compuestos que absorben UV en hojas de *G. magellanica* que crecieron bajo distintos tratamientos de atenuación de UV. Los niveles de flavonoides solubles en metanol acidificado se expresaron como la Absorbancia a 305 nm del extracto (A₃₀₅), por mg de peso seco del material vegetal. La transmitancia epidérmica al UV-B se estimó mediante la medición del parámetro RF_{uvb} (altos niveles de RF_{uvb} indican una mayor transmitancia epidérmica al UV-B). UL= Unidades arbitrarias de luminosidad. EE: error estándar del ANOVA ($n = 7$ bloques).

Tratamiento	A ₃₀₅ mg ⁻¹	RF _{uvb} (UL)
UV ambiental	11.70	355
UV-B reducido	12.02	318
-UV	11.80	324
EE	0.11	23.35
Efecto del tratamiento, $P > F$	0.63	0.74

Regulación ambiental de la reparación de CPDs

Para estudiar el impacto de la atenuación del UV solar en la reparación de CPDs en *G. magellanica*, recolectamos hojas de las parcelas experimentales y las sometimos a condiciones de luz estandarizadas (UV-A + visible u oscuridad) y temperatura (8 o 25 °C) para evaluar la reparación de CPDs.

A 25 °C, bajo UV-A + luz visible, las hojas que crecieron bajo los distintos ambientes lumínicos en el campo presentaron diferentes cinéticas de reparación de CPDs (Fig. 15 A, símbolos abiertos). La cantidad de CPDs removidos luego de 2 h puede ordenarse de mayor a menor, según el grado de fotorreparación observada: UV ambiental > UV-B reducido > -UV. El contenido de CPDs se mantuvo constante cuando las hojas se dejaron en oscuridad durante 2 h (Fig. 15 A, símbolos cerrados). Estos resultados indican que la fotorreparación es el mecanismo principal de reparación de CPDs en *G. magellanica*.

No se detectó reparación de CPDs a 8 °C bajo ninguna de las condiciones ensayadas (luz u oscuridad) (Fig. 15 B).

Hay relativamente poca información acerca de los efectos de la temperatura sobre la velocidad de fotorreparación en plantas superiores, y ninguno de los estudios realizados se han llevado a cabo a campo. En plantas de *A. thaliana* cultivadas en cámaras, la fotorreparación de CPDs *in vivo* fué mayor a 22 °C que a 37 °C (Pang & Hays, 1991). Cotiledones etiolados de plántulas de pepino presentaron los mayores niveles de fotorreparación alrededor de los 25-30 °C, disminuyendo tanto a temperaturas menores (15-20 °C) como mayores (30 °C) (Takeuchi *et al.*, 1996). En células de tabaco, se mantuvo una alta remoción de CPDs a 25 y 12 °C, mientras que no se observó reparación a 0 °C (Li *et al.*, 2002). Nuestros experimentos revelaron que los procesos de fotorreparación de CPDs en *G. magellanica* tienen una marcada dependencia de la temperatura, que podría ser ecológicamente relevante. Como se discutió más arriba, la combinación de días con baja temperatura y alto UV-B es un fenómeno bastante común durante la primera mitad de la estación de crecimiento (octubre a diciembre), particularmente cuando el sitio está bajo la influencia directa del agujero de ozono antártico. Bajo tales condiciones, una capacidad limitada de reparar CPDs podría resultar en una rápida acumulación de lesiones en el ADN en los tejidos de *G. magellanica*.

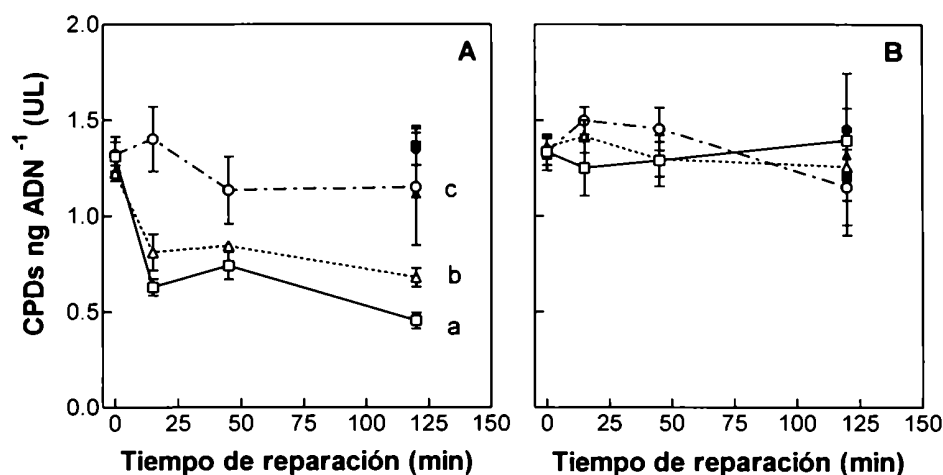


Figura 15: Reparación de CPDs en el tiempo, en hojas de *G. magellanica* recolectadas de plantas que crecieron en el campo bajo UV ambiental (□, ■), UV-B reducido (▲, △) y -UV (○, ●), e incubadas a distintas temperaturas (A: 25 °C, B: 8 °C) y condiciones de irradiación (símbolos abiertos: luz blanca + UV-A, símbolos cerrados: oscuridad). El ANOVA con MR indicó una interacción significativa del tratamiento con el tiempo ($P < 0.0001$) a 25 °C, y falta de efecto del tiempo ($P = 0.26$) y del tratamiento ($P = 0.96$) a 8 °C. En ambos experimentos, el contenido inicial de CPDs no difirió entre tratamientos ($P = 0.45$ a 25 °C, $P = 0.44$ a 8 °C). En A, las letras indican diferencias significativas en el número de CPDs reparados luego de 2 h bajo luz blanca + UV-A ($P < 0.05$), según post-test de Duncan. Si bien los análisis estadísticos se realizaron teniendo en cuenta el diseño experimental en bloques ($n = 3$), como el efecto de los mismos no fue significativo, las barras de error estándar provienen de la dispersión entre bloques (por ser más ilustrativa) y no del análisis estadístico. UL: Unidades arbitrarias de luminosidad.

En relación a la regulación de la capacidad de fotorreparación por luz, nuestros resultados indican que la exposición al UV solar aumentó la habilidad de las células de hojas de *G. magellanica* de fotorreparar CPDs a temperaturas óptimas (25 °C, Fig. 15 A). Atenuar el componente UV-B (que disminuye el flujo fotónico global solar en menos de un 0.6 %) redujo de manera significativa la capacidad de reparar CPDs (Fig. 15 A). Estos resultados sugieren que la regulación de la actividad foliar en *G. magellanica* es influenciada por las longitudes de onda

más cortas del espectro solar. En este aspecto, la fotorregulación de la capacidad fotorreparativa en *G. magellanica* contrasta con la regulación de los compuestos fotoprotectores solubles, que no son afectados por el UV solar en esta especie (Rousseaux *et al.*, 2001; Tabla 5).

Si bien no se dispone de información acerca de lo que ocurre en plantas terrestres, parece haber una variación en la capacidad de reparar el ADN entre especies animales que viven en ambientes con distintos niveles de UV (Van de Mortel *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000). Aún bajo condiciones óptimas, la velocidad de reparación de CPDs en *G. magellanica* es baja al compararla con las cinéticas publicadas de otras especies (Pang & Hays, 1991; Quaitte *et al.*, 1994; Sutherland *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1996; Takeuchi *et al.*, 1996), sobre todo cuando se consideran plantas que crecieron en el campo (Takanayagi *et al.*, 1994; Kang *et al.*, 1998). Para obtener una comparación válida bajo condiciones ambientales equivalentes, llevamos a cabo experimentos con hojas de *G. magellanica* y de *A. thaliana*. Los resultados muestran que la reparación de CPDs en *Arabidopsis* es mayor que en *G. magellanica*, tanto en luz como en oscuridad (Fig. 16).

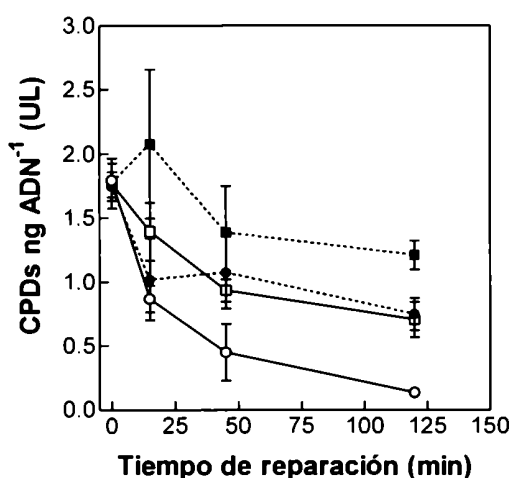


Figura 16: Reparación de CPDs en el tiempo, en hojas de *G. magellanica* (□, ■) y *A. thaliana* (○, ●), de plantas cultivadas en invernáculo en Buenos Aires, e incubadas a 25 °C bajo luz blanca + UV-A (símbolos abiertos) u oscuridad (símbolos cerrados). El ANOVA con MR indicó una interacción significativa de los dos tratamientos de reparación, luz u oscuridad ($P = 0.05$) y del tiempo con la especie ($P = 0.01$). El contenido de CPDs al comienzo del experimento de reparación no difirió entre especies ($P = 0.91$, test *t*). Luego de 2 h de incubación, *A. thaliana* reparó más CPDs que *G. magellanica*, tanto en luz como en oscuridad ($P < 0.05$). Los datos son medias \pm error estándar, $n = 5$.

Conclusiones

Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren que el UV solar (tanto el UV-B como el UV-A) puede aumentar la capacidad de fotorreparación de CPDs en *G. magellanica* (Fig. 15 A). La baja velocidad de reparación que se observa a bajas temperaturas (Fig. 15 B), frecuentes durante la estación de crecimiento, y aún a temperaturas mayores (Fig. 16), probablemente sea una de las razones por las cuales la cantidad de CPDs en hojas de *G. magellanica* correlaciona positivamente con los niveles de UV-B previos al momento de muestreo (Fig. 4 de la Introducción General). Este hecho, conjuntamente con la falta de inducción de respuestas de protección (Tabla 5), sugieren que incrementos en el UV-B solar (debido a la reducción del ozono) producirían mayormente efectos nocivos en *G. magellanica*, sin la inducción concomitante de mecanismos de protección. Sería interesante investigar si una baja capacidad de reparación del ADN es una característica general de especies que evolucionaron en latitudes altas, con bajos niveles de UV-B solar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III

Dinámica diaria del contenido de CPDs en hojas de *Gunnera magellanica*: balance entre generación y reparación del daño

La formación de CPDs por acción del UV-B ambiental ha sido claramente demostrada (Rousseaux *et al.*, 1999; Mazza *et al.*, 1999; Mazza *et al.*, 2000; Ballaré *et al.*, 1996), sin embargo la participación del UV-A no ha sido totalmente establecida. Quaité *et al.*, (1992) demostraron que en plántulas de alfalfa el UV-A puede generar CPDs. Si bien las longitudes de onda correspondientes al UV-A son menos eficientes que las del UV-B en producir dímeros de pirimidina, el UV-A representa una proporción de la irradiancia solar que llega a la superficie terrestre mucho mayor que el UV-B. Por lo tanto, el efecto del UV-A podría ser relevante en condiciones naturales. En el caso de *G. magellanica*, las funciones de ponderación que mejor explicaron el daño al ADN producido por la radiación solar en plantas creciendo en el campo fueron aquellas basadas en espectros de acción en los cuales la eficiencia cuántica del UV-A es órdenes de magnitud inferior a la del UV-B (Rousseaux *et al.*, 1999). Además, la eliminación del UV-A mediante filtros, no redujo los niveles de CPDs respecto de las plantas que crecieron bajo UV-B reducido (con UV-A). Esto parece sugerir una baja participación del UV-A en la inducción de CPDs en esta especie, en condiciones naturales.

Hay sólo dos trabajos publicados en los que se ha estudiado la dinámica diaria del contenido de CPDs en plantas terrestres bajo radiación natural. Stapleton *et al.*, (1997) encontraron que en maíz, la densidad de CPDs tendía a aumentar hacia el atardecer. Sin embargo, las diferencias en el contenido de CPDs entre muestras tomadas en distintos momentos del día eran pequeñas y sólo marginalmente significativas. Hidema *et al.*, (1999) detectaron que los niveles de CPDs en plantas de arroz cultivadas bajo radiación natural no fluctuaban durante el día, ni se acumulaban, sino que se mantenían dentro de ciertos límites. Estos resultados contrastan con las observaciones en otros organismos como bacterioplancton marino (Jeffrey *et al.*, 1996), larvas y huevos de anchoa (Vetter *et al.*, 1999), y el musgo *Saniona uncinata* (Lud *et al.*, 2002), en los cuales hubo una marcada fluctuación diaria del daño al ADN, acompañando la fluctuación en radiación.

Los factores ambientales que afectan el balance entre la generación y reparación de los CPDs cambian en conjunto a lo largo del día. La temperatura del aire aumenta desde la mañana hacia el mediodía, manteniendo los valores máximos durante las 2-3 primeras horas de la tarde, y luego disminuyendo hacia la noche (Fig. 17). Los niveles de UV-B, UV-A y radiación visible siguen un perfil similar, alcanzando los valores máximos durante el mediodía local, y disminuyendo hacia el atardecer (Fig. 18 A, B, C). De esta manera, el factor ambiental que

induce la formación de CPDs (UV-B) frecuentemente va acompañado de factores que promueven la fotorreparación de los mismos (UV-A, radiación visible, temperatura). El nivel de daño en el ADN en plantas a lo largo de un día, es el reflejo de un balance entre factores que promueven el daño, y factores que inducen mecanismos de protección y reparación.

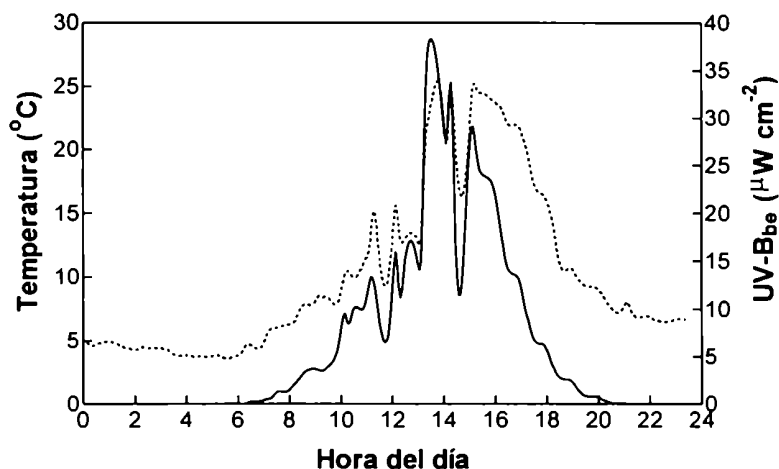


Figura 17: Ejemplo del perfil diario de la irradiación instantánea de UV-B_{be} (línea llena) y de la temperatura del aire (línea punteada), registrados en las parcelas experimentales durante la primavera. Mediodía local: 13:30 hs.

Basados en estos antecedentes, investigamos la dinámica diaria del contenido de CPDs en plantas de *G. magellanica* creciendo bajo distintos ambientes lumínicos en Tierra del Fuego. Para ello medimos los niveles de CPDs y de compuestos fotoprotectores a lo largo de dos días consecutivos en tres fechas diferentes, en plantas que crecieron bajo tres tratamientos de atenuación de UV en el campo: UV ambiental, UV-B reducido y -UV.

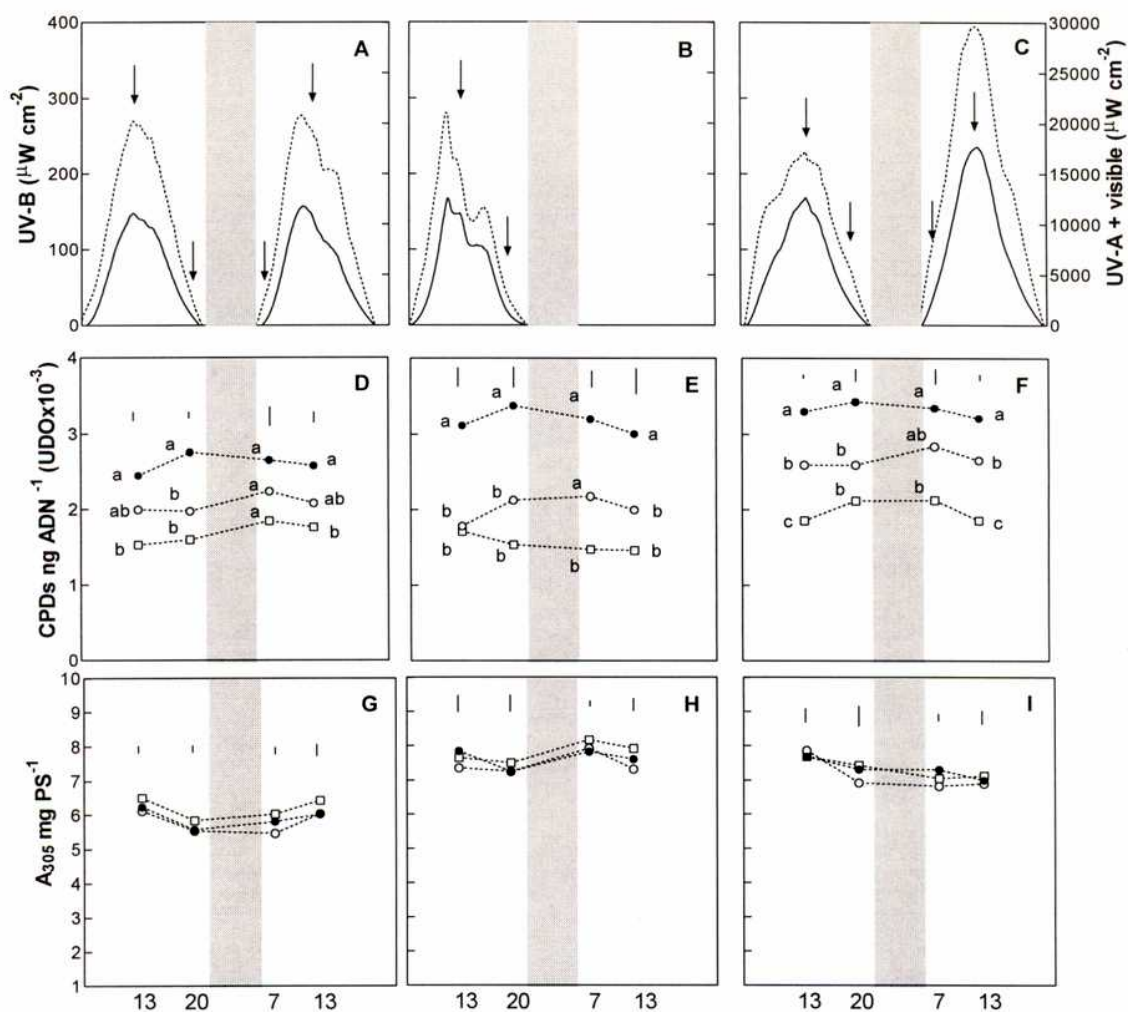


Figura 2: Dinámica diaria de la irradiancia de UV-B (línea llena) y UV-A + visible (línea punteada) correspondientes a los días de muestreo (A, B, C); del contenido de CPDs (D, E, F); y de los niveles de compuestos fotoprotectores (G, H, I) en hojas de *G. magellanica* que se desarrollaron bajo UV ambiental (●), UV-B reducido (○) y -UV (□). Los datos corresponden a los muestreos realizados a lo largo de tres pares de días consecutivos (de izquierda a derecha: 13 y 14 de noviembre, 4 y 5 de diciembre, 9 y 10 de diciembre de 1998). La zona sombreada indica la noche. Las flechas en los perfiles de radiación señalan los horarios en que se tomaron las muestras: a las 13, 20 y 7 hs. En relación al contenido de CPDs, el análisis conjunto de todas las fechas indicó un claro efecto del ambiente lumínico ($P = 0.013$, ANOVA con MR). El análisis de cada horario de muestreo por separado permitió la separación de medias significativamente distintas, indicadas por letras diferentes, según post-test de Duncan. Los niveles de compuestos fotoprotectores [medidos como Absorbancia a 305 nm (A_{305}) de un extracto metanólico por peso seco de material vegetal] no fueron afectados por el ambiente lumínico ($P = 0.21$, ANOVA con MR). UDO: unidades de densidad óptica. PS: peso seco. Los datos son medias, las líneas indican los errores estándar derivados de cada ANOVA teniendo en cuenta el diseño en bloques, $n=3$.

El UV-B solar tuvo mayor incidencia en la inducción de CPDs que el UV-A

El análisis conjunto del contenido de CPDs a lo largo de los seis días analizados, indicó un claro efecto del ambiente lumínico, bajo el cual crecieron las plantas, sobre el estado estacionario de los niveles de CPDs ($P = 0.01$, ANOVA con MR) (Fig. 18 D, E, F). El análisis detallado en cada horario de muestreo indicó que en 7 de 12 muestreos la atenuación del UV-B redujo significativamente el contenido de CPDs respecto de los niveles de plantas que crecieron bajo UV ambiental (control). La eliminación de todo el UV (UV-B y UV-A) redujo significativamente el daño al ADN respecto del control en 11 de los 12 muestreos analizados. Sin embargo, solo se pudieron detectar diferencias significativas entre el tratamiento de UV-B reducido y -UV en 3 de los 12 muestreos. Esto indica que el UV solar de onda corta tiene mayor incidencia en la formación de CPDs en esta especie que el UV de onda larga. Estos resultados confirman los obtenidos en distintas fechas de muestreo (realizados solamente al mediodía) durante el año 1997.

Es importante notar que las plantas que crecieron sin UV presentaron niveles detectables de CPDs. Para evaluar si estos dímeros se generaron en el ambiente lumínico en el que crecieron las hojas o simplemente fueron señales inespecíficas detectadas por el anticuerpo, medimos también los CPDs en hojas que se desarrollaron en completa oscuridad. Sorprendentemente se detectaron CPDs en estas hojas, si bien los niveles fueron menores que en hojas que crecieron sin UV (Tabla 6). No sabemos cuál puede ser el origen de estos dímeros, ya que los CPDs solo se forman por absorción de UV, situación inexistente en el caso de las hojas que se desarrollaron en completa oscuridad. Por lo tanto es altamente probable que la señal detectada en las plantas etioladas sea inespecífica, debido a una reacción cruzada del anticuerpo con algún componente arrastrado en la purificación del ADN. El hecho que los niveles de CPDs en hojas que crecieron sin UV sean mayores que los que se detectaron en hojas etioladas (Tabla 6), sugiere que su origen se halla en el ambiente lumínico del tratamiento sin UV. Esto podría deberse al pasaje de la radiación UV por los costados de los filtros durante el amanecer o el atardecer (momentos del día en que los rayos solares caen oblicuos a las parcelas experimentales). Es improbable que la radiación de longitudes de onda > 400 nm (transmitida por los filtros) haya causado los dímeros, pues, como se ha comprobado a través de espectros de acción realizados tanto en tejidos

vegetales [cotiledones de alfalfa (Quaite *et al.*, 1992)] como en ADN en solución (Setlow, 1974) la eficiencia con que se forman CPDs por fotón se acerca a 0 para longitudes de onda > 370 nm.

Tabla 6: Niveles de CPDs en hojas que crecieron bajo los distintos ambientes lumínicos (UV ambiental, UV-B reducido, -UV) y en completa oscuridad (etioladas). Los datos corresponden a los días 4 y 5 de diciembre, fechas en las cuales se registraron los menores niveles de CPDs bajo el tratamiento -UV. Los datos de los ambientes con diferente composición en el UV representan el promedio del contenido de CPDs en los 4 horarios de muestreo, considerando los bloques como fuente de variación. Se indican el error estándar (EE) y el valor de $P > F$ derivados del ANOVA, $n = 3$.

Tratamiento	CPDs ng ADN ⁻¹ (UDO x 10 ⁻³)	EE	P > F
UV ambiental	3.17 a		
UV-B reducido	1.98 b	0.19	0.0005
-UV	1.54 b		
etioladas	0.69 c		

Los niveles de CPDs en hojas de G. magellanica mostraron un patrón inesperado de fluctuación diaria.

Al analizar los perfiles del contenido de CPDs en el tiempo en cada grupo de los tres pares de días consecutivos (Fig. 18 D, E, F), no se observó un patrón claro de fluctuación diaria (efecto del tiempo Fig. 18 D: $P = 0.56$, E: $P = 0.67$, F: $P = 0.07$, ANOVA con MR). Los niveles de CPDs no siguieron las fluctuaciones de radiación UV-B (Fig. 18 A, B, C), sino que por el contrario, los niveles de daño registrados al mediodía tendieron a ser menores que los registrados al atardecer y al amanecer, en todas las fechas de muestreo. Para verificar esta tendencia, decidimos unir los datos de los tres grupos de días consecutivos, y los analizamos teniendo en cuenta cada fecha de muestreo como fuente de variación (Fig. 19). De esta manera se hizo evidente una variación de CPDs en el tiempo ($P < 0.05$, ANOVA con MR). Esta variación estuvo dada por un aumento de los niveles de CPDs al atardecer respecto de lo registrado al mediodía bajo el tratamiento de UV

ambiental (UV ambiental $P < 0.05$, UV-B reducido: $P = 0.47$, -UV: $P = 0.40$, test t pareado mediodía vs atardecer), y por una tendencia a la disminución de los CPDs desde la mañana hacia el mediodía en el tratamiento con UV-B ambiental ($P = 0.14$, test t pareado mañana vs mediodía), que fué significativa en el ambiente con UV-B reducido ($P < 0.003$). Al comparar los niveles de CPDs a la tarde de un día con los niveles de CPDs a la mañana siguiente, no se observaron diferencias bajo ningún tratamiento (UV ambiental $P = 0.88$, UV-B reducido $P = 0.12$, -UV $P = 0.56$, test t pareado), indicando la ausencia de reparación nocturna.

Las diferencias en los niveles de CPDs registrados durante los distintos momentos del día y en los distintos ambientes, no pueden explicarse por cambios en los niveles de compuestos fotoprotectores foliares que absorben UV-B. Los mismos no fueron afectados por el ambiente lumínico en el cual crecieron las plantas (Fig. 18 G, H, I), tal como se había observado en mediciones anteriores en esta especie [Rousseaux *et al.*, (2001) y Tabla 5 de la sección anterior], ni presentaron un patrón consistente de fluctuación diaria.

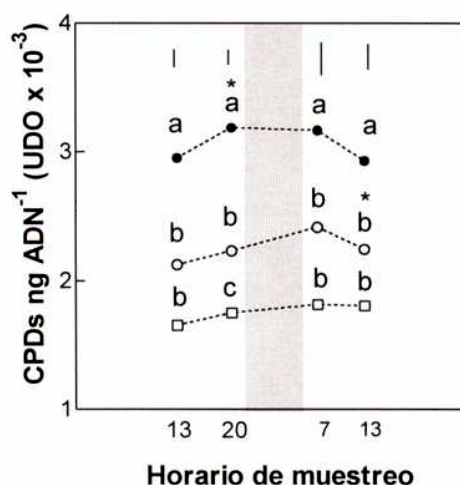


Figura 19: Patrón general del perfil diario del contenido de CPDs en hojas de *G. magellanica* que crecieron bajo distintos ambientes lumínicos: UV ambiental (●), UV-B reducido (○) y -UV (□). Los datos se agruparon teniendo en cuenta la fecha de muestreo como fuente de variación. Los perfiles de CPDs variaron en el tiempo (efecto tiempo en ANOVA con MR $P = 0.02$), y los niveles de CPDs difirieron según los tratamientos ($P = 0.004$) y la fecha de muestreo ($P = 0.06$). Esta fluctuación estuvo dada por una acumulación de CPDs a la tarde respecto de los registrados al mediodía ($P = 0.05$, test t pareado) bajo UV ambiental, y por una disminución de los mismos al mediodía respecto de los registrados al amanecer ($P = 0.003$, test t pareado) bajo UV-B reducido. Estas diferencias están indicadas por el asterisco. Los datos son medias, las líneas indican los errores estándar derivados de los ANOVAs realizados en cada horario de muestreo, teniendo en cuenta las fechas como fuente de variación, $n=3$. Las letras indican medias significativamente diferentes según post-test de Duncan.

Resultados previos en esta especie mostraron que los niveles de CPDs durante el mediodía de catorce fechas diferentes contrastantes en los niveles de ozono, correlacionaron positiva y linealmente con la dosis de radiación UV-B acumulada durante las horas de la mañana, previas al muestreo (Fig. 4 de la Introducción General). Por lo tanto esperábamos que a lo largo de un día los CPDs fluctuaran acompañando el perfil de UV-B. Sin embargo, la aparente discrepancia entre aquellos y estos resultados, puede explicarse por la variación, junto con el UV-B, de otros factores ambientales que participan en la fotorreparación de los dímeros. Durante el mediodía el UV-B alcanza el máximo de intensidad, y si bien esto produce mayor daño al ADN en *G. magellanica*, también estimula la capacidad reparadora en esta especie, tal como se demostró en los experimentos descritos en el capítulo anterior (Fig. 15 A de la sección anterior). A su vez el aumento de UV-B que ocurre al mediodía, va acompañado por aumentos de UV-A, radiación visible y temperatura, que aumentan la velocidad de fotorreparación. Al atardecer y al amanecer sucedería la situación inversa: los CPDs serían lentamente fotorreparados debido a la declinación en la luz y la temperatura. Por otro lado, los niveles de CPDs al comienzo del día son indicadores de la eficiencia de los procesos de reparación nocturnos, independientes de la luz. En el caso de *G. magellanica*, no se observó una disminución clara de los CPDs luego del transcurso de la noche. Esto sería consecuencia de la baja o nula reparación en oscuridad que presenta esta especie, en condiciones de bajas temperaturas como las que se registran en el campo experimental durante la noche, tal como se demostró en el capítulo anterior (Fig. 15 B de la sección anterior). Además de la regulación de la fotorreparación por factores ambientales, es posible que la actividad fotoliasa presente un ritmo de variación diaria. Takahashi *et al.*, (2002) encontraron que tanto la expresión del gen como la actividad de la fotoliasa de pepino siguen un ritmo circadiano, presentando un máximo de actividad durante el mediodía, que disminuye hacia la tarde.

Si se toman en cuenta todos los mediodías muestreados y se grafican en función de la dosis de UV-B acumulada durante la mañana, encontramos la misma relación funcional que la encontrada anteriormente (Fig. 4 de la Introducción General), y el 68 % de la variabilidad en los niveles de CPDs puede ser explicada por la cantidad de radiación UV-B que incidió bajo los filtros durante las horas de la mañana (Fig. 20).

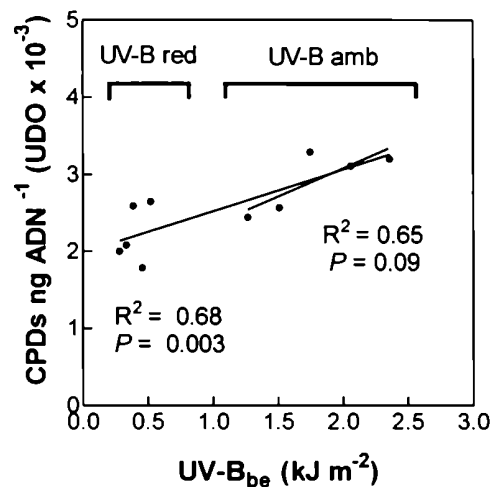


Figura 20: Contenido de CPDs en hojas que se desarrollaron bajo UV ambiental (UV-B amb) y bajo UV-B reducido (UV-B red), en función de la dosis de UV-B_{be} previa al momento del muestreo (13 hs). Las dosis de UV-B_{be} se calcularon en base a los datos de la Red de Monitoreo de UV de NSF, modificados por la transmitancia de los filtros agujereados. Los datos son medias. Se indican los valores de R² y la significancia de las regresiones lineales, realizadas sólo con los datos de UV-B ambiental, o considerando también los de UV-B reducido.

Los altos niveles de CPDs registrados al atardecer en las hojas que crecieron bajo UV ambiental resultaron inesperados. Si bien los factores ambientales que promueven la fotorreparación disminuyen hacia el final del fotoperíodo, también lo hace el UV-B. Por lo tanto, los CPDs detectados a la tarde deberían reflejar la dosis de UV-B que recibieron las plantas durante las horas anteriores. Los CPDs registrados al amanecer deberían estar ligados a los niveles de UV-B del día anterior, debido a la ausencia de reparación nocturna. La ruptura de esta conexión entre días estaría dada por lo que ocurre hacia el mediodía, momento en que la fotorreparación alcanzaría niveles máximos. Siguiendo esta idea, relacionamos los niveles de CPDs detectados en las distintas horas del día (tanto bajo UV ambiental como bajo UV-B reducido) con las dosis de UV-B_{be}, UV-A + visible, y la relación UV-B_{be}/UV-A + visible (debajo de los filtros) consideradas de la siguiente manera:

13 h : radiación correspondiente a las horas anteriores de ese mismo día

20 h: radiación correspondiente a las horas anteriores de ese mismo día

7 h: radiación correspondiente a las horas anteriores de ese mismo día + la radiación del día anterior.

Efectivamente, encontramos que el contenido de CPDs aumentó en función de la dosis de UV-B_{be} y de la relación UV-B_{be}/UV-A + visible (calculadas según lo indicado, Fig. 21), mientras que no varió en función del UV-A + visible ($R^2 = 0.07$, $P = 0.25$, regresión lineal).

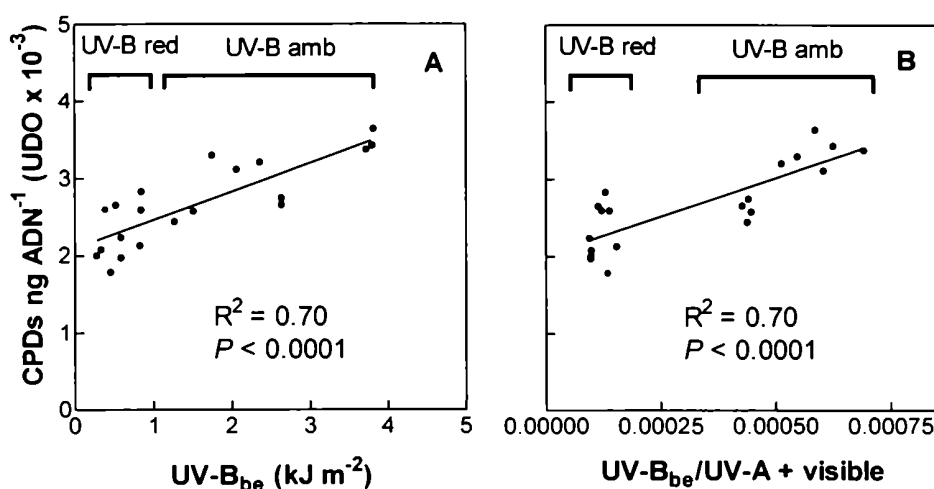


Figura 21: Contenido de CPDs en hojas que crecieron bajo UV-B ambiental (UV-B amb) y UV-B reducido (UV-B red), en función de las dosis de UV-B_{be} (A), y de la relación UV-B_{be}/UV-A + visible (B). Las dosis corresponden a la radiación acumulada durante las horas previas al momento de muestreo, según lo indicado en el texto. Los datos de radiación se obtuvieron de los registros de la red de monitoreo de UV de la NSF, y se modificaron por la transmitancia de los filtros agujereados. Los datos son medias; se indican los valores de R^2 y la significancia de las regresiones lineales.

Conclusiones

Tomados en conjunto, nuestros resultados demuestran que la radiación UV-B solar es la responsable de la formación de CPDs en *G. magellanica*, mientras que la radiación UV-A no parece tener una participación relevante en condiciones naturales. Sin embargo, los niveles de CPDs en hojas de esta especie no fluctúan a lo largo del día acompañando la fluctuación del UV-B, sino que son levemente menores al mediodía respecto de la mañana y la tarde (Fig. 19). Este patrón diario distinto del esperado, podría explicarse a través de la regulación de la fotoreparación por factores ambientales (radiación UV-A, visible y temperatura) que acompañan la fluctuación del UV-B, pero que en lugar de promover la formación de dímeros, favorecen su reparación. De manera que en los momentos del día en los que estos factores son altos (mediodía), los niveles de CPDs son relativamente bajos. Además, la ausencia de reparación nocturna trae como consecuencia el hecho que los niveles de CPDs con los que una planta “comienza” un día, están de alguna manera conectados a lo que ocurrió el día anterior. Esta relación entre días se rompería hacia el mediodía por un pico de actividad fotorreparativa. Futuros estudios de la expresión del gen y actividad de la fotoliasa de *G. magellanica* en distintos momentos del día, y en distintas fechas de muestreo, contribuirían a la comprensión de los patrones observados en nuestros experimentos.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV

**Inhibición del crecimiento de *Gunnera magellanica*
inducido por UV-B: participación del daño al ADN y del daño
oxidativo a lípidos de membrana**

Si bien uno de los efectos más consistentes del UV-B sobre las plantas es la reducción del crecimiento, las causas de esta inhibición no son claras. Se ha demostrado el UV-B puede reducir la fotosíntesis en varias especies, actuando tanto a nivel de las reacciones de fotofosforilación oxidativa en la membrana del tilacoide, como en el ciclo de Calvin y en la apertura estomática (Allen *et al.*, 1998). Pero muchos de los experimentos que llevaron a estas conclusiones, se realizaron sometiendo a hojas ya maduras a radiación UV-B, en lugar de hacerlo a lo largo de todo su desarrollo, para permitir su aclimatación al ambiente lumínico. En plantas aclimatadas a la radiación natural, la asimilación de CO₂ no se ve en general afectada por el UV-B (Ballaré *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 1998; Searles *et al.*, 2001a), y estudios detallados han demostrado que niveles ambientales o moderadamente elevados de UV-B no afectan la integridad del fotosistema II (PS II) en plantas creciendo a campo (Xiong & Day, 2001; Kolb *et al.*, 2001). En términos generales, los reportes de reducción del crecimiento y de cambios morfológicos son más frecuentes que los reportes de inhibición de la fotosíntesis (Caldwell & Flint, 1994), y en la mayor parte de los casos, la reducción en el área foliar inducida por UV-B no va acompañada de una reducción en la fotosíntesis por unidad de área, o de la asimilación neta de carbono (Naidu *et al.*, 1993, Ballaré *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 1998; González *et al.*, 1998, Nogués *et al.*, 1998).

La inhibición del crecimiento foliar podría ser el resultado de un efecto fotomorfológico, o bien ser una consecuencia del daño producido por el UV-B a estructuras celulares clave, con secuelas en procesos metabólicos. Entre los daños moleculares generados por el UV-B, que pueden tener efectos negativos sobre el crecimiento, se encuentran los dímeros de pirimidina que, al acumularse transitoriamente en el ADN, pueden impedir la replicación y transcripción del mismo, afectando la división celular y el metabolismo (Britt, 1999). Un indicio muy claro que el daño al ADN puede tener un impacto negativo en el crecimiento vegetal, está dado por el hecho que genotipos mutantes de *Arabidopsis* deficientes en mecanismos de reparación del ADN son más sensibles al UV-B que plantas salvajes (Jiang *et al.*, 1997; Landry *et al.*, 1997; Britt & Fiscus, 2003).

Otro tipo de daño molecular que puede estar implicado, es el daño oxidativo a lípidos de membrana producido por aumentos de especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por el UV-B (Kramer *et al.*, 1991; Takeuchi *et al.*, 1995; A.-H.-Mackerness *et al.*, 1998; Malanga *et al.*, 1999; Hideg *et al.*, 2003). Las ROS pueden extraer hidrógenos de grupos metileno (-CH₂-) de lípidos poli-insaturados de membrana, generando de esta manera radicales lipídicos. Los

radicales lipídicos pueden a su vez reaccionar con oxígeno molecular (O_2), formando radicales peroxilo. Los radicales peroxilo son especies altamente oxidantes, capaces de extraer hidrógenos de ácidos grasos adyacentes, generando así una reacción en cadena autocatalítica que se conoce con el nombre de “peroxidación lipídica”. El resultado final de estas reacciones es la ruptura de las cadenas lipídicas y la formación de aldehídos, con la consecuente pérdida de la integridad y funcionalidad de la membrana, e inactivación de proteínas y transportadores (Girotti, 1985). La secuencia de reacciones de peroxidación de lípidos puede detenerse por acción de moléculas antioxidantes como ácido ascórbico y α -tocoferol, que interceptan a los radicales lipídicos y peroxilo respectivamente.

El papel que juegan estos dos mecanismos de daño molecular (el daño al ADN y la peroxidación lipídica) en la reducción en el crecimiento inducida por UV-B en condiciones naturales no ha sido investigado hasta el presente. Se ha observado un aumento en los niveles de peroxidación de lípidos en plantas de pepino (Kramer *et al.*, 1991; Takeuchi *et al.*, 1995) y soja (Galatro *et al.*, 2001) expuestas a dosis altas de UV-B o a tratamientos desbalanceados en su composición espectral (por ejemplo, con alta relación UV-B:visible, que normalmente exageran los efectos del UV-B). Sin embargo, no se ha estudiado hasta el presente la generación de daño oxidativo a lípidos de membrana en plantas expuestas a dosis ambientales de UV-B. Debido a que las respuestas al UV-B son extremadamente sensibles a otras condiciones ambientales (particularmente a la radiación visible), existe un consenso general sobre las ventajas de realizar experimentos balanceados en su composición espectral para obtener conclusiones realistas.

Con el objetivo de dilucidar la participación de ambos daños moleculares en la reducción del crecimiento inducido por UV-B en *G. magellanica*, medimos en forma simultánea el crecimiento, el contenido de CPDs y de radicales lipídicos en plantas expuestas a un gradiente de dosis de UV-B en invernáculo. El rango de dosis se eligió sobre la base de los niveles de radiación UV-B registrados naturalmente en Tierra del Fuego durante la estación de crecimiento de esta especie. Los lípidos peroxidados se detectaron por resonancia paramagnética electrónica (EPR), la única técnica que permite detectar los radicales lipídicos en forma específica. También medimos los niveles de radical ascorbilo (A^\cdot) y el contenido de ácido ascórbico (AH^\cdot), y utilizamos la relación en el contenido de ambos (A^\cdot/AH^\cdot) como indicadora global de estrés oxidativo (Kozak *et al.*, 1997).

El UV-B redujo la expansión foliar de *G. magellanica*, e indujo una respuesta antioxidante temprana

Evaluamos el efecto de distintas dosis de UV-B (0, 2, 4 y 6.5 kJ m⁻² día⁻¹) sobre la expansión foliar de *G. magellanica*, midiendo dos cohortes de hojas (llamadas 1 y 2) que abarcaron la primera y la segunda mitad del experimento respectivamente (Fig. 22).

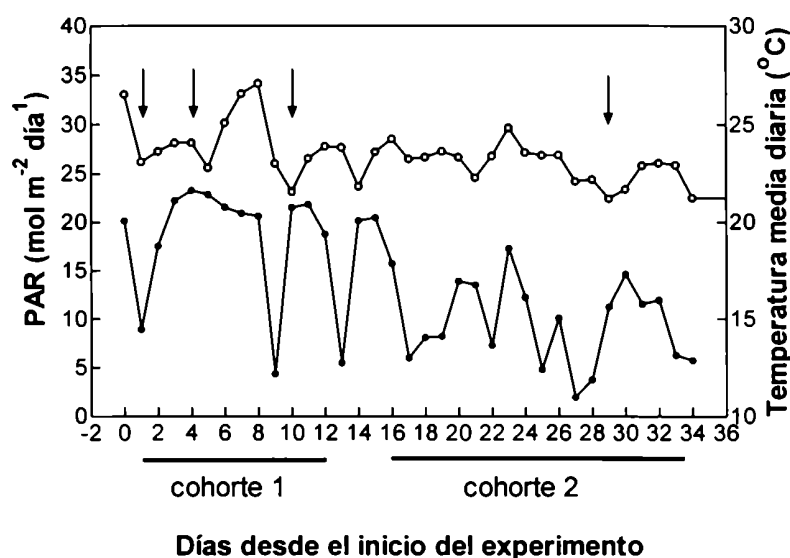


Figura 22: Perfiles diarios del flujo fotónico de PAR (●) y la temperatura media diaria (○) dentro del invernáculo, a lo largo de todo el experimento. Los períodos de tiempo que abarcaron las mediciones de expansión foliar, correspondientes a las cohortes 1 y 2, están indicados por las barras horizontales debajo del eje de las abscisas. Las flechas indican los días de muestreo para el posterior análisis bioquímico.

Las hojas que crecieron bajo todas las dosis de UV-B se expandieron menos que las que crecieron sin UV-B (Fig. 23). Esta inhibición fué de aproximadamente un 25 %. Tal como se esperaba, según los resultados obtenidos anteriormente, el contenido de compuestos fenólicos solubles y la masa foliar específica (MFE) no fueron afectados por el tratamiento de UV-B (Tabla

7). La reducción en el área foliar sin modificación de la MFE, nos está indicando que bajo UV-B la biomasa foliar fué menor.

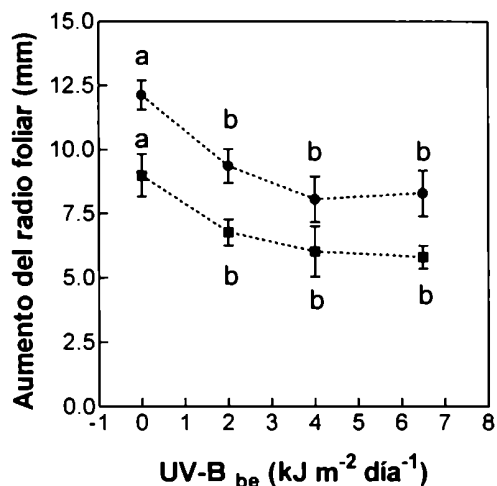


Figura 23: Efecto del UV-B en la expansión foliar de *G. magellanica*, medida en dos cohortes diferentes de hojas: la cohorte 1 (■) comprendió las medidas realizadas entre los días 1 a 12, y la cohorte 2 (●) comprendió las medidas realizadas entre los días 16 a 34. El crecimiento foliar está expresado como el aumento en el radio foliar en mm (aumento del radio foliar= radio final – radio inicial). El tamaño promedio de las hojas marcadas inicialmente en cada cohorte no difirió entre tratamientos ($P = 0.92$ cohorte 1; $P = 0.47$ cohorte 2, ANOVA, datos no mostrados). Los valores correspondientes a la cohorte 2 son mayores que los de la cohorte 1 debido a diferencias en los tamaños iniciales (el radio promedio de las hojas jóvenes marcadas en la cohorte 1 fué de 11.55 mm, y de la cohorte 2 fué de 10.47 mm). En cada cohorte, las hojas que crecieron sin UV-B se expandieron más que las que crecieron con UV-B ($P < 0.05$, ANOVA). Los datos son medias, las líneas representan el error estándar, $n=3$. Letras diferentes indican medias significativamente distintas según post-test de Duncan.

Tabla 7: Absorbancia a 305 nm (A_{305} , expresada por mg de peso seco de material vegetal) de compuestos fenólicos solubles en metanol acidificado, y masa foliar específica (MFE) de hojas de *G. magellanica* que crecieron bajo 0, 2, 4 and 6.5 $\text{kJ m}^{-2} \text{día}^{-1}$ de UV-B_{be}, medidos luego de 4 y 29 días de comenzado el ensayo. Se presentan las medias de 3 repeticiones independientes y el error estándar entre paréntesis. La significancia del efecto del tratamiento en cada fecha de muestreo se analizó con un ANOVA. ns = $P > 0.05$.

		UV-Bbe ($\text{kJ m}^{-2} \text{día}^{-1}$)			
	Día	0	2	4	6.5
A_{305} (mg PS^{-1})	4	5.65 (0.40)	6.25 (0.34)	5.42 (0.39)	5.90 (0.34) ns
	29	5.56 (0.32)	7.51 (1.07)	6.19 (0.54)	7.51 (0.76) ns
MFE (mg cm^{-2})	4	2.01 (0.03)	2.36 (0.18)	2.36 (0.08)	2.24 (0.11) ns
	29	2.06 (0.11)	1.92 (0.26)	2.12 (0.09)	2.03 (0.14) ns

Para caracterizar el efecto a corto plazo del UV-B sobre la generación de estrés oxidativo y la inducción de respuestas antioxidantes medimos los niveles de una molécula abundante y con un rol antioxidante central en plantas, el ácido ascórbico (AH^{\cdot}), y su radical oxidado, el radical ascorbilo (A^{\cdot}). Las mediciones las realizamos 1, 4 y 10 días luego de comenzado el experimento. El A^{\cdot} puede considerarse como el producto terminal de una serie de reacciones del AH^{\cdot} con radicales libres, y además puede reconvertirse a AH^{\cdot} por acción de la ascorbato reductasa o pasar a ácido dehidroascórbico espontáneamente (Fig. 3 de la Introducción General). De manera que la relación $\text{A}^{\cdot}/\text{AH}^{\cdot}$ refleja un balance entre las reacciones oxidativas que forman A^{\cdot} , y las reacciones de reconversión de A^{\cdot} a AH^{\cdot} y de síntesis de ácido ascórbico. Un aumento de esta relación indica que las reacciones de oxidación superan las de reducción y/o síntesis de AH^{\cdot} , e indican un posible estado de estrés oxidativo (Kozak *et al.*, 1997; Malanga *et al.*, 1999; Estevez *et al.*, 2001; Galatro *et al.*, 2001). Los homogenatos de *G. magellanica* exhibieron un fuerte doblete en EPR con las características espectrales ($a_{\text{H}} = 1.88 \text{ G}$, $g = 2.0054$) del radical ascorbilo (Fig. 24).

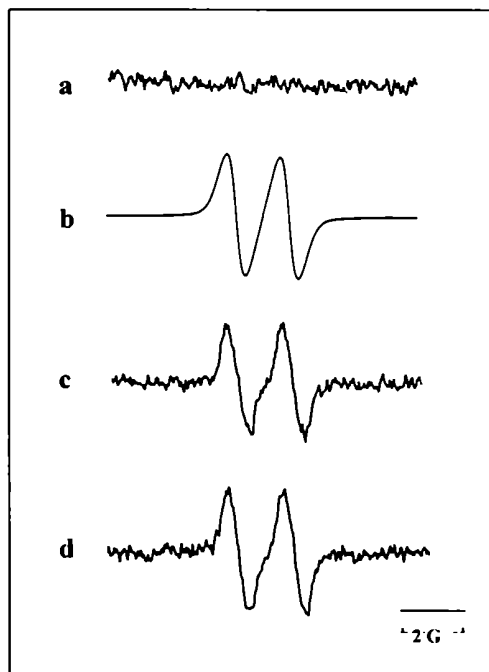


Figura 24: Detección del radical ascorbilo por EPR. (a) Espectro EPR del DMSO, (b) espectro simulado por computadora (utilizando los parámetros espectrales del radical ascorbilo), (c) hojas de *G. magellanica* que crecieron sin UV-B, (d) hojas de *G. magellanica* que crecieron bajo $6.5 \text{ kJ m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ durante 10 días.

El UV-B no modificó los niveles del A^{\cdot} durante los 10 primeros días de tratamiento (Fig. 25 A). El contenido de ascorbato disminuyó significativamente en hojas expuestas a UV-B luego de 4 días de tratamiento, pudiendo ordenarse los tratamientos (dosis de UV-B) según el contenido de ascorbato de mayor a menor de la siguiente manera: $0 > 4 > 2 > 6.5 \text{ kJ m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ (Fig. 25 B). De manera que la relación A^{\cdot}/AH^{\cdot} en las hojas expuestas a la mayor dosis de UV-B (que tuvieron menor contenido de AH^{\cdot}) aumentó significativamente respecto del resto de los tratamientos (Fig. 25 C), indicando una posible situación de estrés oxidativo. En el día 10 el contenido de ascorbato aumentó aproximadamente el doble que lo detectado en días anteriores en todas las plantas que recibieron UV-B, de manera que la relación A^{\cdot}/AH^{\cdot} disminuyó a niveles iguales en todos los tratamientos (Fig. 25 B y C). Esto indicaría que, en *G. magellanica*, los niveles de ascorbato podrían ser un punto de control del sistema de defensa antioxidante regulado por UV-B.

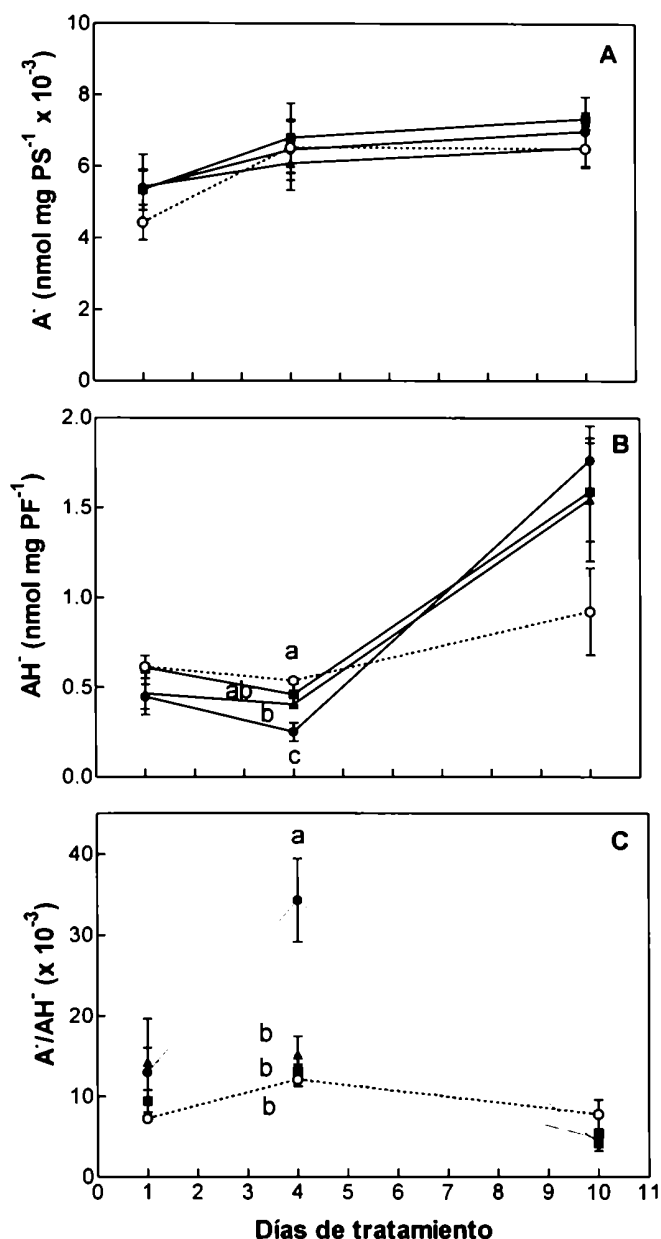


Figura 25: Perfil temporal de los niveles de radical ascorbilo (A^{\cdot}) (A), ascorbato (AH^{\cdot}) (B) y la relación A/AH^{\cdot} (C), durante los primeros 10 días del experimento, medidos en hojas que crecieron sin UV (\circ), y bajo 2 (\blacktriangle), 4 (\blacksquare) y 6.5 (\bullet) $\text{kJ m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ de UV-B_{bc}. Los niveles de A^{\cdot} no se vieron afectados por el tratamiento de UV en ninguno de los días analizados (efecto del tratamiento, ANOVA: día 1, $P = 0.79$; día 4 $P = 0.94$; día 10 $P = 0.65$). El contenido de AH^{\cdot} varió en el tiempo, observándose una disminución dependiente de la dosis de UV-B durante el día 4 (efecto del tratamiento, ANOVA $P = 0.0014$), y luego un aumento bajo todos los tratamientos de UV-B en el día 10. Como consecuencia de los cambios en los niveles de AH^{\cdot} , la relación A/AH^{\cdot} aumentó en el día 4 en hojas que crecieron bajo la dosis de UV-B_{bc} más alta (efecto del tratamiento, ANOVA $P = 0.002$) indicando una situación de estrés oxidativo. Esto fue controlado hacia el día 10 (la relación A/AH^{\cdot} retornó a los niveles iniciales), a través del aumento en el contenido de AH^{\cdot} bajo el tratamiento de UV-B. Letras diferentes indican medias significativamente distintas según post-test de Duncan. Los datos son medias \pm error estándar, $n=3$.

También se han detectado aumentos de ascorbato en otras especies como pepino (Takeuchi *et al.*, 1996), arroz (Kim *et al.*, 1996), y cloroplastos de soja (Galatro *et al.*, 2001), si bien las dosis de UV-B_{bc} utilizadas en dichos trabajos fueron en todos los casos mayores a las utilizadas en nuestro experimento. En los trabajos de Kim *et al.* (1996) y Takeuchi *et al.* (1996), los aumentos en niveles de ascorbato fueron detectados sólo luego de 6 días de tratamiento con UV-B pero no antes, de manera similar a nuestras observaciones.

El UV-B no aumentó los niveles de peroxidación lipídica, pero produjo daño al ADN

A pesar que el estrés oxidativo, evaluado usando la relación A/AH[•], pareció haber estado controlado al día 10 (Fig. 25 C), el efecto inhibitorio del UV-B en la expansión foliar persistió durante la segunda mitad del experimento (Fig. 23, cohorte 2). Por lo tanto, realizamos mediciones simultáneas del daño oxidativo a lípidos y de CPDs, como indicadores de daño molecular inducido por UV-B, en dos momentos del experimento: luego de 4 y 29 días de iniciado el ensayo.

La técnica de EPR es una herramienta poderosa que permite la detección de los radicales lipídicos en forma específica. Otras técnicas más ampliamente empleadas son indirectas, e involucran la cuantificación de productos derivados de los procesos de peroxidación lipídica [como ser la medición de malondialdehído (MDA) y especies reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARs)] en lugar de los radicales lipídicos en sí mismos. Los radicales lipídicos pueden combinarse con el atrapador de spin POBN, resultando en aductos que dan una señal característica en EPR, con constantes de acoplamiento hiperfino de $a_N = 15.8$ G y $a_H = 2.6$ G (Fig. 26). No se encontraron diferencias significativas entre el contenido de radicales lipídicos bajo las distintas dosis de UV-B, en ninguna de las dos fechas analizadas (efecto del tratamiento en ANOVA: día 4 $P = 0.90$; día 29 $P = 0.55$) (Fig. 27 A), ni siquiera durante el día 4, momento de mayor estrés oxidativo. Esto sugiere la existencia de un control adecuado a nivel del ambiente lipofílico, probablemente a través de la acción de antioxidantes liposolubles como los tocoferoles. Kramer *et al.*, (1991), Dai *et al.*, (1997) y Hideg *et al.*, (2003), trabajando con pepino, arroz y

tabaco respectivamente, en invernáculo y con UV-B suministrado por lámparas, encontraron un aumento en el contenido de TBARs y MDA en plantas expuestas al UV-B, junto con daño al PS II (Hideg *et al.*, 2003), e inhibición del crecimiento (Kramer *et al.*, 1991; Dai *et al.*, 1997) . Si bien la aproximación experimental usada por estos autores es similar a la nuestra, es importante destacar que, en estos trabajos, los efectos del UV-B sobre la peroxidación de lípidos fueron detectados solo bajo altas dosis de UV-B_{bc} . Dai *et al.*, (1997) no encontraron ningún efecto del UV-B sobre el contenido de MDA bajo 3 y 6 kJ m⁻² día⁻¹ de UV-B, lo que concuerda con los resultados obtenidos en *G. magellanica*. Otros estudios realizados en cámaras de cultivo con lámparas de UV-B detectaron un aumento en los niveles de MDA inducidos por UV-B en cotiledones de pepino (Takeuchi *et al.*, 1995), en plantas de arveja (A.-H.-Mackerness *et al.*, 1998; Alexieva *et al.*, 2001) y trigo (Alexieva *et al.*, 2001), pero estos estudios se realizaron a bajos niveles de PAR, y alto UV-B (hasta 49 kJ m⁻² día⁻¹), condiciones que casi con seguridad exageran los efectos detectados del UV-B.

Las dosis de UV-B_{bc} ensayadas en este trabajo aumentaron el contenido de CPDs en hojas de *G. magellanica* en forma dependiente de la dosis (Fig. 27 B) en ambas fechas analizadas.

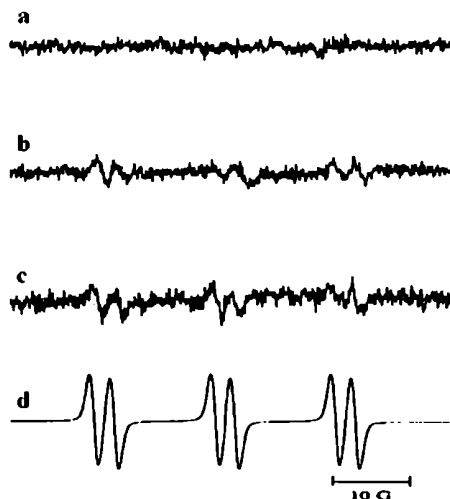


Figura 26: Detección de radicales lipídicos por EPR. (a) espectro EPR del POBN, (b) hojas de *G. magellanica* que crecieron sin UV-B, (c) hojas de *G. magellanica* expuestas a 6.5 kJ m⁻² día⁻¹ UV-B_{bc} durante 10 días, (d) espectro simulado por computadora (con los parámetros espectrales de los radicales lipídicos).

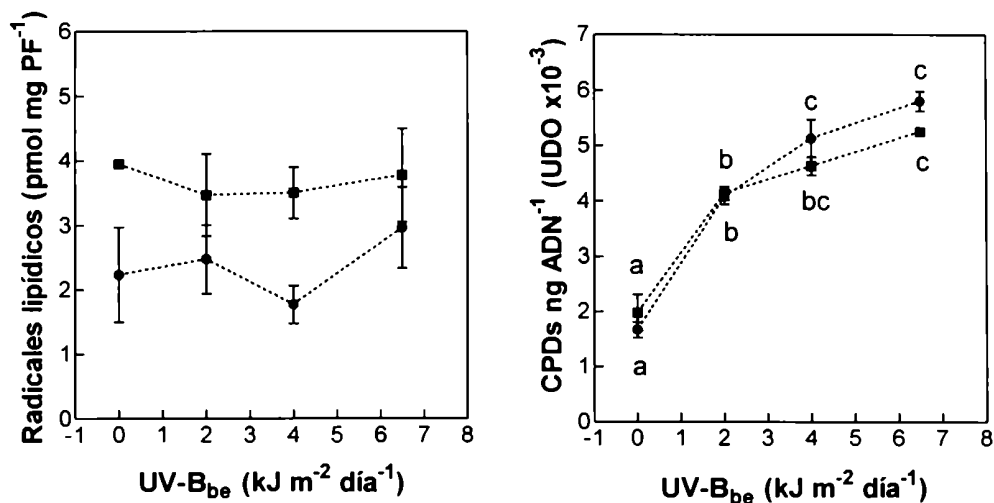


Figura 27: Daño molecular en hojas de *G. magellanica* que crecieron sin UV-B o bajo 2, 4 y 6.5 kJ m⁻² día⁻¹, luego de 4 (■) y 29 (●) días de comenzado el experimento. (A) Contenido de radicales lipídicos. No hubo efecto del tratamiento de UV-B (día 4 $P = 0.90$; día 29 $P = 0.55$, ANOVA). (B) Niveles de CPDs en el ADN. El UV-B aumentó el contenido de CPDs bajo todas las dosis ensayadas ($P < 0.05$, ANOVA). Letras diferentes indican medias significativamente distintas según post-test de Duncan. Los datos son medias \pm error estándar, $n=3$.

La inhibición de la expansión foliar estuvo inversamente correlacionada con el contenido de CPDs, pero no con el nivel de peroxidación lipídica

Analizamos la relación entre la inhibición del crecimiento observada en ambas cohortes de hojas, y el daño molecular medido en los días 4 y 29. La inhibición en el crecimiento estuvo inversamente correlacionada con el contenido de CPDs. Los coeficientes de correlación de Pearson fueron -0.77 ($P < 0.01$) para la cohorte 1 y -0.82 ($P < 0.01$) para la cohorte 2, de manera que el 59 % y el 67 % de la variación en la expansión foliar pudo ser explicada por diferencias en el contenido de CPDs (Fig. 28 A, C). No encontramos una correlación significativa entre la inhibición del crecimiento y el contenido de radicales lipídicos (Fig. 28 B, D).

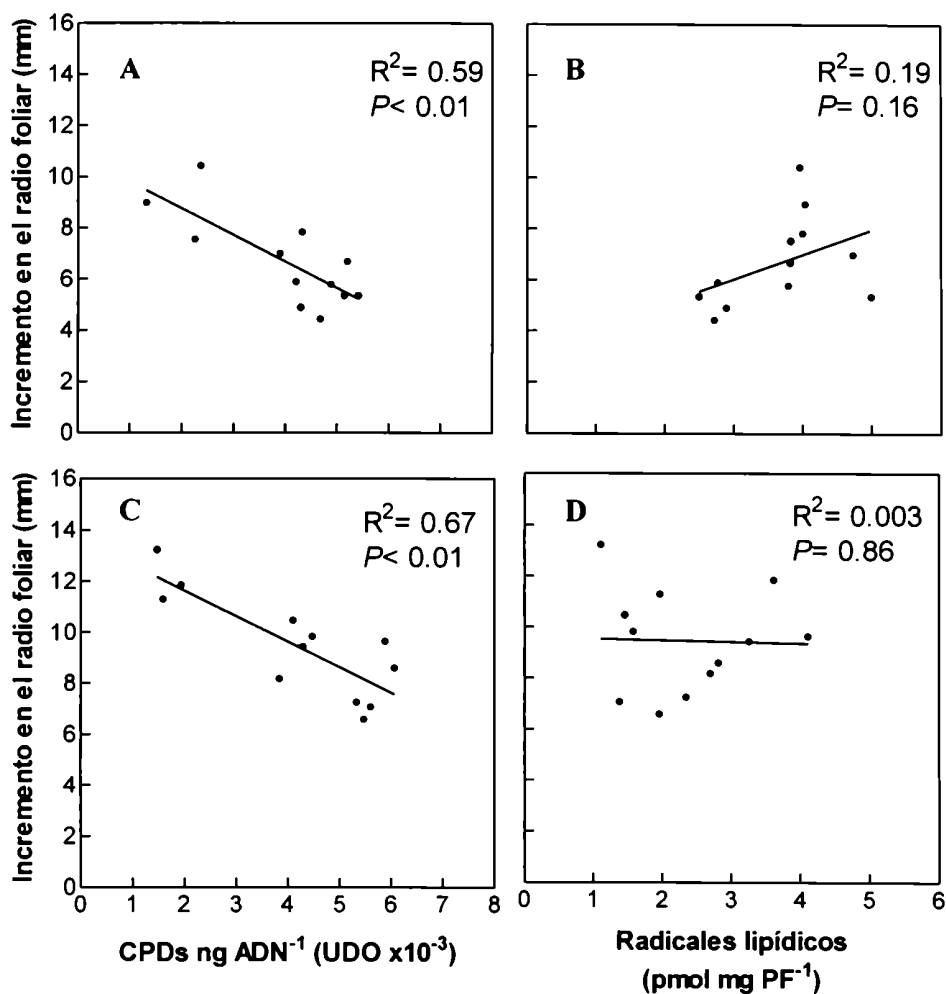


Figura 28: Expansión foliar en función del contenido de CPDs (A, C) y de radicales lipídicos (B, D) en hojas de *G. magellanica* que crecieron bajo distintas dosis de UV-B (0, 2, 4 y 6.5 kJ m⁻² día⁻¹). Los paneles A y B corresponden a la expansión foliar de la cohorte 1 y daño molecular luego de 4 días de tratamiento. Los paneles C y D corresponden a la expansión foliar de la cohorte 2 y daño molecular luego de 29 días de tratamiento. La expansión foliar correlacionó inversamente con el contenido de CPDs (coeficientes de correlación de Pearson: -0.77 para la cohorte 1 y -0.82 para la cohorte 2, $P < 0.01$). Los valores de R^2 y la significancia de las correlaciones están indicados en cada gráfico.

Conclusiones

Según nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en el que se mide la expansión foliar de una especie natural, junto con daño molecular inducido por UV-B (CPDs y radicales lipídicos) bajo dosis realistas de UV-B. El aumento en el contenido de ascorbato, y la falta de daño oxidativo a membranas sugieren que, en *G. magellanica*, los efectos inhibitorios del UV-B en el crecimiento probablemente no estén relacionados con daño oxidativo (Fig. 28 B, D). En cambio, la presencia de dímeros en el ADN parece jugar un rol más importante en este proceso (Fig. 28 A, C). La presencia de CPDs no reparados puede tener consecuencias negativas tanto a nivel de la división como de la expansión celulares. Ambos procesos han sido inhibidos por UV-B en distintas especies estudiadas (Ballaré *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1995; Logemann *et al.*, 1995; Nogués *et al.*, 1998; González *et al.*, 1998; Hopkins *et al.*, 2002). Además del daño oxidativo y de los dímeros en el ADN, otros factores pueden ser los responsables de la reducción en el crecimiento bajo UV-B: reducción en la extensibilidad de la pared celular debido a la fotodegradación del AIA (Tevini & Iwanzik, 1986) o acumulación de ácido ferúlico (Liu *et al.*, 1995); cambios en la turgencia debido al funcionamiento de los estomas (Nogués *et al.*, 1998), etc. Se necesitan aún más estudios para establecer cuales de estos mecanismos (u otros) son los responsables directos de la inhibición del crecimiento foliar causado por UV-B en *G. magellanica*.



CONCLUSIONES
FINALES Y
PERSPECTIVAS

El estudio de los efectos del UV-B solar en plantas terrestres puede realizarse a través de diversas aproximaciones experimentales: bajo niveles normales de radiación solar; suplementando la radiación solar con UV-B suministrado por lámparas; utilizando lámparas de UV-B dentro de invernáculos; o bajo condiciones de irradiación artificiales en cámaras de crecimiento. Los distintos métodos cuentan con ventajas y desventajas. Si bien la utilización de cámaras de cultivo y de lámparas permite controlar al máximo condiciones tales como dosis de radiación (tanto UV-B como visible), temperatura, fotoperíodo, etc, tanto la composición espectral como el balance entre longitudes de onda de este tipo de experimentos normalmente difieren de la radiación solar. Debido a que muchos de los efectos nocivos del UV-B pueden ser revertidos por procesos que dependen de radiación de longitudes de onda correspondientes al UV-A y al visible (por ejemplo, la fotorreparación del ADN), es importante que el balance entre UV-B:UV-A:visible sea similar al ambiental, para no sobredimensionar los efectos del UV-B. La utilización de lámparas dentro de invernáculos permite manipular las dosis de UV-B, mientras que el resto de las longitudes de onda provienen de la radiación solar. Si las dosis de UV-B no son anormalmente elevadas, el balance espectral entre longitudes de onda puede mantenerse en forma aproximadamente realista. Una de las maneras de asegurar un adecuado balance espectral, es trabajando bajo radiación solar, eliminando el UV en forma selectiva mediante el uso de filtros de exclusión. Este tipo de experimentos permite detectar los efectos de dosis actuales de UV-B, pero no evaluar los efectos de futuros aumentos en el UV-B. La manera de estudiar este aspecto es la suplementación del UV solar con lámparas que siguen el perfil diario del UV solar, suplementándolo en un porcentaje pre-establecido. El diseño de este tipo de experimentos es normalmente complejo, y el costo de los materiales, alto.

El acercamiento experimental utilizado en Tierra del Fuego, mediante el uso de filtros que atenúan selectivamente distintas porciones del UV solar, nos ha permitido establecer consistentemente efectos de niveles actuales de UV (elevados respecto de la media histórica, debido a la erosión de la capa de ozono) en una especie nativa, y en condiciones ambientales naturales. La realización del experimento en invernáculo nos permitió manipular las dosis de UV-B, aplicando dosis realistas según los registros históricos de UV-B de Ushuaia. En todos nuestros experimentos buscamos integrar las respuestas observadas a nivel morfológico, con los efectos a nivel molecular, teniendo en cuenta factores ambientales relevantes. Esto pudo lograrse mediante el trabajo de campo, el análisis de datos climáticos, y técnicas tanto bioquímicas como

moleculares en el laboratorio. La utilización de estas técnicas, normalmente descriptas para animales, bacterias y para plantas-modelo como *A. thaliana*, requieren una ardua puesta a punto para poder utilizarlas con especies salvajes, escasamente estudiadas. Este tipo de trabajo, que atraviesa niveles de organización, no abunda en la bibliografía disponible. La tendencia general a la especialización en cualquier área de investigación que se considere, es probablemente una de las causas que explican la poca abundancia de trabajos que integren distintas escalas. La disponibilidad creciente de mutantes de diversas especies, en particular de *A. thaliana*, constituyen una herramienta muy valiosa para el estudio de respuestas fisiológicas y los mecanismos subyacentes. Sin embargo, las conclusiones que se obtienen en condiciones controladas, pueden potencialmente cambiar bajo condiciones naturales, donde muchos de los factores ambientales (físicos, químicos y bióticos) difieren de las condiciones de laboratorio. La interacción de las plantas y su entorno, sumados a la capacidad de aclimatación de muchos procesos fisiológicos al ambiente en el cual se desarrolla la planta, conforman un panorama complejo, pero cuya comprensión representa un desafío interesante.

Al comenzar los experimentos descriptos en esta Tesis, los estudios realizados anteriormente en diversos ecosistemas de Tierra del Fuego, nos brindaron un marco de conocimiento previo sobre los efectos de niveles actuales de UV-B solar en las comunidades naturales de esta región. El UV-B solar tiene acción sobre diversos componentes del ecosistema: afecta el crecimiento vegetal, la abundancia de microorganismos, relaciones tróficas tales como la herbivoría, y los procesos de descomposición. Estos efectos podrían tener consecuencias futuras en la abundancia relativa de especies de las comunidades, y en los ciclos biogeoquímicos. El objetivo general de esta Tesis fue profundizar en el estudio de los efectos a nivel molecular generados por el UV en la flora nativa de la región, que subyacen los efectos observados en niveles de organización superiores. Para ello, utilizamos a *G. magellanica* como modelo de estudio. Elegimos esta especie debido a que los conocimientos previos indicaron que su crecimiento se ve negativamente afectado por la radiación UV-B, y esta reducción en el crecimiento va acompañada por daño al ADN. Otras respuestas de protección, tales como acumulación de compuestos flavonoides en hojas y modificaciones del grosor de las mismas, no se ven afectados por esta radiación en esta especie. Nosotros investigamos no solo el efecto del UV-B sobre estos parámetros (crecimiento, daño al ADN, respuestas de protección), sino también

el efecto del UV-A. También avanzamos en el estudio de la regulación de los mecanismos de reparación del ADN por el UV y por otros factores ambientales ecológicamente relevantes. Analizamos el ritmo diario del contenido de CPDs a lo largo de varios días, integrando los conocimientos logrados en la etapa anterior. También evaluamos la capacidad del UV-B de generar daño oxidativo a estructuras celulares, y el impacto relativo de este tipo de daño y de los dímeros en el ADN, sobre la reducción del crecimiento inducida por esta radiación.

En relación a los efectos sobre el crecimiento, encontramos que las longitudes de onda más inhibitorias son las correspondientes al UV-B, mientras que el UV-A no parece tener una participación relevante. La magnitud de la reducción del crecimiento registrada durante nuestros experimentos concuerda con resultados anteriores en esta misma especie. El efecto inhibitorio del UV-B se observó consistentemente durante 4 años y en diferentes épocas de la estación de crecimiento. Es interesante destacar que aún dosis relativamente bajas de UV-B (como las que se registran a principios de la primavera) son suficientemente dañinas como para causar este efecto.

Encontramos que la fotorreparación es el mecanismo predominante de remoción de CPDs en esta especie, tal como ocurre en otras especies vegetales estudiadas. Este mecanismo es regulado positivamente por la radiación UV, de manera que plantas que crecen bajo esta radiación presentan una mayor velocidad de fotorreparación de CPDs que plantas que crecen sin UV. Debido a las características climáticas de la región, esperábamos que *G. magellanica* presentara una alta capacidad de reparación del ADN aún a temperaturas relativamente bajas. Sin embargo, encontramos que la velocidad de fotorreparación decae de 25 a 8 °C. Si bien temperaturas máximas cercanas a 25 °C son frecuentes durante días soleados a nivel del canopeo de *G. magellanica*, durante la mayor parte del día las temperaturas son inferiores a este valor. La baja velocidad de reparación a bajas temperaturas, podrían explicar en parte la relación positiva observada previamente entre la cantidad de CPDs en hojas de *G. magellanica* y las dosis de UV-B. Evaluar las velocidades de reparación a temperaturas intermedias entre los dos extremos ensayados en nuestros experimentos, nos permitiría establecer la relación funcional entre la capacidad de fotorreparación y la temperatura. De esta manera podríamos predecir la variación de la fotorreparación a lo largo de un día, y a lo largo de la estación de crecimiento. Este último aspecto sería particularmente importante, ya que los eventos de pasaje de agujero de ozono sobre

la región ocurren con mayor frecuencia luego del invierno, cuando las temperaturas son todavía bajas. Por otro lado, el UV solar no participa en la regulación de los niveles de compuestos fenólicos foliares en *G. magellanica*, respuesta frecuentemente observada en otras especies. Sería interesante investigar si velocidades relativamente bajas de fotorreparación de CPDs, y carencia de respuestas de fotoprotección son características comunes de especies que evolucionaron en latitudes altas, con bajos niveles de UV-B solar y bajas temperaturas.

Si bien se ha demostrado que el UV-A puede producir CPDs en tejidos vegetales, el componente UV-B es el principal generador de CPDs en plantas de *G. magellanica*. Sin embargo, los CPDs no fluctúan a lo largo del día acompañando las fluctuaciones de UV-B, sino que son levemente menores al mediodía respecto del amanecer y el atardecer. Este patrón diario puede explicarse al considerar la acción de los mecanismos de fotorreparación, que son regulados tanto por la radiación UV-B como por el UV-A, la radiación visible y la temperatura. Los valores relativamente bajos de CPDs al mediodía podrían ser consecuencia de una alta fotorreparación favorecida por las condiciones lumínicas (altos UV-A y visible) y la temperatura. Los relativamente altos valores de CPDs registrados al atardecer podrían explicarse por una caída abrupta de la capacidad fotorreparativa desde el mediodía hacia la tarde, de manera que a pesar de la disminución de la irradiancia instantánea de UV-B, la radiación acumulada durante las primeras horas de la tarde sin fotorreparación concomitante, produciría la acumulación de CPDs hacia las últimas horas del día. La ausencia de reparación en oscuridad detectada en ensayos controlados, fué corroborada en las determinaciones a campo, ya que los niveles de CPDs al finalizar el día no difirieron de los niveles de CPDs al comienzo del día siguiente. Esta ausencia de reparación nocturna trae como consecuencia una conexión entre días, que se “rompe” al mediodía por la actividad reparativa. Esto evitaría una acumulación continua de los CPDs a lo largo del año, manteniendo los niveles de daño dentro de ciertos límites. Si bien los patrones diarios del contenido de CPDs pueden explicarse por los resultados obtenidos en los ensayos de reparación de CPDs *in vivo*, el estudio de la expresión del gen y de la actividad de la enzima fotoliasa a lo largo de un día contribuiría a la mejor comprensión de nuestros resultados.

Entre las múltiples acciones del UV-B a nivel celular, se encuentra la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos compuestos son altamente reactivos y pueden

provocar daño oxidativo a proteínas, ADN y membranas celulares, con la consecuente alteración de su estructura y función. Debido a que el ácido ascórbico (AH^{\cdot}) puede reaccionar virtualmente con cualquier radical libre que se genere en un sistema biológico, los niveles del producto de su oxidación, el radical ascorbilo (A^{\cdot}), son indicadores de la presencia de ROS en la célula. Debido a que la velocidad de oxidación del ascorbato puede variar por cambios en su concentración, el empleo de la concentración del radical ascorbilo como indicadora de estrés oxidativo, sólo es adecuada en sistemas donde la concentración de ascorbato no varía en relación a la condición oxidativa. Por lo tanto cuando se producen cambios en el contenido de ascorbato, la relación A^{\cdot}/AH^{\cdot} puede emplearse como un índice temprano, simple y global de estrés oxidativo. En los experimentos realizados en invernáculo con dosis de UV-B controladas, encontramos que se indujo un estado de estrés oxidativo bajo la dosis más alta de UV-B. Este estado fue transitorio, e involucró una disminución en el contenido de ascorbato. La disminución en el contenido de ascorbato en relación a la concentración de su producto de oxidación (el radical ascorbilo), estaría reflejando una regeneración insuficiente de esta molécula, e indicaría que las reacciones de oxidación del mismo superan las de reducción y síntesis. La medición de la actividad de las enzimas que intervienen en estas reacciones de oxido-reducción (tales como la ascorbato-peroxidasa, monodehidroascorbato-reductasa y dihidroascorbato-reductasa), así como la concentración de los compuestos intermedios, completarían el cuadro de sucesos que se llevan a cabo, y los puntos de acción específicos del UV-B.

Luego de 10 días de comenzado el experimento, el estado de estrés oxidativo fue controlado mediante un aumento en la concentración de ascorbato, bajo todas las dosis de UV-B ensayadas. Este hecho indicaría que esta molécula, con una función central en la detoxificación de radicales libres en células vegetales, estaría sujeta a regulación por el UV-B.

Los procesos de peroxidación lipídica se producen como consecuencia de la interacción de ácidos grasos poli-insaturados (componentes de membranas celulares) con una variedad de ROS. Pudimos detectar radicales lipídicos en esta especie, producto del metabolismo normal, ya que ninguna de las dosis de UV-B indujeron un aumento en su concentración en *G. magellanica*. Esto indicaría un control adecuado a nivel del ambiente lipofílico, probablemente por acción del α -tocoferol, principal molécula antioxidante liposoluble. Para comprobar esta suposición, sería interesante estudiar si los niveles de α -tocoferol son regulados por el UV-B, o son constitutivamente altos en esta especie.

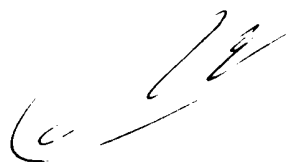
En estos experimentos también pudimos detectar la presencia de CPDs, que aumentaron de manera dependiente de la dosis de UV-B, tal como se esperaba en base a los resultados previos en esta especie. Las plantas que crecieron bajo UV-B presentaron menor expansión foliar que las que crecieron sin UV-B. Esta reducción en el crecimiento estuvo acompañada de daño al ADN (CPDs), pero no de daño oxidativo a lípidos. De manera que, de los dos tipos de daño molecular evaluados, el que mejor explicaría la inhibición en la expansión foliar, es la presencia de CPDs. Los CPDs pueden tener un impacto negativo en el crecimiento, a través del retardo en la replicación y traducción del ADN, con consecuencias tanto en la división como expansión celulares. Analizar cuál de los dos mecanismos se ve afectado en *G. magellanica*, contribuiría a entender las etapas del desarrollo más sensibles a la presencia de este tipo de daño molecular en esta especie.

Los resultados obtenidos a lo largo de nuestros experimentos, nos permitieron ampliar el estado de conocimiento existente al comienzo de los mismos, y pudimos poner a prueba en forma satisfactoria todas las hipótesis planteadas. Queremos enfatizar en particular, la utilidad de incorporar técnicas de análisis bioquímicas y moleculares en el estudio de los procesos fisiológicos, que subyacen las problemáticas que surgen de observaciones ecológicas.



Lic. Carla V. Giordano

Tesista



Dr. Carlos L. Ballaré

Director de Tesis



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- A.-H.-Mackerness, S., Surplus, S. L., Jordan, B. R. & Thomas, B. (1998). Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthetic transcripts at different stages of leaf development and light levels in pea (*Pisum sativum* L.): Role of active oxygen species and antioxidant enzymes. *Photochemistry and Photobiology*, **68**, 88-96.
- A.-H.- Mackerness, S. (2000). Plant responses to ultraviolet-B (UV-B : 280-320 nm) stress: What are the key regulators? *Plant Growth Regulation*, **32**, 27-39.
- A.-H.- Mackerness, John, F. C., Jordan, B. & Thomas, B. (2001). Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Letters*, **489**, 237-242.
- Ahmad, M., Jarillo, J. A., Klimaczak, L. J., Landry, L. G., Peng, T., Last, R. L. & Cashmore, A. R. (1997). An enzyme similar to animal type II photolyases mediates photoreactivation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **9**, 199-207.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment*, **24**, 1337-1344.
- Allen, D. J., Nogués, S. & Baker, N. R. (1998). Ozone depletion and increased UV-B radiation: is there a real threat to photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*, **49**, 1775-1788.
- Allen, D. J., Nogués, S., Morison, J. I. L., Greenslade, P. D., McLeod, A. R. & Baker, N. R. (1999). A thirty percent increase in UV-B has no impact on photosynthesis in well-watered and droughted pea plants in the field. *Global Change Biology*, **5**, 235-244.
- Asada, K. (1993). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: *Causes of Photo-Oxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, pp. 77-104. Boca Raton: CRC Press.
- Ballaré, C. L., Scopel, A. L., Stapleton, A. E. & Yanovsky, M. J. (1996). Solar ultraviolet-B radiation affects seedling emergence, DNA integrity, plant morphology, growth rate, and attractiveness to herbivore insect in *Datura ferox*. *Plant Physiology*, **112**, 161-170.

- Ballaré, C., Rousseaux, M., Searles, P., Zaller, J., Giordano, C., Robson, T., Caldwell, M., Sala, O. & Scopel, A. (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, P. W., Searles, P., Ballaré, C. L., Ryel, R. J. & Caldwell, M. M. (2000). Non-invasive measurements of leaf epidermal transmittance of UV radiation using chlorophyll fluorescence: field and laboratory studies. *Physiologia Plantarum*, **109**, 274-283.
- Bilger, W., Veit, M., Schreiber, L. & Schreiber, U. (1997). Measurement of leaf epidermal transmittance of UV radiation by chlorophyll fluorescence. *Physiologia Plantarum*, **101**, 754-763.
- Boccalandro, H. E., Mazza, C. A., Mazzella, M. A., Casal, J. J. & Ballaré, C. L. (2001). Ultraviolet-B radiation enhances a phytochrome-B mediated photomorphogenic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **126**, 780-788.
- Bojkov, R. D., Fioletov, V. E. & Díaz, S. B. (1995). The relationship between solar UV irradiance and total ozone from observations over southern Argentina. *Geophysical Research Letters*, **22**, 1249-1252.
- Britt, A. B. (1999). Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends in Plant Science*, **4**, 20-25.
- Britt, A. B. & Fiscus, E. L. (2003). Growth responses of *Arabidopsis* DNA repair mutants to solar irradiation. *Physiologia Plantarum*, **118**, 183-192.
- Buchholz, G., Ehmann, B. & Wellmann, E. (1995). Ultraviolet light inhibition of phytochrome-induced flavonoid biosynthesis and DNA photolyase formation in mustard cotyledons (*Sinapis alba* L.). *Plant Physiology*, **108**, 227-234.
- Buettner, G. R. & Jurkiewicz, B. A. (1993). Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. *Free Radical Biology & Medicine*, **14**, 49-55.
- Caldwell, M. M. (1971). Solar UV radiation and the growth and development of higher plants. In: *Photophysiology* (Ed. by Giese, A. C.). pp. 131-177. New York: Academic Press.
- Caldwell, M. M. & Flint, S. D. (1994). Stratospheric ozone reduction, solar UV-B radiation and terrestrial ecosystems. *Climatic Change*, **28**, 375-394.

- Chen, J. J., Mitchell, D. L. & Britt, A. B. (1994). A light-dependent pathway for the elimination of UV-induced pyrimidine (6-4) pyrimidinone photoproducts in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **6**, 1311-1317.
- Cooley, M. M., Holmes, M. G. & Attridge, T. H. (2000). Growth and stomatal responses of temperate meadow species to enhanced levels of UV-A and UV-B + A radiation in the natural environment. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, **57**, 179-185.
- Cooley, M. M., Higgins, J. T., Holmes, M. G. & Attridge, T. H. (2001). Ecotypic differences in responses of *Arabidopsis thaliana* L. to elevated polychromatic UV-A and UV-B + A radiation in the natural environment: a positive correlation between UV-B + A inhibition and growth rate. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, **60**, 143-150.
- Dai, Q., Yan, B., Huang, S., Liu, X., Peng, S., Miranda, M. L. L., Chavez, A. Q., Vergara, B. S. & Olszyk, D. M. (1997). Response of oxidative stress defense systems in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplemental UV-B radiation. *Physiologia Plantarum*, **101**, 301-308.
- Day, T. A. (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, T. A., Ruhland, C. T., Grobe, C. W. & Xiong, F. (1999). Growth and reproduction of Antarctic vascular plants in response to warming and UV radiation reductions in the field. *Oecologia*, **119**, 24-35.
- Day, T. A., Ruhland, C. T. & Xiong, F. (2001). Influence of solar ultraviolet-B radiation on Antarctic terrestrial plants: results from a four-year field study. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, **62**, 78-87.
- Estevez, M., Malanga, G. & Puntarulo, S. (2001). UV-B effects on Antarctic *Chlorella sp* cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, **62**, 19-25.
- Farman, J. C., Gardiner, B. G. & Shanklin, J. D. (1985). Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClOx/NOx interaction. *Nature*, **315**, 207-210.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (1985). Agroclimatological data. In: *Agroclimatological data for Latin America and the Caribbean*. FAO, Rome, Italy.

- Foyer, C. H., Descourvieres, P. & Kunert, K. J. (1994)a. Protection against oxygen radicals: An important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment*, **17**, 507-523.
- Foyer, C. H., Lelandais, M. & Kunert, K. J. (1994)b. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, **92**, 696-717.
- Galatro, A., Simontacchi, M. & Puntarulo, S. (2001). Free radical generation and antioxidant content in chloroplasts from soybean leaves exposed to ultraviolet-B. *Physiologia Plantarum*, **113**, 564-570.
- Gherke, C. (1998). Effects of enhanced UV-B radiation on production-related properties of a *Sphagnum fuscum* dominated subarctic bog. *Functional Ecology*, **12**, 940-947.
- Gherke, C. (1999). Impacts of enhanced ultraviolet-B radiation on mosses in a subarctic health ecosystem. *Ecology*, **80**, 1844-1851.
- Girotti, A. W. (1985). Mechanisms of lipid peroxidation. *Free Radical Biology & Medicine*, **1**, 87-95.
- González, R., Mepsted, R., Wellburn, A. R. & Paul, N. D. (1998). Non-photosynthetic mechanisms of growth reduction in pea (*Pisum sativum* L.) exposed to UV-B radiation. *Plant, Cell and Environment*, **21**, 23-32.
- Hada, M., Buchholz, G., Hashimoto, T., Nikaido, O. & Wellmann, E. (1999). Photoregulation of DNA photolyases in Broom *Sorghum* seedlings. *Photochemistry and Photobiology*, **69**, 681-685.
- Hideg, E., Nagy, T., Oberschall, D., Dudits, D. & Vass, I. (2003). Detoxification function of aldose/aldehyde reductase during drought and ultraviolet-B (280-320 nm) stresses. *Plant, Cell and Environment*, **26**, 513-522.
- Hidema, J., Kumagai, T., Sutherland, J. C. & Sutherland, B. M. (1997). Ultraviolet B-sensitive rice cultivar deficient in cyclobutyl pyrimidine dimer repair. *Plant Physiology*, **113**, 39-44.
- Hopkins, L., Bond, M. A. & Tobin, A. K. (2002). Ultraviolet-B radiation reduces the rates of cell division and elongation in the primary leaf of wheat (*Triticum aestivum* L. cv Maris Huntsman). *Plant Cell and Environment*, **25**, 617-624.
- Jansen, M. A. K., Gaba, V. & Greenberg, B. M. (1998). Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science*, **3**, 131-135.

- Jiang, C. Z., Lee, J., Mitchell, D. L. & Britt, A. B. (1997). Photorepair mutants in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **94**, 7441-7445.
- Johanson, U., Gehrke, C., Bjorn, L. O. & Callaghan, T. V. (1995). The effects of enhanced UV-B radiation on the growth of dwarf shrubs in a subarctic heathland. *Functional Ecology*, **9**, 713-719.
- Jordan, B. R. (1996). The effects of ultraviolet-B radiation on plants: A molecular perspective. *Advances in Botanical Research*, **22**, 97-162.
- Jordan, B. R. (2002). Molecular response of plant cells to UV-B stress. *Functional Plant Biology*, **29**, 909-916.
- Kang, H. S., Hidema, J. & Kumgai, T. (1998). Effects of light environment during culture on UV-induced cyclobutyl pyrimidine dimers and their photorepair in rice (*Oryza sativa* L.). *Photochemistry and Photobiology*, **68**, 71-77.
- Khan, A. U. & Wilson, T. (1995). Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chemistry and Biology*, **2**, 437-445.
- Kim, H. Y., Kobayashi, K., Nouchi, I. & Yoneyama, T. (1996). Differential influences of UV-B radiation on antioxidants and related enzymes between rice (*Oryza sativa* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) leaves. *Environmental Science*, **9**, 55-63.
- Kirchhoff, V. W. J. H., Casiccia, S. C. A. R. & Zamora, F. B. (1997). The ozone hole over Punta Arenas, Chile. *Journal of Geophysical Research*, **102**, 8945-8953.
- Kalbin G. (2001). Towards the understanding of biochemical plant responses to UV-B. Dissertation thesis at Goteborg University.
- Kolb, C. A., Kaser, M. A., Kopecky, J., Zots, G., Riederer, M. & Pfundel, E. E. (2001). Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves. *Plant Physiology*, **127**, 863-875.
- Kotake, Y., Tanigawa, T., Tanigawa, M., Ueno, I., Allen, D. R. & Lai, C. (1996). Continuous monitoring of cellular nitric oxide generation by spin trapping with an iron-dithiocarbamate complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1289**, 362-368.
- Kozak, R. G., Malanga, G., Caro, A. & Puntarulo, S. (1997). Ascorbate free radical content in photosynthetic organisms after exposure to ultraviolet-B radiation. *Recent Research and Development in Plant Physiology*, **1**, 233-239.

- Kramer, G. F., Norman, H. A., Krizeck, D. T. & Mirecki, R. M. (1991). Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochemistry*, **30**, 2101-2108.
- Krizek, D. T., Mirecki, R. M. & Kramer, G. F. (1994). Growth analysis of UV-B -irradiated cucumber seedlings as influenced by photosynthetic photon flux source and cultivar. *Physiologia Plantarum*, **90**, 593-599.
- Krizek, D. T., Britz, S. J. & Mirecki, R. M. (1998). Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. New Red Fire lettuce. *Physiologia Plantarum*, **103**, 1-7.
- Kubo, A., Aono, M., Nakajima, N., Saji, H., Tanaka, K. & Kondo, N. (1999). Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, **112**, 279-290.
- Kumagai, T., Hidema, J., Kang, H. S. & Sato, T. (2001). Effects of supplemental UV-B radiation on the growth and yield of two cultivars of Japanese lowland rice (*Oryza sativa* L.) under the field in a cool rice-growing region of Japan. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **83**, 201-208.
- Kutnink, M. A., Hawkes, W. C., Schaus, E. E. & Omaye, S. T. (1987). An internal standard method for the unattended high-performance liquid chromatographic analysis of ascorbic acid in blood components. *Analytical Biochemistry*, **166**, 424-430.
- Landry, L. G., Stapleton, A. E., Lim, J., Hoffman, P., Hays, J. B., Walbot, V. & Last, R. L. (1997). An *Arabidopsis* photolyase mutant is hypersensitive to ultraviolet-B radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **94**, 328-332.
- Langer, B. & Wellmann, E. (1990). Phytochrome induction of photoreactivating enzyme in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings. *Photochemistry and Photobiology*, **52**, 861-863.
- Li, S., Paulsson, M. & Bjorn, L. O. (2002). Temperature-dependent formation and photorepair of DNA damage induced by UV-B radiation in suspension-cultured tobacco cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, **66**, 67-72.
- Liu, L., Gitz, D. C. I. & McClure, J. W. (1995). Effects of UV-B on flavonoid, ferulic acid, growth and photosynthesis in barley primary leaves. *Physiologia Plantarum*, **93**, 723-733.

- Logemann, E., Wu, S. C., Schroder, J., Schmelzer, E., Somssich, I. E. & Hahlbrock, K. (1995). Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-related genes. *The Plant Journal*, **8**, 865-876.
- Malanga, G., Kozak, R. G. & Puntarulo, S. (1999). N-acetylcysteine-dependent protection against UV-B damage in two photosynthetic organisms. *Plant Science*, **141**, 129-137.
- Mazza, C. A., Battista, D., Zima, A. M., Szwaberg-Bracchitta, M., Giordano, C. V., Acevedo, A., Scopel, A. L. & Ballaré, C. L. (1999). The effects of solar ultraviolet-B radiation on the growth and yield of barley are accompanied by increased DNA damage and antioxidant responses. *Plant, Cell and Environment*, **22**, 61-70.
- Mazza, C. A., Bocalandro, H. E., Giordano, C. V., Battista, D., Scopel, A. L. & Ballaré, C. L. (2000). Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiology*, **122**, 117-125.
- McKenzie, R., Connor, B. & Boderek, G. (1999). Increased summertime UV radiation in New Zealand in response to ozone loss. *Science*, **285**, 1709-1711.
- McPeters, R. D., Hollandsworth, S. M., Flynn, L. E., Herman, J. R. & Seftor, C. J. (1996). Long-term ozone trends derived from the 16-year combined Nimbus 7/Meteor 3 TOMS Version 7 record. *Geophysical Research Letters*, **23**, 3699-3702.
- Meijkamp, B., Aerts, R., Van de Staaij, J., Tosserams, M., Ernst, W. H. O. & 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* (Ed. by Rozema, J.), pp. 71-99. Leiden, The Netherlands: Backuys Publishers.
- Mepsted, R., Paul, N. D., Stephen, L., Corlett, J. E., Nogués, S., Baker, N. R., Jones, H. G. & Hayes, P. G. (1996). Effects of enhanced UV-B radiation on pea (*Pisum sativum*) grown under field conditions in the UK. *Global Change Biology*, **2**, 325-334.
- Mitchell, D. L., Vaughan, J. E. & Nairn, R. S. (1989). Inhibition of transient gene expression in Chinese hamster ovary cells by cyclobutane dimers and (6-4) photoproducts in transfected ultraviolet-irradiated plasmid DNA. *Plasmid*, **21**, 21-30.
- Mori, T., Nakane, M., Hattori, T., Matsunaga, T., Ihara, M. & Nikaido, O. (1991). Simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or (6,4) photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet-irradiated DNA. *Photochemistry and Photobiology*, **54**, 225-232.

- Musil, C. F. (1995). Differential effects of elevated ultraviolet-b radiation on the photochemical and reproductive performances of dicotyledonous and monocotyledonous arid environment ephemerals. *Plant, Cell and Environment*, **18**, 844-854.
- Naidu, S. L., Sullivan, J. H., Teramura, A. H. & De Lucia, E. H. (1993). The effects of ultraviolet-B radiation on photosynthesis of different aged needles in field-grown loblolly pine. *Tree Physiology*, **12**, 151-162.
- Nakajima, S., Sugiyama, M., Iwai, S., Hitomi, K., Otsoshi, E., Kim, S. T., Jiang, C. Z., Todo, T., Britt, A. B. & Yamamoto, K. (1998). Cloning and characterization of a gene (UVR3) required for photorepair of 6-4 photoproducts in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, **26**, 638-644.
- Noctor, G. & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49**, 249-279.
- Nogués, S., Allen, D., Morison, J. & Baker, N. (1998). Ultraviolet-B radiation effects on water relations, leaf development, and photosynthesis in droughted pea plants. *Plant Physiology*, **117**, 173-181.
- O'Conner, K. A., McBride, M. J., West, M., Yu, H., Trinh, L., Yuan, K., Lee, T. & Zusman, D. R. 1996. Photolyase of *Myxococcus xanthus*, a Gram-negative eubacterium, is more similar to photolyases found in Archaea and "higher" eucariotes than to photolyases of other eubacterium. *Journal of Biological Chemistry*, 271.
- Pang, Q. & Hays, J. B. (1991). UV-B-inducible and temperature-sensitive photoreactivation of cyclobutane pyrimidine dimers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, **95**, 536-543.
- Papadopoulos, Y. A., Gordon, R. J., Mc Rae, K. B., Bush, R. S., Belanger, G., Butler, E. A., Fillmore, S. A. E. & Morrison, M. (1999). Current and elevated levels of UV-B radiation have few impacts on yields of perennial forage crops. *Global Change Biology*, **5**, 847-856.
- Protic-Sabljić, M. & Kraemer, K. H. (1986). One pyrimidine dimer inactivates expression of transfected gene in xeroderma pigmentosum cells. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **82**, 6622-6626.
- Quaite, F., Sutherland, B. & Sutherland, J. (1992). Action spectrum for DNA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion. *Nature*, **358**, 576-578.

- Quaite, E. F., Takanayagi, S., Ruffini, J., Sutherland, J. C. & Sutherland, B. M. (1994). DNA damage levels determine cyclobutyl pyrimidine dimer repair mechanisms in alfalfa seedlings. *The Plant Cell*, **6**, 1635-1641.
- Rao, M. V., Paliyath, C. & Ormrod, D. P. (1996). Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, **110**, 125-136.
- Ries, G., Heller, W., Puchta, H., Sandermann, H., Seidlitz, H. K. & Hohn, B. (2000). Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. *Nature*, **406**, 98-101.
- Robson, M. T., Pancotto, V. A., Flint, S. B., Ballaré, C. L., Sala, O. E., Scopel, A. L. & Caldwell, M. M. 2003. Six years of solar UV-B manipulations affect growth of Sphagnum and vascular plants in Tierra del fuego peatland. *New Phytologist*, **160**, 379-389.
- Rousseaux, M. C., Ballaré, C. L., Giordano, C. V., Scopel, A. L., Zima, A. M., Szwaberg-Bracchitta, M., Searles, P., Caldwell, M. M. & Díaz, S. B. (1999). Ozone depletion and UVB radiation: Impact on plant DNA damage in southern South America. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **96**, 15310-15315.
- Rousseaux, M. C., Ballaré, C. L., Scopel, A. L., Searles, P. S. & Caldwell, M. M. (1998). Solar ultraviolet-B radiation affects plant-insect interactions in a natural ecosystem of Tierra del Fuego (southern Argentina). *Oecologia*, **116**, 528-535.
- Rousseaux, M. C., Scopel, A. L., Searles, P., Caldwell, M. M., Sala, O. E. & Ballaré, C. L. (2001). Responses to solar ultraviolet-B radiation in a shrub-dominated natural ecosystem of Tierra del Fuego (southern Argentina). *Global Change Biology*, **7**, 467-478.
- Sancar, A. (1994). Mechanisms of DNA excision repair. *Science*, **266**, 1954-1956.
- Searles, P., Flint, S., Diaz, S., Rousseaux, M., Ballaré, C. & Caldwell, M. (1999). Solar ultraviolet-B radiation influence on Sphagnum bog and *Carex* fen ecosystems: first field season findings in Tierra del Fuego, Argentina. *Global Change Biology*, **5**, 225-234.
- Searles, P. S., Flint, S. D. & Caldwell, M. M. (2001)a. A meta-analysis of plant field studies simulating stratospheric ozone depletion. *Oecologia*, **127**, 1-10.
- Searles, P. S., Kropp, B. R., Flint, S. D. & Caldwell, M. M. (2001)b. Influence of solar UV-B radiation on peatland microbial communities of southern Argentina. *New Phytologist*, **152**, 212-221.

- Searles, P. S., Flint, S. B., Díaz, S. B., Rousseaux, M. C., Ballare, C. L. & Caldwell, M. M. (2002). Plant response to solar ultraviolet radiation in southern South American *Sphagnum* peatland. *Journal of Ecology*, **90**, 704-713.
- Setlow, R. B. (1974). The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: A theoretical analysis. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **71**, 3363-3366.
- Smith, M. A., Kapron, C. M. & Berrill, M. (2000). Induction of photolyase activity in wood frog (*Rana sylvatica*) embryos. *Photochemistry and Photobiology*, **72**, 575.
- Stolarski, R., Bojkov, R. D., Bishop, L., Zerefos, C., Staehlin, J. & Zawdony, J. (1992). Measured trends in stratospheric ozone. *Science*, **256**, 342-349.
- Sullivan, J. H., Teramura, A. H. & Dillenburg, L. R. (1994). Growth and photosynthetic responses of field-grown sweetgum (*Liquidambar styraciflua*; Hamamelidaceae) seedlings to UV-B radiation. *American Journal of Botany*, **8**, 826-832.
- Sutherland, B. M., Takayanagi, S., Sullivan, J. H. & Sutherland, J. C. (1996). Plant responses to changing environmental stress: cyclobutyl pyrimidine dimer repair in soybean leaves. *Photochemistry and Photobiology*, **64**, 464-468.
- Takanayagi, S., Trunk, J. G., Sutherland, J. C. & Sutherland, B. M. (1994). Alfalfa seedlings grown outdoors are more resistant to UV-induced DNA damage than plants grown in a UV-free environmental chamber. *Photochemistry and Photobiology*, **60**, 363-367.
- Takeda, J., Obi, I. & Yoshida, K. (1994). Action spectra of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase expression in carrot cells in suspension. *Physiologia Plantarum*, **91**, 517-521.
- Takeuchi, Y., Fukumoto, R., Kasahara, H., Sakaki, T. & Kitao, M. (1995). Peroxidation of lipids and growth inhibition induced by UV-B irradiation. *Plant Cell Reports*, **14**, 566-570.
- Takeuchi, Y., Murakami, M., Nakajima, N., Kondo, N. & Nikaido, O. (1996). Induction and repair of damage to DNA in cucumber cotyledons irradiated with UV-B. *Plant Cell Physiology*, **37**, 181-187.
- Taylor, R. M., Nikaido, O., Jordan, B. R., Rosamond, J., Bray, C. M. & Tobin, A. K. (1996). Ultraviolet-B-induced DNA lesions and their removal in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Cell and Environment*, **19**, 171-181.
- Teramura, A. H. & Sullivan, J. H. (1994). Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynthesis Research*, **39**, 463-473.

- Tevini, M. & Iwanzik, W. (1986). Effects of UV-b radiation on growth and development of cucumber seedlings. In: *Stratospheric ozone reduction, solar ultraviolet radiation and plant life* (Ed. by Worrest, R. C. & Caldwell, M. M.), pp. 271-285. Berlin: Springer-Verlag.
- Todo, T., Ryo, H., Yamamoto, K., Toh, H., Inui, T., Hayaki, H., Nomura, T. & Ikenaga, M. (1996). Similarity Among the *Drosophila* (6-4) photolyase, a Human Photolyase Homolog, and the DNA Photolyase-Blue-Light Photoreceptor Family. *Science*, **272**, 109-112.
- Todo, T., Kim, S. T., Hitomi, K., Otsoshi, E., Inui, T., Morioka, H., Kobayashi, H., Ohtsuka, E., Toh, H. & Ikenaga, M. (1997). Flavin adenine dinucleotide as a chromophore of the *Xenopus* (6-4) photolyase. *Nucleic Acids Research*, **25**, 764-768.
- Tosserams, M., Pais de Sa, A. & Rozema, J. (1996). The effect of solar UV radiation on four plant species occurring in a coastal grassland vegetation in The Netherlands. *Physiologia Plantarum*, **97**, 731-739.
- Van de Mortel, T., Buttemer, W., Hoffman, P., Hays, J. B. & Blaustein, A. (1998). A comparison of photolyase activity in three Australian tree frogs. *Oecologia*, **115**, 366-369.
- Waterworth, W. M., Juiang, Q., West, C. E., Nikaido, M. & Bray, C. M. (2002). Characterization of *Arabidopsis* photolyase enzymes and analysis of their role in protection from ultraviolet-B radiation. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1005-1015.
- Wilson, M. I. & Greenberg, B. M. (1993). Specificity and photomorphogenic nature of ultraviolet-B-induced cotyledon curling in *Brassica napus* L. *Plant Physiology*, **102**, 671-677.
- World Meteorological Organization (WMO) (1999). Scientific assessment of ozone depletion: 1998 (Executive Summary). WMO, Geneva, Switzerland.
- Xiong, F. S. & Day, T. A. (2001). Effect of solar ultraviolet-B radiation during springtime ozone depletion on photosynthesis and biomass production of Antarctic vascular plants. *Plant Physiology*, **125**, 738-751.
- Yashuhira, S. & Yasui, A. (1992). Visible light-inducible photolyase gene from the goldfish *Carassius auratus*. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 25644-25647.
- Yasui, K. A., Eker, A. P. M., Yasuhira, S., Yajima, H., Kobayashi, T., Takao, M. & Oikawa, A. (1994). A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals. *EMBO Journal*, **13**, 6143-6151.
- Zaller, J. G., P. S. Searles, M. C. Rousseaux, S. D. Flint, M. M. Caldwell, O. Sala, C. L. Ballaré, and A. L. Scopel. (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.

Zaller, J. G., P. S. Searles, M. M. Caldwell, S. D. Flint, A. L. Scopel, and O. E. Sala. (2003). Growth responses to ultraviolet-B radiation of two *Carex* species dominating an Argentinean fen ecosystem. *Basic and Applied Ecology* **in press**.