

Tesis de Licenciatura

Efectos de la radiación ultravioleta-B solar sobre dos cultivos vegetales

Battista, Daniela

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

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura 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 Six-Year Bachelor's 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:

Battista, Daniela. (). Efectos de la radiación ultravioleta-B solar sobre dos cultivos vegetales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000701_Battista

Cita tipo Chicago:

Battista, Daniela. "Efectos de la radiación ultravioleta-B solar sobre dos cultivos vegetales". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000701_Battista

Efectos de la radiación ultravioleta-B solar sobre dos cultivos vegetales

TESIS DE LICENCIATURA

DANIELA BATTISTA

DIRECTOR: CARLOS BALLARÉ

Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas

Vinculadas a La Agricultura

Facultad de Agronomía

Diciembre de 1999

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Buenos Aires

A mi hermano

Indice

| | |
|--|----|
| Indice ----- | 1 |
| Agradecimientos ----- | 2 |
| Abreviaturas ----- | 3 |
| Resumen ----- | 4 |
| Introducción ----- | 7 |
| La radiación UV y las plantas ----- | 9 |
| Efectos directos del UV-B ----- | 11 |
| Efectos indirectos del UV-B sobre el crecimiento y el desarrollo ----- | 13 |
| Efectos indirectos del UV-B producidos por un aumento de ROS----- | 14 |
| Mecanismos de defensa ----- | 19 |
| Implicancias ecológicas de la radiación UV-B ----- | 21 |
| Objetivo ----- | 27 |
| Materiales y Métodos ----- | 28 |
| Material vegetal y diseño experimental ----- | 28 |
| Análisis bioquímico ----- | 29 |
| Análisis del rendimiento ----- | 31 |
| Resultados ----- | 32 |
| La radiación UV-B afectó el rendimiento ----- | 32 |
| La radiación UV-B promovió un aumento en las respuestas protectoras y de defensa ----- | 34 |
| Efectos del UV-B sobre el daño oxidativo ----- | 42 |
| Discusión ----- | 44 |
| Conclusión ----- | 49 |
| Bibliografía ----- | 50 |

Agradecimientos

Quiero agradecer a Charly por haberme dado un lugar en su grupo de trabajo y por todas las cosa que aprendí con él. También quiero agradecer a Anita sin la cual nunca habría podido hacer este trabajo ya que siempre estuvo para apoyarme y enseñarme y además por haberme tenido siempre tanta confianza y por supuesto por todas las discusiones óxido-reducción que tuvimos. A Marie por haberme recibido con los brazos abiertos, por escucharme sin importar lo que estuviera haciendo, por haberme dado todos los consejos que me dio y sin la cual tampoco habría podido hacer este trabajo. A Carlos porque es gran parte de este trabajo, por haberme ayudado tantas veces a hacer tantas cosas, por estar siempre y por todo lo que me enseñó reiteradas veces (puedo ser bastante dura). A las otras personas que hicieron parte del trabajo que yo no hice y a los otros componentes del grupo por hacer de él un lugar especial, Vero, Carlunchi, Andrés y a vos, pendeja, gracias.

También quiero agradecer a otras personas que estuvieron indirectamente relacionadas con este trabajo. A Javi por haber estado incondicionalmente conmigo durante cuatro años, por todas las cosas que vivimos juntos y por haber compartido conmigo la mayor parte de este seminario. A mis amigos Pao y Ogui porque también estuvieron conmigo todo este tiempo, y siguen estando y a Flor por ser mi mejor amiga, mi otra mitad, porque sin su amistad hubiera sido otra persona.

Por último quiero agradecer a mi familia por haberme escuchado y apoyado siempre. A mi hermano, a Silvi, a Julia (por el mero hecho de existir) y a mis padres. Viejos, gracias por ser mi continente, mi cable a tierra.

Abreviaturas

- UV-A: radiación ultravioleta-A (315-400 nm)
- UV-B: radiación ultravioleta-B (280-315 nm)
- UV-C: radiación ultravioleta-C (100-280 nm)
- CAT: enzima catalasa
- APx: enzima ascorbato peroxidasa
- SOD: enzima superóxido dismutasa
- mda: malondialdehído
- CPD'S: dímeros de pirimidina
- Fd: ferredoxina
- PSI: fotosistema I
- PSII: fotosistema II
- ROS: especies activas de oxígeno
- AsA: ácido ascórbico
- MDA: monodehidroascórbico
- DHA: dehidroascórbico
- RF_{UV}: fluorescencia en el rojo de la clorofila al ser excitada con un pulso de UV
- TBARS: compuestos reactivos al ácido tiobarbitúrico
- UV-B+: Tratamiento con radiación UV-B solar (filtros Aclar)
- UV-B-: Tratamiento sin UV-B solar (filtros mylar)

Resumen

La capa de ozono estratosférico ha disminuido considerablemente en los últimos 20 años especialmente en el hemisferio sur. Como consecuencia de esta disminución se ha observado un aumento en la radiación solar ultravioleta que incide sobre latitudes medias y altas en la superficie terrestre. Hay poca información sobre los efectos de la radiación solar ultravioleta-B (UV-B; 290-315 nm) sobre el crecimiento y el rendimiento de cultivos vegetales y sobre los mecanismos que confieren tolerancia a esta radiación.

Este trabajo analiza los efectos de la radiación ultravioleta-B solar en experimentos de exclusión de dicha banda de radiación realizados a campo en Buenos Aires. Se utilizaron dos cultivos de interés agronómico: uno de época estival, soja, y otro de época invernal, cebada.

Se analizó la sensibilidad al UV-B de estos cultivos a través de cambios en el rendimiento y el daño oxidativo (medido en forma de peroxidación lipídica). Se midieron también los niveles de compuestos absorbentes de UV en la epidermis (compuestos fenólicos o fotoprotectores) y la actividad de enzimas antioxidantes como parámetros de respuesta protectora y de defensa al UV-B.

Los experimentos realizados con cebada permitieron analizar el impacto de la radiación UV-B solar en una época del año donde la intensidad de la radiación es mucho menor a la intensidad en pleno verano. La utilización de dos variedades de cebada, una mutante deficiente en la actividad de la enzima catalasa (RPr 79/4) y su línea madre (Maris Mink) permitieron, a su vez, analizar las diferencias en la respuesta y tolerancia al UV-B de dos variedades con capacidad antioxidante diferente.

En los experimentos realizados con soja se utilizaron varios genotipos correspondientes a distintos grupos de madurez que potencialmente podrían presentar susceptibilidades diferentes al UV-B y variabilidades en las respuestas a dicha radiación. Esto permite hacer un análisis más amplio sobre la interacción entre los mecanismos que confieren tolerancia y el daño generado por el UV-B.

Se observó una disminución en el rendimiento en ambos genotipos de cebada expuestas a la radiación UV-B, pese a un aumento significativo en los niveles de compuestos absorbentes de UV en la epidermis. Los efectos sobre el rendimiento fueron más severos en el genotipo mutante (una disminución en el rendimiento del 39 % frente a un 17 % en el genotipo normal). En los genotipos de soja se observó una tendencia a una disminución del rendimiento con el UV-B a pesar, también, de aumentos significativos en los niveles de compuestos absorbentes de UV en la epidermis. El contenido de estos compuestos varió dependiendo del genotipo. Se observó una relación positiva entre los mismos y el nivel de rendimiento independientemente del tratamiento. De esta forma las diferencias en el contenido de compuestos fotoprotectores entre genotipos podría explicar la variabilidad encontrada en el rendimiento.

La radiación UV-B solar aumentó significativamente la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APx) en el genotipo Maris Mink de cebada. Se detectó una baja actividad de CAT en el genotipo mutante, como era de esperarse, pero se detectaron niveles aumentados de la actividad de APx respecto a su línea madre. No se encontró una respuesta antioxidante al UV-B para este genotipo mutante.

No se encontraron diferencias en el nivel de actividad de CAT y APx entre los seis genotipos de soja analizados. Tampoco se observó una clara respuesta antioxidante al UV-B, ésta fue muy variable dependiendo del genotipo. Se observó, sin embargo, una relación positiva entre la magnitud de la respuesta y los niveles de compuestos fotoprotectores en la epidermis inducidos por el UV-B.

No se observó que la radiación UV-B aumentara la peroxidación lipídica, medida como contenido de malondialdehido (mda) en plantas de soja. Por el contrario, se observó que las plantas crecidas bajo radiación UV-B solar tuvieron niveles de peroxidación menores. Se encontró una tendencia a que el nivel de daño oxidativo sea menor en las plantas con mayor abundancia de compuestos fotoprotectores, independientemente del tratamiento. No se midieron niveles de peroxidación en las plantas de cebada.

Estos resultados muestran que la radiación solar UV-B reduce el rendimiento aun en primavera donde las irradiancias son relativamente bajas. La disminución del rendimiento ocurrió pese a un aumento significativo en los compuestos absorbentes en el UV y en la actividad de las enzimas antioxidantes removedoras de H₂O₂, indicando que los mecanismos protectores no fueron suficientes para mitigar los efectos de esta banda de radiación. La disminución en el rendimiento no se debería, en principio, a un daño oxidativo sino a algún otro tipo de daño.

Los niveles de compuestos absorbentes en el UV determinaron diferencias en los niveles de rendimiento entre los distintos genotipos y en la respuesta antioxidante al UV-B. Esta respuesta antioxidante podría ser la responsable de mitigar en gran parte el daño oxidativo generado por el UV-B. El daño observado en el genotipo mutante de cebada sugiere, a su vez, la importancia de la actividad antioxidante tanto constitutiva como la inducida por el UV-B en la tolerancia a esta radiación.

Introducción

El ozono estratosférico es el responsable de la absorción de la radiación ultravioleta (UV) que incide sobre la tierra. Como consecuencia de la reducción del ozono estratosférico documentada en los últimos veinte años se ha observado un aumento en la transmisión de la radiación solar ultravioleta (Madronich *et al.*, 1998). Este aumento de UV es particularmente notorio sobre la Antártida, pero también está claramente documentado para latitudes medias del hemisferio sur (Mackenzie *et al.*, 1999).

El interés por el aumento en la radiación UV solar ha crecido debido al aumento en la incidencia de cáncer de piel, daño ocular y otros efectos que involucran la salud de los seres vivos en general y por las alteraciones que se producen en los ciclos bioquímicos de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos cuya degradación depende de la exposición a la radiación solar (Caldwell, 1981; Moorhead & Callaghan, 1994). La depleción más importante de ozono se ha observado en la zona antártica durante la primavera. Si bien los valores de radiación en esta época del año son menores que los niveles de radiación que inciden en zonas de latitud baja en verano, es importante comprender y predecir el impacto producido por una mayor incidencia de radiación UV en ecosistemas poco adaptados a dichos niveles de radiación (Mackenzie *et al.*, 1999).

La dosis de radiación UV solar que incide sobre la superficie terrestre es altamente variable. Depende de la latitud, hora del día, estación, día del año, nivel de nubosidad y nivel de ozono. Los mayores niveles de radiación se observan en zonas de latitud baja donde los rayos del sol inciden en forma perpendicular a la superficie terrestre. En las zonas polares donde los rayos del sol llegan en forma más indirecta los niveles son menores (Madronich, 1993). Los niveles de radiación UV también dependen de la presencia de sustancias contaminantes. En algunas zonas es posible que el aumento de radiación UV debido a la reducción del ozono estratosférico se haya visto enmascarada por altos niveles de estas sustancias. Esto sucede principalmente en zonas industrializadas y urbanas (Frederick *et al.*, 1993).

La regiónpectral del UV comprende longitudes de onda que van desde los 100 nm hasta los 400 nm. Una pequeña porción de esta radiación llega a la superficie terrestre y comprende aproximadamente un 7% de la radiación solar de onda corta que impacta en la superficie terrestre. Las longitudes de onda más cortas (y por lo tanto las más dañinas) comprenden el rango que va entre 100-280 nm y corresponden al UV-C. Este tipo de radiación es absorbida completamente por gases atmosféricos; oxígeno (O_2) y ozono (O_3). El rango comprendido entre 280-315 nm corresponde al UV-B. Esta banda de radiación es absorbida solo parcialmente por el ozono. Por último la radiación UV-A comprende el intervalo entre 315-400 nm, es poco absorbida en la estratosfera, y por lo tanto altamente transmitida a la superficie terrestre.

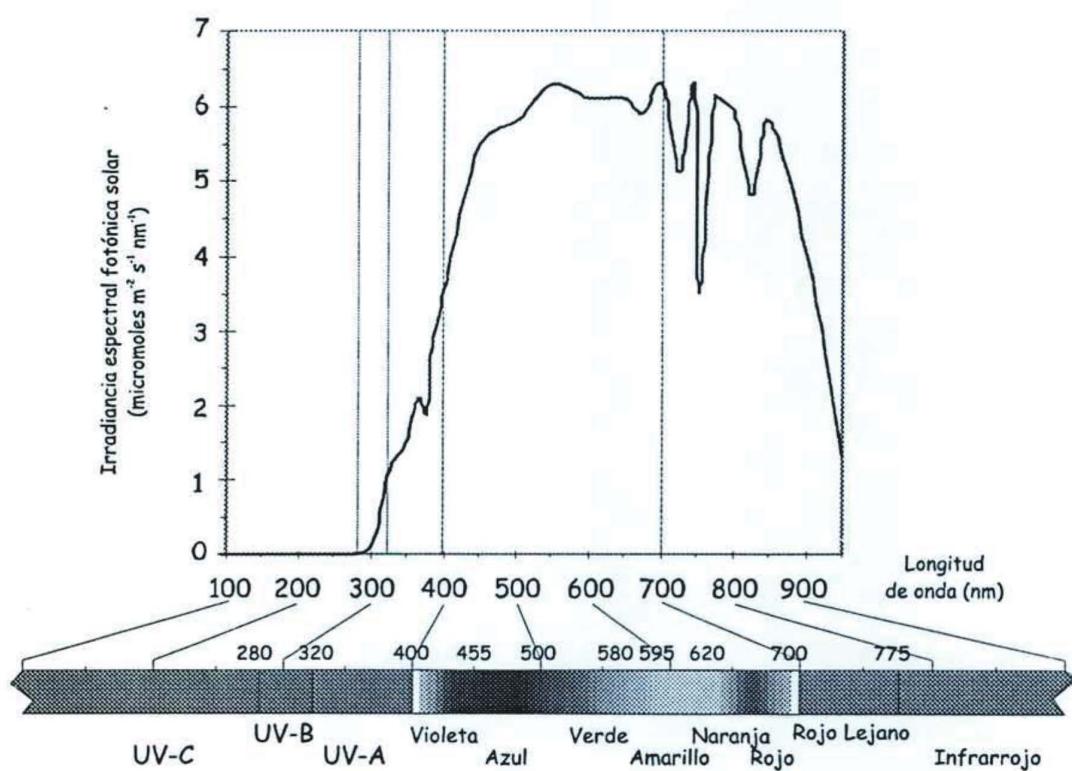
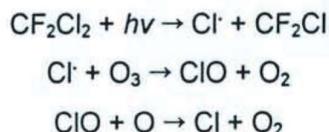


Figura A Espectro de irradiancia del UV solar al mediodía en un día de verano en Corvallis, Oregon, USA. Se muestran las divisiones del espectro de UV.

Si bien la intensidad de radiación del UV-B es menor a la del UV-A muchas respuestas biológicas son mayores en el UV-B debido a la mayor energía que poseen las longitudes de onda más cortas y a que es absorbido por macromoléculas como

proteínas y ácidos nucleicos. Como la radiación UV-B es absorbida solo parcialmente por el ozono, cambios en los niveles de ozono influyen fuertemente sobre los niveles de radiación UV-B que inciden en la superficie terrestre y por lo tanto en las respuestas biológicas (Caldwell, 1981).

Gran parte de la disminución de la capa de ozono se debe a la emisión de compuestos halogenados. Estos compuestos son tan inertes que no son removidos de la atmósfera por precipitación. Al migrar a la estratosfera son expuestos al UV-C solar que causa su fotodisociación. Los clorofluorometanos (CF_2Cl_2 , CFCl_3) se fotodisocian en la estratosfera liberando clorina que actúa como catalizador de la reducción del ozono.



(Solomon, 1990).

Resulta difícil hacer predicciones sobre los niveles de ozono a largo plazo. Hay numerosos factores involucrados además de los niveles de compuestos halogenados. Sin embargo si se tiene en cuenta nada más este factor y se asume que los niveles de radiación dependen exclusivamente del ozono y que éste a su vez depende solamente de la cantidad de compuestos halogenados, se puede hacer una estimación sobre los niveles futuros de incidencia de radiación UV. Esta predicción tiene en cuenta los niveles permitidos de producción de compuestos halocarbonados determinada por el Protocolo de Montreal en 1987 y asume, además, que a partir del año 2000 no habrá más emisión de estos compuestos. Este sería el escenario más optimista y aun así se espera que los niveles de radiación UV que inciden en la superficie terrestre vuelvan a los niveles observados en 1980 recién a mediados del siguiente siglo (Madronich *et al.*, 1998).

La radiación UV y las plantas

Los efectos de la radiación UV en plantas terrestres han sido estudiados en considerable detalle en los últimos 20 años. Se han observado alteraciones en la

morfología y en el crecimiento así como efectos a nivel molecular y celular. Se ha encontrado, por otro lado, una gran variabilidad entre especies y entre variedades diferentes dentro de una misma especie en la sensibilidad al UV-B y en las respuestas que éste genera. Algunas especies son altamente sensibles al UV-B mientras que otras resisten niveles muy superiores a los naturales. La historia de la planta y las condiciones ambientales (ej. nivel de radiación fotosintéticamente activa, nivel de nutrientes, etc.) también influyen sobre esta sensibilidad (Caldwell *et al.*, 1989; Day, 1992).

El UV-B puede dañar directamente una serie de componentes celulares importantes (ej. daño a membranas, daño al ADN, daño al aparato fotosintético, etc.). Estos daños pueden tener consecuencias sobre la fisiología de la planta disminuyendo el crecimiento e induciendo respuestas de protección. Hay, además, evidencias indirectas de efectos del UV-B que podrían estar disparados por fotorreceptores específicos de UV-B. Estos efectos estarían involucrados en los procesos de respuesta y adaptación a esta radiación (Ballaré *et al.*, 1996). Es importante la determinación de fotorreceptores que puedan mediar o modular estas respuestas. Los fotorreceptores serían moléculas que absorben en el UV-B y a causa de su modificación fotoquímica, activan o inhiben alguna vía de trasducción de señales, actuando como segundos mensajeros (Wilson *et al.*, 1995). Entre los cromóforos potenciales del UV se encuentran los ácidos nucleicos, el ácido absísico, ácido indolacético, flavoproteínas, proteínas y ambas formas del fitocromo. Si bien todas estas moléculas absorben en el UV (cada una con sus picos de absorción a distintas longitudes de onda) es difícil la identificación de éstos como cromóforos debido a los grandes cambios que en general una alteración en alguno de ellos pueda generar en la biología celular (Caldwell, 1981). Los espectros de absorción de las moléculas cromóforas se correlacionan con la capacidad de las distintas longitudes de onda de producir una respuesta (espectros de acción). De esta forma se puede especular cual o cuales moléculas están involucradas en determinados tipos de respuestas. La figura B muestra el espectro de absorción de alguno de estos cromóforos.

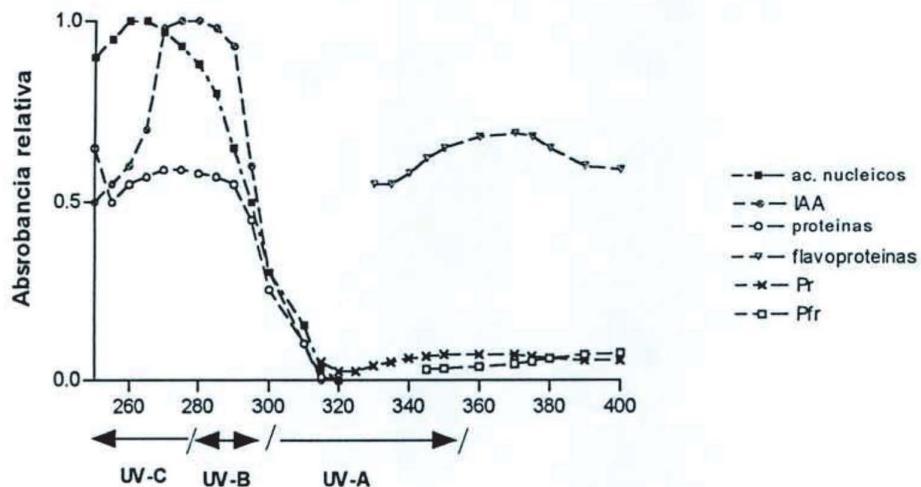


Figura B Espectro de absorción de algunos cormóforos potenciales de UV en plantas. IAA, ácido absfílico, Pfr y Pr, las dos formas del fitocromo.

Efectos directos del UV-B

Entre los efectos más dañinos del UV se encuentra el daño a los ácidos nucleicos. El ADN absorbe en el UV principalmente en el UV-C. Una de las lesiones fotoquímicas más comunes que suceden cuando el ADN absorbe radiación UV es la dimerización de bases pirimidínicas. Los dímeros más comunes y mejor estudiados son los dímeros de pirimidina (CPD's, "ciclobutane pyrimidine dimers") y los 6,4-fotoproductos (pirimidin(6,4)pirimidona) (Stapleton, 1992). Se ha observado que la formación de estos dímeros sucede *in vivo* como consecuencia de la exposición a radiaciones naturales de UV-B (Ballaré *et al.*, 1996). La formación de estos dímeros puede llevar a mutaciones y alteraciones en la transcripción y duplicación del ADN con los consecuentes efectos en la biología celular y la fisiología de la planta. Tanto el ADN nuclear como el mitocondrial y el cloroplástico son sensibles a la radiación UV-B (Bornman & Teramura, 1993).

Las proteínas también se ven afectadas ya que los amino ácidos aromáticos absorben en el UV-B. El triptofano, por ejemplo, sufre fotodegradación. La absorción proteica a estas longitudes de onda puede dar lugar a la formación de fotoproductos

aberrantes con funciones biológicas alteradas. Esto tendrá importantes efectos en la biología de la célula, con alteraciones en la transcripción, actividad enzimática, estructura de la célula, división y diferenciación celular.

Una de las proteínas más afectadas por el UV es la Rubisco (ribulose-1,5-biphosphate carboxylase). Esta proteína, soluble en el estroma de la planta, conforma el 50 % de las proteínas totales de la planta y consta de dos subunidades. Ambas subunidades se ven afectadas por la radiación UV-B; algunos trabajos reportan una disminución de la transcripción de los mensajeros de la proteína (Jordan *et al.*, 1992) y otros una disminución en la actividad de la enzima (Vu, 1984). Otra proteína blanco del UV-B es la tubulina. Esta proteína citoesquelética posee un alto contenido de amino ácidos aromáticos, haciéndola especialmente susceptible. La tubulina tiene un pico máximo de absorción a 280 nm. El UV-B altera su polimerización afectando la división celular (Bornman & Teramura, 1993).

La radiación UV-B también tiene efectos dañinos sobre la fotosíntesis, indirectamente afectando la transcripción de mensajeros de proteínas cloroplásticas y directamente sobre los fotosistemas. El centro de reacción del fotosistema II parece ser especialmente sensible (Teramura & Sullivan, 1994). Se ha observado a su vez menores concentraciones de clorofila debido a la radiación UV-B. Hay trabajos que muestran que el efecto es debido a un aumento en la degradación de la misma (clorosis) y no por una acción específica sobre enzimas involucradas en su biosíntesis (Jordan *et al.*, 1991).

En general estos efectos tan marcados sobre la fotosíntesis y el daño a las proteínas se han observado en experimentos realizados en laboratorio con dosis de radiación UV-B muy altas. En experimentos realizados a campo los efectos observados han sido más moderados. Aparentemente la fotosíntesis de las plantas terrestres es poco sensible al UV-B en condiciones naturales; existen inclusive, trabajos que reportan un aumento de la fotosíntesis con el UV-B en plantas de determinada edad (Deckmyn & Impens, 1995).

Efectos indirectos del UV-B sobre el crecimiento y el desarrollo

Las alteraciones del UV-B a nivel molecular y celular tienen implicancias en la biología general de la planta. El daño producido por el UV-B sobre el ADN, las membranas biológicas y la fotosíntesis tiene efectos directos en el crecimiento y el rendimiento. Una disminución de la duplicación y la transcripción del ADN y una disminución en la tasa fotosintética implican retrasos en el crecimiento. Muchas de las moléculas que se ven afectadas por el UV-B pueden, también, influir en parámetros fisiológicos indirectamente a través de la inducción o inhibición de vías de trasducción de señales. Esto resulta en la modificación de la transcripción génica y de la actividad enzimática y como consecuencia se pueden ver alterados otros parámetros más generales (ej. alteraciones morfológicas, alteraciones en el crecimiento, etc). Muchos de los efectos indirectos del UV-B están asociados a respuestas de adaptación y de defensa. Es posible que algunos de los efectos del UV-B estén mediados por fotorreceptores cuya modificación fotoquímica desencadenen respuestas biológicas particulares. Es posible que algunas de las moléculas que se ven modificadas por el UV-B y que median las respuestas producidas por esta radiación sean moléculas fotorreceptoras cuya modificación fotoquímica desencadena respuestas biológicas particulares (Ros & Tevini, 1995; Barnes *et al.*, 1996; Ballaré *et al.*, 1995; Ensminger, 1993).

Los cambios inducidos por el UV-B en la morfología y el crecimiento de la planta frecuentemente involucran reducción en la biomasa total de la planta (Tevini & Teramura, 1989), inhibición de la expansión foliar, disminución de la elongación del tallo, retraso en la emergencia de las plántulas, alteración en la tasa de crecimiento (Ballaré *et al.*, 1996) y aumento del grosor foliar (Murali *et al.*, 1988).

El rendimiento también puede resultar afectado como consecuencia de la radiación UV-B; se ha observado esto en experimentos de exclusión realizados a campo en el hemisferio norte; aunque los resultados en algunos de estos trabajos han sido controversiales (Deckmyn & Impens, 1995).

Las alteraciones en el desarrollo y la reproducción involucran cambios en el patrón de floración, depresión de la floración y alteraciones en el polen y en su germinación (Flint & Caldwell, 1984).

Efectos indirectos del UV-B producidos por un aumento de ROS

El oxígeno molecular (O_2) puede reducirse para formar moléculas más reactivas. Estas moléculas conocidas como especies activas del oxígeno (ROS) son muy perjudiciales, dañando tejidos y estructuras celulares e interfiriendo en procesos biológicos. Su rápida detoxificación es primordial para prevenir el daño oxidativo; bajo condiciones fisiológicas normales la acumulación de estos compuestos está estrictamente controlada por la acción de enzimas y agentes antioxidantes. El sistema de transporte de electrones de la cadena respiratoria y de la fotosíntesis es una fuente de especies activadas de oxígeno, siendo la fotosíntesis la principal. Es una consecuencia inevitable de la actividad fotosintética en una atmósfera oxigenada. El O_2 puede competir por los electrones del fotosistema I dando lugar a la formación del anión superóxido (O_2^-) mediante la oxidación de la ferredoxina (Fd) reducida del fotosistema I (PSI). El O_2^- generado es dismutado espontáneamente a agua oxigenada (H_2O_2) y O_2 . Esta reacción es acelerada por la acción de una enzima, la superóxido dismutasa (SOD),

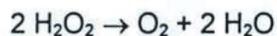


(Foyer *et al.*, 1994a). Existen tres isoformas de la superóxido dismutasa con una localización subcelular diferente. En general la Fe/SOD se encuentra en cloroplastos y peroxisomas, la Mn/SOD en matriz mitocondrial y la Cu,Zn/SOD en citosol.

Si bien la toxicidad del O_2^- y el H_2O_2 es relativamente baja estas especies pueden dar lugar a la formación de radical hidroxilo (OH^-), altamente reactivo, muy inestable y aparentemente responsable de la mayoría de los daños biológicos asociados a ROS. Otra forma altamente reactiva del oxígeno es el singulete de

oxígeno ($\cdot\text{O}_2$) que se forma como subproducto de algunas reacciones enzimáticas, por ejemplo la acción de la lipoxigenasa. No se ha caracterizado aún la enzima que cataliza la conversión del OH^- y del $\cdot\text{O}_2$ pero se sabe que son removidos por antioxidantes no enzimáticos como el α -tocoferol y carotenos (Salin, 1987). También hay otras reacciones enzimáticas que pueden dar lugar a la formación de especies activas del oxígeno, como la acción de la peroxidasa, NADPH oxidasa y xantina oxidasa.

El H_2O_2 generada es destruida por la acción de enzimas específicas. La enzima catalasa (CAT) es una hemoproteína que se encuentra en peroxisomas y cataliza la reacción de conversión del H_2O_2 a O_2 y H_2O :



Esta enzima es importante en la destrucción del H_2O_2 , pero su localización subcelular y su baja afinidad por el H_2O_2 hace que sea poco efectiva en la detoxificación del H_2O_2 generada en el cloroplasto. La enzima ascorbato peroxidasa (APx) es la responsable de esta detoxificación. Se encuentra asociada tanto a la membrana del tilacoide como al estroma y en forma soluble en el citosol (Chen & Asada, 1989). La APx utiliza como dador de hidrógeno al ácido ascórbico (AsA), que se oxida para dar monodehidroascorbato (MDA), éste es reducido nuevamente a ácido ascórbico a través de la ferredoxina o de la enzima monodehidroascorbato reductasa. También el MDA puede espontáneamente pasar a ácido ascórbico y dehidroascórbico (DHA), el cual es convertido en ácido ascórbico a través de la enzima dehidroascorbato reductasa utilizando al glutatión como dador electrónico. De esta forma, bajo condiciones fisiológicas normales, las plantas detoxifican estas moléculas previniendo un daño oxidativo.

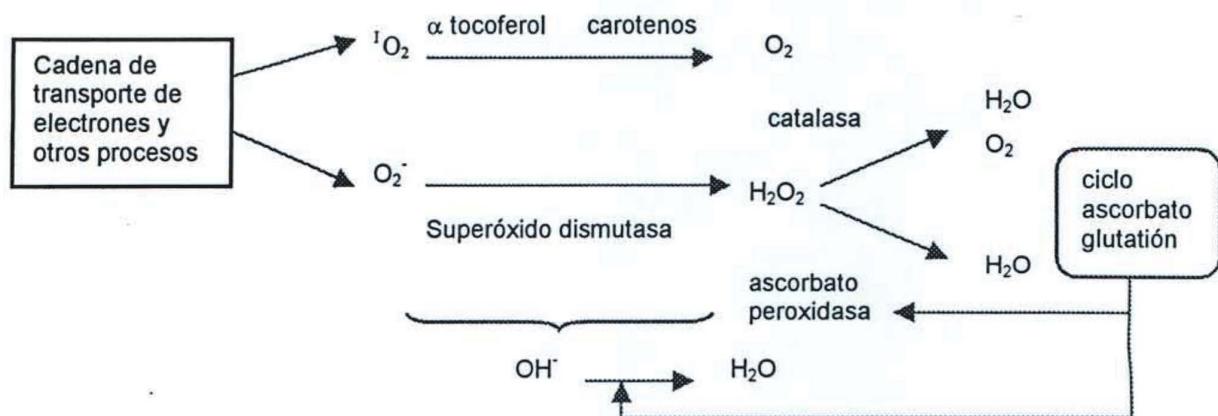


Figura C Representación esquemática de la vía de producción y destrucción de especies activas de oxígeno en tejidos vegetales. Una de las principales fuentes de especies activas de oxígeno es la cadena de transporte de electrones de cloroplastos. El anión superóxido (O_2^-) es removido por la enzima superóxido dismutasa y el agua oxigenada (H_2O_2) es removida por las enzimas catalasa (principalmente en peroxisomas) y ascorbato peroxidasa (en cloroplasto y citosol). El singulete de oxígeno es removido por antioxidantes no enzimáticos como el α tocoferol y carotenos. El radical hidroxilo (OH^-) tiene una vida media muy corta y es muy reactivo. El ciclo ascorbato-glutatión podría llegar a atrapar a este radical; se necesitan, sin embargo, altas concentraciones de ascorbato (Foyer *et al.*, 1994b).

Existen varias vías por las que se pueden generar ROS debido a la actividad fotosintética. Cuando la cadena de transporte de electrones se ve alterada la clorofila excitada no puede transferir su energía a los centros de reacción de los fotosistemas y como consecuencia esta energía puede excitar al oxígeno llevándolo al estado de singulete. Esto puede ocurrir en situaciones en las que las membranas de transporte se encuentran dañadas, por falta de algunos nutrientes específicos o cuando los estomas se encuentran cerrados, por ejemplo durante una sequía. A su vez bajo condiciones de alta intensidad lumínica la reducción del PSI puede exceder la capacidad de fijación del CO_2 , limitándose de esta forma la oxidación del NADPH y su disponibilidad para el PSI. En esta situación el O_2 compite por los electrones del PSI dando lugar a la formación de O_2^- . Bajo intensidades lumínicas moderadas algunas situaciones de estrés también pueden llevar a un aumento de O_2^- . Las temperaturas bajas o una disminución en la disponibilidad de CO_2 limitan la capacidad de fijación del CO_2 dando lugar a la formación de O_2^- (Allen, 1995).

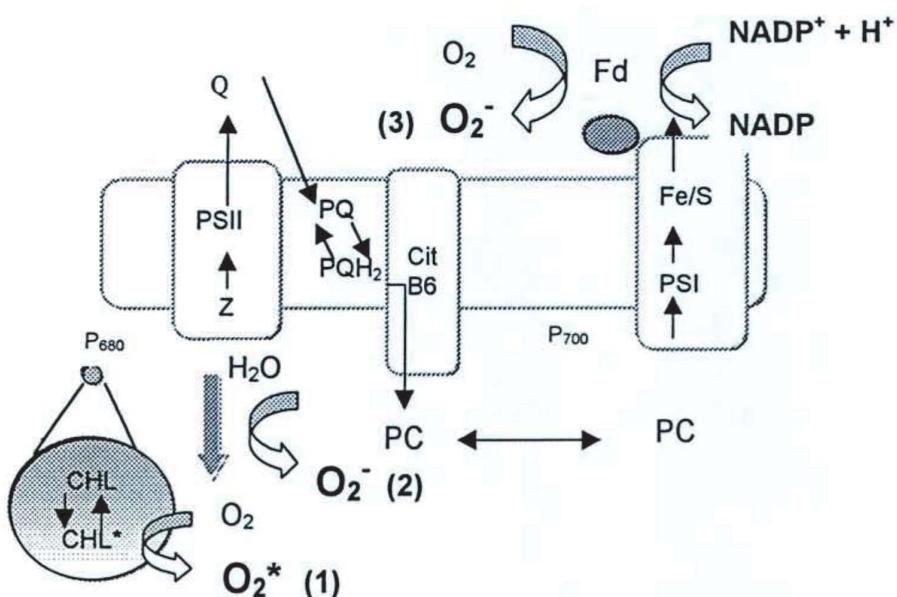


Figura D Representación esquemática de la cadena de transporte de electrones de la membrana del tilacoide donde se muestran tres posibles sitios de producción de especies activas de oxígeno. (1) La clorofila normalmente transfiere su energía de excitación a los centros de reacción de los fotosistemas. Bajo condiciones que previenen la utilización de la energía lumínica por parte de la cadena de electrones esta energía puede pasar al oxígeno generando el singulete de oxígeno. (2) También se puede formar anión superóxido como una pérdida de electrones hacia el oxígeno molecular (O_2) luego de la fotólisis del agua en el lado oxidativo del fotosistema II (PSII). (3) El fotosistema I (PSI) puede reducir el oxígeno bajo condiciones en las que la disponibilidad del NADP se encuentra limitada. Las flechas angostas indican flujo de electrones; CHL, clorofila; CHL*, clorofila excitada; PC, plastocianina; PQ, plastoquinona; PQH₂, plastoquinona reducida; Cit_{B6}, citocromo B6; Fd, ferredoxina

Una situación ambiental que sature el poder reductor de la célula o que impida la oxidación del NADPH va a estimular la formación de O_2^- mediante este mecanismo. Otras situaciones de estrés también pueden llevar a un aumento de ROS por vías diferentes. Si la capacidad antioxidante se ve alterada se producirá, como consecuencia, un aumento en el contenido de ROS. Un mecanismo estudiado como posible generador de O_2^- es la actividad de una enzima de membrana conocida como NADPH oxidasa. Esta enzima transfiere electrones del NADPH al O_2 . Las células neutrófilas de la sangre de los mamíferos producen O_2^- ; esta producción ha sido asociada a la NADPH oxidasa. En plantas de arroz la producción de O_2^- es dependiente de NADH y NADPH y es inhibida por inhibidores de la NADPH oxidasa de

neutrófilos (Murphy & Chung-Kyoong Auh, 1996). Se ha observado que las infecciones por patógenos en plantas estimulan un aumento en los ROS a través de un aumento en la actividad de esta enzima (Surplus *et al.*, 1998). La radiación UV-B aparentemente aumentaría los niveles de ROS mediante la estimulación de esta enzima. Hay trabajos que reportan un aumento en la actividad de la NADPH oxidasa luego de un tratamiento con UV-B (Rao *et al.*, 1996). Si bien el mecanismo no es muy claro, se ha demostrado que la radiación UV-B aumenta el contenido de ROS y con ello un aumento del daño oxidativo (Kim, 1996; MalAnaga & Puntarulo, 1995, Murphy & Huerta, 1990).

El aumento de las especies reactivas del oxígeno debido a condiciones de estrés provoca alteraciones a nivel celular, dañando membranas y alterando a biomoléculas. Una de las moléculas blanco es el ADN que es atacado por el anión hidroxilo vía la reducción del H_2O_2 . Los radicales libres reaccionan también con las uniones carbono-carbono insaturadas, siendo las membranas celulares las más perjudicadas. Este proceso involucra la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados a través del anión superóxido (Pelle *et al.*, 1990). Como producto de la peroxidación lipídica se libera un compuesto denominado malondialdehído (mda). La detección de este compuesto se ha utilizado frecuentemente como indicador de daño oxidativo (Kramer *et al.*, 1991; Takeuchi *et al.*, 1995).

Los radicales libres, tan dañinos para la planta en altas concentraciones, pueden tener efectos beneficiosos y ser totalmente necesarios en concentraciones bajas. Forman parte del sistema de alerta de las plantas frente a situaciones de estrés, actuando como segundos mensajeros de forma tal que la planta puede responder y enfrentarse a una situación ambiental adversa (Foyer *et al.*, 1994b). Se ha observado también que los radicales libres podrían tener un rol en la defensa contra patógenos, estimulando la expresión de genes que confieren resistencia a los mismos (Green & Fluhr, 1995). Por otro lado participan en los mecanismos de muerte celular programada y apoptosis y son responsables en gran medida de la senescencia celular (Khan & Wilson, 1995). Aparentemente también podrían estimular la transcripción de las mismas enzimas antioxidantes que luego los eliminan (ej. APx, CAT) (Rao *et al.*, 1996). De esta forma una estricta regulación de la concentración de estas especies, vía la acción de los agentes antioxidantes, juega un importante rol en la biología celular.

Mecanismos de defensa

Los mecanismos de defensa de las plantas a la radiación UV-B pueden clasificarse esencialmente en dos categorías; los que permiten reducir la penetrancia de la radiación UV-B y los que reparan el daño generado. Ambos mecanismos están involucrados en los procesos de adaptación y aclimatación que surgen como consecuencia de la exposición a la radiación UV (Caldwell, 1981). Estas respuestas involucran cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares.

Entre los mecanismos que evitan la exposición a la radiación se encuentran los cambios en la inclinación de las hojas, el aumento del grosor foliar y la disminución del área foliar con una disminución en la penetración del UV-B a capas más internas debido a un aumento en el camino óptico de los fotones que inciden en su superficie (Murali *et al.*, 1988; Wilson & Greenberg, 1993).

Otra forma de disminuir la penetración del UV-B es mediante la acumulación de compuestos fotoprotectores en la epidermis. De hecho, se ha observado que la mayor parte de la radiación UV-B que incide en las hojas es absorbida en la epidermis (Teramura & Sullivan, 1994). Los flavonoides son una serie de derivados fenólicos que se sintetizan a partir de la fenilalanina. En general son solubles en agua y se acumulan en las vacuolas de las células epidérmicas y las paredes celulares (Roberecht & Caldwell, 1978). Entre los flavonoides hay algunos que absorben en el UV preferentemente en el UV-B, con un pico de absorción alrededor de los 295 nm. Estos compuesto absorbentes en el UV protegerían a la planta de la radiación UV-B impidiendo que llegue a capas celulares más internas (Beggs *et al.*, 1986).

La síntesis de flavonoides y de intermediarios en su vía biosintética es inducida por el UV-B a intensidades que reflejan las naturales (Tevini *et al.*, 1981; Cen & Bornman, 1993). El efecto protector de estos compuestos se ha observado en ciertos experimentos a través de la disminución del daño a la fotosíntesis (Tevini *et al.*, 1991). También se ha observado una mayor sensibilidad a la radiación UV-B en plantas mutantes deficientes en la síntesis de fenilpropanoides (Li *et al.*, 1993). Estos experimentos muestran el rol que cumplirían los derivados fenólicos en la protección al UV-B y en los mecanismos que confieren resistencia a esta radiación.

La enzima chalcona sintetasa es la enzima inicial en la vía de síntesis de los flavonoides. La radiación UV-B estimula la biosíntesis de estos compuestos a través de la regulación en la transcripción de esta enzima y de otras enzimas de la misma vía (Hahlbrock & Grisebach, 1979; Li *et al.*, 1993). Aparentemente esta regulación involucra cambios en el calcio intracelular, calmodulina, serina/treonina kinasa y actividad fosfatasa (Christie & Jenkins, 1996). La transcripción de esta enzima puede ser estimulada también por otras situaciones de estrés como una infección por patógeno, sequía, temperaturas extremas (Christie *et al.*, 1994). Éste podría ser un nodo en el que convergieran las distintas vías de respuesta y un posible mecanismo que explique el fenómeno de tolerancia cruzada (Hahlbrock & Scheel, 1989).

Entre los mecanismos que se encargan de reparar el daño generado se encuentra la fotoreparación del ADN y la respuesta de la maquinaria antioxidante.

Muchos de los efectos dañinos de la radiación UV-B pueden ser revertidos por exposición a luz en el rango del azul o del UV-A. Este fenómeno es conocido como fotoreactivación y es debido a la reparación del ADN. La enzima responsable es la fotoliasa. Esta enzima se une al ADN y monomeriza los CPD's. Es activada por longitudes de onda entre los 350-450 nm. Se ha observado que la fotoreactivación es capaz de revertir, en parte, algunos efectos del UV-B como la inhibición del crecimiento, inducción de los flavonoides (Beggs *et al.*, 1985) y aumento en la tasa de mutación (Britt, 1995).

Hay varios trabajos que reportan un aumento de la actividad antioxidante como consecuencia de la radiación UV-B. Se ha observado un aumento tanto de la actividad enzimática antioxidante, SOD, CAT, APx, como la acumulación de compuestos antioxidantes no enzimáticos, α -tocoferol y carotenos (Malanaga & Puntarulo, 1995; Dai *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 1996). Los antioxidantes cumplen un importante rol en la defensa contra el estrés oxidativo disminuyendo la concentración de especies activas de oxígeno en una situación de estrés y manteniendo un tono basal en condiciones normales. Plantas mutantes que sobreexpresan alguna de las enzimas antioxidantes suelen tener menos daño oxidativo y ser más tolerantes a la radiación UV-B (Allen, 1995). De todas formas la mayoría de estos experimentos han

sido realizados en cámara o invernáculos con condiciones artificiales de radiación UV-

B. Hay pocos trabajos que analizan estas respuestas en condiciones naturales.

El mecanismo por el cual la radiación UV-B induce un aumento en los niveles de enzimas antioxidantes no está del todo determinado. Aparentemente esta inducción es vía un aumento de los radicales libres; éstos actuarían como segundos mensajeros estimulando su transcripción. El rol de los radicales libres como segundos mensajeros ha sido demostrado en varios trabajos siendo el agua oxigenada uno de los candidatos más fuertes (Khan & Wilson, 1995; Yalpani *et al.*, 1994). Aparentemente el agua oxigenada también induce la expresión de genes relacionados con la síntesis de flavonoides. Esto resulta interesante ya que los flavonoides pueden cumplir un rol antioxidante debido a la gran cantidad de grupos hidroxilo que presentan.

Implicancias ecológicas de la radiación UV-B

Existe una gran variabilidad en la sensibilidad al UV-B entre distintas especies y distintos cultivares dentro de una misma especie. Esta diferencia en la sensibilidad puede influir sobre las interacciones intra e interespecíficas y, como consecuencia, alterar el balance competitivo. Los cambios morfológicos, las alteraciones en el patrón de floración y en el desarrollo producidas por el UV-B influyen en la competencia entre poblaciones. Cuando la competencia interespecífica se ve afectada la composición relativa de una comunidad vegetal se ve alterada también (van der Leun *et al.*, 1995). Estas alteraciones pueden darse sin cambios en la productividad primaria de la comunidad y sin cambios en la biomasa total o en la tasa de fotosíntesis de la población. De esta forma la radiación UV-B puede tener efectos importantes en un ecosistema sin que haya un aumento del daño o una disminución en la acumulación de biomasa. Cambios en la arquitectura de la planta y en la distribución de biomasa solamente, pueden alterar el patrón de sucesión y la composición de especies de una comunidad natural (Barnes *et al.*, 1996).

La radiación UV-B puede alterar el contenido de compuestos químicos (nitrógeno, hidratos de carbono, compuestos fenólicos, etc.) de una planta y esto a su vez puede alterar la sensibilidad a enfermedades y al ataque de insectos (Paul *et al.*, 1997). Hay trabajos que reportan una disminución en el ataque de insectos con un

aumento de la radiación UV-B (Mazza *et al.*, 1999a, Ballaré *et al.*, 1996). Por otro se ha observado que las enfermedades debidas a hongos son más severas en plantas expuestas a radiación UV-B. Parece haber más de un tipo de efecto de la radiación UV-B en la interacción planta-patógeno ya que la respuesta no solo varía entre especies sino en el momento de aplicación del patógeno.

El siguiente esquema representa los efectos de un aumento de la radiación UV-B solar debido a una disminución en la capa de ozono estratosférico.

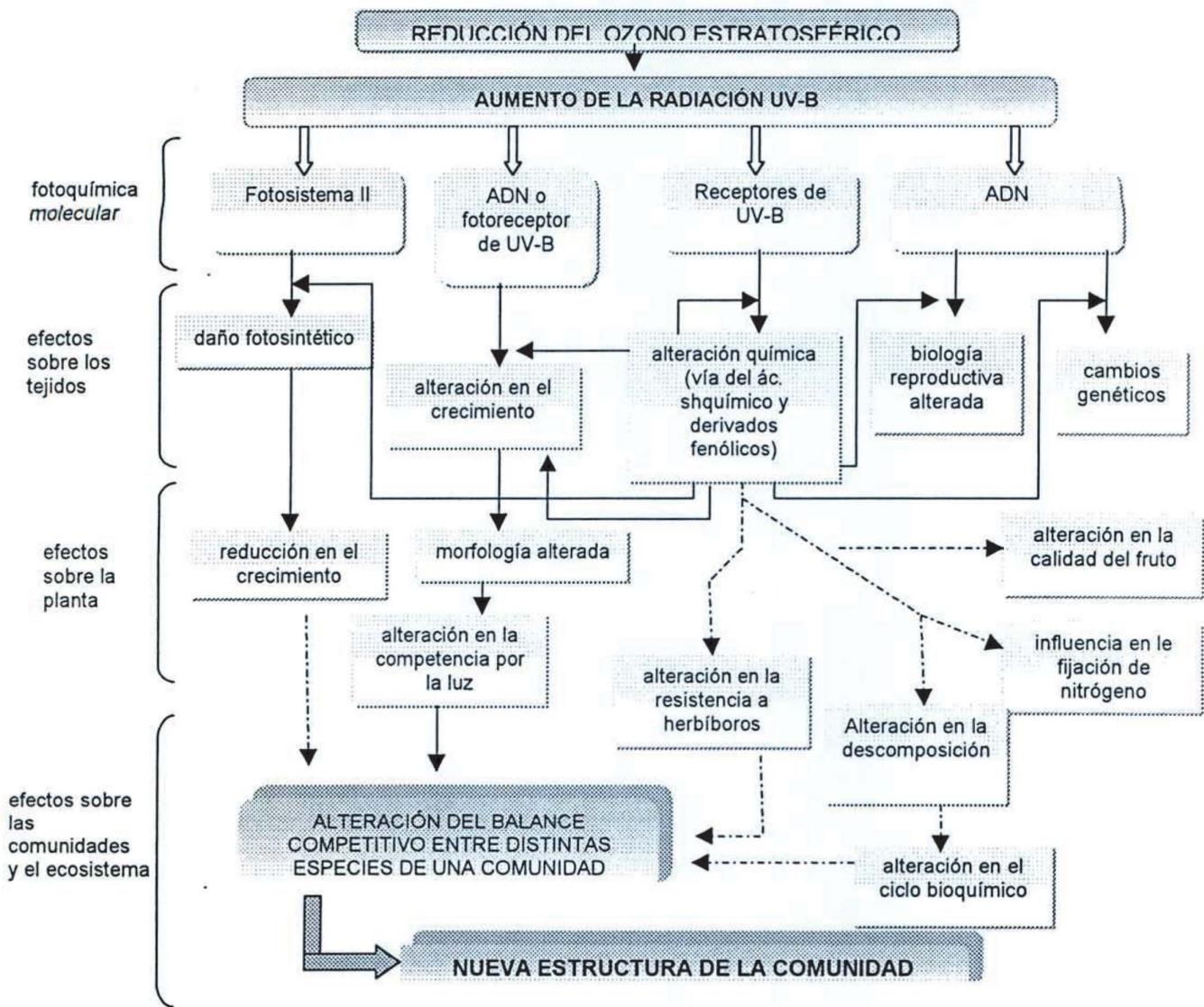


Figura E Posibles consecuencias de una disminución del ozono estratosférico y un aumento en la radiación UV-B solar en plantas superiores. Se muestran distintos niveles de integración, desde fotobioquímica molecular hasta ecosistemas. Se muestran posibles fotorreceptores que mediarián los cambios fisiológicos y genéticos indicados. Las flechas sólidas indican interacciones para las cuales existe evidencia experimental. Las flechas punteadas indican interacciones para las cuales aún no hay una evidencia experimental directa. Las flechas que salen del cuadro de la vía fenólica hacia arriba indican que un aumento en el contenido de compuestos UV absorbentes serviría de filtro reduciendo la radiación percibida por los fotorreceptores (Caldwell, 1989).

En general los experimentos a campo en condiciones naturales de radiación solar han aportado información sobre respuestas morfológicas y de crecimiento mientras que experimentos realizados en laboratorio bajo condiciones de radiación UV artificiales han aportado información sobre los efectos del UV a nivel celular. Si bien los experimentos llevados a cabo en laboratorios han sido de gran importancia en la caracterización de ciertas respuestas a la radiación UV-B, las radiaciones utilizadas no siempre reflejan las radiaciones que ocurren en la naturaleza. Las intensidades de radiación UV-B utilizadas suelen ser mucho más altas que las naturales. En varios estudios se utilizan sistemas de irradiancia que emiten una gran proporción de radiación UV en el rango del UV-C y cuyo balance espectral presenta relaciones distorsionadas entre la radiación fotosintéticamente activa y el UV-B. Estas alteraciones influyen o modulan los efectos y las respuestas de las plantas a la radiación UV-B. Es posible que bajo condiciones naturales algunas respuestas prevalezcan por sobre otras y que esta relación o interacción se invierta o se vea modificada bajo condiciones artificiales. La extrapolación de los resultados de estos experimentos para estimar los efectos del UV-B solar no es válida, y tiende a sobreestimar las alteraciones que el UV-B produce (Fiscus & Booker, 1995). En general los efectos observados en experimentos a campo son menos dramáticos (Deckmyn & Impens, 1995).

En los experimentos en laboratorio se ha observado que la radiación UV-B daña considerablemente la fotosíntesis, el ADN y produce daño oxidativo (Wilson *et al.*, 1995; Takeuchi *et al.*, 1995; Malanga & Puntarulo, 1995; Sullivan & Teramura, 1993). A su vez se ha observado la inducción de respuestas de protección como la acumulación de compuestos fotoprotectores y aumento en la respuesta antioxidante (Rao *et al.*, 1999; Grace & Logan, 1996). Estos parámetros han sido estudiados en menor detalle en experimentos realizados a campo. Hay algunos trabajos realizados con lámparas que suplementan la radiación UV-B solar. Mackerness *et al.* (1998) muestra una disminución de la expresión de algunos genes fotosintéticos aparentemente mediado por ROS en experimentos de suplementación. Sin embargo, de la mayoría de los experimentos realizados a campo surge que, en general, la fotosíntesis no se ve afectada (Fiscus & Booker, 1995). Algunas respuestas adaptativas como el aumento en el grosor foliar y en el contenido de compuestos fotoprotectores inducido por estas radiaciones de UV-B podrían proteger al sistema fotosintético (Teramura & Sullivan,

1994). Se han observado también diferencias en la respuesta antioxidante. Hay trabajos que muestran un aumento en el daño oxidativo y la respuesta antioxidante mientras que otros trabajos no han detectado diferencias en estos parámetro en experimentos de suplementación (Kim *et al.*, 1996; Dai *et al.*, 1997). También se ha observado un aumento en los CPD's en plantas cercidas a campo con radiaciones naturales de UV-B (Stapleton *et al.*, 1997)

Resulta difícil la generalización sobre los efectos del UV-B en el rendimiento y el crecimiento. La gran variabilidad encontrada (Sinclair *et al.*, 1994; Teramura *et al.*, 1990; Sullivan *et al.*, 1994) surge no sólo de diferencias en la suceptibilidad de las distintas especies vegetales analizadas sino también de diferencias en los diseños experimentales, la falta de experimentos a largo plazo y la interacción de estos factores con otros factores ambientales (Deckman & Impens, 1995; Teramura & Sullivan, 1994). El conocimiento de los mecanismos que confieren tolerancia y sensibilidad al UV-B es importante para poder predecir los efectos de un aumento de la radiación UV-B debido a una disminución del ozono estratosférico. La participación de las respuestas a nivel bioquímico en la tolerancia a la radiación UV-B solar no ha sido estudiada en detalle. Una pregunta que surge de estas consideraciones es qué rol cumplen los mecanismos de defensa y protección (ej. acumulación de compuestos fotoprotectores, antioxidantes) en la tolerancia al UV-B. Las discrepancias encontradas entre los experimentos llevados a cabo en condiciones artificiales y a campo sugiere la importancia de realizar experimentos en condiciones naturales donde se puedan sacar conclusiones más realistas sobre la participación de las respuestas adaptativas en la tolerancia al UV-B. Además no se ha estudiado con mucho detalle la importancia de algunas alteraciones que induce el UV-B en la tolerancia y supervivencia de la planta. Se ha observado, por ejemplo, que el daño al ADN (en forma de CPD's) aumenta considerablemente con el UV-B tanto en condiciones de campo como de laboratorio, sin embargo no se ha determinado aun su importancia fisiológica así como tampoco la importancia de los mecanismos de reparación en condicionar la sensibilidad al UV-B.

Los experimentos realizados en este trabajo se hicieron con plantas crecidas en experimentos a campo, en condiciones naturales de radiación UV-B, a fin de determinar el impacto de niveles corrientes de esta radiación en Buenos Aires sobre el rendimiento de dos cultivos de interés agronómico. La utilización del cultivo de cebada

permitió evaluar el efecto del UV-B en una época del año (primavera) donde las radiaciones son mucho menores que en verano. Por otro lado se estudió la actividad antioxidante a fin de determinar si el UV-B en estas condiciones es suficiente para provocar un daño oxidativo y una consecuente respuesta antioxidante. Se estudiaron además los niveles de compuestos fotoprotectores como posibles moduladores de la sensibilidad al UV-B.

Objetivo

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el impacto de la radiación UV-B solar sobre el rendimiento de dos cultivos (tanto de época estival como invernal) y caracterizar posibles factores que modulen la tolerancia de las plantas a la radiación UV-B.

Los objetivos particulares fueron:

1. Estudiar el efecto de la radiación UV-B solar en el rendimiento de los diferentes genotipos.
2. Estudiar la respuesta fotoprotectora al UV-B como la acumulación de compuestos absorbentes en el UV.
3. Estudiar el daño oxidativo y la respuesta antioxidante.
4. Correlacionar algunas de las respuesta bioquímicas analizadas para cada genotipo con los niveles de rendimiento.

Materiales y Métodos

Material vegetal y diseño experimental

Todos los experimentos fueron realizados en el IFEVA (CONICET), Cátedra de Fisiología, Facultad de Agronomía (UBA). Las semillas de cebada (*Hordeum vulgare L.*) del genotipo mutante RPr 79/4 y de su línea madre Maris Mink (Kendall et al., 1983) fueron plantadas en cubos plásticos de 300 ml el 10 de junio de 1997. Se plantaron dos genotipos uno deficiente en la actividad de catalasa. Las semillas emergieron bajo filtros de poliéster (Mylar-D, 0.1mm de grosor) que corta las longitudes de onda por debajo del UV-B (tratamiento UV-B-) o bajo filtros de acetato (Aclar, 0.04 mm de grosor) que tiene una alta transmitancia en el UV (tratamiento UV-B+). Unos 25 días después las plantas fueron transplantadas a la tierra bajo parcelas de 1 x 1-m. Se realizaron tres parcelas por tratamiento (tres repeticiones verdaderas). Las plantas fueron cosechadas en diciembre de 1997.

Las semillas de soja fueron plantadas directamente en la tierra bajo filtros de Aclar o Mylar en parcelas de 1,3 x 1,3-m; cuatro parcelas por tratamiento. El día de siembra fue el 5 de diciembre de 1997. Se sembraron 6 genotipos diferentes: PI 423853 (PI), Charata-76 (CH), Dekalb 458 (DK), Nidera A5308 (A53), RR-A5634 (RR) y Williams (W). Cada genotipo corresponde a un grupo de madurez diferente asociado a un número en particular que está relacionado con el momento de floración. Los grupos de madurez correspondientes a cada genotipo son: CH (7,0), PI (6), RR (5,6), A 53 (5,3), DK (4,58) y W (3,0). Este experimento (grupo 1) se utilizó para todas las mediciones bioquímicas. Se realizó, además, un experimento paralelo en el que se sembraron solamente 4 genotipos, CH, A53, PI y W. Hubo dos fechas de siembra, el 22 de noviembre para CH y W y el 29 de noviembre para A53 y PI. Este grupo de parcelas (grupo 2) se hizo con fines que exceden el tema de este seminario, pero se utilizaron (exclusivamente) en el análisis del rendimiento en conjunto con los datos del grupo 1.

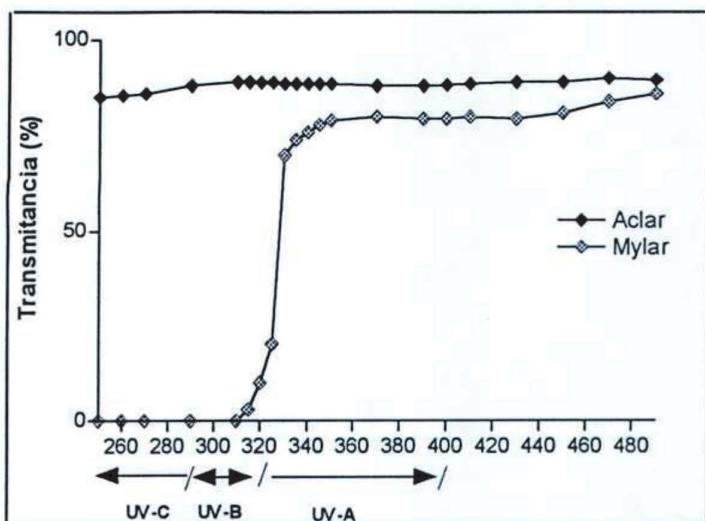


Figura F Transmitancia en el UV para los dos filtros utilizados. Aclar (tratamiento UV-B+), Mylar (tratamiento UV-B-). Se muestran las divisiones dentro del espectro del UV

Análisis bioquímico

Las muestras para la determinación de la actividad enzimática, del contenido de compuestos absorbentes en el UV y la peroxidación lipídica fueron siempre recolectadas al mediodía en días soleados. Se recolectó la hoja más joven totalmente expandida y para todas las determinaciones enzimáticas se tomaron tres repeticiones por bloque. Las muestras fueron inmediatamente envueltas en papel de aluminio y puestas en nitrógeno líquido.

Para la determinación de la actividad de la catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APx) se pesaron 100 mg de tejido que fueron homogeneizados en 1 ml de HEPES 50 mM (pH 7,5) conteniendo 0,1 mM EDTA y PVP y centrifugados 20 minutos a 9500 g a 4 °C. La actividad enzimática fue medida en el sobrenadante. La actividad de CAT fue medida como la velocidad de descomposición del H₂O₂ medida espectrofotométricamente a 240 nm por 60 segundos en un buffer de reacción conteniendo 50 mM de buffer fosfato de potasio (pH 7,0) 24 mM de H₂O₂ y 20 µl de muestra en un volumen final de 600 µl (Aebi, 1984). La actividad de APx fue medida

espectrofotométricamente a 290 nm como la velocidad de descomposición del ácido ascórbico por 30 segundos. El buffer de reacción contenía 50 mM de buffer fosfato de potasio (pH 7,0) 0,1 mM EDTA, 0,5 mM de ascorbato y 20 µl de muestra en un volumen final de 620 µl. La reacción se inició agregando 3 µl de 9,8 mM de H₂O₂. No se necesitó hacer una corrección para la oxidación del ascorbato en ausencia de muestra (Nakano & Asada, 1981).

El contenido de compuestos absorbentes en el UV (o compuestos fenólicos) se midió en forma diferente para los experimentos realizados con cebada y con soja. En cebada el contenido de estos compuestos se midió tomando discos de aproximadamente 0,45 cm de diámetro que fueron colocados en 1,4 ml de 99:1 metanol-HCl por 48 hs a 4 °C y midiendo la absorbancia a 305 nm (A₃₀₅). Se tomaron entre 4 y 8 discos por bloque. Todos los datos fueron corregidos por el peso seco de cada disco. El peso seco se determinó luego de secar los discos a 70 °C por 4 hs.

Para los experimentos realizados con soja se utilizó una técnica puesta a punto en el laboratorio. Se analizó la intensidad de la fluorescencia en el rojo de la clorofila a partir de un pulso de radiación UV (RF_{UV}) como medida de la penetrancia del UV a través de la epidermis foliar. A mayor cantidad de compuestos fotoprotectores la intensidad de UV que llega al mesófilo es menor y por lo tanto es menor la emisión en el rojo de la clorofila. De esta forma se pueden detectar variaciones en los niveles de compuestos que absorben en el UV mediante variaciones en la fluorescencia de la clorofila. Las mediciones de fluorescencia se hicieron con un Fluor-S Multilmager (BioRad) según lo descripto por (Mazz *et al.*, 2000). El pulso de UV se dio con un epiiluminador a 302 nm. La detección de la señal se realizó con una cámara del mismo aparato. Se tomaron discos de 0,4 cm de diámetro (cuatro discos por bloque) y se colocaron sobre planchas de papel saturadas en agua. El tiempo de integración de la señal fue de 30 segundos.

El nivel de daño oxidativo se midió a través del análisis de la peroxidación lipídica. Se midieron los niveles de malondialdehído (mda), principal producto de la reacción de peroxidación. Se tomaron 80 mg de tejido y fueron homogeneizados en 1,3 ml de buffer fosfato de potasio (pH 7,4). Las muestras fueron centrifugadas a 1500 g por 15 min a 4 °C. Se guardaron 300 µl del sobrenadante para la determinación

proteica y se tomaron otros 830 μl a los que se la agregaron 530 μl de 30 % (v/v) de ácido tricloroacético (TCA) y 70 μl de 4 % (v/v) de hidroxitolueno botulado (BHT). Se dejaron 30 min en hielo y luego fueron centrifugados a 2000 g por 10 min a 4 °C. Se tomaron 800 μl del sobrenadante y se mezclaron con 800 μl de ácido tiobarbitúrico (TBA). Se midió la absorbancia del complejo mda-TBA a 535 nm luego de dejar las muestras 50 min a 95 °C. El contenido de mda (en mMoles) se determinó a partir de una curva de calibración realizada con mda preparado a partir de 1,1,3,3-tetramethoxypropano sometido a la misma reacción con el TBA (ϵ del MDA-TBA a 535 nm: $13.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los datos están expresados como compuestos reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en función de los mg de proteínas en el primer sobrenadante (Esterbauer & Cheeseman, 1990; Bartoli, 1995).

Para todas las determinaciones proteicas se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976).

Análisis del rendimiento

Para evaluar el efecto del UV-B sobre el rendimiento se midió el peso seco de las semillas luego de 48 hs a 70 °C. La cebada fue cosechada en diciembre de 1997 y la soja en mayo de 1998.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa PROC GLM del SAS V 6.12 (SAS Institute, Cary, NC). Los datos fueron transformados cuando no se cumplió el supuesto de normalidad.

Resultados

La radiación UV-B afectó el rendimiento

Las plantas de cebada deficientes en la actividad de CAT (RPr 79/4) presentaron grandes zonas dañadas y aclaróticas y fueron mucho más pequeñas que las normales (Maris Mink). El grado de daño que presentaron estas plantas se puede ver reflejado en los bajos niveles de rendimiento que tuvieron para ambos tratamientos. También se observó que la radiación UV-B disminuyó el rendimiento en ambos genotipos (figura 1). Esta diminución fue más marcada en el genotipo mutante que en el normal (39% vs 17 %).

Se observaron grandes diferencias en el rendimiento entre los genotipos de soja analizados (figura 2). Los genotipos DK y PI tuvieron rendimientos bajísimos (sobre todo en los experimentos del grupo 2) debido a la incidencia de enfermedades. Por esta razón no se presentaron los datos del rendimiento del genotipo PI. El genotipo DK tuvo, también, rendimientos muy bajos. En general hay una tendencia a que la radiación UV-B afecte negativamente el rendimiento. Esta tendencia se observó en todos los genotipos menos en el DK.

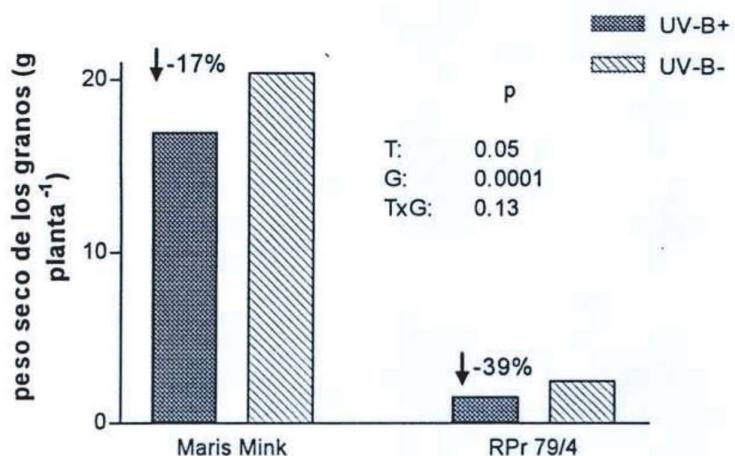


Figura 1 Efecto de la radiación UV-B solar en el rendimiento de cebada. El rendimiento está expresado como el peso seco de los granos. La cosecha fue en diciembre de 1997. Cada barra representa el promedio de tres bloques. Los datos fueron transformados por el logaritmo para que se cumpliera el supuesto de normalidad.

Análisis factorial: T: efecto del UV-B+, G: efecto del genotipo, TxG: efecto de la interacción.

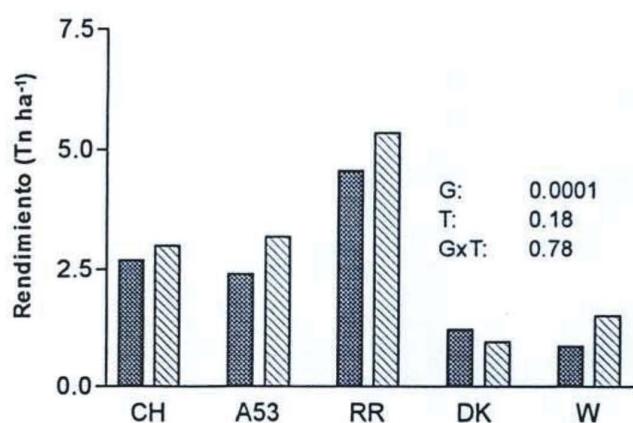


Figura 2 Efecto de la radiación UV-B solar en el rendimiento de los distintos genotipos de soja. Los genotipos están ordenados según el grupo de madurez decreciente. La cosecha fue en mayo de 1998. Cada barra representa el promedio de cuatro bloques del grupo 1 y cuatro bloques del grupo 2. Los datos fueron transformados por el logaritmo para cumplir con el supuesto de normalidad. Análisis factorial ver figura 1.

La radiación UV-B promovió un aumento en las respuestas protectoras y de defensa

El contenido compuestos absorbentes en el UV en la epidermis y los niveles de actividad de enzimas antioxidantes fueron medidos como parámetros de respuestas protectoras y de defensa a la radiación UV-B solar.

La radiación UV-B aumentó el contenido de compuestos absorbentes en el UV en la epidermis, tanto para los cultivos de cebada como para los de soja. En la figura 3 se observan los niveles de estos pigmentos para cebada. Los niveles de estos compuestos fotoprotectores fueron similares en ambos genotipos así como también la magnitud de la respuesta al UV-B.

Se observaron diferencias en el contenido de compuestos fotoprotectores entre los seis genotipos de soja analizados para ambos tratamientos (figura 4). Sin embargo no parece haber diferencias en la respuesta a la radiación UV-B. Se observó que el UV-B promovió un aumento en el contenido de compuestos absorbentes de UV en todos los genotipos analizados.

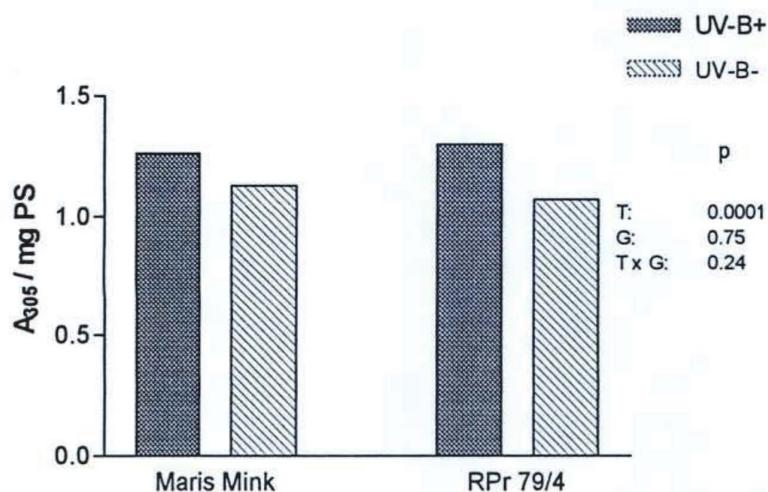


Figura 3 Efecto de la radiación UV-B solar en la acumulación de compuestos absorbentes en el UV en plantas de cebada. Los pigmentos están medidos como la absorbancia a 305 nm (A_{305}). Las muestras fueron recolectadas el 20 de octubre de 1997 al mediodía. Cada barra representa el promedio de los tres bloques. PS, peso seco. Análisis factorial ver figura 1.

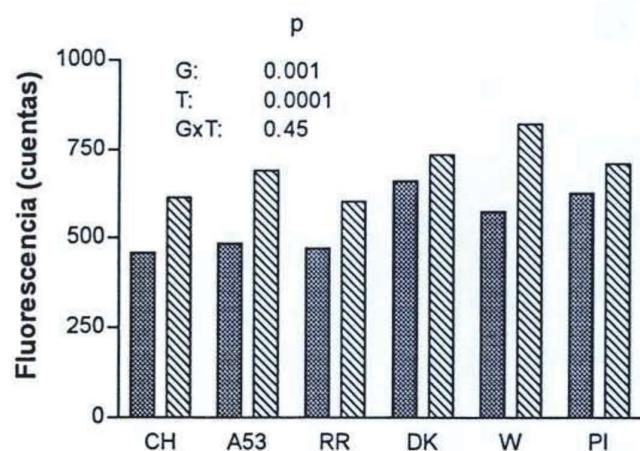


Figura 4 Efecto de la radiación UV-B solar en la acumulación de compuestos absorbentes en el UV en plantas de soja. Se indica la fluorescencia en el rojo de la clorofila al ser excitada con un pulso de UV (RF_{UV} , ver materiales y métodos). A mayor RF_{UV} menor acumulación de compuestos fenólicos. Las muestras fueron analizadas el 12 de enero de 1998 al mediodía. Cada barra representa el promedio de los cuatro bloques.
Análisis factorial ver figura 1.

Uno de los mecanismos de defensa frente a altos flujos de radiación UV-B es el aumento en los niveles de antioxidantes que detoxifican a los radicales libres de oxígeno. Se analizaron los niveles de actividad de dos enzimas antioxidantes, CAT y APx, encargadas de remover el agua oxigenada.

Las figuras 5 y 6 muestran el efecto de la radiación UV-B sobre la actividad antioxidant en los cultivos de cebada y soja, respectivamente. En la figura 5 a se observa el efecto de la radiación UV-B sobre la actividad de CAT en ambos genotipos de cebada. La actividad de esta enzima fue mucho mayor en el genotipo Maris Mink que en el genotipo mutante, como era de esperarse. La figura 5 b muestra el efecto de la radiación solar UV-B en la actividad de APx. Se observó un aumento significativo con la radiación UV-B en el genotipo normal pero no en el mutante. De esta forma el efecto promotor de la radiación UV-B sobre la actividad antioxidant se observó sólo en el genotipo normal. Por otro lado es interesante notar que la actividad de APx fue mucho mayor en el genotipo mutante que en el normal. Estas plantas compensarían el déficit de la actividad de CAT con un aumento en la actividad de APx.

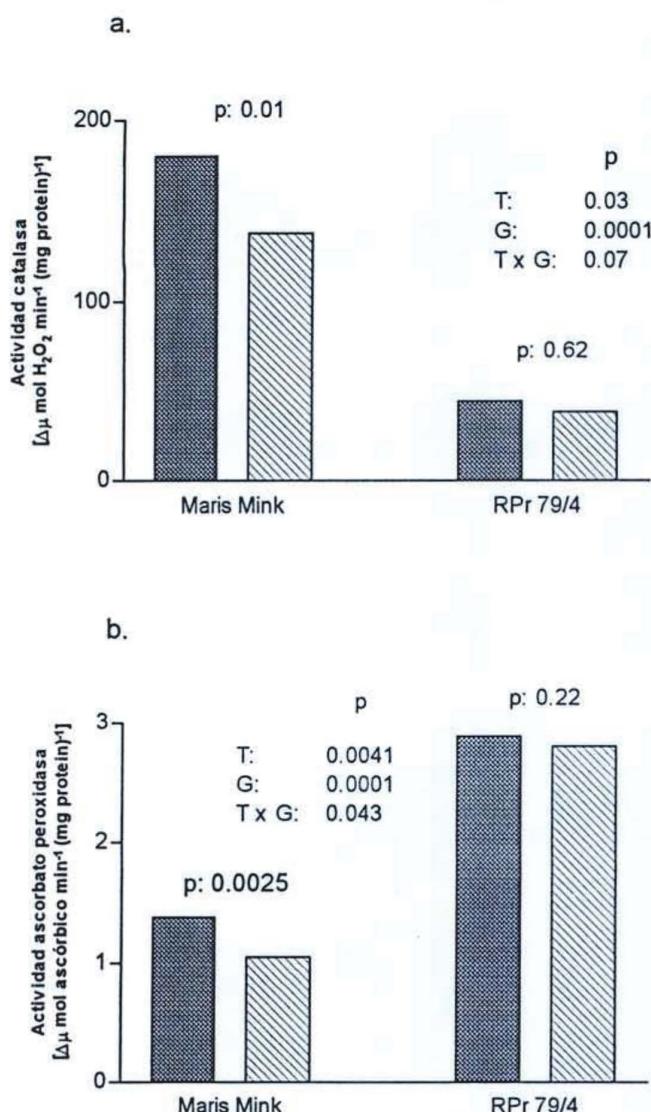


Figura 5 Efectos de la radiación UVB en la actividad de CAT (a) y APx (b) de ambos genotipos de cebada. Las muestras fueron recolectadas el 27 de septiembre al mediodía. El número indicado por arriba de cada barra representa la significancia del efecto del tratamiento para cada genotipo sólo cuando la interacción (TxG) fue significativa. Cada barra representa el promedio de los tres bloques. Análisis factorial ver figura 1.

No se observaron diferencias en la actividad de CAT y APX entre los genotipos de soja analizados (Figura 6 a y b). Tampoco se observó una respuesta significativa inducida por el UV-B. Sin embargo se observó cierta variabilidad en la respuesta entre genotipos. Esta variabilidad en la respuesta correlaciona negativamente con el contenido de compuestos fotoprotectores en la epidermis en el tratamiento con UV-B (figuras 7 y 8). De esta forma las plantas que fueron más transparentes a la radiación UV-B presentaron respuestas antioxidantes mayores que las que acumularon mayor cantidad de compuestos absorbentes de UV. Es posible que la variabilidad en los niveles de pigmentos subyacente a cada genotipo condicione el daño oxidativo y de esta forma la respuesta antioxidant.

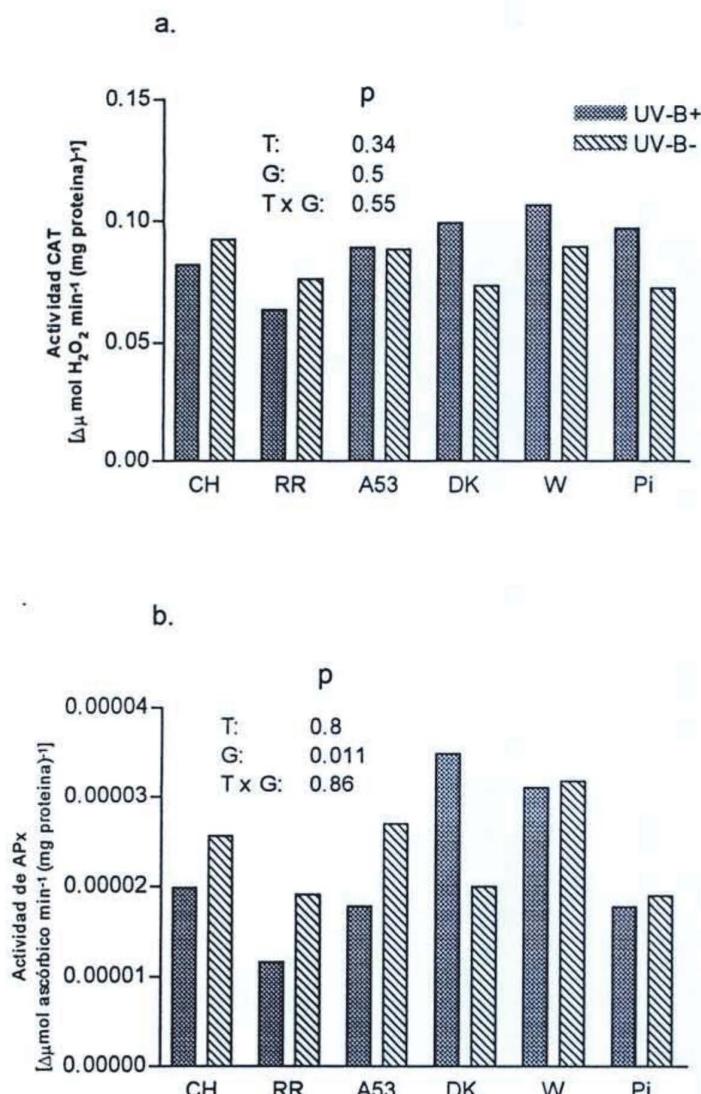


Figura 6 Efectos de la radiación UVB en la actividad de CAT (a) y APx (b) en los seis genotipos de soja. Las muestras fueron recolectadas el 7 y 8 de enero de 1998 al mediodía. La actividad fue corregida por el contenido de proteínas. Cada barra representa el promedio de cuatro bloques y cada repetición consiste en un pool de tres hojas de plantas diferentes. Análisis factorial ver figura 1.

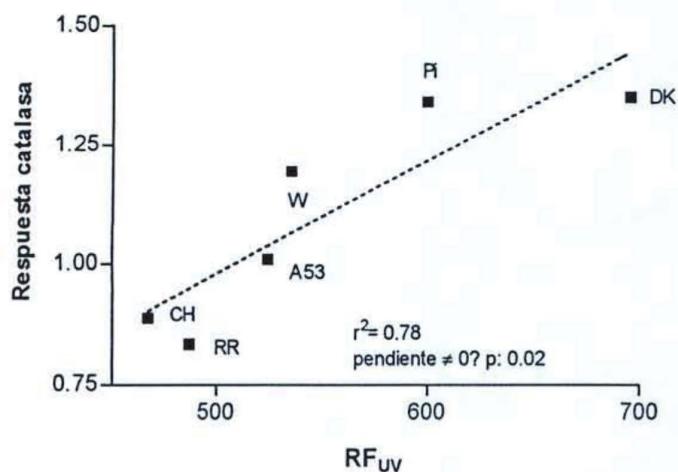


Figura 7 Relación entre la respuesta de la actividad enzimática de CAT inducida por el UV-B y los niveles de pigmentos UV absorbentes en el UV-B+. Se tomaron los datos de las figuras 4 y 6 a. La respuesta está medida como la actividad CAT en el UV-B+ / actividad CAT en el UV-B-. Cada punto representa un promedio de los cuatro bloques. Regresión lineal de los datos.

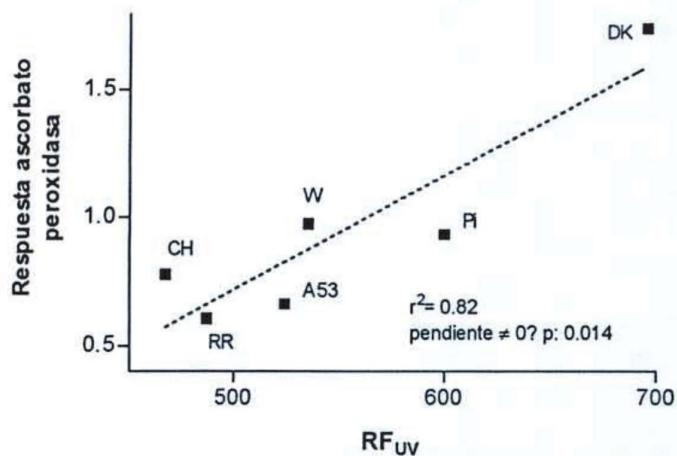


Figura 8 Relación entre la respuesta de la actividad enzimática de APx inducida por el UV-B y los niveles de pigmentos UV absorbentes en el UV-B+. Se tomaron los datos de las figuras 4 y 6 b. La respuesta está medida como la actividad APx en el UV-B+ / actividad APx en el UV-B-. Regresión lineal de los datos.

Se analizó también la relación entre el contenido de compuestos UV absorbentes y el nivel de rendimiento para cada genotipo de soja, a fin de analizar si la respuesta protectora determinó diferencias en la tolerancia al UV-B. La figura 10 muestra esta relación. Se observó una tendencia a que las plantas más transparentes tengan rendimientos menores. Este efecto se observó para ambos tratamientos de forma independiente. De esta forma el contenido de compuestos absorbentes de UV determinó diferencias en el rendimiento pero no susceptibilidades diferentes al UV-B (medidas en función del rendimiento).

De esta forma se puede concluir que tanto para los cultivos de soja como para los de cebada el aumento en los niveles de estos compuestos fotoprotectores inducido por el UV-B no fue suficiente para prevenir una disminución en el rendimiento.

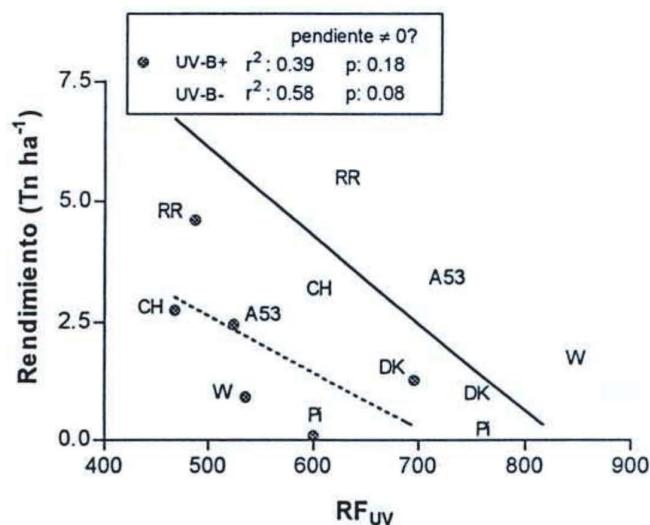


Figura 9 Relación entre el rendimiento y los niveles de pigmentos UV absorbentes para los seis genotipos de soja. Los datos corresponden a aquellos de las figuras 2 y 4. Cada punto representa el promedio de cuatro bloques. Regresión lineal de los datos.

En base a estos resultados este trabajo aborda las siguientes preguntas: Son suficientes estas respuestas de defensa para prevenir el daño oxidativo? Que daños a nivel bioquímico podrían explicar la disminución del rendimiento causada por el UV-B solar?

Efectos del UV-B sobre el daño oxidativo

Como medida de daño oxidativo se midieron los niveles de peroxidación de lípidos en forma de compuestos reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este análisis se hizo solamente en los experimentos realizados con soja. Contrariamente a lo esperado, no se encontró un efecto promotor del UV-B sobre la peroxidación de lípidos. Por el contrario, aquellas plantas cultivadas bajo radiación UV-B tuvieron en promedio niveles de TBARS más bajos que las plantas del mismo genotipo crecidas bajo filtros de exclusión del UV-B. La figura 11 muestra la relación entre los niveles de peroxidación lipídica y el contenido de compuestos absorbentes en el UV en soja para los dos tratamientos utilizados. Se ve una tendencia a que haya una mayor peroxidación lipídica en plantas con mayor transparencia foliar, esta tendencia se observa en ambos tratamientos en forma independiente. La ausencia de niveles mayores de peroxidación en plantas crecidas con UV-B descarta la posibilidad de una disminución del rendimiento debido a un mayor daño oxidativo. Es posible que las plantas sometidas a esta radiación se defiendan efectivamente del daño oxidativo mediante un aumento en la capacidad antioxidante.

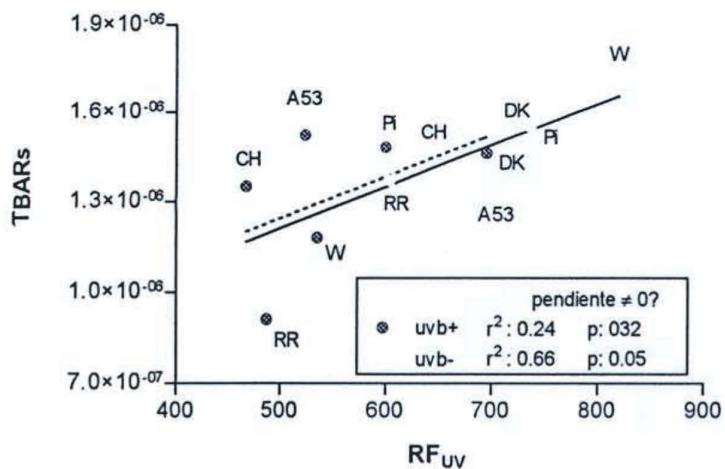


Figura 10 Relación entre la peroxidación lipídica y la acumulación de compuestos fotorreceptores en los seis genotipos de soja. Los niveles de MDA fueron medidos como niveles de TBARS. Se tomaron los datos de la figura 4. Las muestras fueron recolectadas el 7 y 8 de enero de 1998. Cada punto es un promedio de cuatro bloques. Regresión lineal de los datos.

Discusión

Este trabajo permite analizar el efecto de niveles corrientes de radiación UV-B solar sobre dos cultivos de interés agronómico en condiciones naturales. Es importante la realización de experimentos a campo donde las condiciones reflejen las naturales. Además es importante la realización de experimentos a largo plazo que permitan analizar respuestas de adaptación y aclimatación y no sólo efectos directos e inmediatos producidos por una alta dosis de radiación. En experimentos realizados en invernáculos la mayoría de las variables están controladas y por lo tanto la única fuente de estrés es la radiación UV-B. Se sabe que hay una interacción entre los efectos de la radiación UV-B y otros factores de estrés. Estos factores alteran la fisiología de la planta y pueden modular la sensibilidad al UV-B. Muchas situaciones de estrés poseen mecanismos de trasducción de señales comunes de forma tal que un tipo de estrés condiciona la respuesta a otro tipo de estrés. Por otro lado es importante tener en cuenta la alta variabilidad encontrada entre distintas especies y distintos genotipos dentro de una misma especie. Plantas adaptadas a ciertos niveles de radiación serán más tolerantes a estímulos de radiación UV-B que otras adaptadas a niveles menores de radiación.

Los experimentos de exclusión no aportan, sin embargo, información directa sobre los efectos de un posible aumento en la radiación UV-B debido a una disminución del ozono estratosférico. Hay algunos trabajos que analizan los efectos de niveles aumentados de radiación UV-B respecto a las naturales mediante el uso de lámparas. En general se han observado, tanto en experimentos de suplementación como en experimentos con UV-B solar, diminuciones en la acumulación de biomasa y en el crecimiento y alteraciones morfológicas. Sin embargo muchos datos que surgen de estos trabajos han sido contradictorios. Hay trabajos que reportan una disminución en el rendimiento mientras (Teramura & Murali, 1986; Teramura 1990; Correia *et al.*, 1998) que otros no han observado diferencias o inclusive han observado aumentos (Sinclair *et al.*, 1990; Kumar *et al.*, 1988). Otro factor importante que surge de estos experimentos es la alta variabilidad encontrada entre los genotipos estudiados (Caldwell & Flint, 1993; Correia *et al.*, 1998; Teramura & Sullivan, 1994).

En este trabajo se analizó la sensibilidad a la radiación UV-B en términos de rendimiento y daño oxidativo y se midieron algunas respuestas de protección y de defensa. El rendimiento fue expresado como el peso seco de los granos. Este parámetro tiene la ventaja de representar una integración de factores ambientales y genéticos. De esta forma las alteraciones en el rendimiento dependen de la sensibilidad de la especie al UV-B y la combinación de otras respuestas asociadas a otros factores ambientales; microclima, infecciones y competencia. Además el análisis de este parámetro refleja directamente un interés agronómico e implica un seguimiento de la ontogenia de la planta. Por otro lado se ve afectado por otros factores ambientales y por lo tanto cambios en el mismo no necesariamente reflejan consecuencias de niveles aumentados de radiación UV-B. Los genotipos DK y PI de soja analizados en este trabajo tuvieron rendimientos muy bajos debido a la incidencia de enfermedades y por lo tanto su interpretación como parámetro de sensibilidad al UV-B es parcial.

Se observó que la radiación UV-B solar afectó el rendimiento tanto en plantas de soja como de cebada. La disminución en el rendimiento en cebada indica que los niveles de radiación en primavera en Buenos Aires fueron suficientes para provocar una disminución en este parámetro. Esta disminución fue más marcada en el genotipo mutante deficiente en la actividad de la enzima catalasa. A su vez este genotipo tuvo rendimientos menores para ambos tratamientos. De esta forma la actividad de esta enzima tanto constitutiva como la inducida por el UV-B sería un componente importante en la tolerancia a la radiación UV-B. Cuando se analizaron las respuestas de protección en estos cultivos se observó que la radiación UV-B promovió un aumento en el contenido de compuestos fenólicos en ambos genotipos por igual. De esta forma estas plantas responden a niveles aumentados de radiación UV-B con un aumento en el contenido de compuestos que tienden a disminuir la penetrancia de esta radiación. Por otro lado el aumento en el contenido de compuestos fotoprotectores no fue suficiente para prevenir una mayor disminución en el rendimiento en el genotipo mutante, indicando que el daño generado debido a la radiación UV-B es mayor en este genotipo a pesar de poseer niveles de compuestos UV absorbentes parecidos al genotipo normal.

La radiación UV-B también promovió un aumento en los niveles de actividad de dos enzimas antioxidantes, catalasa y ascorbato peroxidasa en el genotipo normal pero no en el mutante. Estas enzimas reducen el H₂O₂ a H₂O con localizaciones subcelulares diferentes. La enzima catalasa se encuentra en general en peroxisomas mientras que la enzima ascorbato peroxidasa se encuentra en citosol y cloroplastos. Se ha observado en varios trabajos que la actividad y la expresión de estas enzimas aumenta como respuesta al UV-B (Willekens *et al.*, 1994, Dai *et al.*, 1997). Experimentos previos, realizados en laboratorios, muestran un aumento en el contenido de ROS (Dai *et al.*, 1997) y en el daño oxidativo (Malanga & Puntarulo, 1995; Mackerness *et al.*, 1998). Dai *et al.* (1997) muestra un aumento en el contenido de ROS en experimentos realizados a campo con radiaciones de UV-B naturales. Plantas mutantes que sobreexpresan la actividad de alguna de estas enzimas antioxidantes han demostrado ser más tolerantes a situaciones de estrés (Foyer *et al.*, 1994b). Por otro lado plantas de *Arabidopsis* deficientes en el contenido de ácido ascórbico son, aparentemente, más sensibles a la radiación UV-B (Conklin *et al.*, 1996). No se midió daño oxidativo en plantas de cebada, pero el aumento en la actividad de CAT y APx en el genotipo normal sugiere un aumento en el contenido de ROS con el UV-B y una subsiguiente respuesta mediada por el sistema antioxidante. Hay varias evidencias que sostienen la idea que las especies activas de oxígeno están involucradas en los sistemas de trasducción de señales que activan algunas vías de respuesta al UV-B; entre ellas la inducción de la transcripción de mensajeros de algunas enzimas antioxidantes (Khan & Wilson, 1995). Gupta *et al.* muestra en sus experimentos niveles aumentados de actividad de APx en plantas que sobreexpresan Cu-Zn SOD. Se cree que niveles aumentados de H₂O₂ estimulan la expresión de las enzimas encargadas de removerlo. Los resultados en este trabajo de seminario son consistentes con esta hipótesis ya que el genotipo deficiente en la actividad de CAT tuvo niveles de actividad de APx aumentados respecto al genotipo normal. Este aumento en la actividad de APx, sin embargo, no fue suficiente para suplir la baja actividad de CAT ya que las plantas mutantes presentaron grandes zonas dañadas y bajos rendimientos. La falta de respuesta antioxidante al UV-B en este genotipo (tanto para la actividad de CAT como para la actividad de APx) es posible que haya condicionado la susceptibilidad al UV-B provocando una disminución en el rendimiento mayor.

Los genotipos de soja presentaron grandes diferencias en el nivel de rendimiento. Los genotipos DK, W y Pi tuvieron rendimientos mucho más bajos que los otros genotipos. No se observaron grandes diferencias en el grado de disminución del rendimiento para cada genotipo. Hay algunos trabajos, por otro lado, que muestran grandes diferencias en la susceptibilidad al UV-B entre distintos genotipos de una misma especie (Caldwell & Flint, 1993; Correia *et al.*, 1999). Por otro lado la radiación UV-B promovió un aumento en el contenido de compuestos absorbentes de UV. Esta disminución en la transparencia foliar no fue suficiente para prevenir el daño causado por el UV-B ya que la mayoría de los genotipos presentaron rendimientos menores. Si bien estos resultados sugieren que la acumulación de compuestos fotoprotectores no jugó un rol importante en modular la sensibilidad al UV-B la importancia de estos compuestos ha sido demostrada en trabajos con plantas mutantes deficientes en el contenido de flavonoides (Li *et al.*, 1993). Existen evidencias que el aumento en los niveles de compuestos fenólicos forma parte de los mecanismos de aclimatación y adaptación a la radiación UV-B aumentando la tolerancia a la misma (Wilson *et al.*, 1995). Se han observado diferencias en el contenido de compuestos absorbentes en el UV entre plantas adaptadas a distintas latitudes (Teramura & Sullivan, 1994); en general se ha observado una gran variabilidad entre distintas especies. La figura 9 de este trabajo muestra una correlación negativa entre la transparencia foliar y el rendimiento para ambos tratamientos. Las plantas que fueron más transparentes tuvieron en general rendimientos menores en una forma independiente del tratamiento. De esta forma el contenido de compuestos absorbentes en el UV característico de cada genotipo podría explicar las diferencias constitutivas en el rendimiento.

El efecto de la radiación UV-B sobre la actividad de las enzimas antioxidantes analizadas (CAT y APx) fue también dependiente del genotipo. No se observaron grandes diferencias en los niveles basales de actividad y tampoco se observó un efecto significativo en la respuesta al UV-B. Sin embargo se observó cierta variabilidad en esta respuesta entre los genotipos. Estas diferencias en las respuestas pueden ser explicadas si se tiene en cuenta el nivel de transparencia foliar de cada genotipo. Se observa una alta correlación positiva entre la transparencia foliar en el tratamiento con UV-B y la respuesta antioxidante (figuras 7 y 8). De esta forma el UV-B promovió un aumento en la actividad específica de las enzimas antioxidantes en aquellos genotipos que fueron más transparentes al UV-B. Esto es independiente de la magnitud del

aumento en el contenido de compuestos fotoprotectores por el UV-B, sólo depende del contenido de los mismos en el tratamiento con UV-B. El contenido de estos compuestos fotoprotectores modularía la respuesta antioxidante al UV-B. Este efecto podría ser no sólo debido a la disminución en la penetrancia de esta radiación sino también a una disminución en el contenido de ROS. Se sabe que algunos de estos compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes no enzimáticos reduciendo el contenido de estas especies activas.

Para ver si efectivamente el aumento en el contenido de los compuestos fotorreceptores y la respuesta antioxidante al UV-B fueron suficientes para prevenir el daño oxidativo se midieron los niveles de peroxidación lipídica. Contrariamente a lo esperado no se encontró un aumento de la peroxidación lipídica en plantas tratadas con UV-B. Por el contrario las plantas sometidas a este tratamiento presentaron niveles menores de daño a las membranas. Esto indicaría que las respuestas protectoras y de defensa fueron suficientes para prevenir este tipo de daño. Existe una correlación positiva entre la transparencia foliar y nivel de peroxidación lipídica. De esta forma las plantas crecidas bajo radiación UV-B tuvieron niveles de compuestos fotoprotectores mayores y niveles de peroxidación lipídica menores. Por lo tanto, las disminuciones en el rendimiento causadas por el UV-B en este experimento no parecerían estar mediadas por este tipo de daño.

La utilización de varios genotipos de soja permitió hacer comparaciones en la sensibilidad al UV-B y además permitió analizar posibles parámetros que modulen esta sensibilidad. La actividad antioxidante tanto constitutiva como la inducida por el UV-B parece ser importante en la modulación de la tolerancia al UV-B ya que plantas deficientes en la actividad de CAT parecen ser más sensibles al UV-B. Por otro lado el contenido de compuestos fenólicos podrían actuar modulando la respuesta antioxidante, no sólo reduciendo la penetrancia foliar del UV-B, sino actuando como antioxidantes no enzimáticos, disminuyendo el daño oxidativo y de esta forma condicionando la respuesta antioxidante. Por otro lado estos mecanismos de defensa no serían suficientes para prevenir completamente el daño causado por la radiación UV-B y por lo tanto una disminución en el rendimiento.

Conclusión

Estos resultados muestran que la radiación UV-B afecta el rendimiento a pesar de aumentos en el contenido de compuestos fotoprotectores que tienden a disminuir la penetrancia de esta radiación. El aumento de estos compuestos como respuesta adaptativa parece modular el daño oxidativo y la respuesta antioxidante. Por otro lado la actividad de estas enzimas antioxidantes tanto constitutivas como las inducidas por el UV-B sería un componente importante en la tolerancia a esta radiación.

Bibliografía

- Aebi H (1984) Catalase in vitro, *Methods in Enzymology*. 105:121-126
- Allen RD (1995) Dissection of Oxidative Stress Tolerance Using Transgenic Plants, *Plant Physiology*. 107:1049-1054
- Ambasht Kumar Navin & Madhoolika Agrawal (1998) Physiological and biochemical response of *sorghum vulgare* plants to supplemental ultraviolet-B radiation, *Canadian Journal of Botany*, 76:1290-1294
- Ballaré CL, Barnes PW & Flint SD (1995) Inhibition of hypocotyl elongation by ultraviolet-B radiation de-etiolating tomatoes seedlings. I. The photoreceptor, *Physiologia Plantarum*. 93:584-592
- Ballaré CL, Scopel AL, Stapleton AE & Yanovsky MJ (1996) Solar Ultraviolet-B Radiation Affects Seedling Emergence, DNA integrity, Plant Morphology, Growth Rate, and Attractiveness to Herbivore Insects in *Datura ferox*, *Plant Physiology*. 112:1-10
- Barnes PW, Ballaré CL & Caldwell MM (1996) Photomorphogenic Effects of UV-B Radiation on Plants: Consequences for light Competition, *Journal of Plant Physiology*. 148:15-20
- Bartoli CG, Simontacchi M, Guiamet JJ, Montaldi E & Puntarulo S (1995) Antioxidant enzymes and lipid peroxidation during aging of *Chrysanthemum morifolium* RAM petals, *Plant Science*. 104:161-168
- Beggs CJ, Stolzer-Jehie A & Wellmann E (1985) Isoflavonoid formation as an indicator of UV stress in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves, *Plant Physiology*. 79:630-634

Beggs CJ, Schneider-ziebert U & Wellman E (1986) UV-B radiation and adaptive mechanisms in plants. In Stratospheric Ozone Reduction, Solar Ultraviolet Radiation and Plant Life, G8. Worrest RC & Caldwell MM (eds.), pp. 235-250, Springer-Verlag, NY

Bornman JF & Teramura AH (1993) Effects of Ultraviolet-B Radiation on Terrestrial Plants. In: Environmental UV Photobiology. Youn AR, Bjorn LO & Moan J (eds.), cap.14, pp. 427-471. Plenum Press, NY

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*. 72:248-254

Britt AB (1995) Repair of DNA Damage Induced by Ultraviolet Radiation, *Plant Physiology*. 108:891-896

Caldwell MM (1981) Plant Responses to Solar Ultraviolet Radiation, *Encyclopedia of Plant Physiology*, pp. 170-197

Caldwell MM, Teramura AH & Tevini M (1989) The changing Solar Ultraviolet Climate and the Ecological Consequences for Higher Plants, *TREE*. 4:363-366

Caldwell MM & Flint SD (1993) Implications of increased solar UV-B for terrestrial vegetation. In: The role of the Stratosphere in Global Change. Chanin ML (ed.), vol. 18, pp. 495-516. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

Cen Y & Bornman JF (1993) The effect of exposure to enhanced UV-B radiation on the penetration of monochromatic and polychromatic UV-B radiation in leaves of *Brassica napus*, *Physiologia Plantarum*. 87:249-255

Chen G & Asada K (1989) Ascorbate Peroxidase in Tea Leaves: Occurrence of Two Isozymes and the Differences in Their Enzymatic and Molecular Properties, *Plant, Cell Physiology*. 30:987-998

Christie PJ et al. (1994) Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings, *Planta*. 194:541-549

Christie JM & Jenkins GI (1996) Distinct UV-B and UV-A/Blue Light Signal Transduction Pathways Induce Chalcone Synthase Gene Expression in *Arabidopsis* cells, *The Plant Cell*. 8:1555-1567

Conklin PL, Williams EH & Last RL (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93:9970-9974

Correia CM, Areal EL, Torres-Pereira MS & Torres-Pereira JMG (1998) Intraspecific variation in sensitivity to ultraviolet-B radiation in maize grown under field conditions. I. Growth and morphological aspects, *Field Crops Research*. 51:81-89

Correia CM, Areal EL, Torres-Pereira MS & Torres-Pereira JMG (1999) Intraspecific variation in sensitivity to ultraviolet-B radiation in maize grown under field conditions. II. Physiological and biochemical aspects, *Field Crops Research*. 62:97-105

Dai Q, Yan B, Huang S, Liu X, Peng S, Miranda LL, Chavez AQ, Vergara BS & Olszyk DM (1997) Response of oxidative stress defense systems in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplemental UV-B radiation, *Physiologia Plantarum*. 101:301-308

Day TA, Vogelman TC & DeLucia EH (1992) Are some plants life forms more effective than others in screening out ultraviolet-B radiation? *Oecologia*. 92:513-519

Deckmyn G & Impens I (1995) UV-B increases the harvest index of beans, *Phaseolus vulgaris L. Plant, Cell and Environment*. 18:1426-1433

Ensminger PA (1993) Control of development in plants and fungi by far-UV radiation, *Physiologia Plantarum*. 88:501-508

Esterbauer H & Cheeseman KH (1990) Determination of Aldehydic Lipid Peroxidation Products: Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal, *Methods in Enzymology*. 186:407-431

Fiscus EL & Booker FL (1995) Is increased UV-B a threat to crop photosynthesis and productivity?, *Photosynthesis Research*. 43: 81-92

Flint SD & Caldwell MM (1984) Partial inhibition of in vitro pollen germination by stimulated ultraviolet-B radiation, *Ecology*. 65:792-795

Foyer CH, Lelandais M & Kunert K (1994a) Photooxidative stress in plants, *Physiologia Plantarum*. 92:696-717

Foyer CH, Descourvières P & Kunert KJ (1994b) Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants, *Plant, Cell & Environment*. 17:507-523

Frederick JE, Soulen PF, Diaz SB, Smolskiaia I, Booth CR, Lucas T & Neuschuler D (1993) Solar Ultraviolet Irradiance Observed From Southern Argentina: September 1990 to March 1991, *Journal of Geographical Research*. 98:8891-8897

Frederick JE, Diaz SB, Smolskiaia I, Esposito W, Lucas T & Booth CR (1994) Ultraviolet Solar Radiation in the high latitudes of South America, *Photochemistry and Photobiology*. 60: 356-362

Grace SC & Logan BA (1996) Acclimation of Foliar Antioxidant Systems to Growth Irradiances in Three Broad-Leaved Evergreen Species, *Plant Physiology*. 112:1631-1640

Green G & Fluhr R (1995) UV-B-Induced PR-1 Accumulation Is Mediated by Active Oxygen Species, *The Plant Cell*. 7:203-212

Hahlbrock K & Grisebach H (1979) Enzymic control in the biosynthesis of lignin and flavonoids, *Annual Review of Plant Physiology*. 30:105-130

Hahlbrock K & Scheel D (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism, *Annual Review of Plant Physiology*. 40:347-369

Inskeep WP & Bloom PR (1985) Extinction coefficient of chlorophyll a and b in N,N-dimethylformamide and 80 % acetone, *Plant Physiology*. 77:483-485

Jordan BR, Chow WS, Strid A & Anthony RG (1991) Reduction in Cab and psb A RNA transcripts in response to supplementary ultraviolet-B radiation, *FEBS Letters*. 284:1015-1023

Jordan BR, He J, Chow WS & Anderson JM (1992) Changes in mRNA levels and polypeptide subunits of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase in response to supplementary ultraviolet-B radiation, *Plant Cell and Environment*. 15:91-98

Kendall AC, Keys AJ, Turner JC, Lea PJ & Miflin BJ (1983) The isolation and characterization of a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.), *Planta*. 159:501-511

Khan AU & Wilson T (1995) Reactive oxygen species as cellular messengers, *Chemistry and Biology*. 2:437-445

Kim HY, Kobayashi K, Nouchi I & Yoneyama T (1996) Changes in Antioxidants Levels and Activities of Related Enzymes in Rice (*Oryza sativa* L.) Leaves Irradiated with Enhanced UV-B Radiation under Field Conditions, *Environmental Sciences*. 9:73-78

Kramer GF, Norman HA, Krizek DT & Mireki RM (1991) Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membranes lipids in cucumber, *Phytochemistry*. 30:2101-2108

Kumar R, Sharma MM, Jain VK & Goyal AK (1988) Growth responses of lentil crop to UV-B irradiation under field conditions, *Indian Journal of Plant Physiology*. 3:297-300

Jiayang Li, Tsai-Mei Ou-Lee, Raba R, Amundson RG & Last RL (1993) Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation, *The Plant Cell*. 5:171-179

Madronich S (1993) UV Radiation in the Natural and Perturbed Atmosphere, UV-B Radiation and Ozone Depletion. In: UV-B Radiation and Ozone Depletion, Effects on humans, Animals, Plants, Microorganisms, and Materials. Tevini M (ed.), cap. 2, pp.17-69, Lewis Publishers

Madronich S **McKenzie RL**, **Bjorn LO** & **Caldwell MM** (1998) Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface. In: Environmental effects of Ozone Depletion: 1998 Assessment, cap. 1 pp.4-28, United Nations Environmental Programs (UNEP), Draft Report

Mackerness S A-H, **Surplus SL**, **Jordan BR** & **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

Malanaga G & **Puntarulo S** (1995) Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation, *Physiologia Plantarum*. 94:672-679

Mazza CA, **Zavala J**, **Scopel AL** & **Ballaré CL** (1999) Perception of solar UVB radiation by phytophagous insects: Behavioral responses and ecosystem implications, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96:980-985

Mazza CA, **Boccalandro H**, **Giordano CV**, **Battista D**, **Scopel AL** & **Ballaré CL** (2000) Functional significance and induction by solar radiation of UV-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiology*, en prensa.

Moorhead DI & **Callaghan T** (1994) Effects of increasing ultraviolet-B radiation on decomposition and soil organic matter dynamics: a synthesis and modeling study, *Biology Fertile Soils*. 18: 19-26

Murali NS, Teramura AH & Randall SK (1988) Response differences between two soybean cultivars with contrasting UV-B sensitivities, *Photochemistry and Photobiology*. 48:653-657

Murphy TM & Chung-Kyoong Auh (1996) The superoxide Synthases of Plasma Membrane Preparations from Cultured Rose Cells, *Plant Physiology*. 110:621-629

Murphy TM & Huerta AJ (1990) Hydrogen peroxide formation in cultured rose cells in response to UV-C radiation, *Physiologia Plantarum*. 78:247-253

Nakano Y & Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiology*. 22:539-549

Paul ND, Rasanayagam S, Moody SA, Hatcher PE & Ayres PG (1997) The role of interactions between trophic levels in determining the effects of UV-B on terrestrial ecosystems, *Plant Ecology*. 128:296-308

Pelle Emaes D, Padulo GA, Kim EK, Smith WP (1990) An *in Vitro* Model to Test Relative Antioxidant Potential: Ultraviolet-Induced Lipid Peroxidation in Liposomes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 283: 234-240

Rao MV, Paliyath G & Ormond DP (1996) Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiology*. 110:125-136

Ros J & Tevini M (1995) Interaction of UV-Radiation and IAA During Growth of Seedlings and Hypocotyl Segments of Sunflower, *Journal of Plant Physiology*. 146:295-302

Salin ML (1987) Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast, *Physiologia Plantarum*. 72:681-689

Sinclair TR, N'Diaye O & Biggs RH (1990) Growth and yield of field-grown soybean in response to enhanced exposure ultraviolet-B radiation, *Journal of Environmental Quality*. 19:478-481

Solomon S (1990) Progress towards a quantitative understanding of Antarctic ozone depletion, *Nature*. 347:347-354

Stapleton AE (1992) Ultraviolet Radiation and Plants: Burning Questions, *The Plant Cell*. 4:1353-1358

Stapleton AE, Thornber CS & Walbot V (1997) UV-B component of sunlight causes measurable damage in field-grown maize (*Zea mays L.*): developmental and cellular heterogeneity of damage and repair, *Plant, Cell and Environment*. 29:279-290

Surplus SL, Jordan BR, Murphy AM, Carr JP, Thomas B & Meckerness S A-H (1998) Ultraviolet-B-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic pathogenesis-related proteins, *Plant, Cell & Environment*. 21:685-694

Takeuchi Y, Fukumoto R, Kasahara H, Sakaki T & Kitao M (1995) Peroxidation of lipids and growth inhibition by UV-B irradiation, *Plant Cell Reports*. 14:566-570

Teramura AH (1990) Implications of Stratospheric Ozone Depletion upon Plant Production, *Horticulture Science*. 25:1557-1560

Teramura AH & Sullivan JH (1994) Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants, *Photosynthesis Research*. 39:463-473

Tevini M, Iwanzik W & Thoma U (1981) Some effects of enhanced UV-B irradiation on the growth and composition of plants, *Planta*. 153:388-394

Tevini M & Teramura AH (1989) UV-B effects on terrestrial plants, *Photochemistry and Photobiology*. 50:479-487



Tevini M, Braun J & Gieser G (1991^a) The protective function of the epidermal layer of rye seedlings against ultraviolet-B radiation, *Photochemistry and Photobiology*. 53:329-333

van der Leun JC, Tang X & Tevini M (1995) Environmental effects of ozone depletion: 1994 assessment, *Ambio*. 24:138-142

Vu CV, Allen LH & Garrard LA (1984) Effects of UV-B radiation (280-320 nm) on ribulose-1,5-biphosphate carboxylase in pea and soybean, *Environmental & Experimental Botany*. 24:107-112 (131-143)

Willekens H, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D, Langebartels C & Sandermann H Jr. (1994) Ozone, sulfur dioxide and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana pulmbaginifolia* L., *Plant Physiology*. 106:1007-1014

Wilson MI & Greenberg BM (1993) Protection of the D1 photosystem II reaction center protein from degradation in ultraviolet radiation following adaptation of *Brassica napus* L. to growth in ultraviolet-B, *Photochemistry and Photobiology*. 57:556-563

Wilson MI, Gosh S, Gerhardt, Holland N, Babu S, Edelman M, Dumbroff EB & Greenberg BM (1995) In Vivo Photomodification of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Holoenzyme by Ultraviolet-B Radiation, *Plant Physiology*. 109:221-229

Yalpani N, Enyedi AJ, León J & Raskin I (1994) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco, *Planta*. 193:372-376

Yuan Li, Yue Ming & Wang Xuling (1998) Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on crop structure, growth and yield components of spring wheat under field conditions, *Field Crop Research*. 57:253-263